UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Dipartimento di Medicina Chirurgia e Odontoiatria

"Scuola Medica Salernitana"

XXXVIII ciclo di dottorato di ricerca in

Medicina Traslazionale, dello sviluppo e dell'invecchiamento attivo

PROFILAZIONE METABOLOMICA SALIVARE E URINARIA ASSOCIATA ALLA VALUTAZIONE ECOGRAFICA DELLA STEATOSI EPATICA IN BAMBINI E ADOLESCENTI: VERSO UNO SCREENING NON INVASIVO DELLA MASLD PEDIATRICA

Relatore:	Coordinatore	Candidato:
Chiar.ma Prof.ssa	**Chiar.mo Prof.**	**Angelo Colucci**
Claudia Mandato	**Palmiero Monteleone**	Matr. 8861700014

Anno Accademico 2024/2025

Sommario

Abstract: 5
Abstract (English) 7
Capitolo 1. MASLD in età pediatrica: inquadramento fisiopatologico e clinico 9

1.1 Evoluzione della nomenclatura: da NAFLD a MASLD/MASH 9
1.2 Definizione attuale di MASLD pediatrica 11
1.3 Epidemiologia della MASLD pediatrica 17
1.4 Obesità pediatrica e disfunzione metabolica 20
1.5 Spettro clinico e istologico della MASLD pediatrica 28
1.6 Fattori di rischio e fenotipi clinici della MASLD pediatrica 30
1.7 Fisiopatologia: dal sovraccarico lipidico alla fibrosi 33
1.8 Storia naturale della MASLD pediatrica 37
1.9 Diagnostica: dalla clinica all'imaging avanzato 42
1.10 Biomarcatori non invasivi e approcci "-omici" 48
1.11 Limiti delle strategie attuali nella diagnosi di MASLD pediatrica 53
Capitolo 2. Metodi 56

2.1 Disegno dello studio 56
2.2 Popolazione in studio 56
2.3 Classificazione ponderale e valutazione della pressione arteriosa 57
2.4 Valutazione della steatosi epatica 60
2.5 Raccolta e preparazione dei campioni biologici 61
2.6 Analisi metabolomica 62
2.7 Analisi dei dati metabolomici 65
2.8 Analisi statistica 75
2.9 Considerazioni etiche 77
Capitolo 3. Risultati 78

3.1 Statistica descrittiva 78
3.2 Statistica inferenziale 83
3.3 Analisi metabolomica salivare 91
3.4 Analisi metabolomica urinaria 98
3.5 Ensemble DW-EML e interpretabilità dei modelli (SHAP) 105
Capitolo 4. Discussione 113

4.1 Sintesi dei risultati principali 113
4.2 Confronto con la letteratura clinica su MASLD pediatrica 115
4.3 Interpretazione biologica dei profili metabolomici (saliva) 118

4.4 Interpretazione biologica dei profili urinari e confronto con la saliva 121
4.5 Valore aggiunto del DW-EML e dei metodi di spiegabilità 124
4.6 Limiti dello studio 126
4.7 Implicazioni cliniche e prospettive future 129
Capitolo 5 – Conclusioni 133

5.1 Sintesi dei risultati principali 133
5.2 Implicazioni biologiche, cliniche e di salute pubblica 134
5.3 Limiti e prospettive future 135
5.4 Conclusione generale 136
Capitolo 6. Bibliografia 138

Abstract:

La metabolic dysfunction–associated steatotic liver disease (MASLD) è una delle principali complicanze dell'obesità infantile e un marker precoce di rischio cardiometabolico. In età pediatrica la diagnosi è complessa, basata su una combinazione eterogenea di dati clinici, antropometrici, laboratoristici e strumentali, e mancano strumenti di screening non invasivi, sensibili e facilmente implementabili su larga scala.

Obiettivo di questo studio è stato: (i) descrivere la frequenza della steatosi epatica ecografica in una coorte pediatrica reclutata sul territorio; (ii) valutarne le associazioni con parametri antropometrici e profili pressori; (iii) caratterizzare le firme metabolomiche salivari e urinarie associate alla MASLD; (iv) sviluppare e testare un modello di machine learning spiegabile per la classificazione dei soggetti in base alla presenza di steatosi.

È stato condotto uno studio osservazionale, monocentrico e trasversale su 163 bambini e adolescenti (circa 5–14 anni), normopeso, sovrappeso o obesi, reclutati tramite campagne di prevenzione e screening sul territorio. Per ciascun soggetto sono stati raccolti dati clinici, antropometrici (BMI z-score, circonferenza vita z-score) e pressori (z-score di pressione arteriosa). La steatosi epatica è stata valutata tramite ecografia qualitativa, eseguita da radiologo esperto e classificata in modo dicotomico (presente/assente). Su campioni di saliva e urina sono state effettuate analisi metabolomiche untargeted, elaborate mediante approcci multivariati, analisi di arricchimento dei pathway e un modello di Double-Weighted Ensemble Machine Learning (DW-EML) integrato con metodi di spiegabilità (SHAP). La steatosi ecografica è risultata presente in circa un terzo della coorte, con un chiaro gradiente per classe ponderale e una prevalenza >60% nei soggetti obesi. L'adiposità globale e centrale sono risultate fortemente associate alla steatosi: per ogni incremento di 1 DS di BMI o di circonferenza vita le odds di steatosi aumentavano di circa 2–2,5 volte. Nei bambini con steatosi sono stati osservati z-score pressori più elevati, a conferma dell'intreccio tra rischio epatico e cardiovascolare già in età pediatrica. L'analisi metabolomica ha evidenziato profili distinti nei soggetti con steatosi rispetto ai controlli: nella saliva sono emerse alterazioni dei pathway degli aminoacidi ramificati, del ciclo dell'urea, della β-ossidazione degli acidi grassi e del metabolismo del glutatione e della colina, compatibili con disfunzione mitocondriale precoce e stress ossidativo; nelle urine sono risultati coinvolti il ciclo dell'acido citrico, la

β-ossidazione, il metabolismo della carnitina e del triptofano, suggerendo un ruolo dell'asse intestino–fegato e del microbiota.

Il modello DW-EML ha mostrato, in particolare per la matrice salivare, un'elevata capacità discriminante nel distinguere i bambini con steatosi da quelli senza, con sensibilità ~96%, specificità prossima al 100% e AUC prossima all'unità. L'impiego di SHAP ha permesso di identificare un nucleo ristretto di metaboliti (acilcarnitine, derivati del triptofano, intermedi del TCA), insieme ai parametri antropometrici, come principali determinanti del rischio di steatosi, conferendo al modello un'elevata interpretabilità biologica.

In conclusione, questo studio conferma che la MASLD pediatrica si colloca nel continuum delle complicanze metaboliche dell'obesità infantile e mostra che saliva e urina contengono firme metaboliche coerenti con disfunzione mitocondriale, stress ossidativo sistemico e alterata omeostasi energetica. Questi risultati supportano il potenziale impiego di profili metabolomici salivari e urinari, integrati con parametri clinici, come strumento di screening non invasivo per la MASLD pediatrica.

Abstract (English)

Metabolic dysfunction–associated steatotic liver disease (MASLD) is one of the main complications of childhood obesity and an early marker of cardiometabolic risk. In pediatrics, diagnosis is complex, based on a heterogeneous combination of clinical, anthropometric, laboratory and instrumental data, and non-invasive, sensitive screening tools that can be easily implemented on a large scale are still lacking. The aims of this study were: (i) to describe the frequency of ultrasound-detected hepatic steatosis in a pediatric cohort recruited in the community; (ii) to assess its associations with anthropometric parameters and blood pressure profiles; (iii) to characterize salivary and urinary metabolomic signatures associated with MASLD; and (iv) to develop and test an explainable machine learning model for classifying subjects according to the presence of steatosis.

We conducted a monocentric, cross-sectional, observational study on 163 children and adolescents (approximately 5–14 years), with normal weight, overweight or obesity, recruited through prevention and screening campaigns in the community. For each subject, we collected clinical data, anthropometric measures (BMI z-score, waist circumference z-score) and blood pressure profiles (systolic and diastolic blood pressure z-scores). Hepatic steatosis was assessed by qualitative abdominal ultrasound performed by an experienced radiologist and classified dichotomously (present/absent). Untargeted metabolomic analyses were performed on saliva and urine samples and processed using multivariate approaches, pathway enrichment analysis and a Double-Weighted Ensemble Machine Learning (DW-EML) model integrated with explainability methods (SHAP).

Ultrasound-detected steatosis was present in about one third of the cohort, with a clear gradient across weight categories and a prevalence >60% among children with obesity. Both overall and central adiposity were strongly associated with steatosis: for each 1 SD increase in BMI or waist circumference, the odds of steatosis increased by about 2–2.5 times. Children with steatosis showed higher blood pressure z-scores, supporting the close interplay between hepatic and cardiovascular risk already in pediatric age. Metabolomic analysis revealed distinct profiles in subjects with steatosis compared with controls. In saliva, we observed alterations in pathways related to branched-chain amino acids, the urea cycle, fatty acid β-oxidation, and glutathione and choline metabolism, consistent with early mitochondrial dysfunction and oxidative stress; in urine, involvement of the tricarboxylic acid (TCA) cycle, β-oxidation,

and carnitine and tryptophan metabolism suggested a role of the gut–liver axis and microbiota in shaping the hepatic metabolic phenotype.

The DW-EML model showed, especially for the salivary matrix, a high discriminative ability in distinguishing children with steatosis from those without, with sensitivity around 96%, specificity close to 100% and an AUC approaching 1. The use of SHAP allowed us to identify a restricted core of metabolites (acylcarnitines, tryptophan derivatives, TCA intermediates), together with anthropometric parameters, as the main determinants of steatosis risk, providing the model with high biological interpretability.

In conclusion, this study confirms that pediatric MASLD lies within the continuum of metabolic complications of childhood obesity and shows that saliva and urine contain metabolic signatures consistent with mitochondrial dysfunction, systemic oxidative stress and altered energy homeostasis. These findings support the potential use of salivary and urinary metabolomic profiles, integrated with clinical parameters, as a non-invasive screening tool for pediatric MASLD.

Capitolo 1. MASLD in età pediatrica: inquadramento fisiopatologico e clinico

1.1 Evoluzione della nomenclatura: da NAFLD a MASLD/MASH

Il concetto di steatosi epatica non alcolica (NAFLD) è stato introdotto negli scorsi decenni per descrivere l'accumulo di grasso nel fegato in assenza di un consumo significativo di alcol, in presenza di caratteristiche istologiche sovrapponibili a quelle osservate nell'epatopatia alcolica ma in assenza delle stesse cause eziologiche (Vos et al., 2017). Fin dall'inizio, dunque, la definizione di NAFLD è stata costruita in modo "negativo", come categoria residua che raccoglieva tutte le forme di steatosi epatica non spiegate da alcol o da altre epatopatie note.

Con il progressivo accumularsi delle evidenze, è emerso che tale definizione non coglie adeguatamente il ruolo centrale della disfunzione metabolica – in particolare obesità, insulino-resistenza e alterazioni del metabolismo glucidico e lipidico – nella patogenesi e nella progressione della malattia (Rinella et al., 2023). Per superare questi limiti concettuali, nel 2020 è stata proposta la nuova denominazione MAFLD (Metabolic dysfunction–Associated Fatty Liver Disease), fondata su criteri diagnostici "positivi" basati sulla presenza di disfunzioni metaboliche ben definite, quali obesità, insulino-resistenza e dislipidemia, anziché sulla mera esclusione di altre cause (Eslam et al., 2020).

Questa proposta ha avuto il merito di riportare al centro dell'attenzione la dimensione sistemica e metabolica della malattia epatica steatosica, stimolando un ampio dibattito internazionale che ha coinvolto società scientifiche, clinici e ricercatori. Tale dibattito è confluito nel consenso multisocietario del 2023, coordinato da EASL, AASLD, ALEH e APASL, che ha definito in modo più organico la nuova terminologia MASLD (Metabolic dysfunction–Associated Steatotic Liver Disease) e MASH (Metabolic dysfunction–Associated Steatohepatitis) (Rinella et al., 2023; Stefan et al., 2025). Il passaggio da "fatty" a "steatotic" e l'introduzione del termine MASH rappresentano non solo un'evoluzione lessicale, ma anche concettuale, poiché mirano a

descrivere in maniera più precisa lo spettro delle lesioni epatiche associate alla disfunzione metabolica, distinguendo la semplice steatosi dalla forma infiammatoria a maggiore rischio evolutivo.

Il cambio di nomenclatura risponde a tre esigenze principali. La prima è sottolineare in modo esplicito il ruolo eziopatogenetico della disfunzione metabolica come denominatore comune delle diverse forme di steatosi epatica, favorendo una visione unitaria della malattia che integri funzione epatica e assetto cardiometabolico (Faienza et al., 2024). La seconda è superare una definizione "per esclusione" come NAFLD, ambigua soprattutto nei contesti in cui il consumo di alcol è difficile da quantificare o può coesistere con fattori metabolici (Mosca et al., 2024). Infine, la nuova terminologia è stata concepita anche per **migliorare la comunicazione con pazienti, pediatri e decisori sanitari**, riducendo lo stigma legato ai termini "non-alcoholic" e "fatty" e rafforzando il legame concettuale tra disfunzione metabolica e malattia epatica (Rinella et al., 2023).

Nel contesto pediatrico, questa transizione presenta ulteriori elementi di complessità: è stato infatti evidenziato come il passaggio da NAFLD/MAFLD a MASLD richieda un adattamento specifico per l'età evolutiva, tenendo conto delle differenze nei pattern istologici, nella distribuzione del grasso corporeo e nella prevalenza dei fattori di rischio rispetto all'adulto (Colucci et al., 2021).

In questa prospettiva, la definizione di disfunzione metabolica nel bambino deve tener conto della variabilità legata ad età, sesso e stadio puberale, nonché dell'impiego di indicatori specifici per l'età evolutiva, quali i percentili di BMI, la circonferenza vita e indici di insulino-resistenza come l'HOMA-IR (Wang et al., 2024). Diversi gruppi di consenso pediatrici – ESPGHAN, NASPGHAN e TASL–TSPGHAN – hanno ribadito la necessità di adattare formalmente i criteri MASLD all'età evolutiva e di validare biomarcatori e strumenti diagnostici specifici per la popolazione pediatrica (Y. Lin et al., 2025; Zhang et al., 2024).

Il documento multisocietario internazionale pubblicato nel 2024 e promosso dalla European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) insieme ad altre società scientifiche internazionali (tra cui NASPGHAN e TASL–TSPGHAN) riconosce che la steatosi epatica in età pediatrica presenta caratteristiche distintive rispetto all'adulto, sia in termini di presentazione clinica sia di storia naturale. In tale contesto, raccomanda l'uso del termine "pediatric MASLD" per indicare le forme di steatosi epatica associate a disfunzione metabolica, indipendentemente dalla presenza o meno di obesità franca (European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) et al., 2024). A supporto di questa evoluzione, una survey internazionale ha documentato che la terminologia MASLD è già ampiamente adottata nella pratica clinica dai pediatri epatologi, pur evidenziando una certa eterogeneità nell'applicazione operativa dei criteri e nelle modalità di inquadramento (Lubrecht et al., 2024).

Le analisi di revisione più recenti convergono nel considerare la classificazione MASLD non come un semplice aggiornamento semantico, ma come l'espressione di un paradigma più coerente con la fisiopatologia metabolica della malattia, anche in età pediatrica, aprendo la strada a strategie più mirate di identificazione precoce del rischio, prevenzione delle complicanze cardiometaboliche e stratificazione prognostica lungo l'intero arco dell'età evolutiva (Gómez-Mendoza et al., 2025; Lahtinen et al., 2025).

1.2 Definizione attuale di MASLD pediatrica

La definizione attuale di Metabolic dysfunction–Associated Steatotic Liver Disease (MASLD) in età pediatrica deriva dall'adattamento dei criteri introdotti dal consenso internazionale multisocietario del 2023, che ha proposto una revisione complessiva della terminologia delle epatopatie dismetaboliche, sostituendo il concetto di NAFLD con quello di MASLD/MASH e ponendo al centro la disfunzione metabolica (Rinella et al., 2023). Questi principi sono stati

successivamente recepiti e declinati in modo specifico per la popolazione in età evolutiva dal documento ufficiale della European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN), che riconosce le peculiarità della steatosi epatica pediatrica e ne formalizza la nuova nomenclatura (European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) et al., 2024).

Secondo tale statement, la diagnosi di MASLD nei bambini richiede innanzitutto la dimostrazione di steatosi epatica, ottenibile mediante biopsia epatica o, più frequentemente nella pratica clinica, tramite tecniche di imaging in grado di fornire una valutazione quantitativa del contenuto di grasso epatico, quali ecografia avanzata, MRI-PDFF, Controlled Attenuation Parameter (CAP) o Hepato-Renal Index. La sola presenza di steatosi, tuttavia, non è sufficiente: per porre diagnosi di MASLD è necessario che essa si associ ad almeno un fattore di rischio cardiometabolico, come sovrappeso od obesità, insulino-resistenza, dislipidemia o alterazioni della glicemia a digiuno o dopo carico orale di glucosio (Wang et al., 2024). In questo modo, la definizione pediatrica rispecchia in maniera coerente il passaggio da una malattia definita "per esclusione" (NAFLD) a una condizione fondata sulla presenza documentata di disfunzione metabolica, in linea con la fisiopatologia della malattia epato-metabolica (Faienza et al., 2025).

Nel bambino, l'applicazione operativa di tali criteri richiede un'attenzione particolare agli aspetti età-specifici e sesso-specifici. A differenza dell'adulto, infatti, sovrappeso e obesità vengono definiti su base percentilica: un BMI ≥ 95° percentile per età e sesso identifica l'obesità, mentre un BMI compreso tra l'85° e il 95° percentile, soprattutto se associato ad altre alterazioni metaboliche, configura un profilo ad aumentato rischio di MASLD (Ahrens et al., 2014). Accanto al BMI, assumono un ruolo centrale la circonferenza vita > 90° percentile, il rapporto vita/fianchi aumentato e i valori elevati di HOMA-IR, tutti marcatori che riflettono la presenza di obesità centrale, di eccesso di grasso viscerale e di resistenza insulinica, elementi chiave nel determinare l'accumulo lipidico intraepatico (Semmler et al., 2023; Song et al., 2024).

Negli ultimi anni, diversi studi europei hanno suggerito di raffinare ulteriormente la stratificazione del rischio introducendo indici compositi non invasivi, come il Fatty Liver Index (FLI) e il Triglyceride–Glucose Index (TyG), che integrano parametri antropometrici e biochimici per migliorare l'identificazione precoce dei bambini a maggior probabilità di steatosi epatica e disfunzione metabolica (Demirci & Sezer, 2025). Parallelamente, livelli aumentati di acido urico sono stati associati a un rischio cardiometabolico più elevato e a una maggiore probabilità di riscontro di MASLD in età evolutiva, suggerendo un ruolo di questo parametro come ulteriore marker di rischio in un sottogruppo di pazienti (Zdanowicz et al., 2024).

La letteratura pediatrica attuale riconosce inoltre l'esistenza di diversi fenotipi clinici di MASLD. Da un lato, il quadro più frequente è rappresentato dall'"obese MASLD", in cui la steatosi epatica si inserisce in un contesto di obesità marcata e disfunzione metabolica evidente; dall'altro, è stato descritto un fenotipo di "lean MASLD", caratterizzato dalla presenza di steatosi in soggetti normopeso che presentano insulino-resistenza, dislipidemia, sindrome dell'ovaio policistico o altri elementi di rischio metabolico non necessariamente accompagnati da un eccesso ponderale (Keskin et al., 2024). Questi fenotipi mostrano come la disfunzione metabolica – più che l'obesità di per sé – rappresenti il determinante principale della malattia. Specularmente, una quota non trascurabile di bambini obesi può essere classificata come "metabolicamente sana", in assenza di steatosi epatica e di segni di danno epatico o di alterazioni metaboliche significative, a conferma del fatto che obesità e MASLD non sono sinonimi e non coincidono necessariamente (Sanchez-Torres et al., 2024).

La definizione di MASLD in età pediatrica si intreccia strettamente con quella di sindrome metabolica pediatrica, che rappresenta il principale "substrato" clinico della disfunzione cardiometabolica: diversi gruppi di studio hanno descritto la sindrome metabolica come un cluster di obesità centrale, dislipidemia, alterazioni della pressione arteriosa e del metabolismo glucidico, applicando soglie percentiliche e cut-off differenti in funzione dell'età e del sesso (Ahrens et al., 2014; Chung et al., 2023; D'Adamo et al., 2019; Mann et al., 2018; Zong et al.,

2024). In tutti questi modelli, il fegato viene considerato un organo bersaglio precoce della disfunzione metabolica, e la steatosi epatica assume il significato di marker iniziale di un rischio cardiometabolico destinato a progredire se non adeguatamente intercettato (D'Adamo et al., 2019).

Le evidenze europee e italiane più recenti confermano infine che la MASLD pediatrica costituisce un'entità clinica distinta rispetto alla corrispondente forma dell'adulto, caratterizzata da un rischio metabolico più precoce, da pattern istologici peculiari e da un percorso evolutivo potenzialmente diverso (Faienza et al., 2025; Lahtinen et al., 2025). In questa prospettiva, l'attuale definizione di MASLD in età evolutiva sottolinea il ruolo della steatosi epatica come primo segnale d'organo di una disfunzione metabolica sistemica che, se non riconosciuta e trattata precocemente, può evolvere verso forme infiammatorie (MASH) o fibrotiche, con implicazioni prognostiche significative lungo l'intero arco dello sviluppo.

1.2.1 Criteri operativi e limiti attuali della definizione pediatrica di MASLD

Nella pratica clinica quotidiana, la definizione operativa di MASLD in età pediatrica si fonda su indicazioni derivate da documenti di consenso e studi osservazionali, ma risente ancora di una certa eterogeneità nei criteri e nelle soglie utilizzate. Ciò comporta difficoltà sia nell'inquadramento del singolo paziente sia nella comparazione dei dati epidemiologici tra diversi studi e contesti geografici, nonostante il quadro concettuale sia stato profondamente rivisto.

Lo statement ESPGHAN del 2024 rappresenta, ad oggi, il principale riferimento per l'età evolutiva. In tale documento si afferma che, nei bambini e negli adolescenti, la diagnosi di MASLD può essere considerata in presenza di steatosi epatica documentata – mediante biopsia epatica o tecniche di imaging quantitative – associata ad almeno un fattore di rischio cardiometabolico, quale sovrappeso, insulino-resistenza, dislipidemia o alterazioni glicemiche (European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) et

al., 2024). Questa impostazione riprende e adatta all'età evolutiva i criteri del consenso internazionale del 2023, privilegiando un approccio "inclusivo e positivo" basato sull'identificazione della disfunzione metabolica, piuttosto che sull'esclusione di altre cause epatiche (Rinella et al., 2023).

Un'analisi comparativa tra i diversi sistemi di classificazione – comprendente quelli proposti da NASPGHAN, ESPGHAN e la definizione MASLD – ha messo in evidenza come la terminologia utilizzata e i criteri adottati possano influenzare in modo significativo la prevalenza stimata della malattia e il numero di soggetti inquadrati come affetti da steatosi epatica dismetabolica, con ricadute sulla gestione clinica, sulla programmazione dei servizi e sull'interpretazione degli studi epidemiologici (Wang et al., 2024).

In questo contesto, la definizione di sindrome metabolica pediatrica assume un ruolo cruciale, poiché costituisce il principale "substrato" clinico su cui si innesta la diagnosi di MASLD. La International Diabetes Federation (IDF) propone che nei ragazzi di età ≥ 10 anni la sindrome metabolica venga diagnosticata in presenza di obesità centrale – definita come circonferenza vita ≥ 90° percentile per età e sesso – associata a due o più delle seguenti alterazioni: trigliceridi ≥ 150 mg/dL, HDL < 40 mg/dL, pressione arteriosa ≥ 130/85 mmHg o glicemia ≥ 100 mg/dL (Zimmet et al., 2007). In ambito europeo, il progetto IDEFICS (Identification and prevention of Dietary- and Lifestyle-induced health Effects in Children and Infants) ha suggerito una classificazione alternativa basata su soglie percentiliche adattate per età e sesso, considerando presente la sindrome metabolica quando tre o più componenti – circonferenza vita, trigliceridi, glicemia, pressione arteriosa e colesterolo HDL – risultano alterati, con valori di circonferenza vita, trigliceridi, glicemia e pressione arteriosa al di sopra del 90° percentile e valori di HDL al di sotto del 10° percentile nella popolazione di riferimento (Ahrens et al., 2014). Entrambi questi approcci sono oggi utilizzati come base per definire la disfunzione metabolica che concorre alla diagnosi pediatrica di MASLD, pur con differenze non trascurabili nelle soglie e nelle modalità di applicazione.

Nonostante questi progressi, la definizione operativa pediatrica di MASLD presenta ancora diversi limiti. In primo luogo, manca un consenso univoco e pienamente condiviso sui criteri diagnostici da adottare in età evolutiva: lo stesso statement ESPGHAN riconosce che la presenza di "una delle cinque componenti cardiometaboliche" possa essere sufficiente per considerare la diagnosi, ma non fornisce un algoritmo clinico rigidamente standardizzato né soglie numeriche universalmente accettate per ciascun parametro, lasciando al clinico un margine significativo di interpretazione (European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) et al., 2024).

In secondo luogo, la variabilità delle soglie antropometriche e biochimiche complica ulteriormente il quadro. I cut-off utilizzati per BMI, circonferenza vita, trigliceridi e indici di insulino-resistenza come HOMA-IR differiscono tra studi, linee guida e popolazioni di riferimento, con il rischio di sottostimare o sovrastimare il rischio a seconda dei criteri adottati e di rendere difficoltoso il confronto tra le diverse coorti pediatriche (Ahrens et al., 2014; Mann et al., 2018).

Un ulteriore limite è legato agli strumenti utilizzati per documentare la steatosi epatica. Sebbene la presenza di steatosi rappresenti un prerequisito per la diagnosi di MASLD, nella pratica pediatrica l'ecografia convenzionale rimane lo strumento più diffuso, nonostante presenti una sensibilità ridotta nelle forme lievi, una marcata operatore-dipendenza e una scarsa standardizzazione dei criteri di gradazione. L'impiego di tecniche quantitative più avanzate (MRI-PDFF, CAP, HRI) o di biomarcatori specifici è ancora limitato da problemi di costo, disponibilità e mancanza di cut-off pediatrici validati (Mosca et al., 2024).

La presenza di fenotipi contrastanti contribuisce a rendere il quadro ancora più complesso. Da un lato, i fenotipi "lean MASLD", in cui bambini normopeso presentano steatosi in un contesto di disfunzione metabolica, dimostrano che l'assenza di eccesso ponderale non esclude una significativa compromissione epato-metabolica; dall'altro, i fenotipi "obese metabolically

healthy", in cui soggetti obesi non mostrano steatosi né alterazioni metaboliche rilevanti, evidenziano come l'eccesso ponderale, da solo, non sia sufficiente a definire MASLD e richiedano criteri più specifici per identificare i profili di rischio realmente elevato (Keskin et al., 2024).

Infine, la carenza di dati longitudinali robusti rappresenta un limite cruciale. Le evidenze disponibili sul decorso a lungo termine della MASLD pediatrica, sui fattori predittivi di progressione verso MASH o fibrosi avanzata e sulle conseguenze cardiometaboliche in età adulta restano limitate; molti studi sono di tipo trasversale o con follow-up relativamente breve, e ciò ostacola la validazione di schemi diagnostici realmente predittivi e la definizione di soglie ottimali per l'identificazione precoce dei bambini ad alto rischio (Lahtinen et al., 2025).

Nel complesso, quindi, la transizione da NAFLD a MASLD rappresenta un passo avanti significativo verso una definizione più coerente con la fisiopatologia metabolica della malattia, ma in ambito pediatrico la definizione operativa rimane in evoluzione. Le società scientifiche convergono sull'idea di una diagnosi "positiva", fondata sulla presenza di disfunzione metabolica associata a steatosi epatica; tuttavia, la mancanza di soglie uniformi, di biomarcatori validati e di protocolli di screening condivisi limita ancora l'applicabilità clinica della definizione nei bambini. In questa prospettiva, appaiono necessari ulteriori studi multicentrici, in particolare europei, per sviluppare criteri pediatrici standardizzati e facilmente applicabili, in grado di conciliare le esigenze della pratica clinica con quelle della ricerca epidemiologica in ambito MASLD.

1.3 Epidemiologia della MASLD pediatrica

La MASLD rappresenta oggi la forma più comune di epatopatia cronica in età pediatrica, con una prevalenza in costante aumento a livello globale. Le stime epidemiologiche variano in funzione della popolazione studiata, dei criteri diagnostici adottati e delle tecniche di rilevazione

impiegate, ma convergono nel riconoscere una diffusione crescente, parallela alla cosiddetta "epidemia di obesità infantile" e all'incremento delle comorbidità metaboliche in età evolutiva (Younossi et al., 2025). Studi recenti indicano che, nella popolazione pediatrica generale, la prevalenza di MASLD oscilla complessivamente tra il 7% e il 14%, mentre nei bambini e adolescenti con sovrappeso o obesità essa aumenta fino a raggiungere il 30–40% o più, a seconda del metodo diagnostico utilizzato e della definizione di disfunzione metabolica adottata (Noon et al., 2025; Shi et al., 2024). Dati provenienti da coorti europee e nordamericane confermano che la prevalenza tende ad aumentare proporzionalmente al grado di obesità: nei soggetti con obesità grave, la steatosi epatica può interessare oltre due terzi dei pazienti, delineando un cluster ad altissimo rischio cardiometabolico (De Boom et al., 2024; Mari et al., 2025).

Il rischio di sviluppare MASLD risulta ulteriormente amplificato in presenza di comorbidità metaboliche, in particolare diabete mellito di tipo 2 e sindrome metabolica; tuttavia, la malattia è stata descritta anche nei pazienti con diabete di tipo 1, nei quali è stata osservata in circa il 14% dei casi e si associa in modo significativo a scarso controllo glicemico e resistenza insulinica, suggerendo che l'esposizione cronica a iperglicemia e insulino-resistenza possa rappresentare un denominatore comune al di là del fenotipo ponderale (Maffeis et al., 2024). Anche nei bambini e adolescenti normopeso, tuttavia, la MASLD non è rara: il cosiddetto "lean MASLD" può interessare fino al 20% dei soggetti con normopeso ma disfunzione metabolica, predisposizione genetica o altri fattori di rischio (si veda anche paragrafo 1.6 per i fenotipi clinici), a ulteriore conferma del fatto che la componente metabolica prevale sul solo eccesso ponderale nella determinazione del rischio di steatosi epatica (Keskin et al., 2024).

Dal punto di vista geografico, la MASLD pediatrica mostra un'elevata eterogeneità, che riflette sia differenze metodologiche sia fattori socioeconomici, nutrizionali ed etnici. Nei Paesi asiatici, la prevalenza nella popolazione generale varia tra il 10% e il 20%, mentre nei bambini obesi si attesta intorno al 30–50%, come riportato dal consenso congiunto TASL–TSPGHAN, che

sottolinea il peso crescente della malattia epato-metabolica nelle società in rapida transizione nutrizionale (Y. Lin et al., 2025). In Nord America, i dati del National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) indicano una prevalenza complessiva del 17–18% tra gli adolescenti, con punte superiori al 40% nei soggetti obesi, in linea con l'elevata prevalenza di obesità e sindrome metabolica in questa fascia di età (Noon et al., 2025).

In Europa, le indagini multicentriche più recenti confermano una tendenza simile: studi condotti in Italia, Paesi Bassi e Scandinavia riportano valori compresi tra il 20% e il 30% nella popolazione generale pediatrica seguita in centri specialistici, leggermente superiori alle stime globali (7–14%), verosimilmente per una selezione di popolazioni a più alto rischio. Nei bambini con obesità, la prevalenza varia invece tra il 50% e il 70%, delineando un quadro di sostanziale omogeneità del rischio nei Paesi ad alto reddito (De Boom et al., 2024).

Le analisi temporali disponibili mostrano un incremento costante della prevalenza di MASLD negli ultimi due decenni, in parallelo all'aumento dell'obesità infantile, del diabete mellito e della sindrome metabolica in età evolutiva (Younossi et al., 2025). Negli Stati Uniti e in Europa, la proporzione di adolescenti con steatosi epatica è quasi raddoppiata rispetto ai primi anni 2000, e trend analoghi sono stati descritti in Asia orientale, a testimonianza di una transizione epidemiologica globale che coinvolge sia Paesi occidentali sia nazioni in rapido sviluppo (Y. Lin et al., 2025). All'interno di questo scenario, la forma avanzata della malattia, MASH, è stata documentata in una quota non trascurabile di bambini; la fibrosi clinicamente significativa è presente nel 3–5% dei soggetti con MASLD (Shi et al., 2024), e la sua identificazione precoce riveste un'importanza cruciale, poiché la presenza di fibrosi in età pediatrica si associa a un rischio aumentato di progressione verso complicanze epatiche e cardiometaboliche nell'età adulta (Lahtinen et al., 2025).

Nel complesso, questi dati delineano una condizione ad elevata prevalenza, con valori globali stimati tra il 7% e il 14% nella popolazione pediatrica generale e fino al 40–70% nei bambini

obesi, e con una tendenza all'aumento in tutte le aree geografiche, trainata dall'incremento dell'obesità e della disfunzione metabolica infantile. Sebbene nella maggior parte dei casi il quadro sia inizialmente caratterizzato da steatosi "semplice", una percentuale non irrilevante di pazienti presenta già in età evolutiva segni di infiammazione o fibrosi, sottolineando la necessità di strategie di prevenzione, identificazione precoce e gestione strutturata delle popolazioni pediatriche a rischio.

1.4 Obesità pediatrica e disfunzione metabolica

1.4.1 Definizione e classificazione dell'obesità in età pediatrica

L'obesità in età pediatrica è oggi riconosciuta come una malattia cronica, recidivante e multifattoriale, che si sviluppa dall'interazione complessa tra predisposizione genetica, ambiente obesogeno e comportamenti individuali (abitudini alimentari scorrette, scarsa attività fisica, irregolarità del sonno, uso prolungato di schermi digitali). Le recenti linee guida della American Academy of Pediatrics (AAP) hanno consolidato questa visione, sottolineando la natura cronica e sistemica dell'obesità infantile e la necessità di un approccio precoce, multidisciplinare e continuativo alla gestione del peso in età evolutiva (Hampl et al., 2023; Skolnik, 2023).

Dal punto di vista clinico, l'obesità è caratterizzata da un eccesso di massa grassa rispetto al fabbisogno fisiologico di crescita, con ripercussioni che si estendono ben oltre il semplice aumento di peso, coinvolgendo precocemente diversi organi e apparati. A differenza dell'adulto, nei bambini e negli adolescenti l'interpretazione dello stato ponderale non può basarsi su valori assoluti di indice di massa corporea (BMI), poiché peso, statura e composizione corporea variano in modo significativo con l'età e presentano differenze tra maschi e femmine. Per questo motivo, la valutazione deve essere condotta sulla base delle principali raccomandazioni internazionali — della American Academy of Pediatrics (AAP), della European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) e della European

Association for the Study of Obesity (EASO) — si definisce sovrappeso un BMI compreso tra l'85° e il 94° percentile, obesità un BMI ≥95° percentile e obesità severa un BMI ≥120% del 95° percentile o ≥35 kg/m², a seconda dell'età e del contesto clinico. (Hampl et al., 2023; Hassapidou et al., 2023; Verduci et al., 2021). Questa classificazione consente di uniformare la valutazione dei diversi gradi di eccesso ponderale e di rendere confrontabili i dati tra studi clinici e coorti epidemiologiche internazionali.

L'inquadramento auxologico, tuttavia, non si esaurisce nella semplice collocazione del valore di BMI su una curva di riferimento. È necessario considerare anche la dinamica della crescita, l'andamento nel tempo del BMI z-score, il momento di insorgenza dell'eccesso ponderale e la fase puberale, che può mascherare o amplificare alcune variazioni. In questo senso, il BMI rappresenta uno strumento pratico e riproducibile per la diagnosi clinica e la sorveglianza epidemiologica, ma presenta limiti ben noti: non distingue tra massa magra e massa grassa, non informa sulla distribuzione del tessuto adiposo e può risultare fuorviante in alcune condizioni (ad esempio nei soggetti molto muscolosi o nei bambini con variazioni puberali precoci o tardive) (Valerio et al., 2024).

Per questi motivi, la valutazione dell'obesità in età pediatrica dovrebbe integrare il BMI con altri indicatori, quali circonferenza vita, rapporto vita/altezza e, quando disponibili, misure più dirette della composizione corporea (plicometria, bioimpedenziometria, DEXA). In particolare, l'attenzione si è progressivamente spostata dalla sola quantità di grasso corporeo alla sua distribuzione, con un ruolo centrale attribuito al tessuto adiposo viscerale, più strettamente associato a insulino-resistenza, dislipidemia e ipertensione (Vajravelu et al., 2023). Tali alterazioni configurano il substrato fisiopatologico per lo sviluppo di malattia epatica steatosica associata a disfunzione metabolica (MASLD) e di altre complicanze cardiometaboliche.

Dal punto di vista clinico, è quindi importante sottolineare che la diagnosi di obesità nasce da un atto antropometrico, ma le sue conseguenze sono sistemiche. L'accumulo di tessuto adiposo,

specialmente in sede viscerale, promuove uno stato di disfunzione metabolica e infiammazione cronica di basso grado, che costituisce il terreno su cui si sviluppano comorbidità quali insulino-resistenza, alterazioni del profilo lipidico, ipertensione arteriosa e, in particolare, MASLD (Accacha et al., 2025).

In definitiva, la classificazione dell'obesità in età evolutiva, pur basandosi su parametri auxologici, deve essere interpretata alla luce del contesto clinico e metabolico del singolo paziente. I criteri percentili/z-score offrono il primo livello di stratificazione, mentre la caratterizzazione del rischio — inclusa la presenza di MASLD — richiede una valutazione integrata, che verrà approfondita nei paragrafi successivi dedicati alla fisiopatologia e all'inquadramento clinico della malattia epatica steatosica pediatrica.

1.4.2 Epidemiologia dell'obesità pediatrica e tracking verso l'età adulta

Negli ultimi decenni, l'obesità pediatrica ha assunto le caratteristiche di una vera e propria epidemia globale. Secondo i dati più recenti, la prevalenza di obesità infantile è più che triplicata dagli anni '70, interessando oggi circa il 19–20% dei bambini e adolescenti nei Paesi ad alto reddito, con una tendenza in crescita anche nelle aree a medio reddito (Lee, 2024; Panganiban et al., 2025). In Europa, la prevalenza complessiva di sovrappeso e obesità nei soggetti tra 7 e 17 anni si colloca mediamente tra il 20 e il 30%, con valori più elevati nell'area mediterranea e una significativa disomogeneità legata al sesso, all'origine etnica e allo status socioeconomico (Valerio et al., 2024).

In Italia, secondo i dati più recenti del Sistema di sorveglianza nazionale su obesità e stili di vita in età scolare *OKkio alla Salute* 2023, il 20,9% dei bambini tra 8 e 9 anni è in sovrappeso e il 9,8% è obeso, con una marcata variabilità geografica e un gradiente Nord–Sud ancora evidente. Nonostante un leggero miglioramento rispetto alle rilevazioni precedenti, questi valori rimangono tra i più alti d'Europa (Nardone et al., 2025). In Campania, i dati della stessa indagine delineano un quadro ancora più critico: il 24,6% dei bambini risulta in sovrappeso, il 12,6%

obeso e circa il 6% presenta obesità grave, per un totale di oltre il 43% di eccesso ponderale. Queste percentuali pongono la Campania tra le regioni italiane con la più elevata prevalenza di obesità infantile, confermando il forte impatto delle disuguaglianze territoriali e socioeconomiche sugli stili di vita e sullo stato nutrizionale dei bambini (Nardone et al., 2025).

Studi longitudinali di coorte confermano che l'obesità in età pediatrica tende a persistere nel tempo, configurando il cosiddetto *tracking* dell'obesità lungo l'asse infanzia–età adulta. I dati del National Longitudinal Study of Adolescent Health mostrano che oltre il 90% degli adolescenti obesi rimane obeso in età adulta, con un rischio proporzionale all'età di insorgenza e alla severità del sovrappeso (Gordon-Larsen et al., 2010). Questo fenomeno di continuità ponderale si accompagna a un *tracking* metabolico: le alterazioni dell'insulino-sensibilità, del profilo lipidico e della pressione arteriosa che compaiono in età infantile tendono a persistere e ad amplificarsi in età adulta, favorendo lo sviluppo di diabete mellito di tipo 2, sindrome metabolica e patologia cardiovascolare precoce (Uwaezuoke, 2019).

Dal punto di vista epatologico, il parallelo incremento dell'obesità ha determinato un aumento marcato della prevalenza di MASLD pediatrica, oggi considerata la più frequente causa di epatopatia cronica nell'infanzia (si veda anche paragrafo 1.3). Studi recenti riportano una prevalenza di MASLD nel 25–40% dei bambini obesi, con percentuali crescenti nei casi di obesità severa e in presenza di insulino-resistenza (Faienza et al., 2025; Putri et al., 2024). In questo contesto, MASLD in età pediatrica interagisce sinergicamente con l'iperglicemia e la resistenza insulinica, aumentando il rischio di diabete mellito di tipo 2 giovanile e di fibrosi epatica precoce; al contrario, una risposta efficace al trattamento dell'obesità si associa a una riduzione significativa del rischio di diabete, indipendentemente dalla presenza di MASLD (Putri et al., 2024).

La letteratura più recente conferma quindi che il *tracking* dell'obesità pediatrica verso l'età adulta non è soltanto ponderale, ma anche metabolico ed epatico: il bambino obeso tende a diventare

un adulto con elevato rischio di sindrome metabolica, diabete mellito di tipo 2, malattia cardiovascolare e MASLD persistente (Accacha et al., 2025; Van Kleef et al., 2025). Questa continuità lungo l'asse infanzia–età adulta rende la prevenzione e la gestione precoce dell'obesità non solo un obiettivo prioritario di salute pubblica, ma anche una strategia fondamentale per contenere l'onere futuro delle patologie cardiometaboliche ed epatiche nella popolazione generale, in particolare delle forme di MASLD e MASH a insorgenza giovanile.

1.4.3 Disfunzione cardiometabolica nel bambino obeso

Nel bambino con obesità, l'eccesso di tessuto adiposo non rappresenta un semplice accumulo energetico, ma il punto di partenza di una disfunzione sistemica che coinvolge i principali assi metabolici, con ripercussioni sull'omeostasi glucidica e lipidica, sul tono vascolare e sulla funzione epatica. Questo quadro, comunemente definito disfunzione cardiometabolica, costituisce un continuum fisiopatologico che può iniziare già nei primi anni di vita e si estende dalle alterazioni subcliniche precoci fino alle sindromi metaboliche conclamate dell'età adulta (Accacha et al., 2025).

All'interno di questo continuum, l'insulino-resistenza (IR) è considerata il nodo fisiopatologico centrale e la prima anomalia metabolica caratteristica del bambino obeso. La ridotta sensibilità insulinica può manifestarsi già in età scolare e correla strettamente con l'aumento del grasso viscerale, con la lipotossicità e con lo stato di infiammazione cronica di basso grado che caratterizza l'obesità viscerale (Stenlid et al., 2025). In questo contesto, diversi indici surrogati non invasivi – come il METS-IR, il rapporto trigliceridi/HDL (TG/HDL ratio) o lo SPISE index – si sono dimostrati in grado di predire in modo efficace la presenza di steatosi epatica e la severità della disfunzione metabolica nei bambini obesi (Song et al., 2024). L'IR, a sua volta, favorisce l'iperglicemia e la comparsa di una dislipidemia aterogena, contribuendo anche allo sviluppo precoce di disfunzione endoteliale e di aumentata rigidità arteriosa, anticipando il rischio cardiovascolare già nell'età pediatrica (Faienza et al., 2025).

Il profilo lipidico tipico del bambino obeso è caratterizzato da un incremento dei trigliceridi, da una riduzione del colesterolo HDL e da una prevalenza di particelle LDL piccole e dense, particolarmente aterogene. Questa dislipidemia aterogena riflette una profonda disregolazione epatica della sintesi e dell'esportazione delle lipoproteine, strettamente connessa all'accumulo intraepatocitario di trigliceridi (Zisis et al., 2025). Parallelamente, l'aumento della massa adiposa viscerale e la leptino-resistenza contribuiscono alla comparsa di ipertensione arteriosa attraverso l'attivazione del sistema renina–angiotensina–aldosterone e l'incremento dello stress ossidativo vascolare (Yanai et al., 2023). La coesistenza di queste alterazioni configura un fenotipo ad alto rischio, in cui la compromissione emodinamica e quella metabolica procedono di pari passo fin dalle prime fasi della vita.

Il fegato rappresenta un organo chiave nella regolazione metabolica e uno dei primi bersagli della disfunzione cardiometabolica del bambino obeso. L'accumulo di grasso epatico, determinato dall'eccessivo flusso di acidi grassi liberi al fegato, dalla lipogenesi de novo aumentata e dalla ridotta ossidazione mitocondriale, conduce alla comparsa di MASLD (Metabolic dysfunction–Associated Steatotic Liver Disease), che costituisce la principale manifestazione epatica dell'obesità pediatrica (Accacha et al., 2025). Numerose evidenze dimostrano che la presenza di MASLD si associa a un peggioramento complessivo del profilo cardiometabolico, con valori pressori, lipidici e glicemici più sfavorevoli rispetto ai bambini obesi senza steatosi epatica (D. Zhao et al., 2025). In questa prospettiva, la MASLD può essere considerata la "spia epatica" di una disfunzione metabolica sistemica e un indicatore precoce del rischio di progressione verso diabete mellito di tipo 2 e malattie cardiovascolari (Driessen et al., 2025; Nguyen et al., 2024).

Nel loro insieme, le alterazioni di insulino-sensibilità, profilo lipidico, omeostasi glucidica e regolazione pressoria configurano, nel bambino obeso, un cluster funzionale interconnesso, spesso inizialmente subclinico, nel quale il fegato emerge come uno degli organi bersaglio più precoci. In questo quadro, la MASLD rappresenta l'espressione epatica della disfunzione

cardiometabolica pediatrica e un segnale clinico che rende visibili, a livello d'organo, le alterazioni sistemiche legate all'obesità e ai diversi fenotipi metabolici descritti di seguito.

1.4.4 MASLD nel continuum dell'obesità pediatrica

L'obesità pediatrica e la MASLD non rappresentano entità monolitiche, ma sindromi eterogenee che si distribuiscono lungo uno spettro di fenotipi metabolici. La malattia epatica steatosica associata a disfunzione metabolica (MASLD) rappresenta la principale espressione epatica della disfunzione cardiometabolica pediatrica, ma non coincide automaticamente con la presenza di obesità. Sempre più evidenze indicano che la MASLD si colloca lungo un continuum fisiopatologico in cui coesistono differenti fenotipi metabolici, definiti da combinazioni variabili di stato ponderale, distribuzione del grasso corporeo e grado di compromissione metabolica, con implicazioni eterogenee in termini di rischio evolutivo (Accacha et al., 2025).

All'interno di questo continuum, una quota non trascurabile di bambini e adolescenti presenta MASLD pur in assenza di sovrappeso o obesità conclamata. Si tratta del cosiddetto fenotipo "lean MASLD", in cui un BMI nei limiti di norma si associa tuttavia a un aumento selettivo del grasso viscerale, a insulino-resistenza e a disfunzione metabolica, con un profilo di rischio che non è affatto trascurabile (Rotaru et al., 2025). Studi recenti hanno documentato che questi soggetti possono mostrare alterazioni epatiche e metaboliche comparabili a quelle dei bambini obesi, con una probabilità non irrilevante di fibrosi significativa (Keskin et al., 2025; Mostafa et al., 2025). Questo fenotipo evidenzia i limiti di una lettura esclusivamente basata sul BMI e sottolinea la necessità di integrare la valutazione auxologica con parametri antropometrici più sensibili al grasso viscerale, come la circonferenza vita o il rapporto vita/altezza.

All'estremo opposto del continuum si collocano i bambini con obesità ma profilo metabolico relativamente favorevole, nei quali la sensibilità insulinica, il profilo lipidico e i valori pressori risultano nei limiti: è il fenotipo comunemente definito "obese metabolically healthy" (MHO). Pur apparendo inizialmente a basso rischio, questa condizione non può essere considerata

realmente protettiva nel lungo periodo: dati longitudinali indicano infatti che circa il 40–50% dei soggetti MHO evolve nel tempo verso uno stato metabolicamente compromesso, sviluppando progressivamente insulino-resistenza, dislipidemia e MASLD (Koliaki et al., 2025). La stabilità di questo fenotipo dipende da molteplici fattori — genetici, legati alla distribuzione del grasso, allo stile di vita e al grado di infiammazione sistemica — e tende a ridursi con l'avanzare dell'età e con il protrarsi dell'eccesso ponderale.

Il fenotipo più frequente nella pratica clinica è tuttavia quello "obese metabolically unhealthy" (MUO), in cui l'obesità si associa a insulino-resistenza, dislipidemia aterogena, ipertensione arteriosa e stato infiammatorio cronico di basso grado. Si stima che fino al 70–80% dei bambini obesi presenti almeno un criterio di disfunzione metabolica, configurando un rischio elevato di MASLD, fibrosi epatica e diabete mellito di tipo 2 ad esordio giovanile (Faienza et al., 2024; Putri et al., 2024). In questi soggetti il fegato è tra i primi organi bersaglio e la steatosi epatica si associa spesso a segni precoci di danno cardiovascolare, come aumento della rigidità arteriosa o alterazioni subcliniche della funzione endoteliale (Zisis et al., 2025).

Nel loro insieme, questi fenotipi delineano un gradiente di rischio clinico che si estende dai soggetti con lean MASLD, spesso sottodiagnosticati ma non esenti da fibrosi, fino agli obesi metabolicamente compromessi (MUO), che presentano la maggiore probabilità di evoluzione verso steatoepatite (MASH), fibrosi avanzata e patologia cardiovascolare precoce (Behari et al., 2024; Danpanichkul et al., 2025). Le differenze tra i diversi profili riflettono l'interazione complessa tra fattori genetici, determinanti ambientali, stato infiammatorio e caratteristiche del microbiota, che modulano la risposta metabolica e la vulnerabilità epatica del singolo bambino (Zöggeler et al., 2025).

In questa prospettiva, la MASLD non può essere considerata una semplice conseguenza "meccanica" dell'obesità, ma va interpretata come l'esito epatico di specifiche combinazioni di eccesso adiposo, disfunzione metabolica e suscettibilità individuale. Il continuum che va dal

normopeso con rischio metabolico subdolo fino all'obesità severa con disfunzione multisistemica sarà ulteriormente approfondito nei paragrafi successivi, in particolare nel paragrafo 1.6, dedicato ai fattori di rischio e ai fenotipi clinici della MASLD pediatrica.

1.5 Spettro clinico e istologico della MASLD pediatrica

La MASLD in età pediatrica comprende un ampio spettro di lesioni epatiche, che spaziano dalla steatosi semplice fino alla steatoepatite con fibrosi (MASH) e, nei casi più avanzati, alla cirrosi e all'epatocarcinoma, seppur raramente osservate in età evolutiva. La progressione della malattia è in genere lenta, ma l'esordio in età pediatrica implica un potenziale impatto significativo sulla storia naturale a lungo termine, poiché prolunga la durata dell'esposizione alla disfunzione metabolica e alle sue conseguenze epato-cardiometaboliche (Rinella et al., 2023).

Gli studi basati su biopsia epatica hanno confermato che lo spettro istologico della MASLD pediatrica si colloca lungo un continuum in parte analogo a quello descritto negli adulti, ma con caratteristiche peculiari. Nel complesso, la steatosi semplice rappresenta la forma istologica più frequente, seguita dai quadri di MASLD con infiammazione lobulare e portale (MASH) e dalle forme associate a fibrosi significativa (Li et al., 2025). Nella coorte descritta da Li e colleghi, la presenza di MASH era documentata in circa il 30–60% dei bambini con MASLD, e il rischio di sviluppare una fibrosi rilevante risultava aumentato di circa 5,8 volte rispetto ai soggetti con steatosi semplice, suggerendo che il passaggio dalla steatosi alla steatoepatite rappresenti un nodo critico nella storia naturale della malattia.

I dati istologici pediatrici supportano inoltre l'esistenza di un pattern istologico "tipo 2", distinto da quello tipico dell'adulto e caratterizzato da steatosi macrovescicolare e infiammazione portale prevalente, con interessamento fibrotico soprattutto in sede periportale o "a ponte" (European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) et al., 2024; Y. Lin et al., 2025). Questo pattern, particolarmente frequente nei bambini in età prepubere,

sembra riflettere specificità immunometaboliche e anatomiche del fegato in età evolutiva e, secondo alcune osservazioni longitudinali, può regredire o trasformarsi progressivamente in un quadro più simile a quello "tipo adulto" con il procedere della pubertà (Li et al., 2025).

Le differenze istologiche tra MASLD pediatrica e adulta sono ormai consolidate: negli adulti predomina l'infiammazione lobulare con degenerazione ballooning degli epatociti e fibrosi pericellulare/perivenulare, mentre nei bambini risultano più frequenti l'infiammazione portale, l'interessamento fibrotico periportale e una minore evidenza di ballooning epatocitario (European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) et al., 2024; Y. Lin et al., 2025). Questo pattern "pediatrico" è stato associato a una diversa modalità di attivazione delle cellule stellate epatiche e a un ruolo relativamente più marcato dei fattori immunitari e microbiotici, piuttosto che della sola lipotossicità diretta. Inoltre, il grado di steatosi macrovescicolare tende a essere più elevato nei bambini con obesità centrale e insulino-resistenza, confermando il legame stretto tra accumulo lipidico intraepatico e alterazioni del metabolismo glucidico e lipidico sistemico (Garibay-Nieto et al., 2023).

Nei casi più gravi, la progressione della fibrosi può condurre allo sviluppo di cirrosi e, eccezionalmente, di epatocarcinoma. Sebbene tali esiti siano rari in età pediatrica, sono stati descritti casi in adolescenti con obesità grave e sindrome metabolica, a indicare che, in presenza di fattori di rischio particolarmente marcati e di lunga durata, la storia naturale della MASLD può seguire un continuum patogenetico che porta precocemente alle complicanze tipiche dell'età adulta (Rinella et al., 2023).

Dal punto di vista clinico, la MASLD pediatrica è frequentemente paucisintomatica. Molti bambini sono asintomatici o riferiscono solo disturbi aspecifici, come affaticabilità o modesto discomfort addominale; l'epatomegalia rappresenta il reperto obiettivo più comune alla visita. Gli enzimi epatici, in particolare ALT e AST, possono risultare solo modestamente aumentati e in una quota non trascurabile di pazienti rientrano nei limiti di normalità, soprattutto nelle fasi

iniziali della malattia (Q. Liu et al., 2025). L'aumento di ALT, inoltre, non è necessariamente correlato in modo lineare alla gravità istologica, limitando l'utilità di questo parametro come biomarcatore isolato di danno epatico.

Il quadro laboratoristico si inserisce tipicamente in un contesto di disfunzione metabolica globale e può includere iperinsulinemia, aumento del rapporto HOMA-IR, ipertrigliceridemia e riduzione dei livelli di colesterolo HDL, associati talora ad altre alterazioni del profilo lipidico e glicemico (Garibay-Nieto et al., 2023). In tale contesto, la MASLD viene oggi considerata non soltanto come una malattia epatica, ma come un vero e proprio marker precoce di rischio cardiometabolico, che riflette una compromissione sistemica del metabolismo energetico. Questa visione sistemica è perfettamente coerente con la nuova classificazione, che pone la disfunzione metabolica al centro del processo patogenetico, piuttosto che come semplice comorbidità associata a una epatopatia precedentemente definita "non alcolica" (Rinella et al., 2023).

Queste caratteristiche istologiche peculiari si intrecciano con i fattori di rischio metabolici, genetici ed epigenetici descritti nel paragrafo 1.6, contribuendo alla marcata eterogeneità clinica della MASLD pediatrica.

1.6 Fattori di rischio e fenotipi clinici della MASLD pediatrica

La MASLD è una condizione multifattoriale, il cui sviluppo in età pediatrica è determinato dall'interazione complessa tra fattori metabolici, genetici ed epigenetici, oltre che da elementi ambientali e comportamentali. Il nodo patogenetico centrale è rappresentato dalla disfunzione metabolica, che comprende obesità centrale, insulino-resistenza, dislipidemia e alterazioni del metabolismo glucidico, configurando un continuum di rischio che si esprime sul fegato ma coinvolge l'intero assetto cardiometabolico (Panganiban et al., 2025).

L'obesità viscerale rappresenta il principale fattore di rischio per MASLD in età pediatrica: l'accumulo di grasso intra-addominale determina un incremento del flusso di acidi grassi liberi al fegato, promuovendo lipotossicità, stress ossidativo e infiammazione epatica. Nei bambini e negli adolescenti, la MASLD si associa frequentemente a insulino-resistenza (valori elevati di HOMA-IR), ipertrigliceridemia, riduzione del colesterolo HDL, glicemia alterata e incremento dei valori pressori, delineando un quadro di sindrome metabolica pediatrica (Accacha et al., 2025; Hashim et al., 2025). L'interrelazione tra obesità, resistenza insulinica e steatosi epatica è bidirezionale: l'eccesso di grasso epatico peggiora ulteriormente la sensibilità insulinica e favorisce la dislipidemia e l'adiposità viscerale, alimentando un circolo vizioso che, nel contesto pediatrico, può instaurarsi precocemente anche in assenza di obesità grave, soprattutto in presenza di predisposizione familiare e di fattori ambientali sfavorevoli (Y. Lin et al., 2025).

In questo scenario si collocano due principali fenotipi clinici di MASLD pediatrica, che presentano caratteristiche metaboliche e prognostiche differenti ma condividono la disfunzione epato-metabolica di base. Il fenotipo più comune è l'"obese MASLD", caratterizzato da obesità marcata (BMI ≥ 95° percentile), insulino-resistenza, dislipidemia e maggiore rischio di fibrosi epatica, spesso associato a segni clinici evidenti di sindrome metabolica e a un profilo infiammatorio sistemico più accentuato (Panganiban et al., 2025). Accanto a questo, è stato descritto il fenotipo "lean MASLD", che comprende i bambini normopeso che sviluppano steatosi epatica in presenza di disfunzione metabolica, familiarità per diabete o varianti genetiche di rischio. Questo fenotipo rappresenta circa il 15–20% dei casi pediatrici, con prevalenze maggiori riportate in alcune etnie, in particolare asiatiche e ispaniche (Y.-C. Lin et al., 2020). Rispetto ai soggetti obesi, i bambini "lean" presentano in genere un carico infiammatorio sistemico meno marcato ma una più rilevante predisposizione genetica, che rende la diagnosi meno immediata e la traiettoria evolutiva meno prevedibile (Piras et al., 2025). A completare il quadro, è stato descritto anche un sottogruppo opposto, definito "obese metabolically healthy", in cui bambini obesi non mostrano né steatosi epatica né marcatori di disfunzione metabolica,

a riprova della complessità del legame tra obesità e MASLD e della necessità di non sovrapporre automaticamente eccesso ponderale e malattia epato-metabolica (Habib, 2024).
In sintesi, è la combinazione tra eccesso adiposo viscerale, resistenza insulinica e suscettibilità genetica – più che il solo valore di BMI – a determinare il profilo individuale di rischio per MASLD in età pediatrica.

La suscettibilità individuale alla MASLD è inoltre fortemente modulata da fattori genetici che influenzano il metabolismo lipidico, la risposta infiammatoria e i processi di fibrogenesi. Tra le varianti più studiate, PNPLA3 (rs738409 C>G) è associata a un maggiore accumulo di trigliceridi epatici e a un rischio aumentato di MASH e fibrosi; TM6SF2 (rs58542926 C>T) altera l'esportazione di lipidi dal fegato, favorendo l'accumulo intraepatico; MBOAT7 (rs641738 C>T) è coinvolta nella rimodulazione dei fosfolipidi ed è stata associata a forme più fibrotiche; GCKR (rs1260326 T>C) è legata a dislipidemia e ipertrigliceridemia (Pei & Goh, 2025; Rocha et al., 2025). Le analisi di rischio poligenico (Polygenic Risk Scores) suggeriscono che la combinazione di PNPLA3, TM6SF2 e HSD17B13 spiega una quota significativa della variabilità fenotipica e del rischio di progressione verso MASH, contribuendo a identificare sottogruppi pediatrici particolarmente vulnerabili (Kanda et al., 2025).

Accanto alla componente genetica, i meccanismi epigenetici svolgono un ruolo cruciale nel modulare l'espressione genica in risposta a stimoli ambientali. Modificazioni epigenetiche indotte da dieta ipercalorica e ricca di zuccheri semplici, da un microbiota intestinale disbiotico e da aumentato stress ossidativo concorrono alla progressione della steatosi verso infiammazione cronica e fibrosi, rafforzando il legame tra stile di vita e storia naturale della malattia (Chen et al., 2025; Paolini et al., 2025). Nei bambini, la combinazione di varianti genetiche di rischio e di fattori ambientali sfavorevoli – dieta ricca in zuccheri e grassi saturi, sedentarietà, alterazioni del microbiota – può determinare una comparsa particolarmente precoce della disfunzione epatica, anche in assenza di obesità evidente, e contribuisce a spiegare la crescente prevalenza del fenotipo "lean MASLD".

In conclusione, la MASLD pediatrica si configura come una condizione epato-metabolica eterogenea, nella quale il rischio individuale è determinato dall'interazione tra fattori metabolici (obesità viscerale, insulino-resistenza, dislipidemia, alterata tolleranza glucidica), fattori genetici (PNPLA3, TM6SF2, MBOAT7, HSD17B13 e altre varianti), e fattori ambientali e comportamentali (abitudini alimentari, livello di attività fisica, microbiota intestinale). La definizione di diversi fenotipi clinici, quali "obese MASLD" e "lean MASLD", riflette questa complessità e suggerisce la necessità di un approccio diagnostico e terapeutico personalizzato, orientato a identificare precocemente i profili di rischio più elevato e a prevenire la progressione della malattia già nelle prime fasi della vita.

1.7 Fisiopatologia: dal sovraccarico lipidico alla fibrosi

La fisiopatologia della MASLD è complessa e multifattoriale e, negli ultimi anni, ha subito una profonda revisione concettuale. Inizialmente interpretata secondo il modello della "two-hit hypothesis", che postulava una prima fase caratterizzata dall'accumulo di lipidi negli epatociti e una seconda fase dominata dal danno ossidativo e dall'infiammazione, la malattia viene oggi meglio descritta attraverso un modello "multi-hit", in cui molteplici fattori – metabolici, mitocondriali, infiammatori e microbici – agiscono in maniera simultanea e sinergica sul fegato e sugli altri organi coinvolti nell'omeostasi energetica (Kuchay et al., 2025).

In questo modello "multi-hit", l'interazione tra insulino-resistenza, lipotossicità, stress ossidativo, infiammazione cronica e disfunzione mitocondriale dà origine a un circolo vizioso che sostiene la progressione dalla steatosi semplice alla steatoepatite con fibrosi (MASH). Il fegato non è più considerato un organo bersaglio isolato, ma il nodo di una rete che coinvolge il tessuto adiposo, il muscolo scheletrico e l'intestino, i quali contribuiscono al carico metabolico mediante una complessa interazione di adipochine, epatochine e miochine (Adinolfi et al., 2025). In età pediatrica, tale modello è particolarmente rilevante, poiché l'accumulo di grasso

intraepatico si sviluppa spesso in un contesto di obesità viscerale e insulino-resistenza precoce, che amplificano la lipogenesi, il flusso di acidi grassi liberi verso il fegato e l'esposizione prolungata ai "colpi" patogenetici. Studi recenti hanno inoltre identificato nuovi mediatori, come il methylglyoxal (MGO), sottoprodotto della glicolisi in grado di innescare stress carbonilico, alterazioni proteiche e infiammazione cronica, aggiungendo un ulteriore livello di complessità al quadro fisiopatologico (Berdowska et al., 2025).

Al centro di questo processo si colloca l'insulino-resistenza (IR), che rappresenta il fulcro patogenetico della MASLD. In presenza di IR, il tessuto adiposo – in particolare quello viscerale – rilascia quantità eccessive di acidi grassi liberi (FFA) nel circolo portale, che vengono captati dal fegato e contribuiscono all'accumulo di trigliceridi intraepatici. Contestualmente, l'iperinsulinemia cronica stimola la de novo lipogenesis (DNL) epatica, aumentando la sintesi di acidi grassi a partire dal glucosio, e inibisce la β-ossidazione mitocondriale, riducendo la capacità del fegato di smaltire il surplus lipidico (Kakazu et al., 2025; Yanai et al., 2023). Il risultato è uno squilibrio profondo del metabolismo lipidico, che conduce a lipotossicità: gli intermedi lipidici, quali ceramidi, diacilgliceroli (DAG) e acilcarnitine, esercitano un effetto diretto sulla funzione mitocondriale, inducono stress del reticolo endoplasmatico (ER stress) e promuovono l'apoptosi degli epatociti. L'accumulo cronico di lipidi saturi e ossidati, in un contesto di ridotta capacità antiossidante, favorisce così la transizione dalla steatosi semplice alla steatoepatite (MASH) (Shin et al., 2023).

Lo stress ossidativo rappresenta il punto di convergenza di molti di questi "colpi" patogenetici. L'eccesso di specie reattive dell'ossigeno (ROS) danneggia proteine, lipidi e DNA, determinando alterazioni strutturali e funzionali degli epatociti e attivando la risposta infiammatoria innata. Le cellule di Kupffer, esposte a lipidi ossidati e ad altri segnali di danno, producono citochine proinfiammatorie quali TNF-α, IL-6 e TGF-β, che amplificano l'infiammazione locale e, al tempo stesso, promuovono l'attivazione delle cellule stellate epatiche, principali effettori della fibrogenesi (Svobodová et al., 2025). La progressiva perdita di funzione mitocondriale riduce

ulteriormente la capacità del fegato di neutralizzare i ROS e di sostenere la β-ossidazione, creando un circuito autoperpetuante di stress ossidativo e danno cellulare. In questo contesto, sono state descritte anche mutazioni del DNA mitocondriale – come la variante mt12361A>G – associate a maggiore severità di malattia e a più alto rischio di sviluppo di fibrosi significativa (Lu et al., 2025). Parallelamente, la riduzione dei principali sistemi antiossidanti endogeni, tra cui superossido dismutasi (SOD), catalasi e glutatione perossidasi (GSH-Px), favorisce la perossidazione lipidica e la stabilizzazione del fenotipo infiammatorio-fibrogenico, costituendo un ulteriore passo nella transizione verso MASH (Li et al., 2025).

Negli ultimi anni, un ruolo sempre più centrale è stato attribuito al microbiota intestinale e al cosiddetto asse intestino–fegato. La disbiosi, caratterizzata da un'alterazione qualitativa e quantitativa della flora batterica, determina un aumento della permeabilità intestinale ("leaky gut") con conseguente passaggio di lipopolisaccaridi (LPS) e altri prodotti microbici nel circolo portale. Questi stimoli attivano i recettori Toll-like, in particolare TLR4, espressi sulle cellule di Kupffer e sugli epatociti, inducendo una risposta infiammatoria che contribuisce alla fibrogenesi e alla progressione della malattia (Benedé-Ubieto et al., 2024). Quando tali meccanismi si instaurano in età pediatrica, agiscono in una finestra di vulnerabilità caratterizzata da elevata plasticità metabolica, con il rischio di fissare precocemente traiettorie sfavorevoli di malattia. Contestualmente, le alterazioni del microbiota influenzano la metabolizzazione degli acidi biliari, la produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA) e la generazione di metaboliti pro-infiammatori o potenzialmente tossici, modulando in senso sfavorevole il metabolismo epatico e sistemico (Bergheim & Moreno-Navarrete, 2024). La dieta ipercalorica, ricca di zuccheri semplici e grassi saturi, tipica di molti bambini con obesità, accentua ulteriormente la disbiosi e potenzia la permeabilità intestinale, mentre interventi nutrizionali mirati e l'impiego di probiotici o prebiotici si sono dimostrati in grado di migliorare l'integrità della barriera intestinale e di ridurre alcuni marker infiammatori sistemici e epatici (Hamamah et al., 2024).

In una visione integrata, la MASLD non può quindi essere considerata esclusivamente una malattia epatica, ma una vera e propria condizione sistemica che riflette un'alterazione globale del metabolismo energetico e dell'omeostasi infiammatoria. L'infiammazione cronica a partenza epatica può estendersi a livello sistemico e contribuire a danno vascolare, renale e muscolare, in un processo descritto come "lipotoxic inflammatory spill-over", in cui i mediatori prodotti dal fegato steatosico e infiammato agiscono su organi distanti, amplificando il rischio cardio-renale e metabolico (Sandireddy et al., 2024). In questo contesto, la fibrosi epatica emerge come il principale predittore di prognosi, correlando non solo con le complicanze epatiche (cirrosi, ipertensione portale, epatocarcinoma) ma anche con il rischio cardiovascolare e di mortalità globale (Adinolfi et al., 2025). Modelli recenti descrivono la MASLD come un disturbo epato-metabolico in cui convergono alterazioni del metabolismo lipidico, dello stato ossidativo e della risposta immunitaria, suggerendo che le strategie terapeutiche più efficaci dovranno verosimilmente essere multifattoriali e mirate a diversi nodi della cascata patogenetica (W.-Q. Yang et al., 2025).

Nel loro insieme, questi elementi permettono di interpretare la fisiopatologia della MASLD pediatrica come un continuum che va dal sovraccarico lipidico epatico all'infiammazione cronica e alla fibrosi, innescato da resistenza insulinica e lipotossicità, sostenuto dallo stress ossidativo e dalla disfunzione mitocondriale, amplificato dall'attivazione infiammatoria e dalla fibrogenesi e modulato dalle alterazioni del microbiota e dell'asse intestino–fegato. Tali processi, se non riconosciuti e intercettati precocemente, determinano un rischio elevato di progressione verso MASH e di sviluppo di comorbidità sistemiche in età adulta, rendendo cruciale l'identificazione tempestiva dei fattori di rischio e delle traiettorie patogenetiche individuali.

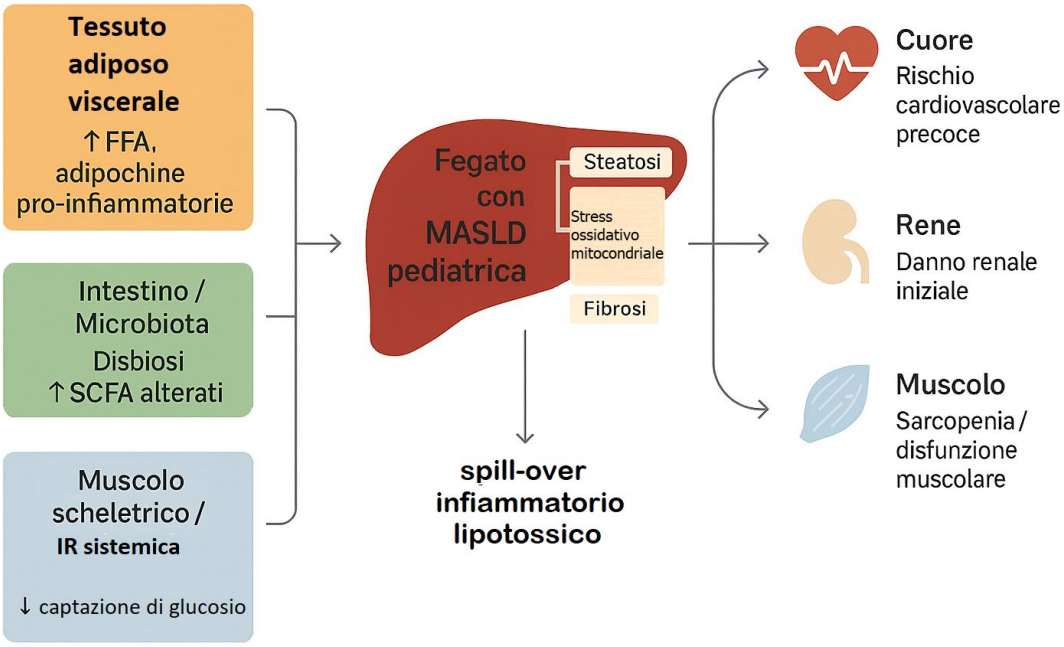


Figura 1 - Fisiopatologia integrata della MASLD pediatrica e "spill-over" infiammatorio lipotossico.

Abbreviazioni: FFA: free fatty acids; SCFA: short-chain fatty acids; IR: insulino-resistenza; MASLD: metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease.

1.8 Storia naturale della MASLD pediatrica

La MASLD in età pediatrica rappresenta una condizione dinamica, caratterizzata da ampi margini di reversibilità nelle fasi iniziali ma anche da un rischio non trascurabile di progressione verso forme infiammatorie (MASH) e fibrotiche nei casi non riconosciuti o non adeguatamente trattati. Pur essendo la conoscenza della storia naturale in età evolutiva ancora più limitata rispetto all'età adulta, i dati disponibili convergono nel riconoscere che la fibrosi epatica costituisce il principale determinante prognostico, anche nei soggetti giovani, e si associa in modo stretto al rischio di complicanze epatiche e cardiometaboliche nel lungo termine (Adinolfi et al., 2025).

Nelle fasi precoci, la steatosi epatica è in larga misura potenzialmente reversibile. Interventi sullo stile di vita che combinano riduzione dell'introito calorico, modifica qualitativa della dieta,

incremento dell'attività fisica e miglioramento della sensibilità insulinica possono condurre a una regressione istologica documentabile, soprattutto in assenza di fibrosi avanzata (Panganiban et al., 2025). In età pediatrica, l'elevata plasticità metabolica fa sì che le oscillazioni ponderali si traducano rapidamente in variazioni del contenuto lipidico epatico: da un lato, una dieta ipercalorica e la sedentarietà determinano un rapido incremento della steatosi intraepatica; dall'altro, una perdita di peso pari a circa il 7–10% del peso corporeo si associa frequentemente a normalizzazione delle transaminasi e a una riduzione significativa del contenuto di grasso epatico, come documentato dalle tecniche di imaging quantitativo (Mullin et al., 2025).

Quando la disfunzione metabolica persiste nel tempo, soprattutto in presenza di obesità viscerale, insulino-resistenza marcata e dislipidemia, il rischio di progressione verso MASH e fibrosi aumenta sensibilmente. I meccanismi patogenetici che sottendono questa evoluzione sono in gran parte sovrapponibili a quelli descritti nell'adulto, ma si sviluppano su tempistiche più lunghe e con una maggiore eterogeneità clinica. La documentazione di fibrosi significativa già in adolescenza, riportata in diversi studi, rappresenta un segnale di allarme rispetto al potenziale evolutivo della malattia (Adinolfi et al., 2025). Tra i principali fattori predittivi di progressione sono stati individuati la gravità della disfunzione metabolica (in particolare la resistenza insulinica e la dislipidemia), l'assetto genetico – con varianti come PNPLA3, TM6SF2 e MBOAT7 che amplificano la suscettibilità al danno epatico indipendentemente dal grado di obesità – e alcune caratteristiche demografiche e ormonali, quali il sesso maschile e la fase puberale, entrambe associate a un peggioramento del profilo metabolico e infiammatorio (Jee et al., 2025).

La disfunzione immunometabolica svolge un ruolo centrale nella transizione dalla steatosi semplice alla steatoepatite. Alterazioni dell'immunità innata, attivazione delle cellule stellate epatiche e produzione di citochine pro-fibrogeniche (TGF-β, IL-1β, TNF-α) sono state descritte anche in età pediatrica, spesso in forma subclinica, e concorrono a stabilizzare il fenotipo infiammatorio-fibrotico (Jee et al., 2025). Nei rari casi pediatrici di progressione avanzata, sono

state riportate forme fibrosanti con pattern istologico "tipo 2", caratterizzato da fibrosi portale e infiammazione lobulare modesta, distinto dal pattern lobulare classico dell'adulto. Ancora più raramente, l'evoluzione può condurre a cirrosi e carcinoma epatocellulare (HCC): sono stati descritti casi isolati in adolescenti con obesità grave, diabete mellito di tipo 2 e genotipo ad alto rischio (ad esempio PNPLA3 omozigote), a testimonianza di come, in presenza di un carico genetico e metabolico particolarmente sfavorevole, la storia naturale della malattia possa accelerare e anticipare complicanze tipiche dell'età adulta (Pîrvu et al., 2025).

La variabilità interindividuale del decorso è ampia e riflette l'interazione complessa tra fattori genetici, ambientali e ormonali. Varianti come PNPLA3 rs738409 e TM6SF2 rs58542926 sono state associate a un incremento del rischio di fibrosi indipendentemente dal BMI, suggerendo che il carico genetico possa modulare il rapporto tra grado di obesità e severità del danno epatico (Bao et al., 2025). La pubertà rappresenta una fase critica, in cui le modificazioni ormonali determinano una ridistribuzione del grasso corporeo, un peggioramento dell'insulino-resistenza e un aumento complessivo del rischio metabolico; in questo contesto, la persistenza di una dieta ipercalorica e della sedentarietà può favorire il passaggio a fenotipi più aggressivi di malattia. Comorbidità frequenti come il diabete mellito di tipo 2, la sindrome metabolica e la sindrome delle apnee ostruttive del sonno (OSAS) agiscono come fattori moltiplicativi di rischio, aggravando il profilo infiammatorio e fibrogenico e contribuendo alla progressione verso danno epatico cronico (Koliaki et al., 2025).

Accanto alle conseguenze strettamente epatiche, la storia naturale della MASLD pediatrica è strettamente intrecciata con le implicazioni extra-epatiche. Già in adolescenza, i soggetti con MASLD mostrano un aumento del rischio di cardiopatia aterosclerotica precoce, documentato dall'ispessimento intimale carotideo e da alterazioni della funzione endoteliale; si osservano inoltre segni iniziali di compromissione renale – come la microalbuminuria – e una tendenza alla sarcopenia o alla riduzione selettiva della massa muscolare, legata alla combinazione di insulino-resistenza, infiammazione cronica e lipotossicità sistemica (Sandireddy et al., 2024).

Queste manifestazioni supportano il concetto di "lipotoxic inflammatory spill-over", secondo cui l'infiammazione e la disfunzione lipidica epatica esercitano effetti diretti su organi periferici e sul metabolismo globale, trasformando la MASLD in un marcatore precoce di rischio cardio-renale e metabolico.

Nel loro insieme, questi elementi delineano una storia naturale caratterizzata da una notevole variabilità, determinata dall'equilibrio tra fattori di rischio metabolici, genetici e ambientali e dalla tempestività dell'intervento terapeutico. Nelle fasi iniziali, la malattia è in larga misura reversibile attraverso modifiche dello stile di vita e correzione della disfunzione metabolica; tuttavia, in presenza di un assetto genetico sfavorevole, di comorbidità metaboliche e di un'esposizione prolungata a obesità e insulino-resistenza, la MASLD può progredire verso MASH, fibrosi avanzata e complicanze extraepatiche. In questa prospettiva, l'identificazione precoce dei determinanti di progressione, mediante una valutazione integrata del profilo metabolico, genetico ed ambientale, rappresenta un obiettivo cruciale per prevenire gli esiti epatici e sistemici in età adulta. Questa variabilità del decorso rende inoltre indispensabile disporre di strumenti diagnostici sensibili e specifici, in grado di identificare precocemente i bambini avviati verso traiettorie di progressione, tema affrontato nei paragrafi successivi. Queste dinamiche sono riassunte schematicamente in Figura 2, che illustra il continuum evolutivo della MASLD pediatrica, le principali finestre di opportunità e i determinanti di progressione.

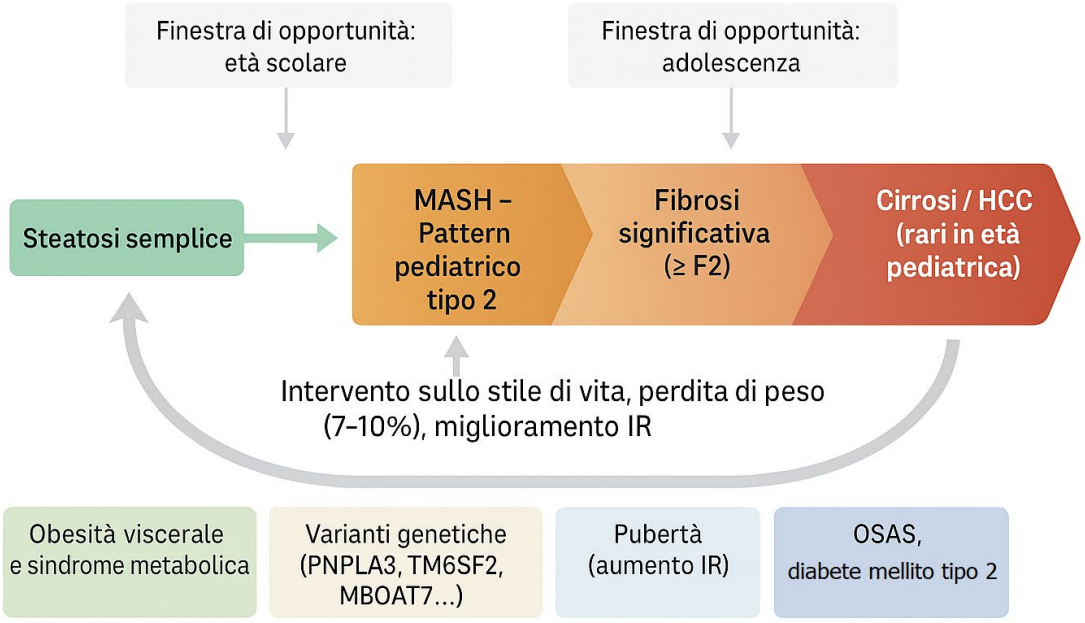


Figura 2 - Storia naturale della MASLD pediatrica.

Abbreviazioni: MASLD = Metabolic dysfunction–Associated Steatotic Liver Disease; MASH = Metabolic dysfunction–Associated Steatohepatitis; IR = insulino-resistenza; HCC = carcinoma epatocellulare; OSAS = sindrome delle apnee ostruttive del sonno.

Categoria	Fattori di progressione	Fattori di regressione o protezione	Fonti principali
Metabolici	Insulino-resistenza, dislipidemia, iperglicemia; aumento di FFA e lipotossicità epatica	Perdita di peso (≈7–10%), miglioramento dell'HOMA-IR, normalizzazione delle transaminasi	Adinolfi et al., 2025; Panganiban et al., 2025
Genetici	Varianti PNPLA3 (rs738409), TM6SF2 (rs58542926), MBOAT7 (rs641738), GCKR (rs1260326) associate a fibrosi precoce	Assenza di polimorfismi ad alto rischio; risposta favorevole e duratura alla terapia comportamentale precoce	Bao et al., 2025; Kanda et al., 2025
Ormonali	Pubertà (testosterone, estrogeni) e sesso maschile: aumento dell'IR e peggioramento del profilo lipidico	Età prepuberale; equilibrio ormonale	(Jee et al., 2025; Koliaki et al., 2025)
Ambientali e comportamentali	Dieta ipercalorica, eccesso di zuccheri/fruttosio, sedentarietà, apnee ostruttive del sonno (OSAS)	Dieta equilibrata, attività fisica regolare, riduzione di fruttosio e grassi saturi	Mullin et al., 2025; Sandireddy et al., 2024
Epigenetici / Microbiota	Disbiosi intestinale, aumento della permeabilità ("leaky gut") ed endotossinemia metabolica; stress ossidativo cronico	Microbiota eubiotico, alimentazione ricca in fibre e polifenoli, assenza di endotossiemia	Benedé-Ubieto et al., 2024; Hamamah et al., 2024

Tabella 1 – Principali determinanti di progressione e regressione nella storia naturale della MASLD pediatrica

1.9 Diagnostica: dalla clinica all'imaging avanzato

La diagnosi di MASLD in età pediatrica si basa su un approccio integrato che combina valutazione clinico-laboratoristica e metodiche di imaging non invasivo. La biopsia epatica rappresenta tuttora il "gold standard" per la caratterizzazione istologica della malattia e per la stadiazione della fibrosi, ma il suo impiego è limitato ai casi selezionati, in considerazione dell'invasività e delle possibili complicanze, e non è indicato nello screening di popolazione. Di conseguenza, la ricerca recente si è focalizzata sull'ottimizzazione di biomarcatori surrogati e strumenti quantitativi di imaging per identificare precocemente i soggetti a rischio e monitorare nel tempo l'evoluzione della malattia (Yodoshi, 2024).

1.9.1 Valutazione clinico-laboratoristica

Nella pratica clinica pediatrica, il percorso diagnostico inizia con un'anamnesi accurata (storia ponderale, abitudini alimentari, livello di attività fisica, familiarità per diabete e malattie metaboliche) e con un esame obiettivo completo, che includa la rilevazione sistematica dei parametri antropometrici (BMI, circonferenza vita) e della pressione arteriosa. Questi elementi sono fondamentali per definire il profilo di rischio metabolico e inquadrare il sospetto di MASLD nel contesto più ampio della disfunzione cardiometabolica (Sood et al., 2024).

Sul versante biochimico, l'alanina-aminotransferasi (ALT) rimane il marker di laboratorio più utilizzato come indicatore di danno epatocellulare. La sua sensibilità nello screening della steatosi epatica è tuttavia limitata: fino al 25–30 % dei bambini con steatosi significativa presenta valori di ALT nei limiti di normalità, soprattutto nelle forme lievi o nelle fasi iniziali della malattia (Yodoshi, 2024). Per migliorare le performance diagnostiche, la NASPGHAN suggerisce l'adozione di cut-off pediatrici inferiori rispetto all'età adulta (≥26 U/L per i maschi e ≥22 U/L per le femmine), in modo da aumentare la sensibilità a scapito di una moderata riduzione della specificità (Vos et al., 2017). Tali soglie trovano ulteriore conferma nei percentili pediatrici di riferimento per ALT, AST e GGT proposti da (Bussler et al., 2018), che hanno definito intervalli fisiologici specifici per età, sesso, BMI e stadio puberale. Secondo questo studio, il 95° percentile di ALT varia da circa 22 U/L nelle bambine in età prepuberale fino a 30 U/L nei maschi adolescenti, valori coerenti con le raccomandazioni NASPGHAN.

Negli ultimi anni è emerso come l'impiego combinato di enzimi epatici e marcatori di disfunzione metabolica possa migliorare la discriminazione dei casi di MASLD rispetto all'uso isolato dell'ALT. In particolare, la determinazione dell'insulina a digiuno, del rapporto HOMA-IR, del profilo lipidico (trigliceridi, HDL, LDL) e della glicemia a digiuno o dopo carico orale di glucosio consente di identificare con maggiore accuratezza i bambini con epatopatia steatosica in un contesto di sindrome metabolica. Lo studio di Huneault e collaboratori ha evidenziato che

l'associazione tra insulina a digiuno e ALT incrementa significativamente la capacità diagnostica per MASLD nei bambini obesi (AUROC 0,88 vs 0,71 per la sola ALT), sottolineando il valore di una lettura integrata dei parametri epatici e metabolici (Huneault et al., 2024).

Gli score sierologici di fibrosi sviluppati in ambito adulto, come il FIB-4 e il NAFLD Fibrosis Score, mostrano invece importanti limitazioni quando applicati alla popolazione pediatrica, poiché includono variabili (età, piastrine, AST/ALT ratio) che non riflettono in modo accurato la fisiologia dell'età evolutiva e rischiano di sovra- o sottostimare il rischio fibrotico nei bambini (Yodoshi, 2024). Sono in corso diversi tentativi di sviluppo di modelli predittivi specifici per l'età pediatrica, ma nessun punteggio ha finora raggiunto un livello di validazione esterna tale da consentirne l'adozione routinaria.

1.9.2 Ecografia epatica convenzionale

L'ecografia addominale in B-mode rappresenta, ad oggi, il primo livello di indagine strumentale per la rilevazione di steatosi epatica in età pediatrica. Si tratta di una metodica non invasiva, ampiamente disponibile, priva di radiazioni ionizzanti e relativamente economica, che la rende particolarmente adatta come test di screening nei bambini con obesità, sindrome metabolica o altri fattori di rischio per MASLD (Y. Lin et al., 2025).

La diagnosi ecografica di steatosi si basa sulla valutazione qualitativa dell'ecogenicità epatica e del rapporto di contrasto rispetto alle strutture circostanti (principalmente il rene destro), nonché sulla visibilità dei vasi intraepatici e del diaframma. La sensibilità dell'ecografia convenzionale cala tuttavia sensibilmente quando il contenuto di grasso epatico è inferiore al 20%, e la metodica è fortemente operatore-dipendente, con assenza di criteri standardizzati di gradazione (Feng et al., 2023). Nonostante ciò, mantiene un ruolo centrale come strumento di screening iniziale, soprattutto se interpretata in associazione con i dati clinici e biochimici, e può indirizzare verso l'impiego di metodiche quantitative di secondo livello o di elastografia per la valutazione della fibrosi.

1.9.3 Tecniche ecografiche quantitative

Per superare la natura qualitativa e operatore-dipendente dell'ecografia convenzionale, negli ultimi anni sono state sviluppate varie metodiche ecografiche quantitative per la valutazione della steatosi epatica. Tra queste, l'Hepato-Renal Index (HRI), il Controlled Attenuation Parameter (CAP) e le tecniche basate su *backscatter* o *attenuation imaging* rappresentano gli strumenti più promettenti.

L'HRI si basa sul confronto dell'ecogenicità del parenchima epatico con quella del rene destro, calcolando un rapporto numerico che riflette in maniera più oggettiva la quantità di grasso intraepatico. Studi pediatrici hanno documentato una buona correlazione tra HRI e MRI-PDFF, nonché una riproducibilità inter-osservatore soddisfacente; tuttavia, la diffusione clinica di questa metodica è ancora limitata dalla disponibilità di software dedicati e dalla mancanza di curve di riferimento specifiche per età e sesso in età evolutiva (Q. Liu et al., 2025).

Tra le metodiche emergenti, l'Ultrasound-Guided Attenuation Parameter (UGAP) ha mostrato prestazioni elevate nello studio della steatosi, con un'AUC pari a 0,91 per la diagnosi di steatosi ≥ S1 rispetto a MRI-PDFF, assumendo quest'ultima come standard di riferimento (Huang et al., 2025). Tecniche analoghe basate sulla quantificazione dell'attenuazione ultrasonografica offrono il vantaggio di fornire misure continue e potenzialmente standardizzabili, più adatte al monitoraggio longitudinale della malattia e alla valutazione della risposta agli interventi sullo stile di vita o alle terapie farmacologiche. Nel complesso, queste tecniche rappresentano un'evoluzione importante rispetto all'ecografia convenzionale, ma necessitano ancora di ampia validazione pediatrica e della definizione di cut-off specifici per età, sesso e BMI prima di poter essere integrate in algoritmi diagnostici di routine.

1.9.4 Elastografia e imaging RM

La valutazione non invasiva della fibrosi epatica riveste un ruolo cruciale nella stratificazione prognostica dei bambini con MASLD, poiché la presenza e il grado di fibrosi costituiscono il

principale determinante del rischio di complicanze epatiche a lungo termine. Le tecniche di elastografia, sia *transient* (come FibroScan®) sia *shear-wave* (point e 2D-SWE), consentono di misurare in modo non invasivo la rigidità epatica, che correla in maniera significativa con lo stadio di fibrosi istologica.

In ambito pediatrico, diversi studi hanno dimostrato una buona accuratezza diagnostica dell'elastografia per l'identificazione di fibrosi significativa (≥ F2), con valori di AUC superiori a 0,85, pur evidenziando la necessità di definire cut-off specifici che tengano conto dell'età, del BMI e di eventuali condizioni concomitanti (infiammazione acuta, congestione) (Hudson et al., 2024). Per questi motivi, le linee di consenso più recenti indicano l'elastografia come strumento di secondo livello nei bambini con steatosi documentata e/o alterazioni biochimiche persistenti, con particolare utilità per selezionare i casi in cui la biopsia possa essere indicata.

La risonanza magnetica con Proton Density Fat Fraction (MRI-PDFF) e la spettroscopia protonica (^{1}H-MRS) rappresentano il gold standard non invasivo per la quantificazione della frazione di grasso epatico. Entrambe le metodiche presentano un'elevata sensibilità e specificità nel rilevare anche modesti aumenti del contenuto lipidico intraepatico e consentono una quantificazione altamente riproducibile, rendendole strumenti ideali per studi clinici e di ricerca. Tuttavia, l'elevato costo, la durata dell'esame, la necessità di sedazione in alcuni bambini e la limitata disponibilità di apparecchiature e software dedicati ne riducono l'impiego nei programmi di screening su larga scala in età pediatrica (Tacke et al., 2024). I documenti di consenso più recenti sottolineano quindi il ruolo di MRI-PDFF e ^{1}H-MRS principalmente in contesti di ricerca o in casi selezionati, in cui sia necessario chiarire la diagnosi o approfondire il grado di coinvolgimento epatico. Nel complesso, l'approccio diagnostico alla MASLD pediatrica si basa su un modello gerarchico che combina indicatori clinici e biochimici, ecografia (con eventuali estensioni quantitative) ed elastografia o MRI-based per la stratificazione del rischio fibrotico e la selezione dei casi da sottoporre a biopsia o a follow-up intensivo. L'algoritmo diagnostico proposto è sintetizzato in Figura 3.

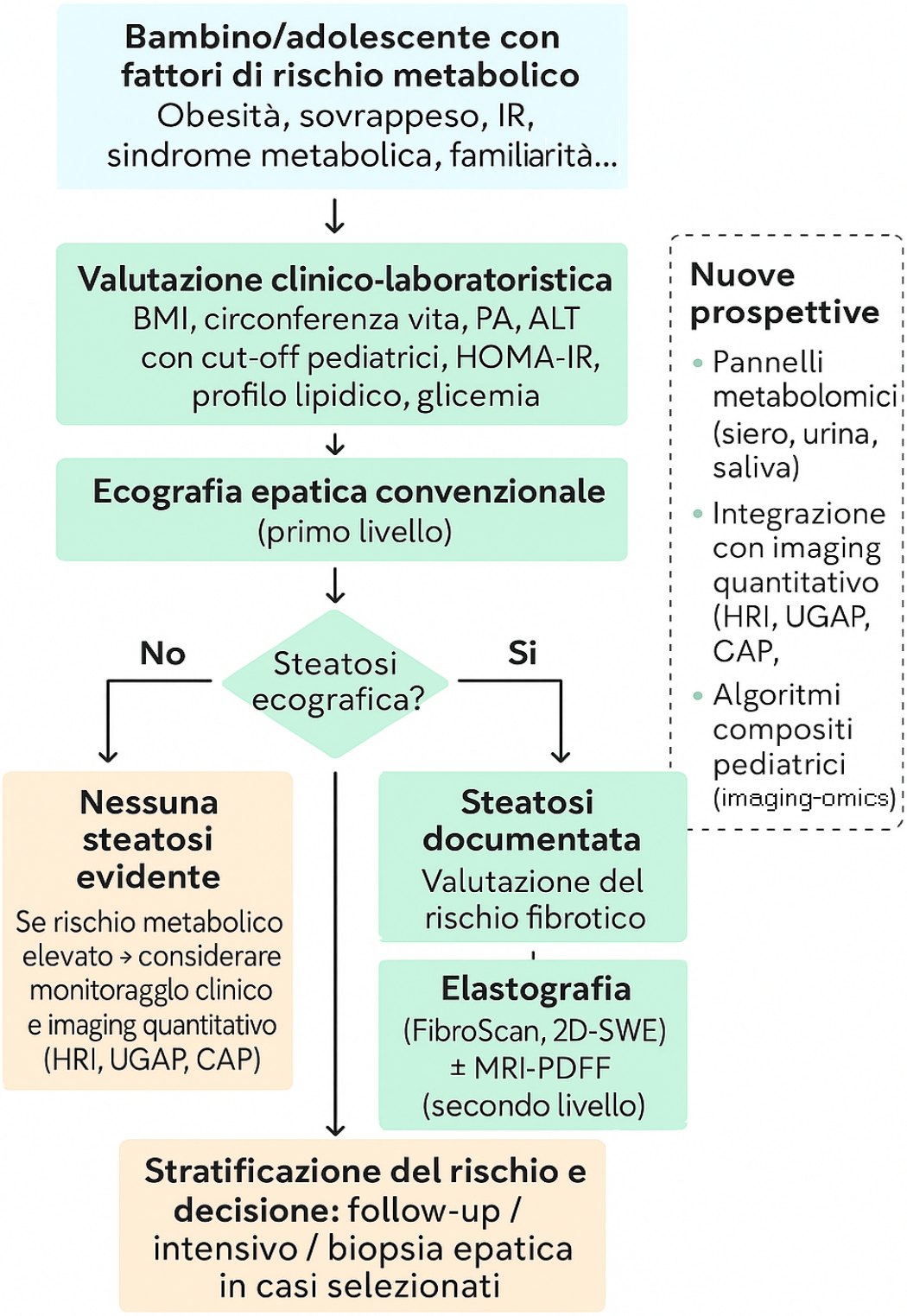


Figura 3 - Percorso diagnostico non invasivo per la MASLD pediatrica e prospettive future.

Abbreviazioni: PA = pressione arteriosa; IR = insulino-resistenza; HOMA-IR = Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance; HRI = Hepato-Renal Index; UGAP = Ultrasound-Guided Attenuation Parameter; CAP = Controlled Attenuation Parameter; MRI-PDFF = Magnetic Resonance Imaging–Proton Density Fat Fraction; MASLD = Metabolic dysfunction–Associated Steatotic Liver Disease.

1.10 Biomarcatori non invasivi e approcci "-omici"

Negli ultimi anni la ricerca sulla MASLD in età pediatrica si è progressivamente orientata verso l'identificazione di biomarcatori non invasivi in grado di colmare il divario tra semplici test biochimici e metodiche di imaging avanzato. L'obiettivo è duplice: da un lato migliorare l'identificazione precoce dei bambini con steatosi epatica e disfunzione metabolica, dall'altro affinare la stratificazione del rischio evolutivo senza ricorrere sistematicamente alla biopsia epatica. In questo contesto, gli approcci "-omici" – in particolare metabolomica, lipidomica e proteomica – consentono di caratterizzare in modo integrato il profilo biochimico sistemico associato al danno epatico e alla disfunzione metabolica, offrendo una "firma molecolare" delle diverse fasi di malattia e dei differenti fenotipi clinici (Bourganou et al., 2025).

1.10.1 Metabolomica sierica e urinaria

La metabolomica sierica e urinaria rappresenta attualmente l'approccio "-omico" più ampiamente utilizzato nello studio della MASLD, sia in ambito adulto sia pediatrico. Attraverso tecniche ad alta risoluzione (NMR, LC-MS, GC-MS) è possibile quantificare in modo simultaneo centinaia di metaboliti e delineare profili metabolici distintivi associati alla steatosi, alla steatoepatite e alla fibrosi. Alterazioni nei livelli di aminoacidi a catena ramificata (BCAA), aminoacidi aromatici, acilcarnitine, acidi grassi liberi, intermedi del ciclo di Krebs e biomarcatori dello stress ossidativo sono state ripetutamente correlate alla presenza di steatosi e infiammazione epatica, confermando il legame stretto tra metabolismo energetico, lipotossicità e danno epatocitario (Tan et al., 2024).

In età pediatrica, Huneault e colleghi (Huneault et al., 2024) hanno proposto un pannello metabolomico sierico validato in bambini con MASLD, che combina marker di lipotossicità, aminoacidi aromatici e metaboliti coinvolti nel metabolismo energetico. Questo pannello ha mostrato un'elevata capacità discriminante nell'identificare i soggetti con steatosi significativa, con valori di AUC superiori a 0,85, superiori a quelli ottenuti con i soli marcatori biochimici

tradizionali. In parallelo, Du e collaboratori (Du et al., 2025) hanno descritto una stretta interazione tra composizione del microbiota intestinale e profilo metabolico sierico, evidenziando come acidi biliari secondari, acidi grassi a catena corta (SCFA) e altri metaboliti derivati dal microbiota si correlino con la gravità della steatosi e con la presenza di disfunzione metabolica sistemica. Questi dati rafforzano il concetto di asse intestino–fegato non solo sul piano fisiopatologico, ma anche come potenziale fonte di nuovi biomarcatori combinati di origine microbica e ospite.

Nel contesto italiano, lo studio di Masarone (Masarone et al., 2021) ha mostrato che un approccio metabolomico *untargeted* è in grado di discriminare i diversi stadi di NAFLD/MASLD – dalla steatosi semplice alla steatoepatite fino alla cirrosi – identificando pattern distinti di acidi grassi, intermedi ossidativi e metaboliti del ciclo degli acidi tricarbossilici associati alla progressione del danno epatico. Sebbene condotto principalmente in popolazioni adulte, questo lavoro ha fornito un importante *proof-of-concept* sulla capacità della metabolomica di cogliere le transizioni tra i diversi stadi di malattia, concetto potenzialmente trasferibile anche alle coorti pediatriche (Huneault et al., 2024; Masarone et al., 2021).

In prospettiva pediatrica, la metabolomica urinaria si configura come una frontiera particolarmente promettente. L'urina rappresenta infatti una matrice facilmente accessibile, non invasiva e ben accettata dai bambini, che riflette in modo integrato le alterazioni del metabolismo energetico, ossidativo e dell'escrezione di metaboliti derivati dal microbiota. Studi recenti suggeriscono che specifici pattern urinari di acidi organici, BCAA e metaboliti dello stress ossidativo possano essere associati alla presenza e alla severità della disfunzione epato-metabolica, aprendo alla possibilità di sviluppare test di screening basati su pannelli urinari in grado di identificare precocemente i bambini a maggior rischio di MASLD (Accacha et al., 2025).

1.10.2 Metabolomica salivare

La saliva è emersa come una biomatrice ideale per lo studio di biomarcatori metabolici in età pediatrica, grazie alla semplicità di raccolta, alla possibilità di ripetere i campionamenti nel tempo e all'elevata accettabilità nei bambini e negli adolescenti. Dal punto di vista biochimico, la saliva contiene una vasta gamma di metaboliti di origine sia sistemica sia locale, che possono riflettere in modo indiretto lo stato metabolico dell'organismo.

Il primo studio sistematico a esplorare la metabolomica salivare in bambini con obesità e NAFLD è stato condotto dal nostro gruppo di ricerca (Troisi et al., 2019), che ha identificato un profilo salivare distintivo caratterizzato da alterazioni dei BCAA, dei corpi chetonici, degli zuccheri ridotti e di marcatori di stress ossidativo, in parallelo a insulino-resistenza e dislipidemia. Questo lavoro ha fornito una solida prova di concetto che la saliva possa fungere da biomatrice surrogata per la disfunzione metabolica sistemica e per la presenza di steatosi epatica, ponendo le basi per l'utilizzo della metabolomica salivare nella diagnosi non invasiva della MASLD.

Queste evidenze aprono scenari di grande interesse per l'età pediatrica, in cui la metabolomica salivare potrebbe essere impiegata come strumento di screening "pre-ecografico": pannelli salivari ad alta sensibilità potrebbero consentire di selezionare i bambini da avviare a indagini di imaging, riducendo il numero di ecografie inutili nei soggetti a basso rischio e concentrando le risorse diagnostiche sui profili metabolici più suggestivi di MASLD. Inoltre, la possibilità di ripetere facilmente i prelievi salivari rende questa matrice particolarmente adatta al monitoraggio longitudinale della risposta a interventi dietetici, programmi di attività fisica o terapie farmacologiche.

1.10.3 Integrazione tra imaging e metabolomica

L'integrazione tra biomarcatori metabolici e metodiche di imaging quantitativo rappresenta uno dei filoni più innovativi e promettenti nella diagnostica della MASLD pediatrica. Il concetto di

"imaging-omics" si basa sulla combinazione di parametri strutturali derivati dall'imaging (ad esempio l'Hepato-Renal Index, l'attenuation imaging o il CAP) con profili metabolomici sierici, urinari o salivari, al fine di ottenere un modello composito in grado di descrivere simultaneamente la dimensione "morfologica" e quella "funzionale" della malattia (Hernandez et al., 2025).

Studi recenti suggeriscono che l'integrazione di HRI o di altri indici ecografici quantitativi con pannelli metabolomici selezionati possa migliorare in modo significativo l'accuratezza nell'identificare la steatosi subclinica e nel discriminare i diversi gradi di severità della malattia, anche in presenza di enzimi epatici normali (Huneault et al., 2024). In questa prospettiva, i dati di imaging forniscono una misura diretta del contenuto di grasso epatico e, in parte, della fibrosi, mentre la metabolomica aggiunge informazioni sullo stato del metabolismo energetico, sulla lipotossicità, sullo stress ossidativo e sull'interazione con il microbiota. La combinazione di queste due dimensioni consente di costruire algoritmi predittivi più robusti, potenzialmente in grado di predire la progressione verso MASH e fibrosi significative e di personalizzare il follow-up sulla base del profilo di rischio individuale.

In prospettiva, l'insieme delle evidenze disponibili indica che la metabolomica – in particolare quella sierica, urinaria e salivare – in combinazione con metodiche di imaging quantitativo rappresenta una delle strategie più promettenti per la diagnosi precoce, la stratificazione del rischio e il monitoraggio longitudinale della MASLD pediatrica. L'utilizzo di matrici non invasive come saliva e urina apre la possibilità di sviluppare programmi di screening su larga scala, mentre l'integrazione "imaging-omics" potrebbe consentire, in futuro, di ridurre ulteriormente il ricorso alla biopsia epatica e di orientare interventi terapeutici sempre più mirati sui profili metabolici e strutturali specifici di ciascun bambino.

Tabella 2 - Categorie di biomarcatori metabolici non invasivi nella MASLD pediatrica e loro potenziale applicazione clinica.

Categoria di biomarcatori	Biomarcatori / Metaboliti chiave	Alterazioni tipiche nella MASLD pediatrica	Potenziale utilità clinica	Fonti principali (APA)
Metabolomica sierica (pannelli compositi)	Pannelli combinati di lipidi, aminoacidi, acilcarnitine, marker di stress ossidativo	Firme metaboliche caratteristiche associate a steatosi moderata–grave e disfunzione insulino-resistente	Diagnosi non invasiva di MASLD; identificazione di bambini con steatosi significativa e rischio aumentato di MASH/fibrosi	Huneault et al., 2024
Metabolomica sierica (untargeted)	Profili globali di lipidi, acidi grassi e intermedi ossidativi	Pattern distinti lungo il continuum steatosi–steatoepatite–fibrosi, con progressivo incremento di lipidi ossidati e marker di stress ossidativo	Stratificazione del rischio istologico; supporto alla distinzione tra steatosi semplice, MASH e fibrosi avanzata	Masarone et al., 2021
Profilo aminoacidico	Aminoacidi a catena ramificata (BCAA), aminoacidi aromatici, metaboliti del ciclo di Krebs	Aumento di BCAA e aminoacidi aromatici, alterazioni del metabolismo energetico mitocondriale correlate a IR e severità della steatosi	Marker di disfunzione metabolica sistemica; possibile impiego per predire MASH e risposta agli interventi sullo stile di vita	Tan et al., 2024
Acidi grassi e lipotossicità	Acidi grassi liberi, acilcarnitine, metaboliti derivati da β-ossidazione incompleta	Incremento di FFA e acilcarnitine, indicativo di surplus lipidico, β-ossidazione inefficiente e lipotossicità epatica	Valutazione del carico lipotossico e del rischio di progressione; potenziale target per strategie terapeutiche mirate	(Du et al., 2025)
Metabolomica urinaria	Metaboliti del metabolismo energetico, derivati ossidativi, prodotti del microbiota	Alterazioni di metaboliti legati a stress ossidativo, disfunzione mitocondriale e interazione con microbiota intestinale	Screening non invasivo; monitoraggio longitudinale in programmi di prevenzione e follow-up di bambini a rischio	(Accacha et al., 2025)
Metabolomica salivare	Aminoacidi ramificati, chetoni, zuccheri ridotti, marker di stress ossidativo	Profilo salivare caratteristico in bambini obesi con NAFLD/MASLD, parallelo a IR e alterazioni lipidiche	Biomatrice facilmente accessibile per screening pre-imaging e follow-up; potenziale strumento di stratificazione del rischio in età pediatrica	(Troisi et al., 2019)

Imaging-omics integrata	Combinazione di parametri di imaging quantitativo (es. HRI, attenuation imaging) e pannelli metabolomici	Correlazione tra carico lipidico epatico misurato con imaging e profili metabolomici sierici/salivari	Algoritmi integrati di diagnosi e stratificazione del rischio (steatosi subclinica, progressione verso MASH); monitoraggio della risposta a interventi dietetici o farmacologici	(Hernandez et al., 2025)

1.11 Limiti delle strategie attuali nella diagnosi di MASLD pediatrica

Nonostante i progressi nella comprensione fisiopatologica della MASLD, la diagnosi in età pediatrica rimane complessa e, in larga misura, insoddisfacente. Le strategie attualmente disponibili derivano per lo più da strumenti concettualizzati e validati nell'adulto, con un adattamento solo parziale alle peculiarità dell'età evolutiva e una limitata validazione specifica nei bambini.

Come discusso nel paragrafo 1.8, i tradizionali marcatori biochimici di danno epatico (ALT, AST, GGT) presentano sensibilità e specificità modeste, soprattutto nelle forme lievi di steatosi, e non consentono di distinguere in modo affidabile i diversi gradi di severità di malattia (Tacke et al., 2024). Nei bambini, la variabilità interindividuale dei valori di riferimento, legata ad età, sesso e stadio puberale, riduce ulteriormente la capacità discriminativa di questi parametri e rende problematico definire cut-off universalmente applicabili. Di conseguenza, una quota non trascurabile di soggetti con MASLD può presentare enzimi epatici nei limiti di norma e sfuggire a qualunque strategia di screening basata prevalentemente sull'ALT.

In modo analogo, l'ecografia convenzionale – pur rappresentando lo strumento di primo livello più utilizzato per l'identificazione della steatosi epatica – è gravata da una marcata dipendenza dall'operatore e da una sensibilità ridotta per accumuli lipidici inferiori al 20%, con rischio di sottostimare le forme iniziali o subcliniche (Panganiban et al., 2025). Le tecniche di imaging avanzato, quali elastografia transiente, shear-wave elastography e MRI-PDFF, garantiscono una

migliore accuratezza nella valutazione della fibrosi e del contenuto lipidico epatico, ma sono gravate da costi elevati, limitata disponibilità e scarsa praticabilità per programmi di screening su larga scala in età evolutiva, come evidenziato da Munk Lauridsen e colleghi (Munk Lauridsen et al., 2025). Questo quadro si traduce in un utilizzo prevalentemente selettivo e di secondo livello, più che in uno strumento sistematico di identificazione precoce.

Anche i biomarcatori compositi e gli score non invasivi sviluppati nell'adulto (FIB-4, NAFLD Fibrosis Score, ELF test) mostrano limiti significativi quando applicati alla popolazione pediatrica. Le formule disponibili includono variabili (in particolare età, piastrine e parametri biochimici) la cui distribuzione fisiologica differisce profondamente tra bambini e adulti, e per le quali non sono stati ancora definiti in modo condiviso cut-off specifici per età e sesso. Le evidenze correnti indicano che tali score non possono essere trasferiti direttamente all'età pediatrica senza adeguata ricalibrazione e validazione esterna (Ganakumar et al., 2025). A ciò si aggiunge il fatto che, nella pratica clinica quotidiana, la diagnosi di MASLD è spesso ostacolata dall'assenza di criteri operativi uniformi per definire la "disfunzione metabolica" in età evolutiva, elemento cardine della nuova nomenclatura ma tuttora privo di una codifica pediatrica univocamente accettata.

In risposta a questi limiti, negli ultimi anni si è consolidata la necessità di sviluppare strumenti diagnostici non invasivi e integrativi, capaci di intercettare precocemente le alterazioni metaboliche sistemiche che accompagnano la malattia epatica. Come illustrato nel paragrafo 1.10, gli approcci "-omici" – in particolare la metabolomica applicata a matrici biologiche facilmente accessibili come siero, urina e saliva – emergono come una delle prospettive più promettenti. La caratterizzazione dei profili metabolici ha permesso di identificare pannelli associati alla presenza e alla severità della MASLD, suggerendo la possibilità di disporre di firme metaboliche specifiche per le diverse fasi della malattia (Bourganou et al., 2025).

In questo contesto, Huneault e collaboratori hanno validato in ambito pediatrico un pannello metabolomico in grado di discriminare con elevata accuratezza i bambini con MASLD, proponendolo come potenziale strumento di diagnosi non invasiva e di stratificazione del rischio (Huneault et al., 2024). L'integrazione di tali biomarcatori metabolici con le metodiche ecografiche quantitative discusse nei paragrafi precedenti apre la strada a modelli diagnostici multifattoriali, nei quali il dato biochimico "profondo" e l'informazione strutturale ottenuta dall'imaging si completano a vicenda.

Nel complesso, le evidenze disponibili indicano che le strategie attuali, basate su enzimi epatici, ecografia convenzionale e score derivati dall'adulto, non sono sufficienti a rispondere alle esigenze di diagnosi precoce e di stratificazione accurata della MASLD pediatrica. La futura diagnostica in età evolutiva dovrà verosimilmente fondarsi su algoritmi integrati, in grado di combinare parametri clinico-metabolici, imaging quantitativo e biomarcatori "-omici", adattati alle specificità biologiche e auxologiche del bambino, con l'obiettivo di superare i limiti delle metodiche tradizionali e di intercettare precocemente le traiettorie di progressione verso MASH e fibrosi significativa. In questo scenario, l'esplorazione di pannelli metabolomici su matrici non invasive, integrati con misure quantitative di steatosi, rappresenta una strategia promettente per sviluppare strumenti di screening pediatrici più accurati, tema centrale dei capitoli successivi.

Capitolo 2. Metodi

2.1 Disegno dello studio

Lo studio è stato progettato come studio osservazionale monocentrico, trasversale e descrittivo, finalizzato a valutare la presenza di steatosi epatica in una popolazione pediatrica distinta per stato ponderale e a identificare potenziali biomarcatori metabolomici non invasivi in saliva e urina.

L'approccio metodologico ha integrato dati clinici, antropometrici ed ecografici qualitativi con analisi metabolomiche untargeted, al fine di esplorare le relazioni tra stato metabolico sistemico e alterazioni epatiche subcliniche. La diagnosi ecografica di steatosi si è basata esclusivamente sulla valutazione esperta del radiologo, espressa in forma dicotomica (presente/assente).

Il disegno trasversale ha consentito di ottenere una rappresentazione puntuale ("fotografica") della distribuzione delle variabili di interesse nella popolazione in studio, fornendo una base metodologica solida per future indagini longitudinali di conferma e validazione.

Tutte le attività sperimentali e di raccolta dati si sono svolte presso il Dipartimento di Pediatria dell'Azienda Ospedaliera Universitaria "San Giovanni di Dio e Ruggi D'Aragona" di Salerno, in un arco temporale complessivo di 24 mesi.

2.2 Popolazione in studio

Sono stati reclutati bambini e adolescenti di età compresa tra 5 e 16 anni, nell'ambito di attività di informazione e screening nutrizionale condotte presso istituti scolastici e centri sportivi del territorio.

I partecipanti sono stati classificati in base all'indice di massa corporea (BMI), calcolato come peso (kg)/altezza^2 (m^2) e confrontato con i percentili di riferimento dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) per età e sesso, secondo le curve di crescita sviluppate da de Onis e adottate nelle *WHO Growth References* per bambini e adolescenti (De Onis, 2007).

In base a tali cut-off, i soggetti sono stati suddivisi in tre categorie ponderali:

- Normopeso (NW): BMI < 85° percentile
- Sovrappeso (OW): 85° ≤ BMI < 95° percentile
- Obeso (OB): BMI ≥ 95° percentile

Questa classificazione è coerente con le raccomandazioni internazionali più recenti, inclusi gli standard dell'International Obesity Task Force (Cole & Lobstein, 2012), garantendo la comparabilità dei dati con studi europei e globali.

2.2.1 Criteri di inclusione

La partecipazione è stata subordinata alla firma del consenso informato da parte dei genitori o dei tutori legali, previo colloquio informativo volto a illustrare obiettivi, modalità e finalità dello studio, nonché a garantire la piena comprensione del protocollo.

2.2.2 Criteri di esclusione

Sono stati esclusi i soggetti con:

- patologie croniche o acute non correlate all'obesità (ad esempio endocrinopatie, malattie autoimmuni, epatopatie croniche diverse da MASLD o sindromi genetiche note);
- patologie del cavo orale potenzialmente interferenti con la raccolta salivare (stomatiti, carie attive, gengiviti acute);
- assunzione recente (≤ 6 mesi) di farmaci epatotossici o di integratori capaci di interferire con il metabolismo epatico;
- impossibilità di completare le indagini previste dal protocollo sperimentale.

L'arruolamento è stato effettuato in maniera consecutiva fino al raggiungimento del campione stimato necessario a garantire un'adeguata potenza statistica per le analisi previste.

2.3 Classificazione ponderale e valutazione della pressione arteriosa

Per ogni partecipante sono stati rilevati peso, altezza e circonferenza vita mediante strumenti tarati, in condizioni standardizzate (assenza di scarpe e con abiti leggeri). L'indice di massa corporea (BMI) è stato calcolato come:

$$\text{BMI} = \frac{\text{peso (kg)}}{\text{altezza (m)}^2}$$

I valori di altezza, peso, BMI e circonferenza addominale sono stati trasformati in z-score utilizzando le curve di crescita dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) per età e sesso, secondo le procedure descritte nel documento metodologico del 2007 (De Onis, 2007).

Per ciascun parametro antropometrico, lo z-score è stato calcolato come differenza tra il valore osservato e la media di riferimento, divisa per la deviazione standard del riferimento per età e sesso:

$$z = \frac{X - \mu}{\sigma}$$

Ai fini della classificazione ponderale, i soggetti sono stati categorizzati sulla base dei percentili di BMI per età e sesso, utilizzando i cut-off convenzionali (Cole & Lobstein, 2012):

- Normopeso (NW): BMI < 85° percentile
- Sovrappeso (OW): 85° ≤ BMI < 95° percentile
- Obeso (OB): BMI ≥ 95° percentile

Tale classificazione è stata utilizzata come variabile categoriale di riferimento per le analisi comparative e per lo studio dell'associazione con la steatosi epatica e i profili metabolomici.

2.3.1 Calcolo degli z-score della pressione arteriosa

La pressione arteriosa sistolica e diastolica è stata misurata in condizioni standardizzate (posizione seduta, dopo alcuni minuti di riposo, utilizzando bracciali adeguati alla circonferenza del braccio).

Per ciascun soggetto sono stati ricavati i percentili di pressione arteriosa (PA) per età, sesso e altezza utilizzando:

- le tabelle di riferimento per bambini normopeso pubblicate da Rosner (Rosner et al., 2008);
- come recepite e sintetizzate nelle *Linee guida della American Academy of Pediatrics (AAP)* per la diagnosi e la gestione dell'ipertensione in età pediatrica (Flynn et al., 2017).

A partire dai percentili così ottenuti, la PA è stata espressa come z-score rispetto alla distribuzione di riferimento.

2.3.2 Trasformazione percentile → z-score

Quando per un soggetto era disponibile un percentile numerico (ad esempio 50°, 75°, 90°, 95°), lo z-score della PA è stato calcolato assumendo una distribuzione normale dei valori di riferimento e applicando la trasformazione:

$$z = \Phi^{-1}(\frac{p}{100})$$

dove:

- pè il percentile di PA,
- Φ^{-1}è la funzione inversa della distribuzione normale standard.

Corrispondenze indicative:

$$\begin{aligned} 50^{\circ} &\quad \Rightarrow z \approx 0 \\ 90^{\circ} &\Rightarrow z \approx +1.28 \\ 95^{\circ} &\Rightarrow z \approx +1.64 \\ 99^{\circ} &\Rightarrow z \approx +2.33 \end{aligned}$$

Per quanto riguarda gli individui con valori di PA oltre il 99° percentile (indicati nelle tabelle come ≥99°), lo z-score è stato stimato assumendo una distribuzione approssimativamente

normale dei valori di riferimento e utilizzando i percentili 5° e 95° per età e sesso per derivare media (μ) e deviazione standard (σ):

$$\mu \approx \frac{P_5 + P_{95}}{2} \text{e} \sigma \approx \frac{P_{95} - P_5}{2 \times 1.645}$$

Il valore osservato di PA è stato quindi trasformato in z-score come:

$$z = \frac{\text{PA}_{\text{osservata}} - \mu}{\sigma}$$

In questo modo, gli z-score di pressione arteriosa sistolica e diastolica risultano espressi in deviazioni standard rispetto alla popolazione pediatrica di riferimento, consentendo un confronto omogeneo tra soggetti con età e sesso differenti.

2.4 Valutazione della steatosi epatica

Tutti i soggetti sono stati sottoposti a ecografia epatica addominale eseguita da un unico radiologo pediatrico esperto nella valutazione della steatosi epatica e nella gestione di pazienti in età pediatrica, al fine di ridurre la variabilità inter-osservatore. L'indagine è stata effettuata mediante ecografo ad alta risoluzione dotato di sonda convex multifrequenza (3,5–5 MHz), in condizioni di digiuno (≥ 6 ore).

La diagnosi qualitativa di steatosi epatica è stata formulata in base a criteri ecografici consolidati, comprendenti:

- incremento diffuso dell'ecogenicità epatica rispetto al parenchima renale omolaterale;
- attenuazione posteriore del segnale ultrasonografico;
- ridotta visualizzazione delle strutture vascolari intraepatiche (vene epatiche e portali).

Tali parametri ecografici sono riconosciuti come indicatori affidabili della presenza di accumulo di grasso epatico, anche in età pediatrica, con buona riproducibilità inter-osservatore e un'accuratezza diagnostica crescente con il grado di steatosi (D'Hondt et al., 2021; Polti et al., 2023).

Sebbene le metodiche quantitative ecografiche (come il *controlled attenuation parameter* o la *backscatter coefficient analysis*) offrano oggi una valutazione più oggettiva del contenuto lipidico epatico, l'approccio qualitativo tradizionale basato sul giudizio esperto resta lo strumento più largamente impiegato nella pratica clinica pediatrica, per la sua accessibilità e affidabilità (Ferraioli & Monteiro, 2019; Lowry et al., 2024).

Ai fini delle analisi statistiche, la valutazione ecografica è stata sintetizzata in forma dicotomica:

- steatosi assente, in caso di parenchima a ecogenicità normale;
- steatosi presente, comprendente i gradi lieve, moderato o severo secondo il giudizio globale del radiologo.

Questa semplificazione ha consentito di ridurre la variabilità soggettiva legata alla classificazione semiquantitativa e di ottimizzare l'analisi statistica delle associazioni tra presenza di steatosi epatica e parametri antropometrici e metabolomici.

2.5 Raccolta e preparazione dei campioni biologici

2.5.1 Raccolta urinaria

I campioni di urina sono stati raccolti al mattino, a digiuno da almeno 8 ore, utilizzando contenitori sterili monouso. Dopo centrifugazione (3000 rpm per 10 minuti), sono state preparate aliquote da 1 mL, successivamente conservate a −80 °C fino all'analisi.

Particolare attenzione è stata posta alla standardizzazione dell'orario e delle condizioni di raccolta per minimizzare la variabilità intraindividuale e garantire la stabilità metabolomica. Le

procedure di raccolta e conservazione sono state definite secondo le raccomandazioni internazionali per la standardizzazione dei biofluidi a uso metabolomico, con particolare riferimento ai fattori pre-analitici che influenzano la stabilità dei metaboliti (De Souza et al., 2024; Stevens et al., 2019).

2.5.2 Raccolta salivare

La saliva è stata raccolta in condizioni di riposo e digiuno (almeno 30 minuti da cibo e bevande, inclusa l'acqua) mediante dispositivi dedicati (Salivette, Sarstedt). I campioni sono stati centrifugati a 3000 rpm per 15 minuti per rimuovere detriti cellulari, quindi aliquotati e conservati a −80 °C fino all'analisi metabolomica.

Questa matrice biologica, per la sua natura non invasiva e rappresentativa del metabolismo sistemico, è stata selezionata come possibile fonte di biomarcatori di MASLD in età pediatrica. La scelta metodologica è coerente con le procedure validate in studi precedenti di metabolomica salivare condotti in popolazione pediatrica, che hanno dimostrato la stabilità e l'affidabilità dei profili metabolici salivari raccolti con analoghi protocolli di conservazione (Dame et al., 2015; Troisi et al., 2019).

2.6 Analisi metabolomica

2.6.1 Estrazione e preparazione dei campioni

Le analisi metabolomiche sono state condotte utilizzando un approccio untargeted basato su Gas Cromatografia accoppiata a Spettrometria di Massa (GC–MS), al fine di ottenere un profilo metabolico globale dei campioni biologici di urina e saliva.

L'intero processo di estrazione, purificazione e derivatizzazione dei metaboliti è stato eseguito mediante il kit MetaboPrep GC (Theoreo srl, Montecorvino Pugliano, Italia), sviluppato per l'analisi di matrici biologiche complesse e validato in studi precedenti (Troisi et al., 2019). Tale

approccio garantisce la stabilità e la riproducibilità dei metaboliti polari e semipolari in matrici pediatriche.

Per ciascun campione, sono stati processati 100 µL di urina o 200 µL di saliva, posti in provette Eppendorf da 2 mL e addizionati con una soluzione alcolica di estrazione contenente acido 2-isopropilmalico come standard interno. Dopo vortexing per 30 minuti a 1250 rpm, le provette sono state centrifugate per 5 minuti a 16.000 rpm a 4°C.

Il surnatante (200 µL) è stato trasferito in una nuova provetta e trattato con soluzione di purificazione; il campione è stato quindi agitato per 30 secondi e centrifugato nuovamente per 5 minuti alle stesse condizioni.

L'estratto purificato (circa 175 µL) è stato trasferito in vial di vetro da 2 mL e successivamente liofilizzato overnight in condizioni controllate di temperatura e pressione, in accordo con protocolli ottimizzati per il potenziamento dei segnali GC–MS (Liebeke & Puskás, 2019).

2.6.2 Derivatizzazione

La derivatizzazione è stata eseguita in due passaggi sequenziali:

1. Ossidazione e ossimazione: aggiunta di 50 µL di metossilammina cloridrato in piridina e agitazione per 90 minuti a 1200 rpm per stabilizzare i gruppi carbonilici.
2. Silanizzazione: aggiunta di 25 µL di N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) e ulteriore vortexing per 90 minuti a 1200 rpm.

Il volume finale (75 µL) di metaboliti derivatizzati è stato trasferito in vial con inserti a basso volume per l'iniezione automatica. Prima dell'iniezione, i vial sono stati centrifugati a 16.000 rpm per 5 minuti a 4°C per eliminare eventuali residui solidi, seguendo i criteri di stabilità e qualità suggeriti da Dunn (Dunn et al., 2008) e Olivier (Olivier et al., 2023).

2.6.3 Condizioni cromatografiche e di rivelazione

Le analisi sono state eseguite mediante un sistema GCMS-2010SE (Shimadzu Corp., Kyoto, Giappone), dotato di colonna capillare CP-Sil 8 CB fused silica (30 m × 0.25 mm × 1.00 μm; Agilent J&W, Santa Clara, CA, USA).

L'elio è stato utilizzato come gas di trasporto, con velocità lineare costante di 39 cm/s e split ratio 5:1.

Il programma di temperatura del forno prevedeva:

- 100 °C mantenuti per 1 minuto iniziale,
- incremento di 6 °C/min fino a 320 °C,
- mantenimento finale di 2.33 minuti.

Il rivelatore di massa ha operato in ionizzazione elettronica (70 eV), in modalità full scan su un intervallo di 35–600 m/z, con velocità di scansione di 3333 amu/s e ritardo del solvente di 5 minuti. Il volume di iniezione per tutti i campioni (urina, saliva e pooled) è stato di 2 μL, iniettati in modalità automatizzata.

2.6.4 Controllo di qualità analitico

Per garantire l'accuratezza e la riproducibilità dei dati, le analisi sono state condotte in batch di 25 campioni, ciascuno dei quali monitorato mediante quattro controlli indipendenti, secondo i criteri proposti da Martias (Martias et al., 2021):

1. Blank strumentale: iniezione di 2 μL di esano per verificare l'assenza di contaminazioni.
2. Standard mix: soluzione contenente 15 metaboliti rappresentativi di diverse classi chimiche (acidi organici, zuccheri, aminoacidi, steroidi e acidi grassi) derivatizzati in modo identico ai campioni.
3. Pooled sample: campione ottenuto dal pool di 50 campioni derivatizzati casualmente selezionati, utilizzato per il monitoraggio inter-batch.

4. Duplicato casuale: doppia iniezione dello stesso campione all'interno del batch per valutare la precisione intra-batch.

Un batch è stato considerato valido solo se tutte le seguenti condizioni erano soddisfatte:

- assenza di picchi nel solvent blank;
- variazione <10% nei picchi normalizzati degli standard interni rispetto ai valori attesi;
- coefficiente di variazione <15% per le 100 aree di picco più intense nelle iniezioni duplicate;
- posizione del pooled sample entro ±5% dell'area media dei pool complessivi.

Solo i segnali rilevati in almeno l'80% dei campioni sono stati considerati per le successive analisi statistiche.

I picchi con scarsa qualità spettrale o associati a metaboliti presenti in concentrazioni inferiori al limite di rilevabilità non sono stati inclusi. Nei casi di metaboliti che generavano prodotti di derivatizzazione multipli (ad esempio zuccheri o polioli), ciascun picco è stato trattato come feature indipendente.

2.7 Analisi dei dati metabolomici

2.7.1 Pretrattamento dei dati

L'elaborazione dei dati grezzi provenienti dal GC-MS è stata eseguita utilizzando il software LabSolutions GCMSsolution (Shimadzu) per la deconvoluzione dei picchi e l'esportazione delle aree normalizzate sullo standard interno.

Il successivo pretrattamento dei dati è stato condotto mediante una pipeline sviluppata in ambiente R (v4.3.0) e integrata con MetaboAnalyst 5.0, secondo procedure consolidate nella metabolomica non mirata (Di Giovanni et al., 2020). Tale approccio consente di ridurre la variabilità tecnica e migliorare la robustezza del dataset attraverso una serie di passaggi standardizzati.

In particolare:

1. Allineamento e filtraggio dei picchi: i tempi di ritenzione sono stati corretti per minimizzare le variazioni strumentali, ed eliminati i picchi non presenti in almeno l'80% dei campioni di ciascun gruppo, in linea con le raccomandazioni per il controllo di qualità nei dati omici.
2. Normalizzazione interna: le aree dei picchi sono state normalizzate rispetto allo standard interno (acido 2-isopropilmalico) e scalate per la mediana di ogni campione, per compensare differenze di concentrazione e volume di iniezione.
3. Trasformazione logaritmica ($\log_{10}$): applicata per ridurre l'asimmetria delle distribuzioni e rendere i dati più prossimi alla normalità statistica, migliorando la comparabilità tra metaboliti con range di concentrazione eterogenei.
4. Autoscaling: centratura sulla media e divisione per la deviazione standard, al fine di evitare la predominanza dei metaboliti più abbondanti nella modellizzazione multivariata.
5. Analisi esplorativa: condotta mediante Principal Component Analysis (PCA) per identificare outlier, verificare la coerenza tra batch e valutare la stabilità dei profili metabolici globali, secondo un'impostazione metodologica ampiamente validata nella metabolomica clinica (De San-Martin et al., 2021).

L'identificazione dei metaboliti discriminanti tra i gruppi (ad esempio presenza/assenza di steatosi o categorie ponderali) è stata effettuata combinando analisi multivariate e univariate:

- Partial Least Squares–Discriminant Analysis (PLS-DA), validata tramite 10-fold cross-validation e permutation test (n = 2000);
- Variable Importance in Projection (VIP) per la selezione dei metaboliti rilevanti (soglia VIP > 1);

- test univariati corretti per False Discovery Rate (FDR) secondo il metodo di Benjamini-Hochberg.

Per la conferma dei risultati, è stata successivamente condotta un'analisi diagnostica basata su curve Receiver Operating Characteristic (ROC) e calcolo dell'Area Under the Curve (AUC), come proposto in recenti studi metabolomici clinici (An et al., 2024; Yagin et al., 2024). Infine, le relazioni tra i profili metabolici e i parametri clinici (BMI, pressione arteriosa, steatosi ecografica) sono state esplorate tramite correlazioni di Spearman e modelli di regressione multivariata aggiustati per età e sesso.

2.7.2 Analisi multivariata: PLS-DA e VIP

La Partial Least Squares–Discriminant Analysis (PLS-DA) è stata utilizzata come metodo supervisionato per individuare pattern metabolici in grado di discriminare i gruppi di studio — in particolare, soggetti con o senza steatosi epatica ecografica e categorie ponderali (normopeso, sovrappeso, obeso).

Questo approccio, ampiamente validato nella metabolomica clinica, è particolarmente adatto a dataset ad alta dimensionalità ($p \gg n$), consentendo di proiettare le variabili in uno spazio latente di componenti ortogonali che massimizzano la separazione tra classi (An et al., 2024; De San-Martin et al., 2021).

La costruzione del modello è stata eseguita su una matrice normalizzata e bilanciata, con cross-validation a 10-fold per la selezione del numero ottimale di componenti e la prevenzione dell'overfitting. La qualità del modello è stata valutata tramite:

- R^2, indicatore della varianza spiegata;
- Q^2, misura della capacità predittiva stimata in cross-validation;
- Permutation test ($n = 2000$), per verificare la robustezza statistica e l'assenza di overfitting.

I punteggi VIP (Variable Importance in Projection) sono stati utilizzati per stimare il contributo di ciascun metabolita alla discriminazione tra i gruppi, considerandosi rilevanti quelli con VIP > 1,0 e $p < 0,05$ (FDR corretto).

Questa combinazione di criteri è raccomandata come strategia bilanciata di selezione dei biomarcatori metabolici, garantendo interpretabilità e riproducibilità del modello (Bifarin, 2022).

2.7.3 Gestione dello sbilanciamento e partizionamento dei dati

Poiché la popolazione pediatrica presentava una distribuzione non omogenea tra gruppi — in particolare tra soggetti normopeso e obesi — è stato necessario adottare una strategia di bilanciamento del dataset per evitare bias di classificazione.

A tal fine, è stata utilizzata la Adaptive Synthetic Minority Oversampling Technique (a-SMOTE), una versione evoluta del metodo SMOTE originariamente descritto da Chawla (Chawla et al., 2002), che consente di generare campioni sintetici nella classe minoritaria attraverso interpolazione nello spazio delle feature. L'adattamento "adaptive", basato sul lavoro di Bunkhumpornpat (Bunkhumpornpat et al., 2009), introduce un controllo dinamico del livello di sovracampionamento in base alla densità locale, preservando la struttura multivariata dei dati e riducendo il rischio di overfitting.

Dopo la fase di bilanciamento, il dataset è stato suddiviso in due insiemi indipendenti:

- Training set (66%), utilizzato per l'addestramento e la costruzione dei modelli predittivi;
- Test set (34%), destinato alla valutazione indipendente delle prestazioni del modello (validazione hold-out interna).

Questa ripartizione ha permesso di mantenere una separazione rigorosa tra fase di addestramento e di testing, garantendo una stima più affidabile della capacità predittiva complessiva e minimizzando la dipendenza dai dati di training.

2.7.4 Modelli di classificazione e costruzione dell'ensemble

Sul training set sono stati sviluppati molteplici modelli di classificazione, selezionati per rappresentare diverse famiglie algoritmiche (lineari, probabilistiche, ad albero e non lineari), al fine di esplorare la complessità intrinseca del metaboloma pediatrico. Salvo diversa indicazione, tutti i modelli supervisionati sono stati addestrati sul training set e valutati sul test set definiti al paragrafo 2.7.3, mantenendo una rigorosa separazione tra fase di addestramento e fase di testing.

Gli algoritmi impiegati includono:

- Naïve Bayes, per la modellazione probabilistica;
- Generalized Linear Model (GLM) e Regressione Logistica, per approcci lineari interpretativi;
- Decision Tree, Random Forest e Gradient Boosted Trees, per modelli non lineari basati su alberi decisionali;
- Support Vector Machine (SVM), per la classificazione in spazi ad alta dimensionalità;
- Partial Least Squares–Discriminant Analysis (PLS-DA), per l'analisi supervisionata multivariata;
- Deep Learning (reti dense feed-forward), per l'individuazione di pattern metabolici complessi.

Ogni modello è stato ottimizzato mediante tuning degli iperparametri e validato attraverso cross-validation stratificata, garantendo robustezza e generalizzabilità. La selezione delle feature è stata effettuata mediante un algoritmo genetico annidato (nested genetic algorithm), metodologia introdotta da Siedlecki e Sklansky (Siedlecki & Sklansky, 1989) e successivamente adattata in ambito omico per ottimizzare l'equilibrio tra accuratezza e riduzione della dimensionalità.

Solo i modelli che hanno raggiunto una accuratezza di cross-validation ≥ 60% sono stati inclusi nella successiva fase di combinazione ensemble.

L'integrazione dei modelli è stata realizzata secondo un approccio ensemble ispirato alla strategia descritta da Troisi (Troisi, Mollo, et al., 2022), in cui i risultati di più classificatori vengono combinati in un metamodello pesato, migliorando la stabilità predittiva e la capacità di generalizzazione anche in dataset complessi e bilanciati artificialmente.

2.7.5 Double-Weighted Ensemble Machine Learning (DW-EML)

Per migliorare la robustezza e la capacità predittiva dell'analisi metabolomica, è stato sviluppato un modello Double-Weighted Ensemble Machine Learning (DW-EML), ispirato alla metodologia descritta da Troisi e collaboratori (Lombardi et al., 2024; Masarone et al., 2024; Troisi, Mollo, et al., 2022).

L'approccio combina i punteggi predittivi di modelli multipli secondo un meccanismo di pesatura doppia, basato su due parametri chiave:

1. accuratezza di cross-validation, utilizzata come peso primario per valutare la performance di ciascun classificatore;
2. livello di confidenza della classificazione, impiegato come peso secondario per raffinare la fusione dei punteggi predittivi.

Il DW-EML consente di integrare modelli con architetture differenti (lineari, non lineari, ensemble e deep learning) in un metamodello probabilistico, capace di gestire la complessità e l'eterogeneità del metaboloma pediatrico.

Durante la procedura, i punteggi predittivi per ciascun campione sono stati combinati tramite un voting scheme ponderato, generando per ogni soggetto un DW-EML score. I punteggi dei soggetti con steatosi epatica (ST+) sono stati mantenuti positivi, mentre quelli dei soggetti senza steatosi (ST–) sono stati moltiplicati per −1, in modo da proiettare le decisioni su un asse unidirezionale comune.

Il valore complessivo del DW-EML score viene quindi confrontato con un cut-off ottimizzato, determinato attraverso il Youden Index, per classificare ciascun profilo metabolico come predittivo o non predittivo di steatosi epatica.

Questo approccio "a doppio peso" consente di massimizzare la stabilità del modello e di mitigare la varianza dovuta alle differenze strutturali tra i singoli algoritmi, rappresentando un'evoluzione metodologica dei modelli ensemble applicati alla metabolomica clinica.

2.7.6 Analisi di spiegabilità dei modelli (SHAP)

Negli ultimi anni, l'impiego di modelli predittivi complessi nell'ambito delle scienze omiche ha reso essenziale l'utilizzo di strumenti di interpretabilità in grado di spiegare le decisioni algoritmiche in termini biologicamente significativi.

Tra questi, il metodo SHAP (SHapley Additive exPlanations) rappresenta una delle soluzioni più robuste e teoricamente fondate, basandosi sul concetto di contributo marginale delle variabili, mutuato dalla teoria dei giochi cooperativi (Nohara et al., 2019).

L'approccio SHAP assegna a ciascun metabolita identificato un valore di Shapley ($\varphi_j(x)$), che quantifica il contributo della variabile alla predizione del modello per un determinato campione. Matematicamente, il valore di Shapley è definito come:

$$\phi_j(x) = \sum_{S \subseteq F \setminus j} \frac{|S|!(|F| - |S| - 1)!}{|F|!} [f(S \cup j) - f(S)]$$

dove:

- F rappresenta l'insieme complessivo delle feature (metaboliti),
- S è un sottoinsieme che non include la feature *j*,
- f(S) è la predizione del modello conoscendo solo le feature in *S*.

Questo formalismo garantisce tre proprietà essenziali — accuratezza locale, coerenza e additività — che rendono SHAP uno strumento trasparente e riproducibile per l'analisi metabolomica.

Nel presente studio, SHAP è stato applicato ai modelli PLS-DA, Random Forest, Gradient Boosted Trees e DW-EML, per identificare i metaboliti che influenzano maggiormente le previsioni di steatosi epatica pediatrica.
I valori SHAP locali sono stati calcolati per ciascun campione di urina e saliva, quantificando l'impatto di ogni metabolita sulla classificazione del singolo soggetto; i valori SHAP globali, invece, sono stati aggregati sull'intero dataset, per stimare l'importanza media di ciascun metabolita e valutarne la coerenza biologica.

Poiché i modelli adottati presentavano architetture diverse, sono state utilizzate tre varianti specifiche dell'algoritmo:

- TreeSHAP (Bifet et al., 2022) per modelli ad albero (Random Forest e XGBoost);
- KernelSHAP (Covert & Lee, 2021) per modelli generici come SVM e PLS-DA;
- DeepSHAP (Fernando et al., 2019) per reti neurali dense.

Le analisi sono state eseguite in ambiente Python 3.10, con le librerie *SHAP*, *scikit-learn*, *XGBoost* e *TensorFlow*. Le visualizzazioni derivate (summary plot, beeswarm plot e dependence plot) hanno consentito di rappresentare graficamente la direzione e l'intensità del contributo di ciascun metabolita al modello.

2.7.7 Considerazioni metodologiche

Pur essendo un metodo agnostico rispetto al modello, l'algoritmo SHAP presenta un costo computazionale esponenziale, poiché la stima esatta dei valori di Shapley richiederebbe la valutazione del modello su tutte le possibili combinazioni delle feature, pari a $2^{|F|}$. Ciò risulta

impraticabile in contesti ad alta dimensionalità come quelli metabolomici, in cui il numero di variabili può superare di ordini di grandezza il numero di campioni.

Per affrontare tale limitazione, nel presente studio sono state adottate versioni approssimate ma ottimizzate del metodo, in particolare TreeSHAP e KernelSHAP, che riducono la complessità computazionale da esponenziale a polinomiale.
TreeSHAP sfrutta la struttura gerarchica degli alberi decisionali per calcolare in modo esatto i contributi marginali di ciascuna feature, mentre KernelSHAP impiega una regressione lineare pesata basata su un kernel di similarità per stimare i valori di Shapley in modelli arbitrari.
Entrambi gli approcci consentono di mantenere l'equità e la coerenza delle attribuzioni, preservando le proprietà teoriche fondamentali del metodo originale.

Poiché SHAP restituisce un valore di importanza locale per ogni singolo campione, la sua interpretazione è stata eseguita su due livelli:

1. analisi locale, utile a comprendere le predizioni individuali e le relazioni metabolite-specifiche;
2. analisi globale, ottenuta aggregando i valori SHAP su tutto il dataset per derivare una misura media di importanza biologica.

L'interpretazione biologica è stata ulteriormente supportata e contestualizzata attraverso analisi di pathway metabolici, in modo da verificare la coerenza tra l'importanza predittiva attribuita dal modello e la funzione fisiologica dei metaboliti stessi.
Questa integrazione consente di distinguere tra marker puramente statistici e marker dotati di plausibilità biologica, migliorando la trasparenza e la validità interpretativa del modello predittivo complessivo e riducendo il rischio di overfitting.

2.7.8 Validazione e performance del modello

Le prestazioni dei modelli individuali e dell'ensemble DW-EML sono state valutate su un test set indipendente mediante diversi indicatori di accuratezza statistica, tra cui: confusion matrix, accuratezza globale, sensibilità, specificità, valori predittivi positivo e negativo (PPV, NPV), rapporti di verosimiglianza positivo e negativo (LR^+, LR^-) e curve ROC con area sottesa (AUC) calcolate con intervalli di confidenza al 95%. Il confronto tra le AUC dei diversi modelli è stato effettuato utilizzando il test non parametrico di DeLong per la valutazione delle differenze statisticamente significative tra curve correlate.

La stabilità e la riproducibilità del modello DW-EML sono state ulteriormente verificate attraverso una validazione incrociata interna stratificata e mediante procedura bootstrap (n = 1000), al fine di garantire la robustezza delle prestazioni indipendentemente dalla composizione dei campioni di addestramento. Questo approccio segue linee metodologiche consolidate in ambito metabolomico e machine learning applicato alla diagnostica clinica (An et al., 2024; Troisi, Mollo, et al., 2022; Troisi, Tafuro, et al., 2022; Yagin et al., 2024).

2.7.9 Selezione e rappresentazione dei metaboliti discriminanti

Per ciascun modello di classificazione incluso nell'ensemble, i pesi associati ai metaboliti selezionati sono stati analizzati graficamente mediante scree-plot per individuare il punto di flesso ("elbow point") corrispondente ai metaboliti più influenti.

I metaboliti identificati come discriminanti sono stati poi confrontati tra i diversi modelli tramite una rappresentazione di tipo *Upset plot*, in grado di mostrare la ricorrenza e l'intersezione delle variabili significative tra differenti algoritmi.

I metaboliti comuni a più modelli, e caratterizzati da VIP > 1 e $p < 0.05$ (corretto per FDR), sono stati considerati potenziali biomarcatori di steatosi epatica pediatrica e sottoposti a successiva interpretazione biologica.

Questo approccio ha consentito di integrare le evidenze statistiche con la coerenza biologica dei

risultati, riducendo la probabilità di selezione di marker spurii e favorendo l'individuazione di firme metaboliche riproducibili (De San-Martin et al., 2021; Santana et al., 2024).

2.7.10 Integrazione con parametri clinici ed ecografici

Infine, i punteggi metabolomici derivanti dal modello DW-EML sono stati correlati con i parametri clinici e strumentali dei soggetti (BMI, presenza di steatosi ecografica, profilo lipidico) mediante analisi di correlazione di Spearman e modelli di regressione lineare multipla corretti per età e sesso.

Questo approccio integrato ha permesso di valutare la coerenza biologica dei profili metabolici identificati con le alterazioni cliniche e radiologiche osservate nella popolazione pediatrica, offrendo una visione sistemica della disfunzione metabolica associata alla steatosi epatica.

L'integrazione tra dati metabolomici e clinici rappresenta oggi un elemento chiave della medicina di precisione, poiché consente di trasformare i pattern molecolari in informazioni biologicamente e clinicamente interpretabili. Tale integrazione, tuttavia, richiede un'accurata standardizzazione dei processi analitici e un'annotazione affidabile dei metaboliti, elementi che influenzano in modo sostanziale la validità dei risultati (Chaleckis et al., 2019).

In questa prospettiva, la combinazione di modelli predittivi basati su machine learning con dati clinici convenzionali costituisce un passo fondamentale verso la caratterizzazione fenotipica integrata delle malattie metaboliche pediatriche, come la MASLD.

2.8 Analisi statistica

L'elaborazione dei dati è stata condotta con software dedicati (SPSS v.27, R 4.3.0, RStudio e MetaboAnalyst 5.0).

Le variabili continue sono state espresse come media ± deviazione standard (SD) o come mediana e intervallo interquartile (IQR), in base alla distribuzione. Le caratteristiche

antropometriche e pressorie della popolazione sono state descritte sia in valori assoluti (kg, cm, mmHg) sia come z-score:

• z-score di altezza, peso, BMI e circonferenza addominale calcolati rispetto alle curve di crescita WHO per età e sesso (De Onis, 2007);

• z-score di pressione arteriosa sistolica e diastolica calcolati a partire dai percentili di PA secondo i riferimenti di Rosner (Rosner et al., 2008) e le linee guida AAP (Flynn et al., 2017), in accordo con quanto descritto nel paragrafo 2.3.

Le associazioni tra variabili categoriali (ad esempio genere, classi ponderali e presenza/assenza di steatosi epatica ecografica) sono state valutate mediante test χ^2 di Pearson. Il livello di significatività statistica è stato fissato a $\alpha < 0{,}05$ per test a due code.

2.8.1 Analisi univariata e regressione

Per esplorare l'associazione tra profilo antropometrico e steatosi epatica ecografica, sono state confrontate le distribuzioni di BMI z-score e circonferenza vita z-score tra soggetti con e senza steatosi. Poiché le variabili mostravano distribuzioni non gaussiane, il confronto tra i due gruppi è stato effettuato mediante test non parametrico di Mann–Whitney.

Per quantificare l'entità dell'associazione tra adiposità e steatosi, sono stati costruiti due modelli di regressione logistica binaria con outcome "steatosi ecografica presente (1) vs assente (0)" e, rispettivamente, predittore continuo:

• BMI z-score (WHO);

• circonferenza vita z-score (WHO).

Per ciascun modello sono stati stimati odds ratio (OR) e relativi intervalli di confidenza al 95% per un incremento di 1 deviazione standard del predittore.

Le relazioni tra stato ponderale e profilo pressorio sono state valutate mediante analisi di correlazione lineare di Pearson tra:

- età (anni) e BMI z-score;
- BMI z-score e z-score di pressione arteriosa sistolica e diastolica;
- circonferenza vita z-score e z-score di pressione arteriosa sistolica e diastolica.

Tutte le analisi sono state condotte su soggetti con dati completi per le variabili considerate; il livello di significatività è stato fissato a $p < 0,05$ per test a due code.

2.9 Considerazioni etiche

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico Campania Sud (protocollo n. P.U. 1_rpsc/2020).

Tutte le procedure sono state condotte nel rispetto della Dichiarazione di Helsinki e della normativa vigente in materia di protezione dei dati personali (Regolamento UE 2016/679 – GDPR).

Ai genitori/tutori legali è stata fornita informativa scritta ed è stata garantita la possibilità di ritirare il consenso in qualsiasi momento, senza conseguenze cliniche per il minore.

Capitolo 3. Risultati

3.1 Statistica descrittiva

3.1.1 Caratteristiche generali della popolazione

Sono stati inclusi 163 bambini e adolescenti valutati al tempo zero (T0). La distribuzione per genere risultava sbilanciata verso il maschile: 117 (71,8%) maschi e 46 (28,2%) femmine.

L'età, calcolata a partire dalla data di nascita e dalla data della visita, era disponibile per 160/163 soggetti e mostrava una media di 9,3 ± 2,1 anni, con valori compresi tra 5,1 e 14,2 anni. Le femmine risultavano mediamente più giovani dei maschi (femmine 7,9 ± 1,3 anni, maschi 9,9 ± 2,1 anni).

Per la caratterizzazione antropometrica è stato utilizzato esclusivamente il BMI espresso come z-score per età e genere (BMI z-score WHO). Il BMI z-score era disponibile per 161/163 bambini e presentava una media pari a 1,02 ± 1,00 DS (range circa da –1,78 a +2,90 DS).

Stratificando per genere, il BMI z-score risultava leggermente più elevato nei maschi (1,09 ± 0,94 DS) rispetto alle femmine (0,86 ± 1,14 DS), pur con ampia variabilità interindividuale in entrambi i gruppi.

Sulla base dei percentili corrispondenti, i soggetti sono stati classificati in normopeso (NW), sovrappeso (OW) e obesità (OB). La classe ponderale era disponibile per 160/163 bambini e risultava così distribuita:

- normopeso (NW): 70/160 (43,8%)
- sovrappeso (OW): 41/160 (25,6%)
- obesità (OB): 49/160 (30,6%)

Come atteso in un contesto clinico ad alto rischio, oltre la metà della coorte presenta eccesso ponderale (sovrappeso + obesità), configurando già in partenza un profilo metabolico sfavorevole.

Il numero di soggetti inclusi nelle singole analisi può variare rispetto alla numerosità complessiva (N = 163) in funzione della disponibilità di dati completi per le variabili considerate e della qualità dei campioni biologici dopo i controlli di qualità.

I valori sintetici delle principali variabili antropometriche e cliniche (z-score di altezza, peso, BMI, circonferenza vita e pressione arteriosa), per l'intera coorte e stratificati per genere, sono riportati in Tabella 1.

3.1.2 Profilo antropometrico (z-score) complessivo e per genere

Oltre al BMI z-score, sono stati considerati gli z-score di altezza, peso, circonferenza vita e pressione arteriosa sistolica e diastolica.

Nel campione complessivo, peso, BMI e circonferenza vita risultano mediamente al di sopra della media di riferimento (0 DS), delineando un quadro di eccesso ponderale generalizzato. Anche gli z-score pressori mostrano una lieve tendenza verso valori più elevati rispetto alla popolazione standard, coerente con il profilo di rischio cardiovascolare associato all'obesità in età pediatrica.

Stratificando per genere, il pattern antropometrico risulta complessivamente simile tra maschi e femmine, con una tendenza a valori medi leggermente più elevati nei maschi per BMI z-score e circonferenza vita z-score. I valori numerici dettagliati (media ± DS per ciascun parametro, nella coorte totale e per genere) sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1. Parametri antropometrici e clinici (z-score) della coorte, complessivamente e per genere

Variabile	Totale n (media ± DS)	Maschi n (media ± DS)	Femmine n (media ± DS)
Altezza z-score	161 (0,03 ± 1,00)	115 (0,01 ± 1,04)	46 (0,08 ± 0,91)
Peso z-score	161 (0,82 ± 1,12)	115 (0,86 ± 1,10)	46 (0,73 ± 1,17)
BMI z-score	161 (1,02 ± 1,00)	115 (1,09 ± 0,94)	46 (0,86 ± 1,14)
Circonferenza vita z-score	161 (0,66 ± 0,93)	115 (0,69 ± 0,89)	46 (0,58 ± 1,04)
PA sistolica z-score	159 (0,44 ± 1,06)	114 (0,54 ± 1,16)	45 (0,20 ± 0,70)
PA diastolica z-score	157 (0,60 ± 0,86)	112 (0,66 ± 0,91)	45 (0,44 ± 0,72)

3.1.3 Prevalenza di steatosi epatica ecografica

La steatosi epatica è stata valutata in tutti i soggetti mediante ecografia addominale, sulla base del giudizio complessivo del radiologo pediatrico esperto, in accordo con i criteri descritti nei Metodi. Nel database questa informazione è riportata come presenza/assenza di steatosi ecografica.

L'informazione era disponibile per 162/163 bambini; in questa sottopopolazione, la steatosi ecografica risultava presente in circa un terzo dei soggetti. La prevalenza era più elevata nelle femmine rispetto ai maschi e aumentava in modo marcato passando dal normopeso all'obesità.

Le frequenze assolute e percentuali di steatosi ecografica, stratificate per genere e per classe ponderale, sono riportate in Tabella 2 e Tabella 3.

Tabella 2. Prevalenza di steatosi ecografica per genere

Genere	Totale n	Senza steatosi n (%)	Con steatosi n (%)
Maschi	116	79 (68,1%)	37 (31,9%)
Femmine	46	22 (47,8%)	24 (52,2%)

- Test χ^2 associazione genere – steatosi ecografica: $\chi^2 = 4{,}94$; $p = 0{,}026$.

3.1.4 Steatosi ecografica e stato ponderale

Per esplorare in maggiore dettaglio l'intreccio tra steatosi epatica e stato ponderale, la presenza di steatosi ecografica è stata analizzata in relazione alle tre classi di BMI (normopeso, sovrappeso, obesità). Considerando i soggetti con dati completi per entrambe le variabili, la prevalenza di steatosi aumenta progressivamente dal normopeso all'obesità, con valori che si collocano intorno a un quinto nei normopeso e superano la metà nei bambini con obesità.

Questa distribuzione delinea un chiaro gradiente ponderale, in cui l'eccesso di adiposità, in particolare nelle forme di obesità, si associa a una probabilità nettamente maggiore di riscontrare steatosi epatica all'ecografia.

I dettagli numerici (numeri assoluti e percentuali per ciascuna classe ponderale) sono riportati in Tabella 3. Il gradiente ponderale nella prevalenza di steatosi ecografica è rappresentato graficamente in Figura 1.

Tabella 3. Prevalenza di steatosi ecografica per classe ponderale (WHO) (Soggetti con classe ponderale e steatosi ecografica entrambe disponibili, n = 160)

Classe ponderale	**Totale n**	**Senza steatosi n (%)**	**Con steatosi n (%)**
Normopeso (NW)	70	54 (77,1%)	16 (22,9%)
Sovrappeso (OW)	41	28 (68,3%)	13 (31,7%)
Obesità (OB)	49	19 (38,8%)	30 (61,2%)

- Test χ^2 associazione classe ponderale – steatosi ecografica: $\chi^2 = 18{,}86$; $p = 8{,}0 \times 10^{-5}$ ($p < 0{,}001$).

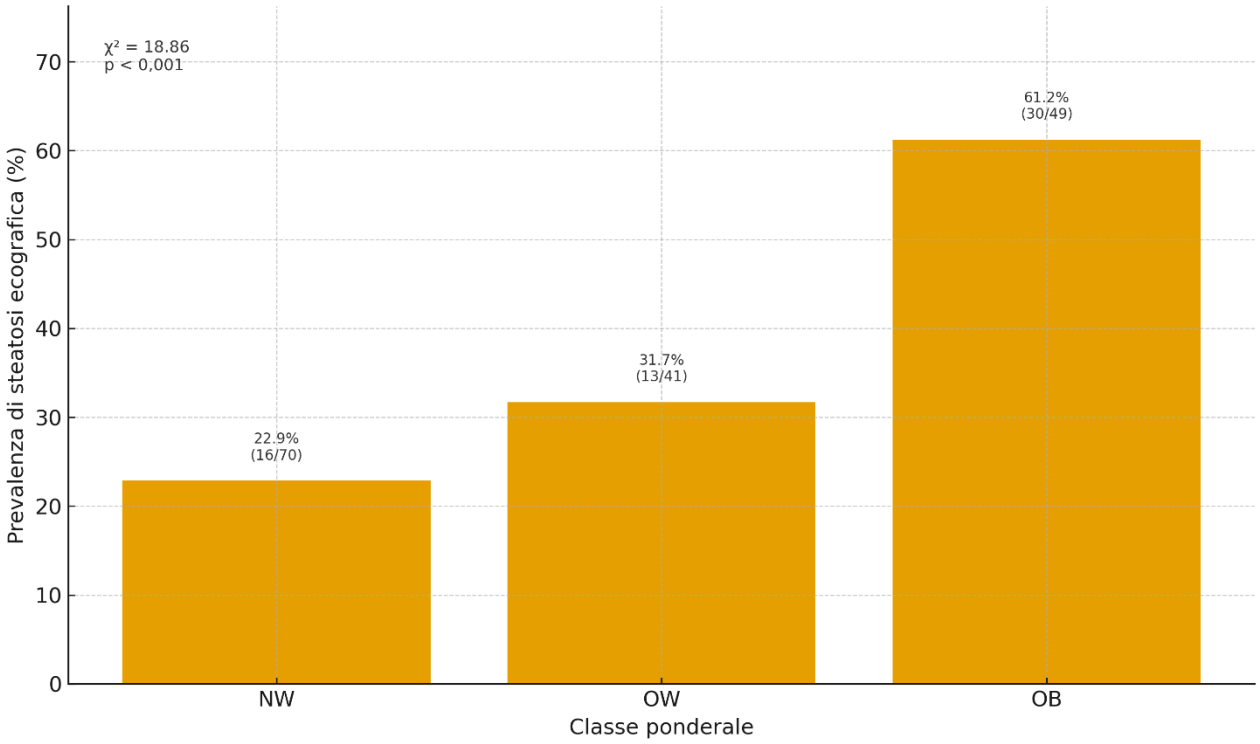


Figura 4 - Prevalenza di steatosi ecografica nelle tre classi ponderali (normopeso, sovrappeso, obesità). Si osserva un chiaro gradiente con incremento marcato della steatosi nei soggetti con obesità.

3.1.5 Disponibilità dei campioni biologici per le analisi metabolomiche

Ai fini del presente lavoro, un elemento importante di statistica descrittiva è rappresentato dalla disponibilità di campioni biologici raccolti (urine e saliva), che costituiranno la base per le successive analisi metabolomiche.

Come illustrato in Tabella 4, la copertura campionaria è risultata elevata:

- campioni urinari disponibili per 143/163 soggetti (87,7%);
- campioni salivari disponibili per 142/163 soggetti (87,1%).

Nel presente capitolo dei risultati ci si concentra esclusivamente sui dati clinici e antropometrici; le analisi metabolomiche su saliva e urine saranno descritte separatamente. Tuttavia, la disponibilità di campioni in circa l'87% della coorte conferisce robustezza alla parte "omica" del

progetto, permettendo una buona rappresentatività dei profili metabolici rispetto alla popolazione complessiva arruolata.

Tabella 4. Disponibilità dei campioni biologici per le analisi metabolomiche

Tipo di campione	n / N totale	Percentuale (%)
Campioni urinari	143 / 163	87,7
Campioni salivari	142 / 163	87,1

3.2 Statistica inferenziale

In tutte le analisi inferenziali sono stati utilizzati esclusivamente gli z-score antropometrici (in particolare BMI z-score e circonferenza vita z-score), in quanto ritenuti più appropriati per confronti statistici in una popolazione pediatrica eterogenea per età e genere.

3.2.1 Relazione tra BMI z-score e steatosi ecografica

Per valutare il legame tra adiposità generale e steatosi epatica, è stato confrontato il BMI z-score tra bambini con e senza steatosi ecografica.

Nei soggetti senza steatosi, i valori medi di BMI z-score risultano generalmente più bassi, mentre nei bambini con steatosi questo indicatore mostra un incremento significativo, suggerendo una forte associazione tra eccesso ponderale globale e danno epatico steatosico.

Il test non parametrico di Mann–Whitney ha evidenziato una differenza statisticamente significativa ($p < 0,001$), confermando il ruolo centrale dell'adiposità generale nella presenza di steatosi ecografica.

Per quantificare l'entità dell'associazione, è stato costruito un modello di regressione logistica con outcome binario "steatosi ecografica presente/assente" e predittore continuo BMI z-score. Un incremento di 1 DS nel BMI z-score si associa a un aumento di circa 2,3 volte delle odds di steatosi (OR ≈ 2,33; IC 95% ≈ 1,55–3,49; $p = 4,5 \times 10^{-5}$).

I valori medi (± DS) di BMI z-score nei due gruppi (steatosi presente vs assente) e l'odds ratio del modello logistico sono riportati rispettivamente in Tabella 5 e in Tabella 6. La distribuzione dei valori di BMI z-score nei bambini con e senza steatosi è illustrata in Figura 2.

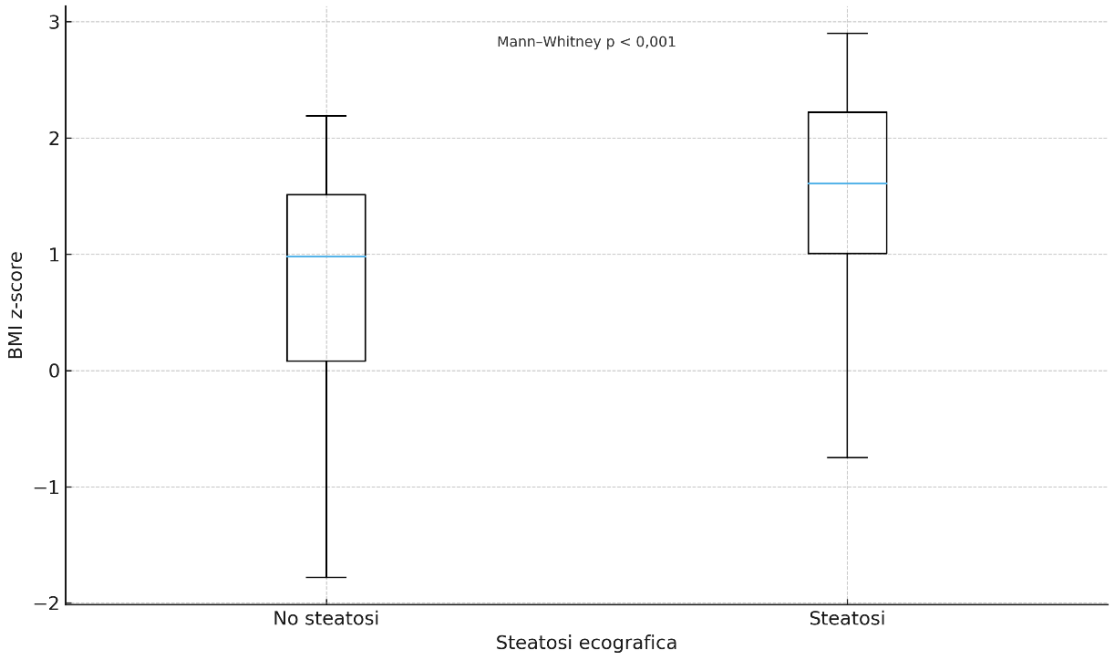


Figura 5 - Distribuzione del BMI z-score nei bambini con e senza steatosi ecografica. I valori risultano significativamente più elevati nei soggetti steatosici (p < 0,001, test di Mann–Whitney).

3.2.2 Relazione tra circonferenza vita z-score e steatosi ecografica

La circonferenza vita z-score è stata considerata come indicatore di adiposità addominale. Anche in questo caso il confronto è stato condotto tra bambini con e senza steatosi ecografica.

- Nei bambini senza steatosi ecografica (n = 101), la circonferenza vita z-score media era pari a 0,41 ± 0,84 DS.
- Nei bambini con steatosi ecografica (n = 60), la circonferenza vita z-score media risultava significativamente più elevata, pari a 1,07 ± 0,93 DS.

Il test di Mann–Whitney ha confermato una differenza statisticamente significativa tra i gruppi ($p < 0,001$), indicando che una maggiore adiposità addominale si associa in modo marcato alla presenza di steatosi.

Nel corrispondente modello di regressione logistica con outcome steatosi ecografica presente/assente e predittore continuo "circonferenza vita z-score", ogni incremento di 1 DS nella circonferenza vita z-score si associava a un aumento di circa 2,4 volte delle odds di steatosi:

- OR ≈ 2,43; IC 95% ≈ 1,60–3,68; $p = 3,0 \times 10^{-5}$.

Questi risultati suggeriscono che la circonferenza vita z-score rappresenti un indicatore particolarmente sensibile per identificare i bambini a maggior rischio di steatosi epatica, in linea con il ruolo centrale dell'adiposità viscerale nella fisiopatologia della MASLD.

I valori medi (± DS) di circonferenza vita z-score nei due gruppi e l'odds ratio del modello logistico sono riportati rispettivamente in Tabella 5 e in Tabella 6. La distribuzione della circonferenza vita z-score nei due gruppi è riportata in Figura 3.

Tabella 5. Confronto antropometrico tra bambini con e senza steatosi ecografica
Confronto descrittivo e test di Mann–Whitney

Variabile	**Senza steatosi (NO) n (media ± DS)**	**Con steatosi (SI) n (media ± DS)**	**p (Mann–Whitney)**
BMI z-score	101 (0,76 ± 0,96)	60 (1,46 ± 0,91)	$1,1 \times 10^{-5}$
Circonferenza vita z-score	101 (0,41 ± 0,84)	60 (1,07 ± 0,93)	$5,5 \times 10^{-6}$

Tabella 6. Modelli di regressione logistica per steatosi ecografica (presente/assente) vs BMI e circonferenza vita
Outcome: steatosi ecografica presente (1) vs assente (0).
Predittore: variabile continua in z-score.

Predittore	**OR per 1 DS ↑ (IC 95%)**	**p**
BMI z-score	2,33 (1,55 – 3,49)	$4,5 \times 10^{-5}$
Circonferenza vita z-score	2,43 (1,60 – 3,68)	$3,0 \times 10^{-5}$

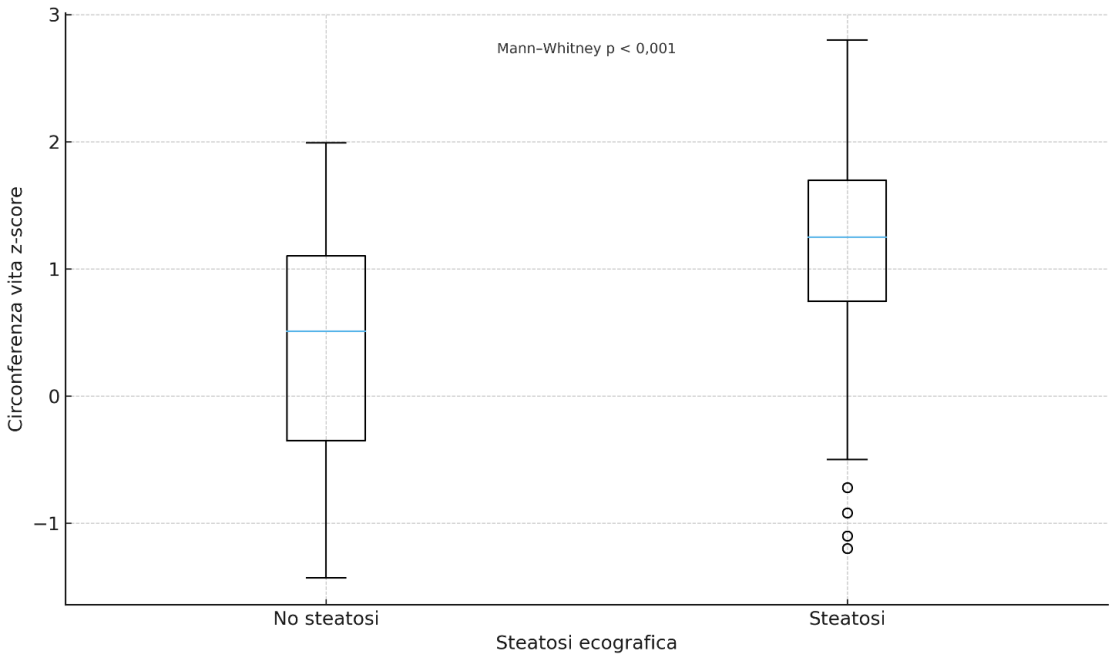


Figura 6 - Distribuzione della circonferenza vita z-score nei bambini con e senza steatosi ecografica. I valori risultano significativamente più elevati nei soggetti steatosici (p < 0,001, test di Mann–Whitney).

3.2.3 Relazione tra età e BMI z-score

Per esplorare il rapporto tra età cronologica e grado di eccesso ponderale, è stata analizzata la correlazione tra età (anni) e BMI z-score nei soggetti con dati completi (n = 160).

L'analisi di correlazione di Pearson ha evidenziato una correlazione positiva di entità lieve-moderata:

- r ≈ 0,27; p ≈ 0,0007.

In pratica, i bambini più grandi tendono, in media, a presentare valori di BMI z-score più elevati, suggerendo che l'eccesso ponderale aumenti progressivamente con l'età all'interno della coorte clinica considerata.

Il coefficiente di correlazione, il p-value e i valori descrittivi delle due variabili sono riportati in Tabella 7. La relazione tra età e BMI z-score è rappresentata in Figura 4.

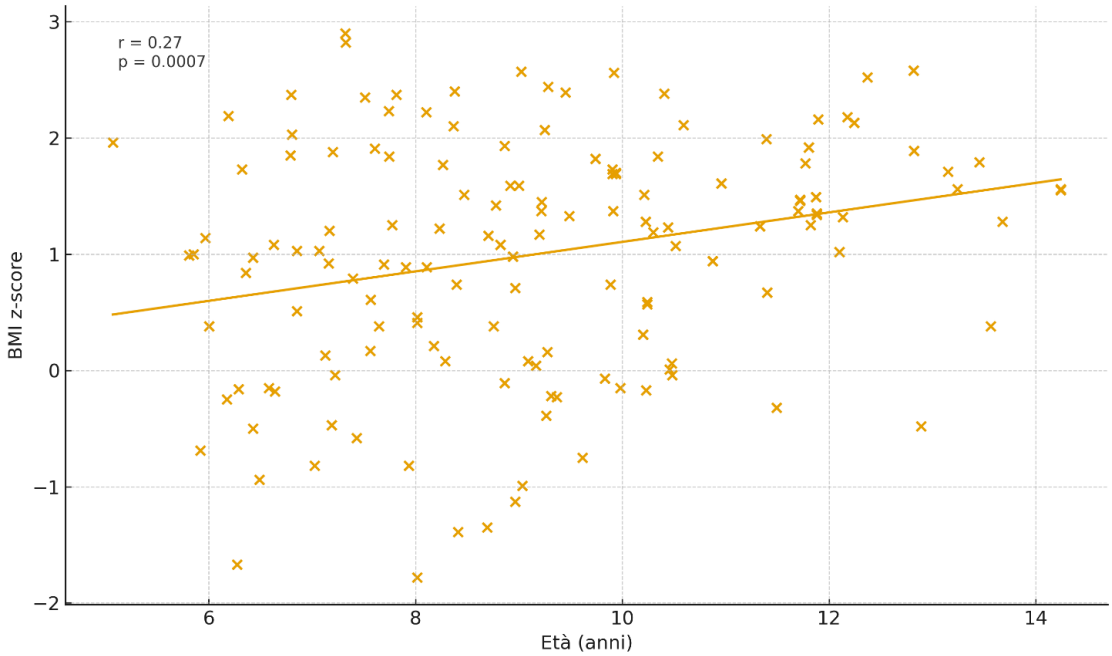


Figura 7 - Correlazione tra età (anni) e BMI z-score nella coorte in studio (n = 160). Si osserva una correlazione positiva di entità lieve-moderata (r = 0,27; p = 0,0007).

Tabella 7. Correlazione tra età e BMI z-score
(Soggetti con dati completi per età e BMI z-score, n = 160)

Coppia di variabili	Coefficiente r (Pearson)	p
Età (anni) – BMI z-score	0,27	0,0007

3.2.4 Relazione tra pressione arteriosa z-score, BMI z-score e circonferenza vita z-score

Per esplorare il rapporto tra stato ponderale, adiposità addominale e profilo pressorio, è stata valutata la correlazione lineare tra BMI z-score, circonferenza vita z-score e gli z-score di pressione arteriosa sistolica e diastolica nei soggetti con dati completi.

Il BMI z-score ha mostrato una correlazione positiva, di entità lieve-moderata ma statisticamente significativa, con entrambi gli indici pressori:

• BMI z-score vs PA sistolica z-score: $r = 0,31$; $p < 0,001$ ($n = 159$)

• BMI z-score vs PA diastolica z-score: $r = 0,27$; $p = 0,0007$ ($n = 157$)

In altre parole, valori più elevati di BMI z-score si associano a z-score pressori (sia sistolici che diastolici) mediamente più alti, confermando il legame tra eccesso ponderale generale e incremento dei livelli pressori già in età pediatrica.

Considerando la circonferenza vita z-score come indicatore di adiposità addominale, è stata analizzata la sua correlazione con entrambi gli indici pressori:

• Circonferenza vita z-score vs PA sistolica z-score: $r = 0,20$; $p = 0,012$ ($n = 159$)

• Circonferenza vita z-score vs PA diastolica z-score: $r = 0,14$; $p = 0,074$ ($n = 157$)

L'associazione con la PA sistolica risulta quindi significativa, seppur di entità modesta, mentre la correlazione con la PA diastolica mostra solo una tendenza, senza raggiungere la significatività statistica ($p \approx 0,07$). Ciò suggerisce che anche l'adiposità addominale contribuisce all'aumento della pressione arteriosa, in particolare sistolica. Le relazioni tra BMI z-score, circonferenza vita z-score e PA sistolica z-score sono rappresentate graficamente in Figura 5 e Figura 6. Le relazioni tra BMI z-score, circonferenza vita z-score e PA diastolica z-score sono rappresentate graficamente in Figura 7 e Figura 8.

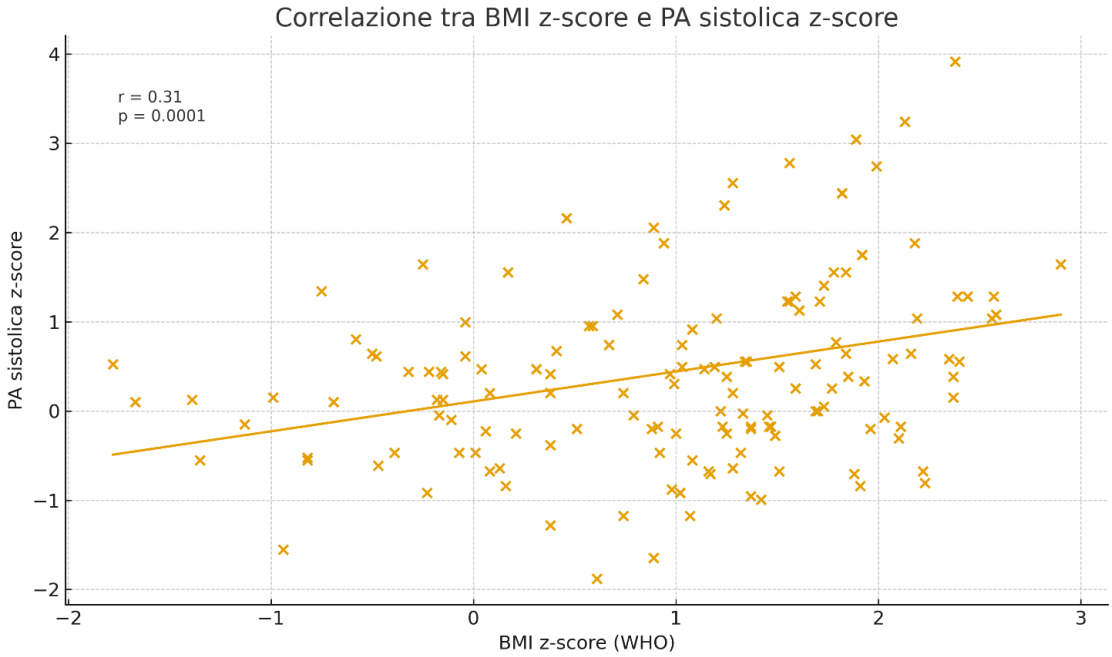


Figura 8 - Correlazione tra BMI z-score (WHO) e pressione arteriosa sistolica z-score (n = 159). Si osserva una correlazione positiva di entità lieve-moderata (r = 0,31; p < 0,001), indicativa di un incremento della PA sistolica al crescere dell'eccesso ponderale.

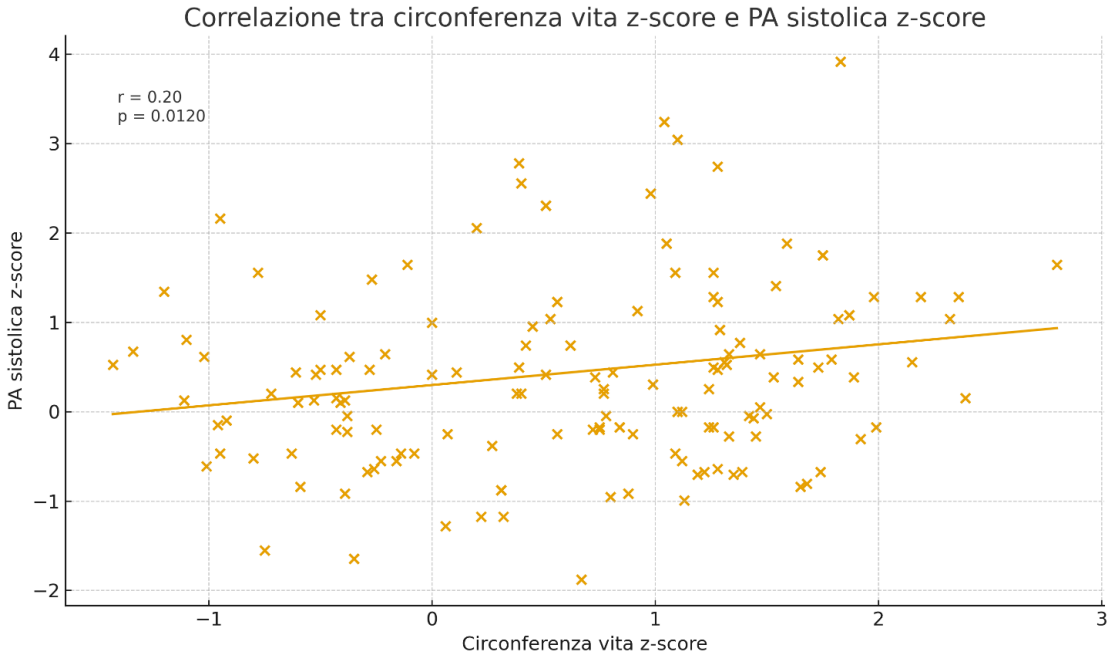


Figura 9 - Correlazione tra circonferenza vita z-score e pressione arteriosa sistolica z-score (n = 159). La correlazione è positiva e statisticamente significativa (r = 0,20; p = 0,012), suggerendo che anche l'adiposità addominale contribuisce all'aumento della PA sistolica, seppur con un effetto più modesto rispetto al BMI.

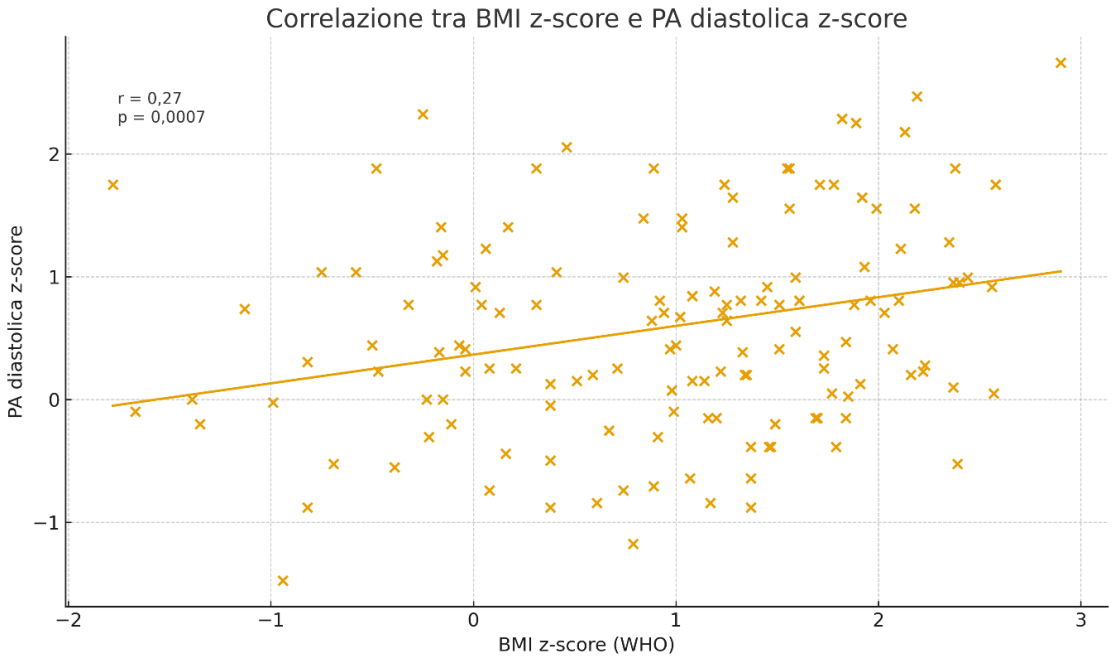


Figura 10 - Correlazione tra BMI z-score (WHO) e pressione arteriosa diastolica z-score (n = 157). Si osserva una correlazione positiva di entità lieve-moderata (r = 0,27; p = 0,0007), coerente con un incremento della PA diastolica al crescere dell'eccesso ponderale generale.

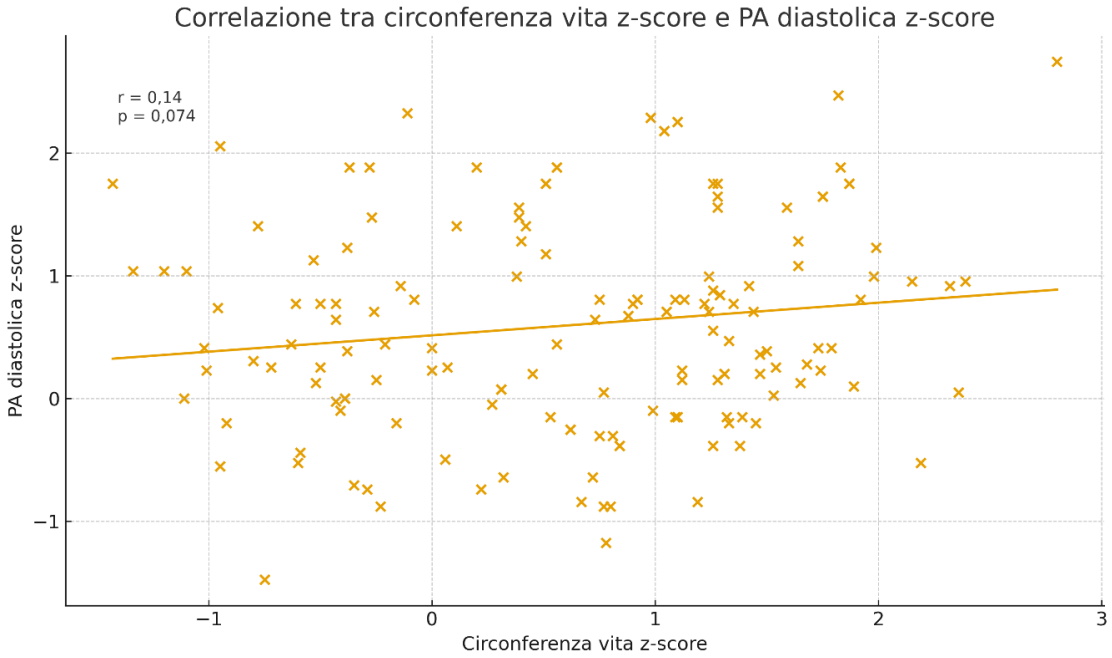


Figura 11 - Correlazione tra circonferenza vita z-score e pressione arteriosa diastolica z-score (n = 157). La correlazione è positiva ma di entità modesta e non raggiunge la significatività statistica (r = 0,14; p = 0,074), indicando una tendenza meno marcata rispetto a quanto osservato per la PA sistolica.

3.3 Analisi metabolomica salivare

L'analisi metabolomica non mirata condotta sulla saliva è stata eseguita in un sottogruppo di soggetti pediatrici appartenenti alla coorte descritta nel Capitolo 3, per i quali era disponibile un campione salivare (n = 142/163; 87,1%). Tutti i partecipanti sono stati accuratamente classificati in normopeso, sovrappeso e obesi sulla base delle classi ponderali definite nelle sezioni 3.1 e 3.2 (BMI z-score per età e genere, secondo i riferimenti WHO). Questa distinzione ha permesso di valutare l'impatto dell'adiposità sulle caratteristiche metaboliche, in un'ottica di comprensione precoce dei processi fisiopatologici che precedono o accompagnano l'instaurarsi della MASLD in età evolutiva.

Parallelamente, l'ecografia addominale ha consentito di suddividere i partecipanti in soggetti con steatosi ecografica presente e assente, sulla base del giudizio complessivo del radiologo pediatrico esperto, come descritto nei Materiali e Metodi. Questa seconda stratificazione è stata utilizzata per esplorare se la saliva sia in grado di catturare segnali legati non solo allo stato ponderale, ma anche alla presenza di accumulo lipidico intraepatico.

L'interesse per la saliva come matrice d'indagine deriva dalla sua natura non invasiva, dalla facilità di raccolta e dall'elevata riproducibilità dei profili metabolomici, che la rendono particolarmente adatta a programmi di screening precoce o di sorveglianza nelle popolazioni pediatriche, come suggerito da studi precedenti (Troisi et al., 2019).

3.3.1 Analisi multivariata (PLS-DA e validazione)

Per esplorare il potenziale discriminante dei profili metabolomici salivari è stata costruita una serie di modelli PLS-DA. Le rappresentazioni tridimensionali incluse in Figura 9A offrono una panoramica immediata delle capacità separative dei modelli. Nel pannello dedicato ai gruppi ponderali, il cluster dei soggetti obesi appare nettamente distinto dagli altri gruppi e distribuito lungo le prime due componenti latenti. Tale separazione indica che l'aumento dell'adiposità comporta modificazioni profonde e sistematiche della composizione metabolica salivare, in

modo più pronunciato rispetto a quanto osservabile tra normopeso e sovrappeso, i cui profili mostrano invece un certo grado di sovrapposizione. Questo gradiente metabolico, che procede parallelamente all'aumento della massa adiposa, suggerisce un reindirizzamento progressivo dei principali flussi metabolici, coerente con la letteratura sulla metabolomica pediatrica dell'obesità.

Il pannello dedicato al confronto tra soggetti steatosici e non steatosici mostra una separazione ancor più netta. I soggetti con steatosi tendono a concentrarsi in una regione omogenea dello spazio latente, mentre i soggetti senza steatosi risultano più dispersi. Questa osservazione indica che la presenza di steatosi epatica costituisce un elemento in grado di imprimere una firma metabolica riconoscibile nella saliva, probabilmente legata a meccanismi di disfunzione epatica, stress ossidativo e alterazioni del metabolismo energetico che si riflettono sistemicamente.

La robustezza dei modelli è descritta nella Figura 9B, che riporta i valori di R^2Y, Q^2 e accuratezza per un numero crescente di componenti latenti. I valori elevati di R^2Y, costantemente superiori a 0,70, indicano una buona capacità del modello di spiegare la varianza associata alle differenze tra gruppi. La Q^2, che esprime la capacità predittiva del modello, supera stabilmente 0,40, valore ampiamente accettato come indice di buona predittività in contesti metabolomici complessi. L'accuratezza complessiva dei modelli, spesso superiore al 75%, rafforza ulteriormente questa interpretazione.

La significatività statistica è stata confermata tramite permutation test, illustrato in Figura 9C. Le distribuzioni delle statistiche permutate mostrano una chiara separazione dal valore osservato, indicato da una freccia rossa che si colloca all'esterno della distribuzione nulla. Il p-value inferiore a 5×10^{-4} conferma che la separazione ottenuta non è il risultato del caso, ma riflette una reale differenza nella composizione metabolica tra i gruppi considerati.

Nel complesso, l'analisi multivariata evidenzia come la saliva rappresenti una matrice altamente sensibile alle alterazioni metaboliche associate sia all'aumento dell'adiposità sia alla presenza di steatosi epatica, confermandone il potenziale come biomarcatore non invasivo.

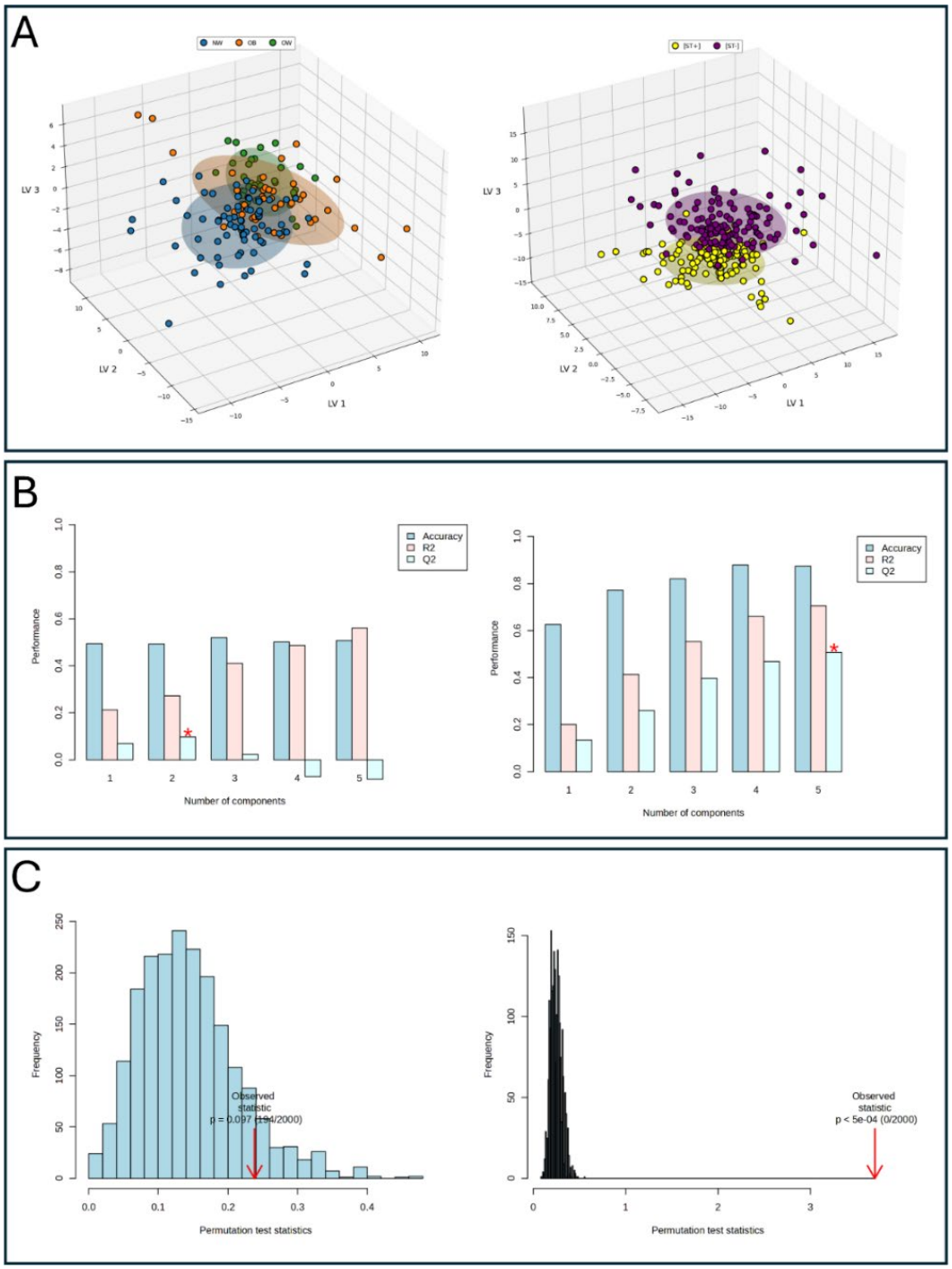


Figura 12 - Analisi PLS-DA dei profili metabolomici salivari nei soggetti pediatrici. (A) Rappresentazione tridimensionale dei modelli PLS-DA costruiti sui profili metabolomici salivari, mostrati separatamente per stato ponderale (NW, OW, OB; pannello sinistro) e per presenza di steatosi epatica (S+, S–; pannello destro). I soggetti obesi evidenziano un cluster metabolicamente distinto, suggerendo una progressiva riorganizzazione dei flussi metabolici con l'aumentare dell'adiposità. La separazione tra soggetti steatosici e non steatosici è ancora più marcata, indicando l'esistenza di una firma metabolica salivare specificamente associata alla steatosi epatica pediatrica.(B) Indici di performance dei modelli PLS-DA (R^2Y, Q^2 e accuratezza) calcolati per un numero crescente di componenti latenti. I modelli mostrano un'elevata capacità di spiegare la variabilità associata ai gruppi e una buona predittività, con valori di Q^2 superiori alla soglia comunemente accettata in analisi metabolomiche.(C) Risultati del permutation test (n = 2000), utilizzati per valutare la significatività dei modelli. Il valore osservato della statistica si colloca al di fuori della distribuzione nulla, indicando che la separazione ottenuta non è attribuibile al caso ($p < 5\times10^{-4}$).

3.3.2 Metaboliti discriminanti e profili molecolari (VIP > 1)

La Figura 10 presenta una sintesi visiva dei metaboliti maggiormente coinvolti nelle differenze tra i gruppi attraverso una heatmap e la rappresentazione dei loro VIP score. L'osservazione complessiva della mappa evidenzia pattern distinti e coerenti con la fisiopatologia della steatosi e dell'obesità.

Le concentrazioni di valina, leucina e isoleucina risultano elevate nei soggetti obesi e in quelli con steatosi epatica. Questi aminoacidi ramificati (BCAA) sono noti per essere strettamente legati ai processi di resistenza insulinica e per rappresentare un indicatore precoce di disfunzione mitocondriale. L'aumento sistematico dei BCAA nei gruppi ad alto rischio è quindi perfettamente coerente con il quadro metabolico osservato.

Allo stesso modo, glutammato e glutammina presentano valori elevati nei soggetti con steatosi. Questo incremento può riflettere una compromissione del ciclo dell'urea e un'aumentata produzione di ammoniaca, due segnali classici di alterazione epatometabolica precoce. Tale interpretazione trova conferma in studi recenti (Long et al., 2024), che evidenziano come la disfunzione epatica, anche in forme iniziali, modifichi significativamente il metabolismo dell'azoto.

La heatmap rivela anche un aumento degli acidi grassi a catena corta, come il butirrato e il caproato, nei soggetti steatosici. Poiché questi metaboliti sono prodotti principalmente dal microbiota intestinale, la loro presenza in saliva suggerisce un coinvolgimento dell'asse intestino–fegato, possibilmente correlato a condizioni di disbiosi. Tale relazione è stata ampiamente discussa in letteratura, con particolare riferimento alla capacità della flora intestinale di modulare lo stato infiammatorio sistemico e le funzioni epatiche.

Infine, la riduzione dei livelli di carnitina e acilcarnitine nei soggetti obesi e steatosici indica una compromissione dei processi di β-ossidazione. La carnitina riveste un ruolo cruciale nel trasporto degli acidi grassi nei mitocondri; pertanto, la sua diminuzione rappresenta un segnale

diretto di disfunzione mitocondriale. Allo stesso tempo, l'aumento del lattato e del piruvato nei gruppi ad alto rischio suggerisce uno shift verso la glicolisi anaerobica, una condizione frequentemente osservata nei contesti di ridotta ossidazione lipidica.

Questi risultati, nel loro insieme, dipingono un quadro metabolico complesso ma coerente, nel quale alterazioni aminoacidiche, energetiche e ossidative convergono verso un profilo salivare tipico della MASLD pediatrica.

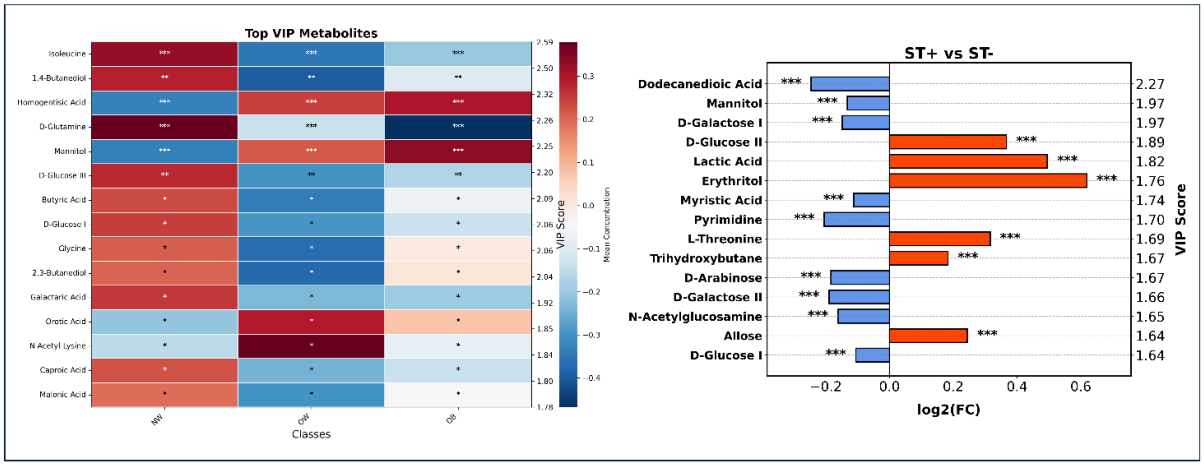


Figura 13 - Metaboliti discriminanti nella saliva: heatmap e VIP score. Heatmap dei principali metaboliti discriminanti nei gruppi ponderali (NW, OW, OB) e nei gruppi steatosici (S+ vs S–), selezionati sulla base del valore di VIP > 1 nel modello PLS-DA. Le variazioni di concentrazione, rappresentate tramite gradiente cromatico, mostrano pattern coerenti con la fisiopatologia dell'obesità e della steatosi, tra cui l'aumento di aminoacidi ramificati (BCAA), glutammato, lattato e acidi grassi a catena corta nei soggetti con fenotipo metabolico alterato. A destra, i VIP score rappresentano il contributo individuale di ciascun metabolita alla discriminazione tra i gruppi.

3.3.3 Analisi di arricchimento metabolico (Pathway Enrichment Analysis)

La Figura 11 riassume i pathway metabolici che risultano significativamente alterati nei soggetti con obesità e con steatosi. L'arricchimento dei pathway relativi al metabolismo dei BCAA conferma ulteriormente il ruolo di questi aminoacidi come marker precoci di insulino-resistenza. Allo stesso tempo, la riduzione dell'attività del ciclo dell'urea suggerisce un'incapacità dell'epatocita di gestire correttamente il carico di ammoniaca, evidenza tipica della disfunzione epatica subclinica.

Una riduzione significativa dei pathway connessi alla β-ossidazione, accompagnata dall'indebolimento del metabolismo del glutatione, indica un quadro complessivo di stress ossidativo e di deficit mitocondriale. Questo quadro risulta ulteriormente aggravato da un incremento dei flussi glicolitici e del metabolismo del piruvato, come suggerito dall'aumento del lattato. Infine, l'alterazione del metabolismo della colina e della fosfatidilcolina risulta particolarmente rilevante, poiché queste molecole sono fondamentali per la sintesi e la secrezione delle VLDL. Il loro deficit è noto per contribuire all'accumulo di lipidi nel fegato e per favorire la progressione della steatosi.

Nel complesso, l'analisi di arricchimento conferma e amplia le informazioni ottenute tramite la PLS-DA, delineando un profilo metabolico salivare caratterizzato da disfunzione energetica, ossidativa e lipidica.

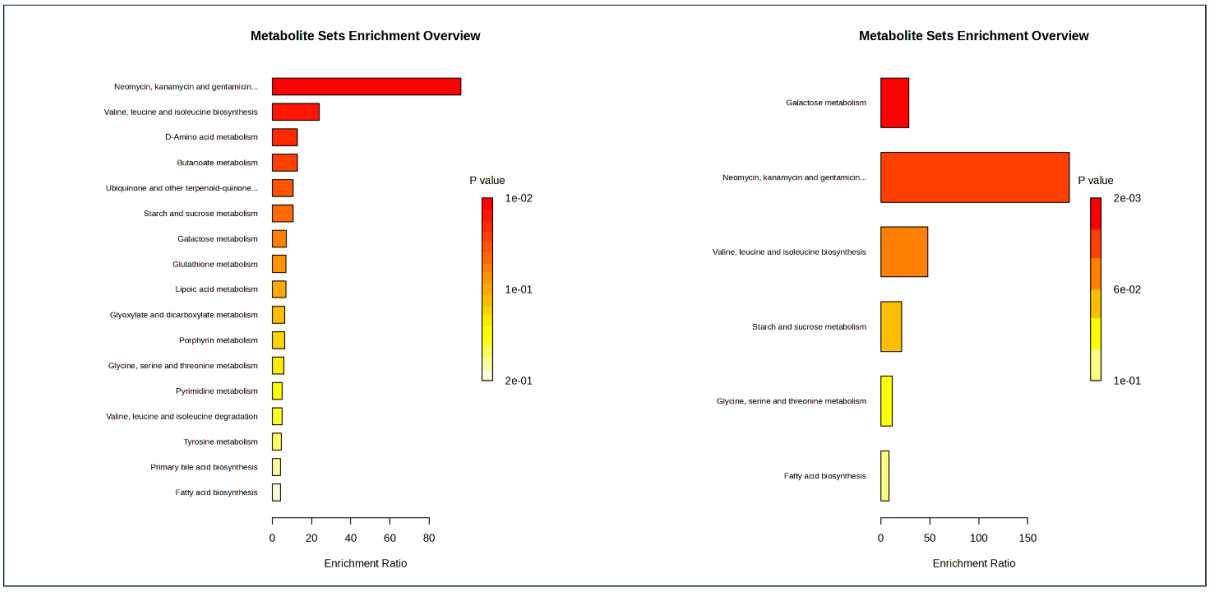


Figura 14 - Analisi di arricchimento dei pathway metabolici salivari. Rappresentazione grafica dei risultati della Metabolite Set Enrichment Analysis (MSEA) applicata ai metaboliti salivari discriminanti. I principali pathway alterati includono il metabolismo dei BCAA, il ciclo dell'urea, la β-ossidazione degli acidi grassi, il metabolismo del glutatione e della colina, indicando una combinazione di disfunzione mitocondriale, stress ossidativo e alterazioni del metabolismo lipidico nei soggetti obesi e steatosici. La lunghezza delle barre e la scala cromatica riflettono l'enrichment ratio e la significatività statistica (FDR < 0,05).

3.3.4 Sintesi interpretativa dei risultati salivari

L'insieme delle evidenze emerse dall'analisi dei metaboliti salivari suggerisce che la MASLD pediatrica sia associata a un'ampia riprogrammazione metabolica, nella quale i processi legati al metabolismo degli aminoacidi, dei lipidi e degli zuccheri risultano profondamente alterati. La combinazione di ridotta β-ossidazione, aumento del lattato, incremento dei BCAA e alterazioni del ciclo dell'urea delinea un quadro fisiopatologico coerente con lo sviluppo e la progressione della steatosi epatica in età evolutiva.

In questo contesto, la saliva emerge come una matrice particolarmente promettente per lo sviluppo di strumenti di screening non invasivi, in grado di intercettare precocemente i bambini a maggior rischio di MASLD e di disfunzione metabolica sistemica.

3.4 Analisi metabolomica urinaria

L'analisi metabolomica non mirata dei campioni urinari è stata eseguita in un sottogruppo della coorte clinica descritta nel Capitolo 3, costituito dai soggetti per i quali era disponibile un campione di urina (n = 143/163; 87,7%). Come per la saliva, i bambini e gli adolescenti sono stati classificati in normopeso, sovrappeso e obesi sulla base del BMI z-score per età e genere (De Onis, 2007) e stratificati in presenza o assenza di steatosi epatica **ecografica**, definita dal giudizio del radiologo pediatrico esperto.

3.4.1 Analisi multivariata (PLS-DA e validazione)

L'urina, per sua natura, presenta una variabilità interindividuale fisiologicamente più ampia rispetto alla saliva; nonostante ciò, l'analisi multivariata ha permesso di evidenziare pattern metabolici distinti. Una prima esplorazione tramite PLS-DA ha mostrato che la distinzione tra i gruppi ponderali risulta solo parzialmente percepibile, mentre la separazione tra soggetti con steatosi epatica e soggetti privi di steatosi emerge in maniera più netta e riproducibile.

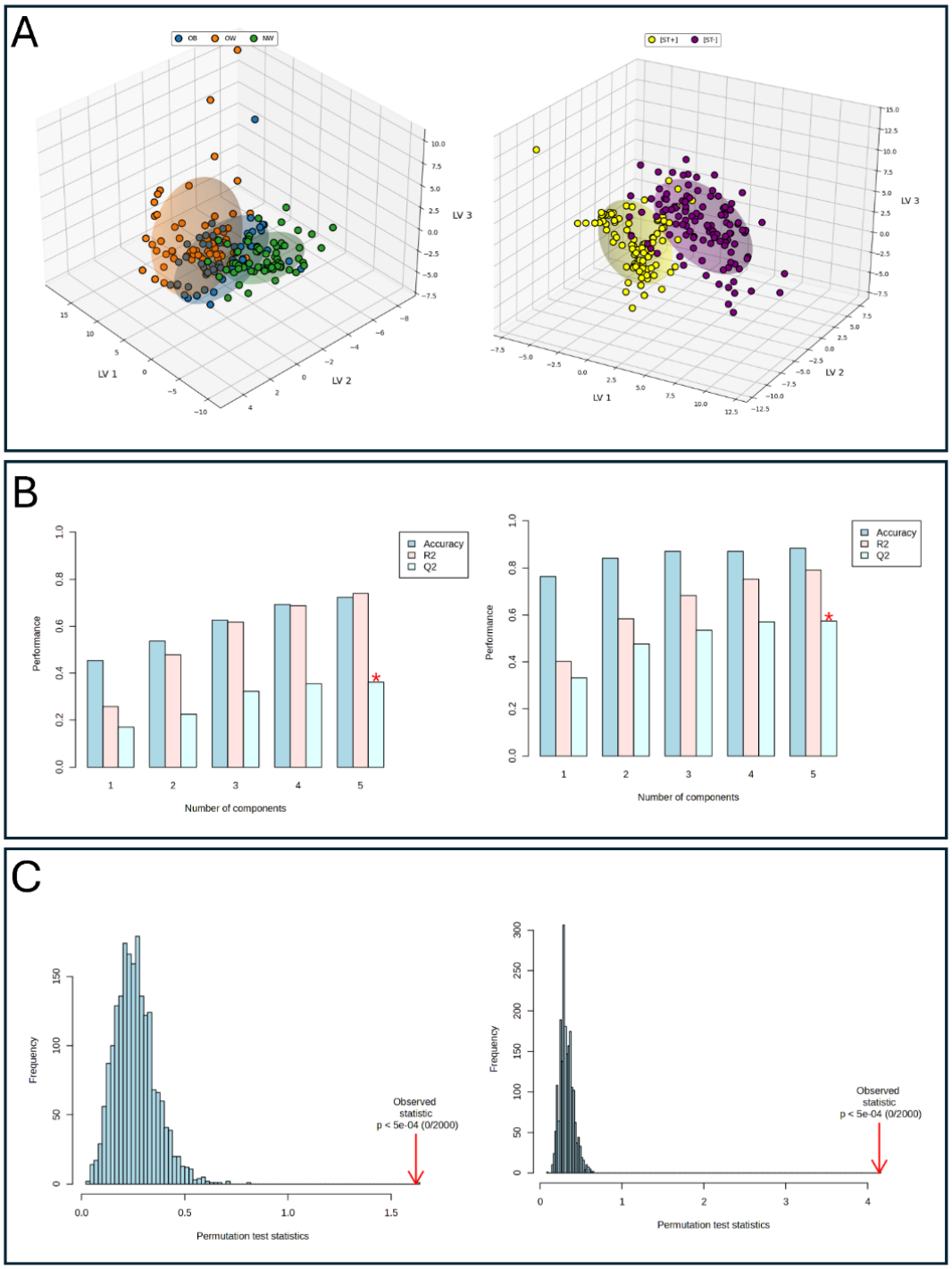


Figura 15 - Analisi PLS-DA delle urine nei soggetti con e senza steatosi epatica. *(A) Modello PLS-DA tridimensionale costruito sui profili metabolomici urinari, con evidenza di una separazione netta tra soggetti steatosici (S+) e non steatosici (S–). I soggetti con steatosi mostrano un cluster più compatto, indicativo di una firma metabolica relativamente omogenea associata alla disfunzione epatica. (B) Valori di R^2Y, Q^2 e accuratezza in funzione del numero di componenti latenti. Il modello mostra buone capacità predittive e una spiegazione coerente della varianza biologica legata alla steatosi. (C) Permutation test ($n = 2000$) a supporto della significatività del modello. I valori osservati risultano esterni alla distribuzione nulla, confermando l'affidabilità della separazione ottenuta ($p < 0,05$).*

La Figura 12A mostra la rappresentazione tridimensionale del modello PLS-DA applicato ai campioni suddivisi per presenza o assenza di steatosi ecografica. I soggetti steatosici tendono a raccogliersi in una regione relativamente compatta dello spazio latente, suggerendo un profilo metabolico più omogeneo e specificamente modificato dalla condizione epatica. Al contrario, i soggetti senza steatosi risultano più dispersi, a testimonianza di una maggiore eterogeneità fisiologica nella popolazione "non steatosica".

Questa separazione qualitativa è supportata dalle metriche quantitative del modello (Figura 12B): i valori di R^2Y ($\approx 0{,}68$) e di Q^2 ($\approx 0{,}41$) indicano che il modello spiega una quota rilevante della varianza associata alla steatosi ed è in grado di generalizzare in modo soddisfacente ai dati non visti, rispettando i criteri comunemente applicati negli studi di metabolomica non mirata.

L'affidabilità del modello è stata ulteriormente corroborata dal permutation test riportato in Figura 12C: i valori osservati delle statistiche di modello si collocano ben al di fuori della distribuzione nulla generata dalle permutazioni casuali, con $p < 0{,}05$. Nel complesso, l'analisi PLS-DA mostra come l'urina rappresenti una matrice sensibile nel discriminare lo stato epatico dei soggetti pediatrici. Pur risultando meno performante della saliva nel distinguere i gruppi ponderali, essa si dimostra particolarmente efficace nel rilevare la presenza di steatosi, probabilmente in virtù della capacità di riflettere metaboliti intermedi del metabolismo epatico e mitocondriale.

3.4.2 Metaboliti discriminanti nei soggetti con steatosi

Una volta verificata la robustezza del modello multivariato, l'attenzione è stata rivolta all'identificazione dei metaboliti dotati di maggiore potere discriminante tra soggetti con e senza steatosi ecografica. I metaboliti più rilevanti, selezionati sulla base dei VIP score (VIP > 1), sono riassunti in Figura 13.

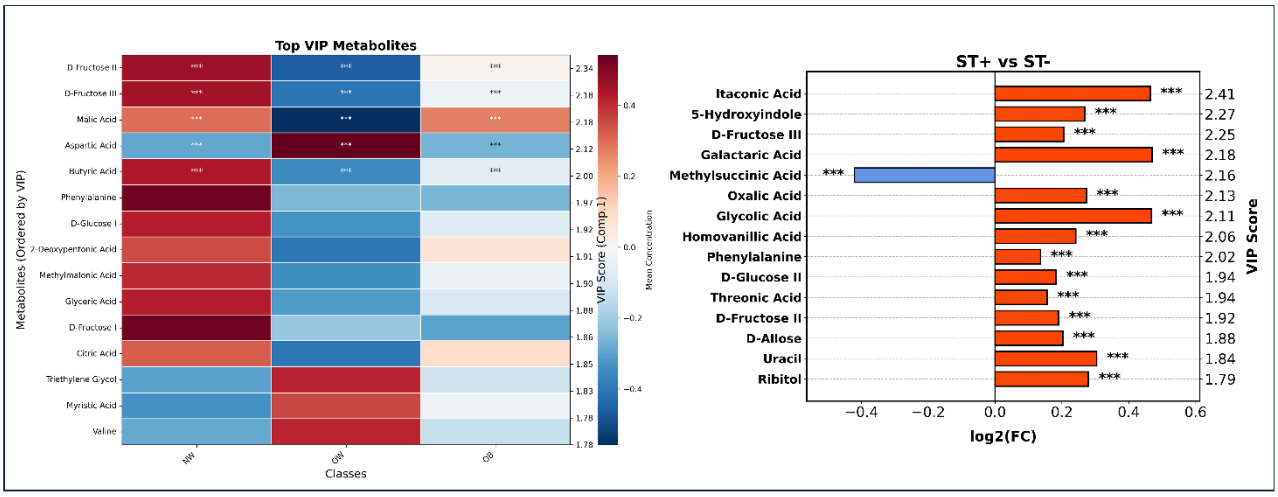


Figura 16 - Metaboliti discriminanti nelle urine: heatmap e VIP score

Heatmap dei metaboliti urinari con maggiore potere discriminante tra soggetti steatosici e non steatosici, identificati tramite VIP score > 1 nel modello PLS-DA. I pattern evidenziano l'aumento di intermedi del ciclo di Krebs (come citrato e succinato), l'incremento dei derivati del triptofano prodotti dal microbiota intestinale e la riduzione della creatinina, della carnitina e dei metaboliti associati alla β-ossidazione. I grafici dei VIP score a destra mostrano il contributo individuale di ciascun metabolita alla classificazione del fenotipo epatico.

Tra le molecole di maggior rilievo, la creatinina e i derivati della creatina risultano ridotti nei soggetti steatosici, spesso caratterizzati da eccesso ponderale. Considerando che la creatinina è tradizionalmente utilizzata come marcatore indiretto della massa muscolare, livelli urinari ridotti suggeriscono una possibile sarcopenia subclinica o, più in generale, un disallineamento nel metabolismo muscolare. In età pediatrica, tali alterazioni sono state descritte in associazione sia con l'obesità sia con la disfunzione epatica metabolica, e la riduzione della creatinina urinaria potrebbe rappresentare un indicatore precoce di alterato equilibrio tra massa magra e massa grassa nei bambini con MASLD.

Un altro insieme di metaboliti di rilievo riguarda gli intermedi del ciclo di Krebs, in particolare citrato e succinato, che risultano aumentati nei soggetti steatosici. L'incremento di questi composti suggerisce una difficoltà del ciclo mitocondriale dell'acido citrico a procedere con efficienza, con conseguente accumulo di intermedi a monte. Queste osservazioni sono coerenti con le evidenze salivari e con il concetto di disfunzione mitocondriale precoce, già riconosciuta

come uno dei principali eventi patogenetici nella transizione dalla steatosi semplice alla steatoepatite.

Anche i metaboliti derivati dal triptofano mostrano un andamento alterato. Molecole come indoloacetato e indossiproprionato risultano aumentate nei soggetti steatosici, indicando un potenziale coinvolgimento del microbiota intestinale. Questi composti sono infatti prodotti principalmente dalla fermentazione del triptofano da parte dei batteri intestinali e la loro presenza elevata nelle urine suggerisce alterazioni dell'asse intestino–fegato, come già ipotizzato in numerosi lavori su MASLD e NAFLD pediatriche. L'aumento dei derivati del triptofano appare inoltre coerente con processi infiammatori di basso grado, che spesso accompagnano la steatosi epatica.

Infine, un elemento di notevole interesse è rappresentato dai livelli ridotti di carnitina e dei derivati degli acidi grassi a catena media e lunga. La carnitina svolge un ruolo centrale nel trasporto degli acidi grassi nei mitocondri per la β-ossidazione. La sua riduzione nelle urine suggerisce una compromissione significativa dell'ossidazione lipidica epatica. Tale deficit rappresenta uno dei segnali biochimici più caratteristici della steatosi e della disfunzione epatica correlata all'obesità, confermando la coerenza fisiopatologica del modello urinario rispetto ai risultati ottenuti nella saliva.

3.4.3 Analisi di arricchimento metabolico nei campioni urinari

La Figura 14 presenta l'analisi di arricchimento dei pathway metabolici maggiormente alterati nei soggetti con steatosi ecografica. Il quadro che emerge è ampiamente coerente con quello ottenuto nella matrice salivare, pur con alcune peculiarità proprie della matrice urinaria.

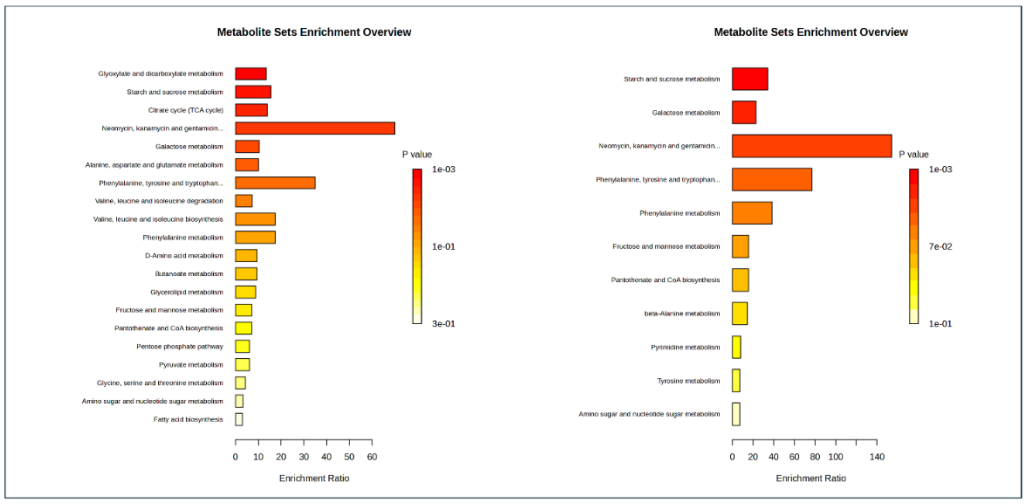


Figura 17 - Analisi di arricchimento dei pathway metabolici urinari

Risultati della Metabolite Set Enrichment Analysis (MSEA) eseguita sui metaboliti urinari discriminanti. I pathway maggiormente alterati nei soggetti steatosici comprendono il metabolismo del triptofano, il ciclo dell'acido citrico (TCA), la β-ossidazione degli acidi grassi e il metabolismo della carnitina. L'insieme delle alterazioni suggerisce un quadro coerente di disfunzione mitocondriale, stress ossidativo e coinvolgimento dell'asse intestino–fegato. La scala cromatica e la lunghezza delle barre riflettono l'entità dell'arricchimento e la significatività delle alterazioni identificate.

Il metabolismo del triptofano risulta tra i pathway maggiormente alterati, confermando l'ipotesi del coinvolgimento microbico nel modulare lo stato metabolico epatico. L'alterazione del ciclo dell'acido citrico rappresenta un ulteriore segnale di inefficienza mitocondriale, evidenziato non solo dai livelli elevati di succinato e citrato, ma anche dalla tendenza a un accumulo sistematico degli intermedi del TCA.

Parallelamente, la β-ossidazione degli acidi grassi appare marcatamente ridotta, portando a un accumulo di acidi dicarbossilici, tipico indicatore biochimico di stress ossidativo e di sovraccarico metabolico epatico.

L'alterazione del metabolismo della carnitina conferma quanto emerso dall'analisi dei singoli metaboliti: la funzione mitocondriale nei soggetti steatosici risulta compromessa, riducendo la capacità del fegato di ossidare adeguatamente gli acidi grassi. Tale osservazione è cruciale perché la disfunzione della β-ossidazione non rappresenta soltanto una conseguenza della steatosi epatica, ma anche un fattore che ne favorisce la progressione.

3.4.4 Sintesi interpretativa dei risultati urinari

Nel loro insieme, i risultati ottenuti dai campioni urinari delineano un profilo metabolico strettamente legato alla presenza di steatosi epatica pediatrica. L'alterazione del metabolismo del triptofano, del ciclo dell'acido citrico, della β-ossidazione e della carnitina converge verso un quadro di disfunzione mitocondriale e di coinvolgimento dell'asse intestino–fegato.

La combinazione di ridotta creatinina, aumento degli intermedi del TCA, alterazione dei derivati del triptofano e deficit funzionale della β-ossidazione suggerisce che l'urina non solo rifletta lo stato epatico, ma possa contribuire a identificare precocemente i bambini con MASLD a maggiore rischio di progressione. In questo senso, i profili metabolomici urinari, integrati con quelli salivari e con i dati clinici, rappresentano un ulteriore tassello verso lo sviluppo di strumenti di screening non invasivi per la MASLD pediatrica.

3.4.5 Integrazione e confronto tra saliva e urina

Uno degli elementi più rilevanti emersi da questo studio è la notevole coerenza tra i profili metabolici ottenuti dalla saliva e quelli ottenuti dall'urina. Sebbene le due matrici riflettano processi fisiologici differenti e abbiano una dinamica distinta, entrambe mostrano un pattern metabolico caratteristico nei soggetti con steatosi epatica pediatrica.

In entrambe le matrici si osserva un incremento dei marker associati allo stress ossidativo, alle alterazioni del metabolismo mitocondriale (in particolare del ciclo dell'acido citrico e della β-ossidazione degli acidi grassi) e all'attivazione di pathway fermentativi da parte del microbiota intestinale. Allo stesso tempo, la riduzione della carnitina e dei metaboliti legati alla β-ossidazione costituisce un segnale convergente e robusto di disfunzione mitocondriale.

La complementarità dei risultati ottenuti nelle due matrici rafforza ulteriormente la validità biologica dei metaboliti individuati e suggerisce che saliva e urina possano essere utilizzate in

sinergia, in un'ottica di screening non invasivo, per identificare precocemente soggetti pediatrici a rischio di MASLD e per caratterizzarne in modo più fine il profilo di disfunzione metabolica.

3.5 Ensemble DW-EML e interpretabilità dei modelli (SHAP)

3.5.1 Prestazioni dell'ensemble DW-EML sulla matrice salivare

L'applicazione del metodo Double-Weighted Ensemble Machine Learning (DW-EML) alla matrice salivare ha prodotto un modello di classificazione estremamente performante nella distinzione tra soggetti steatosici (ST+) e non steatosici (ST–). La distribuzione degli EML-score mostra una separazione netta tra le due classi (Figura 15A), con valori medi del punteggio nettamente superiori nei soggetti ST+ e una soglia ottimale intorno a 147, definita tramite indice di Youden.

La robustezza statistica di questa separazione è confermata dalla curva ROC dell'ensemble (Figura 15B), che evidenzia performance di altissimo livello, con sensibilità del 96%, specificità del 100% e AUC prossima a 1,0. L'andamento della curva, caratterizzato da un rapido incremento della sensibilità anche a livelli molto bassi di falsi positivi, indica un modello estremamente stabile e strettamente allineato ai pattern metabolici osservati nelle analisi PLS-DA preliminari.

L'eccellente prestazione dell'ensemble conferma la rilevanza della saliva come matrice diagnostica per la rilevazione precoce della MASLD pediatrica, in continuità con quanto emerso dai modelli multivariati tradizionali. La coerenza tra analisi lineari, non lineari ed ensemble machine learning rafforza l'idea che la saliva contenga un'impronta metabolica particolarmente nitida della steatosi epatica nei bambini, grazie alla rapidità con cui riflette le variazioni metaboliche sistemiche e al contenuto di metaboliti liberi non legati a proteine.

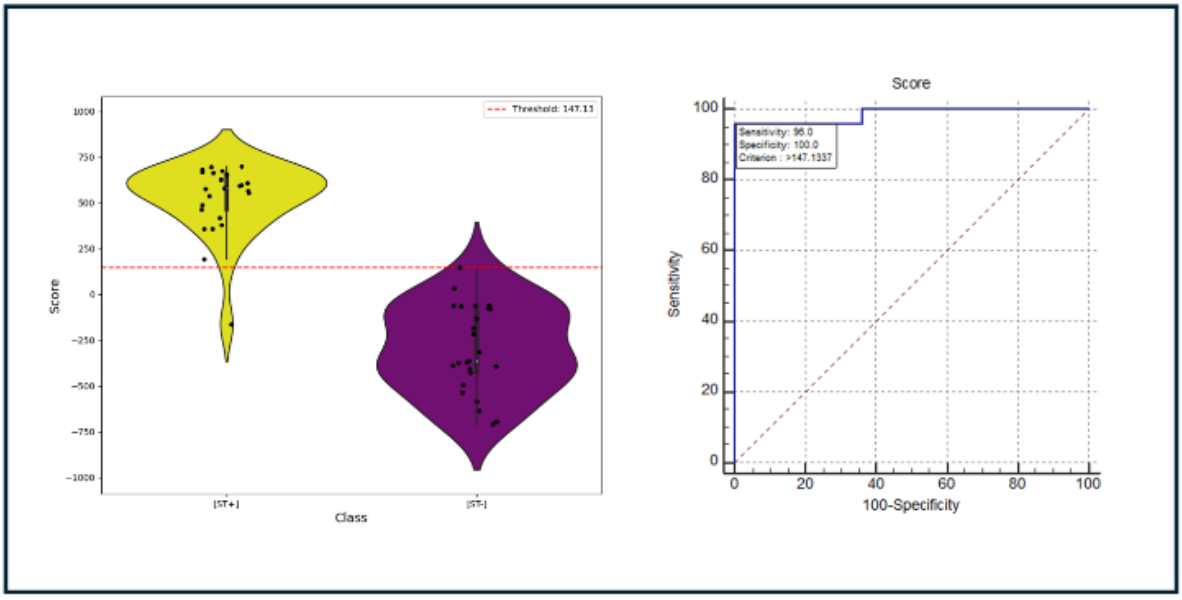


Figura 18 - Ensemble DW-EML (saliva): score e curva ROC

A. Violino plot degli ensemble-score salivari nei soggetti ST+ e ST–, con soglia ottimale definita tramite indice di Youden. La distribuzione mostra una chiara separazione tra i due gruppi
B. Curva ROC del modello DW-EML, con AUC prossima a 0, sensibilità 96% e specificità 100%. Il modello mostra un'eccellente capacità discriminante nella matrice salivare.

3.5.2 Contributo delle variabili nei modelli salivari: interpretazione tramite SHAP e convergenza dei modelli

L'analisi delle SHAP values ha permesso di approfondire il contributo dei singoli metaboliti all'interno dei diversi modelli che costituiscono l'ensemble. Le visualizzazioni SHAP (Figura 16A–H) mostrano chiaramente come diversi metaboliti – tra cui aminoacidi ramificati, acidi organici correlati alla disbiosi, intermedi del ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) e derivati glicolitici – contribuiscano in maniera consistente ad aumentare la probabilità di classificare un campione come steatosico.

Accanto alle rappresentazioni SHAP per i singoli modelli, l'UpSet plot (Figura 16I–J) fornisce una sintesi particolarmente efficace della convergenza tra classificatori, mostrando quali metaboliti ricorrono come rilevanti nel maggior numero di modelli e, di conseguenza, possiedono la maggiore stabilità biologica e predittiva. L'emergere di gruppi metabolici comuni

attraverso architetture eterogenee – da modelli lineari, come la regressione logistica e i generalized linear model, a metodi più complessi, come gradient boosting, random forest, SVM e deep learning – evidenzia l'esistenza di un nucleo fisiopatologico condiviso della MASLD pediatrica, conferendo al modello una robustezza superiore e una solida coerenza biologica.

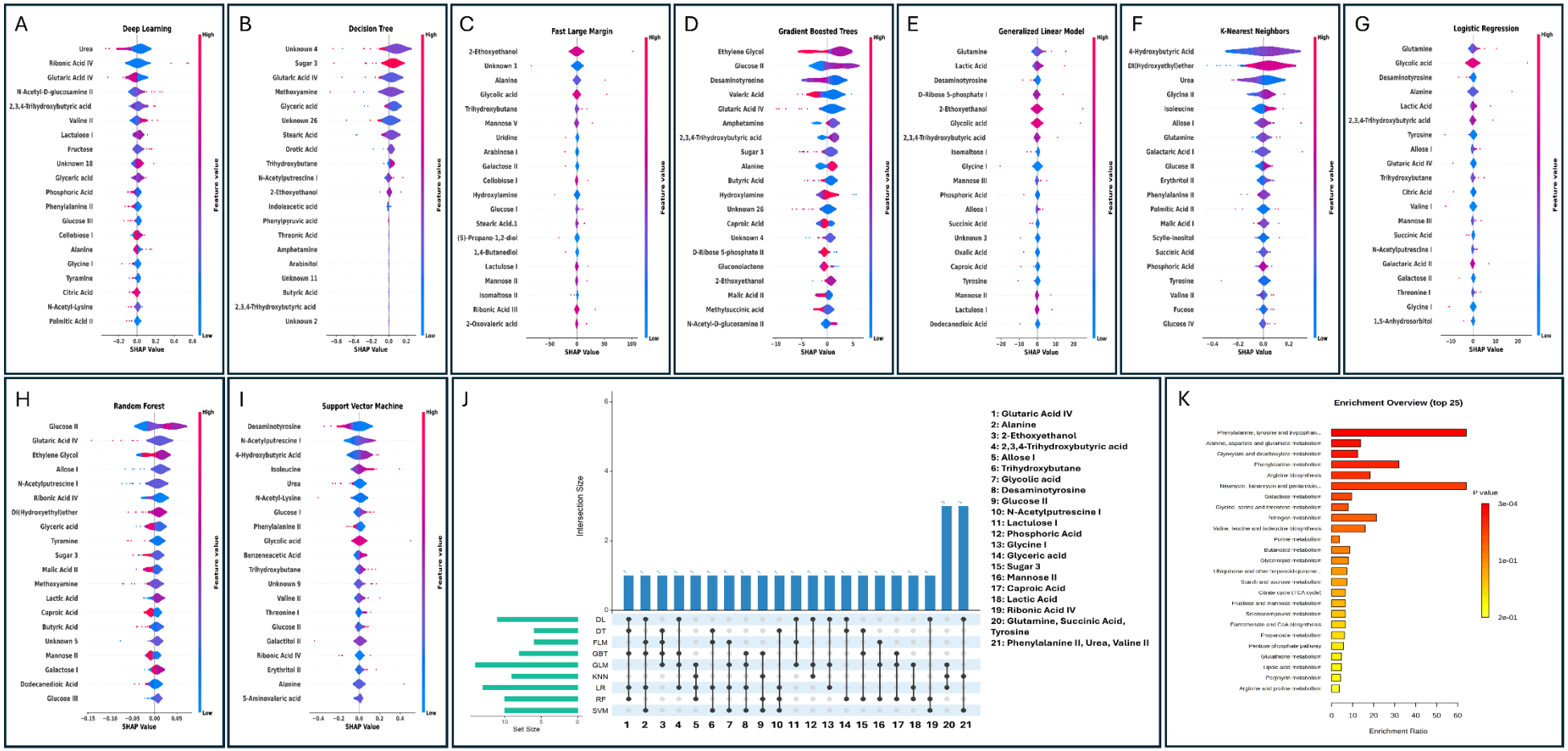


Figura 19 - SHAP e UpSet plot dei modelli salivari A–H.

A–H. Valori SHAP per ciascun modello costituente l'ensemble (Deep Learning, Decision Tree, Fast Large Margin, Gradient Boosted Trees, Generalized Linear Model, KNN, Logistic Regression, Random Forest, SVM), che illustrano il contributo dei metaboliti alla classificazione ST+/ST–.

I–J. UpSet plot dei metaboliti selezionati dai modelli: le intersezioni evidenziano un nucleo di metaboliti condivisi da 6–10 modelli, indicativi di elevata stabilità biologica e predittiva.

3.5.3 Prestazioni dell'ensemble DW-EML nella matrice urinaria

L'ensemble DW-EML applicato alla matrice urinaria ha prodotto risultati altrettanto rilevanti, pur con una separazione tra ST+ e ST– leggermente più sfumata rispetto a quella osservata nella saliva. Il violino plot dell'ensemble-score (Figura 17A) mostra due distribuzioni comunque ben distinte, con valori significativamente più elevati nei soggetti steatosici, seppur con una variabilità più ampia, in linea con la maggiore eterogeneità fisiologica della matrice urinaria.

La curva ROC associata al modello (Figura 17B) evidenzia una sensibilità del 95,2% e una specificità dell'88,4%, a conferma di una performance diagnostica molto buona. La specificità inferiore rispetto alla matrice salivare è coerente con il carattere cumulativo dell'urina, che integra segnali metabolici provenienti da un intervallo temporale più ampio e da vie metaboliche multiple, incluse quelle non direttamente correlate alla funzione epatica.

Questi risultati dimostrano che anche il metabolismo urinario conserva un'impronta caratteristica della steatosi pediatrica, particolarmente evidente negli intermedi del ciclo degli acidi tricarbossilici, nei derivati del triptofano, negli acidi dicarbossilici e nei metaboliti associati alla β-ossidazione.

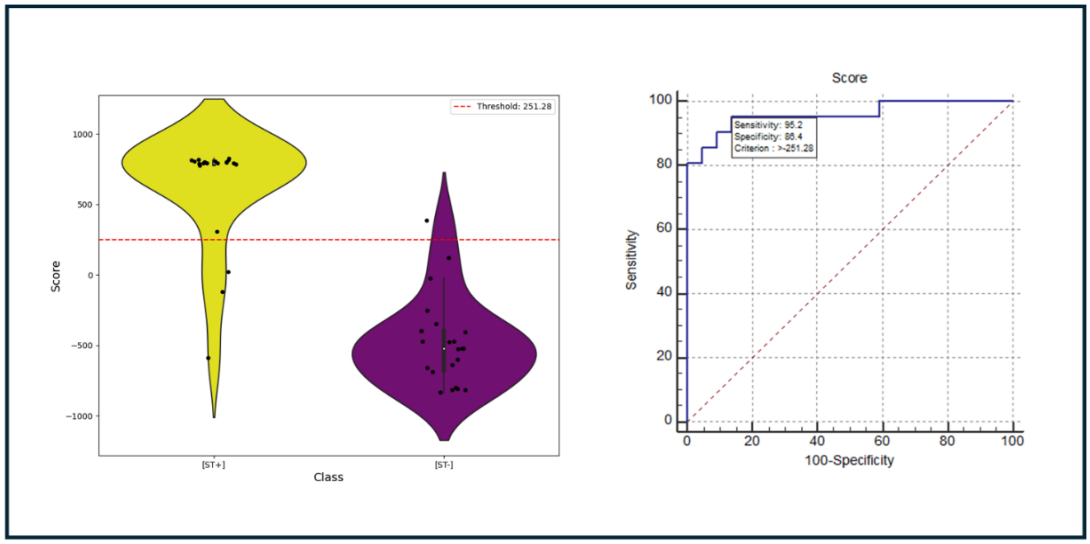


Figura 20 -Ensemble DW-EML (urina): score e curva ROC. A. Violino plot dell'ensemble-score urinario nei soggetti ST+ e ST–, con soglia ottimale definita tramite indice di Youden. B. Curva ROC dell'ensemble DW-EML in matrice urinaria, con sensibilità del 95,2% e specificità dell'88,4%. Le performance confermano la capacità del modello di rilevare i segnali metabolici urinari della steatosi pediatrica.

3.5.4 Interpretabilità dei modelli urinari: analisi SHAP e convergenza delle selezioni

Le analisi SHAP applicate ai modelli urinari (Figura 18A–H) mostrano come alcuni metaboliti – in particolare acidi organici quali ossalico, glicolico, metilsuccinico, 3-idrossibutirrico e derivati del triptofano – contribuiscano a spostare la classificazione verso lo stato steatosico. Al contrario, metaboliti quali citrato, succinato, carnitina e derivati della creatina tendono ad associarsi a probabilità inferiori di steatosi, coerentemente con la loro riduzione fisiopatologica in condizioni di disfunzione epatica e mitocondriale.

Gli UpSet plot (Figura 18I–K) confermano l'esistenza di un insieme centrale di metaboliti selezionati da almeno 6–10 modelli, suggerendo che la fisiopatologia della MASLD pediatrica si manifesti in modo robusto e coerente anche nella matrice urinaria, nonostante la sua maggiore variabilità intrinseca.

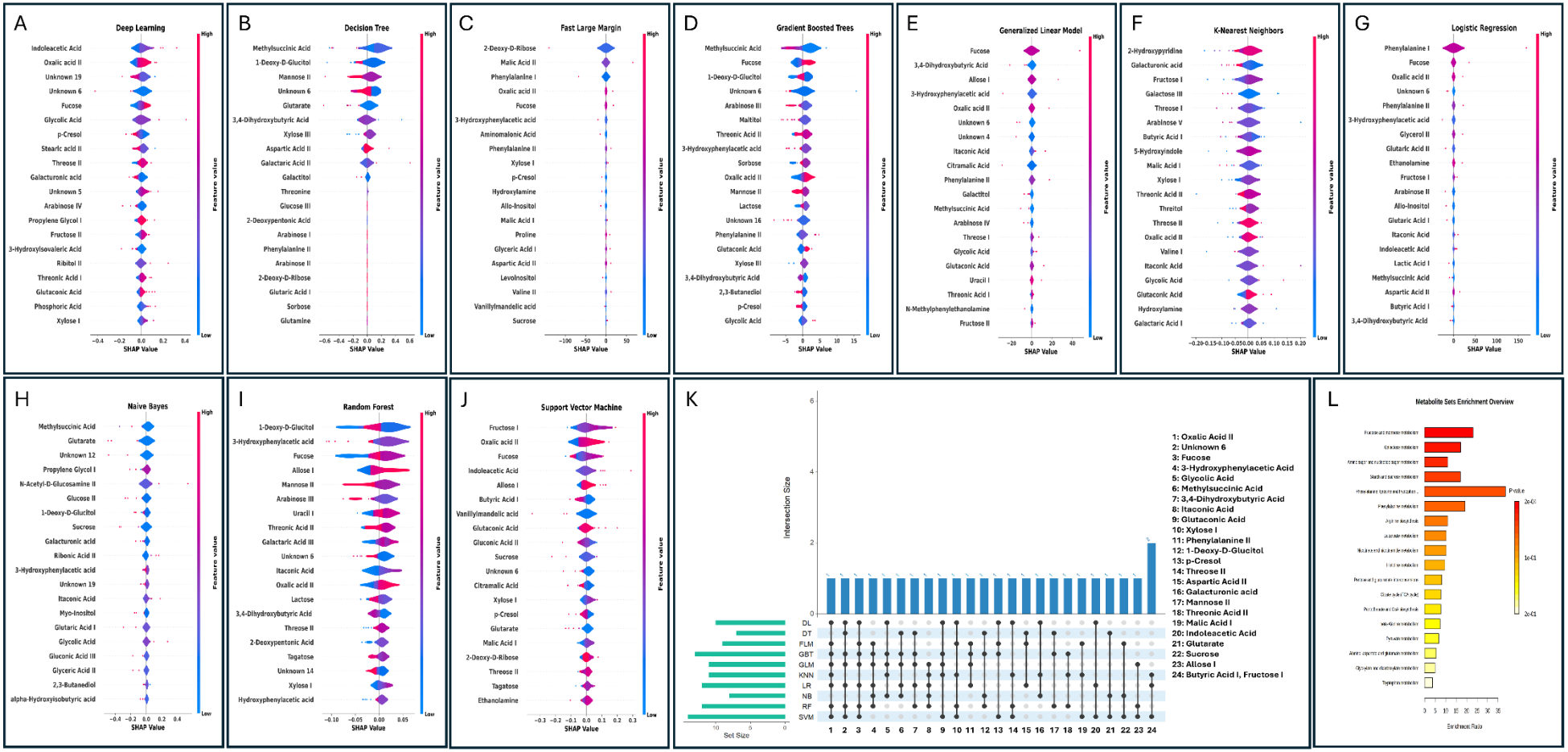


Figura 21 - SHAP e UpSet plot dei modelli urinari.

A–H. Valori SHAP per ciascun modello calcolato sui metaboliti urinari, evidenziando il ruolo discriminante di acidi organici, intermedi del TCA, derivati del triptofano e metaboliti energetici. I–K. UpSet plot dei metaboliti condivisi tra i modelli: le intersezioni rivelano un insieme stabile di metaboliti predittivi, coerenti con la fisiopatologia della MASLD pediatrica.

3.5.5 Sintesi interpretativa dell'ensemble DW-EML e delle analisi di spiegabilità

Nel loro insieme, le analisi condotte confermano che:

• il DW-EML rappresenta un approccio predittivo estremamente accurato, capace di combinare in modo sinergico modelli lineari e non lineari;

• i metaboliti identificati come rilevanti sono fortemente coerenti tra saliva e urina, delineando un nucleo metabolico condiviso;

• le analisi SHAP permettono di comprendere in modo rigoroso come la variazione di ciascun metabolita influenzi la probabilità di steatosi;

• gli UpSet plot evidenziano la presenza di un nucleo metabolico fisiopatologicamente consistente, selezionato in maniera ricorrente da molteplici architetture di modello.

Nel complesso, l'ensemble DW-EML conferma e amplifica la sensibilità delle matrici salivare e urinaria nel rilevare alterazioni metaboliche precoci della MASLD pediatrica, sostenendo l'uso combinato delle due matrici in un futuro contesto di screening clinico non invasivo.

Questi risultati forniscono le basi per la discussione critica dei profili metabolomici e delle prestazioni predittive dei modelli, che sarà affrontata nel Capitolo 4.

Capitolo 4. Discussione

4.1 Sintesi dei risultati principali

Nel presente studio è stata descritta una coorte di 163 bambini e adolescenti di età compresa tra circa 5 e 14 anni, reclutati sul territorio nell'ambito di campagne di prevenzione e screening cardiometabolico coordinati dal Dipartimento di Pediatria, in cui oltre la metà dei soggetti presentava eccesso ponderale (sovrappeso o obesità). In questa popolazione, la valutazione ecografica qualitativa eseguita da radiologo esperto ha permesso di distinguere i soggetti con e senza steatosi epatica; la steatosi è stata quindi analizzata come variabile dicotomica, al fine di esplorare le associazioni con i principali parametri antropometrici e pressori e con i profili metabolomici di saliva e urine. Complessivamente, la steatosi epatica ecografica è risultata frequente, con una prevalenza intorno a un terzo dei soggetti, e ha mostrato un chiaro gradiente in relazione alla classe ponderale: la quota di steatosi aumenta progressivamente dal normopeso all'obesità, fino a superare il 60% tra i bambini obesi.

L'analisi inferenziale ha confermato che sia l'adiposità globale (BMI z-score) sia l'adiposità centrale (circonferenza vita z-score) sono fortemente associate alla presenza di steatosi epatica. All'aumentare di 1 DS di BMI o di circonferenza vita, le *odds* di steatosi aumentano di circa 2–2,5 volte, configurando questi indici auxologici come marcatori semplici ma potenti di rischio epatico nella pratica clinica. Parallelamente, il profilo pressorio mostra una tendenza verso valori più elevati in relazione all'eccesso ponderale, con correlazioni positive tra BMI z-score, circonferenza vita z-score e z-score pressori, a conferma dell'intreccio tra rischio epatico e cardiovascolare già in età pediatrica. Nel nostro campione, anche i valori di pressione arteriosa risultavano più elevati nei soggetti con steatosi rispetto a quelli senza, suggerendo una possibile associazione tra alterazioni epatiche e disfunzione cardiometabolica precoce. Queste osservazioni sono coerenti con le evidenze di Hegarty (Hegarty et al., 2023) e Faienza (Faienza et al., 2025), secondo cui la presenza di steatosi epatica in età pediatrica rappresenta un marker d'organo iniziale della sindrome metabolica e un indicatore di rischio cardiovascolare futuro.

La prevalenza complessiva di steatosi rilevata nella nostra popolazione si colloca nel range riportato dalla letteratura internazionale più recente: tra il 7% e il 14% nei bambini della popolazione generale, e fino al 40–70% tra i soggetti obesi, a seconda della popolazione e dei criteri diagnostici (De Boom et al., 2024; Shi et al., 2024; Younossi et al., 2025). Una recente meta-analisi (Putri, 2025) conferma un pattern analogo, stimando una prevalenza media globale del 7,4% nei bambini normopeso e del 52,5% nei bambini obesi. I nostri dati si inseriscono in modo coerente in questo contesto, evidenziando la forte interdipendenza tra obesità e rischio di MASLD, pur con la presenza di alcuni casi di steatosi anche in soggetti normopeso, compatibili con il fenotipo *lean MASLD* descritto da Keskin (Keskin et al., 2024). Simili associazioni sono state riportate in ampie coorti pediatriche internazionali: Xing (Xing et al., 2023) hanno documentato una prevalenza di MASLD pari al 36% nei bambini obesi, mentre Choi (Choi et al., 2025) hanno identificato nel rapporto vita/fianchi un predittore indipendente di steatosi nei soggetti pediatrici, sottolineando l'importanza dell'adiposità centrale oltre al solo BMI.

Nel complesso, le nostre osservazioni supportano la visione proposta dai più recenti *consensus* internazionali (European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) et al., 2024; Rinella et al., 2023; Zhang et al., 2024), secondo cui la disfunzione metabolica sistemica, più che il semplice eccesso ponderale, costituisce il fattore chiave nella patogenesi della steatosi epatica pediatrica. Studi recenti su coorti con obesità severa, come quello di Mierzwa (Mierzwa et al., 2025), confermano che la probabilità di MASLD aumenta quasi linearmente con la gravità dell'obesità, mentre modelli di screening non invasivi basati su parametri antropometrici e pressori (Y. Liu et al., 2024) hanno mostrato elevata accuratezza nel predire la presenza di steatosi. In questa prospettiva, anche i risultati del nostro studio sostengono l'utilità di parametri clinici semplici, come BMI z-score e pressione arteriosa, per la preselezione di soggetti pediatrici a rischio di MASLD, aprendo la strada alla loro integrazione con approcci metabolomici non invasivi di secondo livello.

Sul versante "omico", infatti, l'analisi metabolomica non mirata di saliva e urina ha evidenziato pattern metabolici distinti nei soggetti con steatosi rispetto ai coetanei senza steatosi. Nella saliva, i profili metabolici discriminano in modo netto i soggetti obesi e, soprattutto, quelli con steatosi epatica, con alterazioni che coinvolgono in particolare il metabolismo degli aminoacidi ramificati (BCAA), della β-ossidazione degli acidi grassi, del ciclo dell'urea, del glutatione e della colina. Nella matrice urinaria, la separazione tra soggetti con e senza steatosi emerge in modo altrettanto chiaro, con particolare coinvolgimento del metabolismo del triptofano, del ciclo dell'acido citrico (TCA), della β-ossidazione e della carnitina. L'integrazione dei risultati nelle due matrici suggerisce l'esistenza di una "firma metabolica" condivisa della MASLD pediatrica, caratterizzata da disfunzione mitocondriale, stress ossidativo e alterazioni dell'asse intestino–fegato.

L'applicazione del modello Double-Weighted Ensemble Machine Learning (DW-EML) ha ulteriormente rafforzato questo quadro, mostrando nella saliva una capacità discriminante molto elevata nel distinguere i bambini con steatosi da quelli senza (sensibilità intorno al 96%, specificità prossima al 100%, AUC vicino a 1). L'uso congiunto di *ensemble learning* e metodi di spiegabilità (SHAP) ha permesso non solo di massimizzare le performance predittive, ma anche di identificare un nucleo stabile di metaboliti maggiormente rilevanti ai fini della classificazione, ponendo le basi per futuri modelli di screening non invasivo basati su pannelli metabolici mirati.

4.2 Confronto con la letteratura clinica su MASLD pediatrica

I risultati del presente studio, che documentano una frequenza significativamente maggiore di steatosi epatica nei soggetti pediatrici con eccesso ponderale, si inseriscono pienamente nel quadro clinico descritto dalla letteratura recente sulla *metabolic dysfunction–associated steatotic liver disease* (MASLD) in età evolutiva. Numerosi studi confermano che la MASLD rappresenta oggi la forma più comune di epatopatia cronica in età pediatrica, con una prevalenza stimata tra il 5

e il 10% nella popolazione generale e fino al 50–70% nei bambini con obesità (Hegarty et al., 2023; Putri, 2025; Zhang et al., 2024). In questo contesto, i dati della nostra coorte – con una prevalenza complessiva di steatosi intorno a un terzo dei soggetti – risultano coerenti con le stime internazionali riportate in popolazioni a elevato rischio cardiometabolico.

Il forte legame con l'obesità è ormai considerato il principale determinante clinico della malattia: la maggior parte delle coorti pediatriche mostra che l'aumento di BMI e circonferenza vita si associa linearmente al rischio di steatosi epatica (Choi et al., 2025; Xing et al., 2023). Nel nostro campione, la distribuzione del BMI z-score e della circonferenza vita z-score, con valori medi superiori allo 0 anche nei bambini formalmente classificati come normopeso, indica un contesto di generale "shift" verso l'alto dei parametri auxologici rispetto alle curve WHO. La prevalenza elevata di steatosi nelle classi di sovrappeso e, soprattutto, di obesità è in linea con quanto riportato in queste casistiche, che descrivono la MASLD come la principale epatopatia cronica associata all'eccesso ponderale in età evolutiva. Nel nostro studio, l'associazione quantitativa tra adiposità e steatosi, espressa attraverso gli *odds ratio* per 1 DS di BMI e circonferenza vita, suggerisce che ogni incremento "standardizzato" del carico adiposo si traduce in un salto di rischio non trascurabile; il ruolo particolarmente marcato della circonferenza vita conferma l'importanza dell'adiposità viscerale come determinante chiave della steatosi epatica e, più in generale, della disfunzione metabolica sistemica.

Anche se la steatosi era prevalentemente concentrata nei soggetti con sovrappeso o obesità, la rilevazione di alcuni casi di MASLD tra i bambini normopeso supporta l'esistenza del fenotipo *lean MASLD*, descritto in diverse popolazioni pediatriche (Di Sessa et al., 2024; Keskin et al., 2024), in cui il ruolo di fattori genetici, epigenetici e metabolici può prevalere su quello del peso corporeo. Questi casi, seppur numericamente limitati, sottolineano come il solo BMI non sia sempre sufficiente a esaurire lo spettro del rischio epatico e come una quota di bambini apparentemente "a basso rischio" possa presentare comunque un accumulo intraepatico di trigliceridi.

Oltre all'obesità, la presenza di componenti della sindrome metabolica – come alterazioni glicemiche, dislipidemia e ipertensione – rappresenta un importante fattore associato. Nei nostri dati, il pattern pressorio osservato – con z-score medi di pressione arteriosa tendenzialmente elevati e correlazioni positive tra BMI/circonferenza vita e pressione arteriosa sia sistolica sia diastolica – si inserisce in un quadro di rischio cardiometabolico integrato, in cui fegato, sistema cardiovascolare e tessuto adiposo partecipano a un'unica "sindrome" dismetabolica. La tendenza all'aumento dei valori pressori nei soggetti con steatosi è in linea con quanto riportato da Faienza (Faienza et al., 2024) e da Maffeis (Maffeis et al., 2024), che documentano un legame bidirezionale tra disfunzione epatica e alterazioni glicometaboliche già in età pediatrica. Secondo queste evidenze, la steatosi epatica non è solo una conseguenza dell'obesità, ma anche un potenziale amplificatore della disfunzione metabolica, in grado di accelerare la comparsa di insulino-resistenza e di aumentare il rischio cardiovascolare futuro.

Sul piano epidemiologico, la prevalenza e le associazioni osservate nel nostro studio risultano sovrapponibili a quelle di coorti europee e italiane recenti. In una meta-analisi multicentrica, Riekki (Riekki et al., 2023) riporta una prevalenza di MASLD del 37% nei bambini obesi e del 9% nei normopeso, mentre Mierzwa et al. (2025) confermano valori simili in una popolazione polacca con obesità severa. Dati nazionali provenienti da casistiche italiane (Di Sessa et al., 2024; Faienza et al., 2024) collocano la prevalenza complessiva tra il 30% e il 45%, con una marcata predominanza maschile, in linea con la distribuzione osservata nel nostro campione. La nostra coorte, reclutata in un setting clinico ad alto rischio, si colloca quindi in continuità con queste esperienze, mostrando una prevalenza di MASLD comparabile e un profilo di associazioni con adiposità e componenti della sindrome metabolica sovrapponibile a quello riportato nelle principali serie europee.

Infine, le nostre osservazioni si allineano con i più recenti documenti di consenso e di posizione internazionale (European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) et al., 2024; Rinella et al., 2023; Vimalesvaran et al., 2024; Zhang et al., 2024), che

definiscono la MASLD pediatrica come una condizione multifattoriale, in cui obesità, insulino-resistenza, disfunzione lipidica e infiammazione di basso grado concorrono a determinare l'accumulo intraepatico di trigliceridi. In questo quadro, la valutazione routinaria della circonferenza vita – spesso trascurata nella pratica clinica rispetto al BMI – emerge come componente essenziale dell'inquadramento dei bambini con eccesso ponderale, così come lo screening pressorio sistematico nei soggetti con steatosi o forte sospetto di MASLD. L'insieme delle evidenze suggerisce quindi che la steatosi epatica in età pediatrica costituisca un precoce indicatore di rischio metabolico sistemico, più che una semplice manifestazione epatica dell'obesità, e che la sua identificazione precoce possa offrire una finestra di intervento cruciale per la prevenzione del rischio cardiometabolico a lungo termine.

4.3 Interpretazione biologica dei profili metabolomici (saliva)

L'analisi metabolomica della saliva ha rappresentato uno degli elementi più innovativi del presente studio, consentendo di esplorare in modo non invasivo le relazioni tra metabolismo sistemico, stato nutrizionale e presenza di steatosi epatica in età pediatrica. L'osservazione di specifici pattern metabolici, riconducibili ad alterazioni dei *pathway* energetici, ossidativi e aminoacidici, suggerisce che la saliva possa fungere da vera e propria "finestra metabolica", in grado di riflettere processi sistemici coinvolti nella patogenesi della MASLD.

Le recenti review di Zhao (X. Zhao et al., 2025) e Xu (Xu et al., 2025) offrono un quadro biologico utile per interpretare questi risultati. Zhao descrive la saliva come una matrice dinamica capace di integrare segnali provenienti dal metabolismo energetico e dallo stress ossidativo, grazie alla presenza di acidi organici, aminoacidi e acilcarnitine che riflettono lo stato mitocondriale e redox sistemico. Xu, invece, propone un modello integrato dell'asse microbiota orale–intestino–fegato, in cui metaboliti microbici come lattato, butirrato e derivati del triptofano modulano infiammazione e metabolismo lipidico epatico. Questi meccanismi

spiegano come alterazioni del metaboloma salivare possano rispecchiare una disfunzione metabolica sistemica e anticipare i segni clinici della steatosi epatica.

In questo contesto si inseriscono i risultati del presente studio, in cui la matrice salivare ha mostrato una notevole capacità di catturare le alterazioni metaboliche associate sia all'aumento dell'adiposità sia alla presenza di steatosi epatica. La separazione ottenuta con i modelli PLS-DA tra normopeso, sovrappeso e obesi, e in modo ancora più netto tra soggetti steatosici e non steatosici, suggerisce che la saliva rifletta in maniera sensibile la riprogrammazione metabolica sistemica che accompagna la MASLD pediatrica. L'analisi di arricchimento dei *pathway* ha evidenziato il coinvolgimento di numerosi snodi metabolici chiave: metabolismo degli aminoacidi ramificati (BCAA), ciclo dell'urea, β-ossidazione degli acidi grassi, metabolismo del glutatione e della colina. L'aumento dei BCAA e degli intermedi azotati, associato a un'alterazione del ciclo dell'urea, è coerente con un ambiente ipercatabolico e pro-infiammatorio, in cui l'omeostasi proteica risulta perturbata. La riduzione della β-ossidazione, accompagnata da segnali di stress ossidativo e da una compromissione del metabolismo del glutatione, indica una difficoltà del mitocondrio nel gestire il carico di acidi grassi e le specie reattive dell'ossigeno, configurando un quadro di disfunzione mitocondriale precoce.

L'alterazione del metabolismo della colina e della fosfatidilcolina è particolarmente rilevante, perché queste molecole sono essenziali per la sintesi e la secrezione delle VLDL. Un deficit relativo in questo ambito può favorire l'accumulo intraepatico di trigliceridi, contribuendo non solo all'instaurarsi della steatosi, ma anche alla sua progressione verso forme più severe di malattia. Nel complesso, la firma metabolica salivare descritta in questo studio si sovrappone a molte delle alterazioni riportate in letteratura in contesti di obesità e MASLD, ma ha il vantaggio di essere ottenuta da una matrice facilmente accessibile e non invasiva.

Questi dati si collocano in continuità con studi precedenti. In un lavoro condotto dal nostro gruppo (Troisi et al., 2019) è stata identificata una caratteristica firma metabolomica salivare

associata all'obesità e alla steatosi epatica pediatrica, con incremento di derivati degli aminoacidi aromatici, lattato e marker di stress ossidativo, in parallelo con un profilo insulinico alterato. Tali risultati hanno aperto la strada all'uso della saliva come potenziale indicatore di disfunzione mitocondriale e resistenza insulinica, due processi chiave nella fisiopatologia della MASLD. Ulteriori evidenze a supporto provengono dal lavoro di India Aldana (India Aldana et al., 2023), che ha mostrato una relazione significativa tra concentrazioni salivari di BCAA, acilcarnitine e BMI in adolescenti sani e in sovrappeso, indicando una ridotta efficienza della β-ossidazione lipidica e un accumulo di intermedi del ciclo di Krebs.

Un contributo importante alla comprensione della variabilità del metaboloma salivare in età evolutiva deriva dal recente studio multicentrico europeo di De Paepe (De Paepe et al., 2025), che rappresenta il più ampio dataset di riferimento finora disponibile, con oltre 400 campioni analizzati su una coorte di più di 1 200 bambini e adolescenti. Gli autori hanno dimostrato che la variabilità del metaboloma salivare riflette indicatori sistemici quali BMI, sesso, età e stato infiammatorio di basso grado, confermando che questa matrice biologica integra segnali provenienti da più distretti metabolici.

Il presente studio, pur basandosi su una numerosità inferiore, ha permesso di approfondire la componente funzionale dei profili metabolici, esplorando l'associazione tra metaboliti salivari, parametri antropometrici e quadro epatico. L'osservazione di pattern specificamente associati alla steatosi, indipendentemente dalla sola classe ponderale, suggerisce che la matrice salivare possa cogliere non solo il "quantum" di adiposità, ma anche la qualità della disfunzione metabolica epatica, contribuendo a distinguere fenotipi metabolici diversi (ad esempio MHO vs MUO) all'interno della stessa categoria di peso. In questo senso, i nostri risultati forniscono una validazione indipendente di pattern metabolici già descritti nella letteratura internazionale e contribuiscono a delineare la saliva come strumento di screening non invasivo per la valutazione precoce della disfunzione metabolica e dello stress ossidativo associati alla MASLD pediatrica.

4.4 Interpretazione biologica dei profili urinari e confronto con la saliva

L'analisi metabolomica urinaria ha fornito informazioni complementari rispetto alla saliva, permettendo di esplorare in modo più diretto i *pathway* energetici e ossidativi che riflettono il metabolismo sistemico e mitocondriale. Nel nostro studio, la matrice urinaria ha confermato e ampliato il quadro emerso dalla saliva: la distinzione tra soggetti con e senza steatosi epatica è risultata chiaramente percepibile nei modelli PLS-DA, mentre la separazione tra le sole classi ponderali è apparsa meno marcata. Questo dato suggerisce che l'urina rifletta in modo più specifico lo stato epatico e la disfunzione metabolica sistemica, piuttosto che il solo carico adiposo.

I profili identificati mostrano variazioni coerenti con un'alterazione della β-ossidazione degli acidi grassi, del ciclo dell'acido citrico (TCA) e del metabolismo del triptofano, *pattern* già ampiamente associati alla disfunzione epatica e all'insulino-resistenza in età pediatrica. Il lavoro di Troisi (Troisi et al., 2017) ha rappresentato uno dei primi tentativi di caratterizzare la firma urinaria della NAFLD pediatrica, evidenziando nei bambini obesi la presenza di un accumulo di intermedi del TCA (succinato, fumarato, malato) e di derivati della β-ossidazione incompleta, insieme a una ridotta escrezione di composti derivati dall'ossidazione del triptofano. Questi risultati suggeriscono un'alterata efficienza mitocondriale e un incremento dello stress ossidativo, elementi fisiopatologici centrali nella MASLD.

L'analisi di arricchimento dei *pathway* nel nostro campione ha posto in primo piano proprio il metabolismo del triptofano, il ciclo dell'acido citrico, la β-ossidazione degli acidi grassi e il metabolismo della carnitina. L'alterazione delle vie del triptofano – che comprendono, tra le altre, le vie chinureninica, serotoninergica e indolica – suggerisce un coinvolgimento dell'asse intestino–fegato e del microbiota nella modulazione del fenotipo metabolico epatico: metaboliti derivati dal triptofano sono infatti noti per agire come segnali immunometabolici, capaci di

influenzare la permeabilità intestinale, la risposta infiammatoria e la funzione epatica. L'accumulo di intermedi del TCA, associato a una riduzione della capacità di β-ossidazione e a un incremento di acidi dicarbossilici, è compatibile con un quadro di stress mitocondriale e di sovraccarico ossidativo. In altre parole, il mitocondrio sembra trovarsi in una condizione di "collasso funzionale" in cui l'ossidazione degli acidi grassi è inefficiente, il ciclo di Krebs è spinto verso un accumulo di intermedi e le vie alternative (inclusi percorsi di ω-ossidazione) vengono attivate come risposta compensatoria. Il metabolismo della carnitina, infine, rappresenta un nodo cruciale: la riduzione della biodisponibilità di carnitina e dei suoi derivati compromette ulteriormente l'ingresso degli acidi grassi a lunga catena nel mitocondrio, instaurando un circolo vizioso tra deficit di β-ossidazione, accumulo lipidico e stress ossidativo.

Studi precedenti, come quello di Miccheli (Miccheli et al., 2015), avevano già confermato il ruolo di questi *pathway* nel metabolismo urinario pediatrico, mostrando che la modulazione del microbiota intestinale mediante probiotici (VSL#3) può normalizzare parzialmente il profilo metabolico urinario, riducendo i metaboliti indicativi di stress ossidativo e migliorando il metabolismo energetico. Tali risultati sottolineano la connessione funzionale tra asse intestino–fegato e metabolismo urinario, coerente con la natura sistemica della MASLD. Un contributo più recente è offerto da Andueza (Andueza et al., 2024), che ha evidenziato in bambini obesi con steatosi epatica un incremento di metaboliti urinari associati a disfunzione mitocondriale, alterato metabolismo lipidico e maggiore produzione di composti ossidativi, confermando l'importanza del metabolismo redox nella progressione della malattia. Anche Gawlik (Gawlik et al., 2019) ha mostrato che nei bambini obesi la steatosi si accompagna a una caratteristica firma steroidea urinaria, con alterazioni nei metaboliti del cortisolo e del DHEA, a supporto dell'ipotesi che la regolazione ormonale dello stress e dell'insulina sia intimamente connessa al metabolismo epatico.

Rispetto alla saliva, che riflette rapidamente le variazioni metaboliche a livello orale e sistemico, l'urina fornisce un'integrazione temporale più ampia del metabolismo intermedio e della

detossificazione renale. La saliva mostra quindi alterazioni più legate a processi acuti (ad esempio stress ossidativo e metaboliti microbici), mentre l'urina evidenzia le conseguenze sistemiche e mitocondriali della disfunzione metabolica. Questa complementarità è stata suggerita anche da studi nutrizionali come quello di Goerdten (Goerdten et al., 2024), che ha identificato metaboliti urinari correlati all'assunzione abituale di snack dolci e grassi (es. acetilcarnitine, derivati dell'istidina e del triptofano), dimostrando come il metaboloma urinario rifletta fedelmente le variazioni dietetiche e i conseguenti adattamenti metabolici.

Nel nostro campione, l'elevata coerenza tra i pattern salivari e urinari – entrambi convergenti verso un'alterazione della funzione mitocondriale, un aumento dello stress ossidativo e un coinvolgimento dell'asse intestino–fegato – rafforza la validità biologica dei metaboliti individuati. Mentre la saliva sembra catturare soprattutto la risposta metabolica immediata e l'interazione con il microbiota orale, l'urina riassume le alterazioni sistemiche dovute alla disfunzione mitocondriale e allo stress ossidativo persistente. In sintesi, i risultati del presente studio e la letteratura concordano nell'indicare che le firme metabolomiche di saliva e urina condividono *pathway* centrali (TCA, β-ossidazione, metabolismo del triptofano), ma ne rappresentano momenti temporali e funzionali diversi. La loro integrazione in modelli di analisi multivariata o di *machine learning* potrebbe potenziare notevolmente la capacità di identificare precocemente la disfunzione metabolica tipica della MASLD pediatrica, aprendo la strada a strategie di screening completamente non invasive basate sull'uso combinato di queste due matrici biologiche.

4.5 Valore aggiunto del DW-EML e dei metodi di spiegabilità

L'impiego del modello di dual-weighted ensemble machine learning (DW-EML, Double-Weighted Ensemble Machine Learning) ha rappresentato uno degli elementi di maggiore originalità del presente studio, consentendo di integrare in un unico *framework* le informazioni provenienti dalle due matrici biologiche (saliva e urina) con le variabili clinico-antropometriche per la classificazione dei soggetti in base alla presenza di steatosi epatica. L'approccio *ensemble*, basato sulla combinazione ponderata di molteplici classificatori appartenenti a famiglie algoritmiche diverse (modelli lineari, ad albero, metodi *kernel*, architetture di *deep learning*), ha permesso di sfruttare la complementarità dei singoli modelli, riducendo la probabilità che le performance complessive fossero guidate da pattern spurii o da peculiarità di un singolo algoritmo. In questo modo è stato possibile ottenere una maggiore accuratezza predittiva rispetto ai singoli modelli di base, riducendo al tempo stesso la varianza e migliorando la robustezza del modello.

Dal punto di vista metodologico, il DW-EML è stato progettato per massimizzare l'informazione derivante da fonti eterogenee, in linea con i principi dell'*integrative multimodal machine learning* descritti da Kline (Kline et al., 2022), secondo cui la fusione di dati clinici e omici consente di migliorare la capacità di discriminare fenotipi complessi come la MASLD pediatrica. Nella matrice salivare, il DW-EML ha raggiunto performance molto elevate nel distinguere i bambini con steatosi da quelli senza, con valori di sensibilità intorno al 96%, specificità prossima al 100% e curva ROC vicina all'unità. Sebbene tali risultati debbano essere interpretati con cautela, alla luce delle dimensioni campionarie e dell'assenza di una validazione esterna indipendente, essi indicano che la combinazione di profili metabolomici salivari e urinari con variabili antropometriche, all'interno di un *framework* di *machine learning* avanzato, può raggiungere un livello di accuratezza potenzialmente competitivo rispetto a molti strumenti di screening attualmente disponibili in ambito pediatrico.

Un aspetto cruciale del modello sviluppato è rappresentato dall'utilizzo del metodo SHAP (*SHapley Additive exPlanations*) per la valutazione della *feature importance*. Introdotto da Lundberg e Lee (Lundberg & Lee, 2017), SHAP consente di quantificare in modo interpretabile il contributo di ciascuna variabile alla predizione, traducendo il risultato del modello in termini clinicamente significativi. Nel contesto del nostro studio, l'analisi SHAP ha evidenziato che le variabili antropometriche (BMI z-score e circonferenza vita) e alcuni metaboliti chiave (acilcarnitine, derivati del triptofano, acidi organici del TCA) erano tra i principali determinanti del rischio di steatosi, fornendo una rappresentazione chiara della relazione tra metabolismo e fenotipo epatico. L'introduzione di diverse varianti di SHAP (TreeSHAP, KernelSHAP) ha permesso di superare la tradizionale opacità (*black box*) dei modelli complessi, consentendo di quantificare il contributo di ciascun metabolita o parametro clinico alla probabilità di classificazione come steatosi/non steatosi, sia a livello di singolo soggetto sia a livello globale. L'uso combinato di SHAP e UpSet plot ha evidenziato un nucleo di metaboliti ricorrenti tra i diversi modelli, suggerendo che alcune firme metaboliche siano robuste e riproducibili nonostante la varietà architetturale degli algoritmi.

Questa componente di *explainability* rappresenta un elemento distintivo rispetto ai modelli predittivi tradizionali. Come sottolineato da Abdullah (Abdullah et al., 2021) e da Stenwig (Stenwig et al., 2022), la possibilità di interpretare i risultati di un modello di *machine learning* in termini clinici è fondamentale per favorirne l'adozione nel contesto sanitario, dove la trasparenza e la tracciabilità delle decisioni hanno un valore etico e operativo. In particolare, il metodo SHAP permette di individuare biomarcatori con un impatto indipendente e misurabile, favorendo la costruzione di pannelli metabolici semplificati, potenzialmente utilizzabili anche in ambito ambulatoriale o scolastico.

L'efficacia del DW-EML nel combinare performance predittiva e spiegabilità si inserisce nel filone dei modelli *interpretable deep ensemble* recentemente sviluppati per applicazioni cliniche complesse. Un esempio è quello di Yang et al. (2024), che ha proposto un modello di rete neurale

interpretabile per la predizione continua del rischio di danno renale acuto, validato su dati di terapia intensiva e analizzato con SHAP. Il parallelismo metodologico con il nostro approccio è evidente: anche in quel caso, la spiegabilità del modello ha consentito di tradurre l'output predittivo in conoscenze clinicamente utili, identificando pattern biologici coerenti con la fisiopatologia sottostante.

Nel contesto della MASLD pediatrica, l'adozione di un modello DW-EML con spiegabilità integrata rappresenta quindi un valore aggiunto duplice: da un lato aumenta la potenza diagnostica combinando segnali di diversa natura (antropometria, metaboliti salivari e urinari), dall'altro consente di interpretare biologicamente le relazioni individuate, ponendo le basi per la costruzione di strumenti di screening non invasivi e personalizzabili. Il nostro studio dimostra che l'unione di approcci di *data fusion* e di metodi interpretativi può contribuire a una comprensione più profonda della disfunzione metabolica infantile, integrando la ricerca metabolomica con la medicina predittiva e aprendo prospettive concrete per l'applicazione clinica di modelli di *machine learning* spiegabile nella pratica pediatrica.

4.6 Limiti dello studio

Il presente studio presenta alcuni limiti metodologici e strutturali che devono essere considerati nell'interpretazione dei risultati, pur senza comprometterne la coerenza complessiva. In primo luogo, il disegno osservazionale, monocentrico e trasversale non consente di stabilire relazioni causali né di valutare la dinamica temporale delle alterazioni metaboliche e della steatosi. Le associazioni riscontrate tra adiposità, steatosi, profili pressori e firme metaboliche descrivono un vero e proprio "fotogramma" della disfunzione metabolica pediatrica, ma non permettono di distinguere in modo definitivo i determinanti causali dai correlati epifenomenici. La raccolta dei dati in un unico centro, se da un lato ha garantito uniformità procedurale e standardizzazione delle analisi, dall'altro limita la generalizzabilità dei risultati ad altre popolazioni pediatriche. Studi

longitudinali e multicentrici saranno necessari per confermare la direzionalità delle associazioni osservate e per identificare precocemente i fattori predittivi di peggioramento della MASLD, come suggerito da Faienza (Faienza et al., 2024; Maffeis et al., 2024).

Un ulteriore limite riguarda la valutazione della steatosi epatica, basata su giudizio radiologico qualitativo (presenza/assenza) e non su quantificazione oggettiva. L'uso dell'ecografia tradizionale, pur essendo la metodica di prima linea in età pediatrica, presenta una sensibilità ridotta nei gradi lievi e una certa variabilità inter-operatore (Ciardullo et al., 2023; Xing et al., 2023). Tecniche quantitative come l'ecografia a controlli di attenuazione (CAP) o la risonanza magnetica *proton density fat fraction* (MRI-PDFF) rappresentano oggi lo standard di riferimento per la caratterizzazione accurata della steatosi (Di Sessa et al., 2024; Zhang et al., 2024), ma non erano disponibili nel contesto operativo di questo studio. Tale scelta metodologica, tuttavia, è coerente con l'obiettivo di sviluppare strumenti di screening non invasivi compatibili con i contesti clinici reali, in cui l'ecografia qualitativa rappresenta spesso l'unica modalità facilmente accessibile.

Anche la dimensione del campione, seppur adeguata per un'analisi metabolomica esplorativa e per applicazioni di *machine learning*, costituisce un potenziale limite statistico. La numerosità moderata, unita all'elevata complessità dei dati metabolomici, può aumentare il rischio di *overfitting* nei modelli di apprendimento automatico, nonostante l'adozione di strategie di *cross-validation* interna e bootstrap. La mancanza di una validazione esterna indipendente del modello DW-EML rappresenta un aspetto che dovrà essere affrontato in futuri studi, come raccomandato in letteratura per garantire robustezza e generalizzabilità ai modelli interpretabili (Stenwig et al., 2022; M. Yang et al., 2024). In questo senso, le performance osservate nel nostro lavoro devono essere considerate promettenti ma preliminari.

Per quanto riguarda la componentistica metabolomica, sia la saliva sia l'urina presentano variabilità pre-analitiche legate a fattori dietetici, circadiani e ambientali. Pur avendo adottato

procedure standardizzate di raccolta e conservazione, è possibile che tali variabili abbiano introdotto un certo grado di "rumore" biologico. Studi recenti sottolineano l'importanza della standardizzazione preanalitica nella metabolomica pediatrica per migliorare la comparabilità tra coorti e la riproducibilità dei risultati (De Paepe et al., 2025; India Aldana et al., 2023; X. Zhao et al., 2025). Inoltre, la natura "untargeted" dell'approccio, se da un lato rappresenta un punto di forza esplorativo, dall'altro richiede cautela nell'interpretazione causale dei singoli metaboliti, che andranno confermati in studi *targeted* dedicati.

Un ulteriore elemento da considerare è la possibile presenza di fattori confondenti non completamente controllati. Abitudini alimentari, livello di attività fisica, assetto puberale, fattori socio-economici e variabili genetiche ed epigenetiche non sono stati misurati in modo sistematico in tutti i soggetti, ma potrebbero contribuire a modulare sia il rischio di MASLD sia i profili metabolomici. In un disegno trasversale, l'associazione tra i profili metabolomici e la steatosi epatica non implica necessariamente una relazione causale: le alterazioni osservate potrebbero rappresentare tanto conseguenze della disfunzione epatica quanto fattori predisponenti, come ipotizzato da Hegarty (Hegarty et al., 2023) e Zhang (Zhang et al., 2024). Studi longitudinali e interventistici saranno essenziali per definire meglio la sequenza temporale e il significato prognostico dei metaboliti identificati.

Infine, pur rappresentando un punto di forza in termini di innovazione, l'approccio DW-EML necessita di ulteriori ottimizzazioni per applicazioni cliniche reali. L'assenza di un confronto diretto con altri modelli *ensemble* e la mancanza di validazione su set esterni limitano, al momento, la possibilità di trarre conclusioni definitive sul suo potenziale clinico. Tuttavia, l'integrazione tra *explainable machine learning* e biomarcatori non invasivi si inserisce pienamente nel paradigma della medicina di precisione, come evidenziato da Kline (Kline et al., 2022) ed Abdullah (Abdullah et al., 2021), aprendo la strada a modelli predittivi pediatrici più affidabili e trasparenti.

In sintesi, i limiti individuati riflettono la natura esplorativa e pionieristica dello studio, ma al tempo stesso delineano le prospettive per la ricerca futura. L'espansione a coorti multicentriche più ampie, l'adozione di tecniche quantitative per la caratterizzazione della steatosi, la standardizzazione dei protocolli preanalitici e la validazione esterna del modello DW-EML rappresentano tappe necessarie per tradurre i risultati ottenuti in strumenti clinici di screening e monitoraggio metabolico affidabili, riproducibili e di facile applicazione nella pratica pediatrica.

4.7 Implicazioni cliniche e prospettive future

I risultati di questo studio si inseriscono in un contesto clinico in cui la *metabolic dysfunction–associated steatotic liver disease* (MASLD) rappresenta una delle principali emergenze sanitarie dell'età pediatrica. L'aumento costante della prevalenza, stimata fino al 25–30% nei bambini con eccesso ponderale nei Paesi industrializzati, richiede l'adozione di strategie di identificazione precoce e non invasiva, integrabili nei percorsi di prevenzione e monitoraggio clinico (Stroes et al., 2024; Zhang et al., 2024). In questo quadro, l'evidenza che semplici parametri auxologici come il BMI z-score e la circonferenza vita z-score siano fortemente associati alla steatosi e a un profilo pressorio sfavorevole rafforza l'importanza di un inquadramento antropometrico completo nei bambini con sospetto rischio cardiometabolico. L'integrazione sistematica della misura della circonferenza vita e dello screening pressorio nelle valutazioni routinarie potrebbe contribuire a identificare in modo più mirato i soggetti da avviare a indagini epatiche e metaboliche di secondo livello.

Sul versante metabolomico, la dimostrazione che saliva e urina contengono firme metaboliche coerenti e biologicamente plausibili della MASLD pediatrica suggerisce che queste matrici potrebbero essere utilizzate per sviluppare in futuro test di screening non invasivi, adatti a contesti scolastici o ambulatoriali. In particolare, la saliva, per la sua facilità di raccolta e l'elevata aderenza potenziale da parte di bambini e famiglie, emerge come candidata ideale per pannelli

metabolici di primo livello, mentre l'urina offre una lettura integrata del metabolismo sistemico e mitocondriale. Come sottolineato da Lahtinen (Lahtinen et al., 2025), l'integrazione di strumenti di screening sistematico per la MASLD in età evolutiva è ormai considerata una priorità di sanità pubblica, ma la mancanza di metodiche semplici, riproducibili e a basso costo costituisce ancora un ostacolo alla loro implementazione. L'approccio metabolomico può colmare questo vuoto diagnostico, permettendo una stratificazione del rischio basata su profili biochimici e predittori personalizzati, anziché su *cut-off* arbitrari di enzimi epatici o parametri ecografici.

In questa prospettiva, l'integrazione di approcci metabolomici e di *machine learning* interpretabile, come il modello DW-EML proposto in questo studio, apre prospettive interessanti per una diagnostica precoce di tipo funzionale. La possibilità di combinare variabili cliniche, antropometriche e metaboliche provenienti da matrici facilmente accessibili (saliva e urina) offre un potenziale concreto per l'applicazione di strumenti di screening non invasivi nei contesti ambulatoriali, scolastici o di medicina preventiva. L'impiego di biomarcatori salivari e urinari rappresenta inoltre una prospettiva coerente con il paradigma della *precision health* pediatrica, orientata alla prevenzione e alla comprensione delle traiettorie metaboliche individuali: come osservato da Schwimmer (Schwimmer et al., 2025), la MASLD non è solo una malattia del fegato, ma una manifestazione precoce di un più ampio disordine dello sviluppo metabolico. L'identificazione tempestiva dei bambini a rischio offre quindi un'opportunità unica di intervento su stili di vita, abitudini alimentari e fattori ambientali in una fase ancora reversibile del processo patologico.

Parallelamente, la crescente disponibilità di modelli di intelligenza artificiale spiegabile (XAI), come evidenziato da Panganiban (Panganiban et al., 2025), consente di integrare queste informazioni in algoritmi clinicamente trasparenti, in grado di fornire non solo una stima di rischio, ma anche una spiegazione biologica del perché quel rischio si manifesta. L'approccio DW-EML adottato in questo studio, con l'impiego di metodi SHAP per la spiegabilità del

modello, si colloca pienamente in questo filone: consente di individuare i contributi specifici di BMI, circonferenza vita e metaboliti chiave (ad esempio acilcarnitine, derivati del triptofano, intermedi del TCA) al rischio di steatosi, rendendo il modello non solo performante ma anche interpretabile e quindi potenzialmente più accettabile per l'utilizzo clinico.

Dal punto di vista della ricerca, i risultati ottenuti aprono la strada a diverse linee di sviluppo complementari:

Validazione multicentrica e longitudinale dei pannelli metabolomici individuati, in coorti più ampie e diversificate per età, sesso, etnia e contesto ambientale, al fine di confermare la stabilità e la generalizzabilità delle firme salivari e urinarie.

Studi di intervento (ad esempio programmi strutturati di nutrizione e attività fisica) con monitoraggio seriale dei profili metabolomici salivari e urinari, per valutare la reversibilità delle alterazioni e la loro capacità di predire la risposta terapeutica.

Sviluppo di pannelli "targeted" derivati dalla firma *untargeted* descritta in questo lavoro, concentrati su un numero limitato di metaboliti ad alta rilevanza biologica e predittiva, compatibili con piattaforme analitiche più snelle e potenzialmente trasferibili alla routine clinica.

Integrazione multi-omica, combinando i dati metabolomici con altre dimensioni (microbioma intestinale, trascrittomica, profili lipidomici) e con strumenti di intelligenza artificiale sempre più avanzati, per costruire modelli di rischio personalizzati in grado di distinguere in modo precoce i bambini con obesità "metabolicamente sana" da quelli a maggior rischio di evoluzione verso MASLD e comorbidità cardiometaboliche.

Infine, come indicato in un recente consensus internazionale multidisciplinare (Zhang et al., 2024) nonché in recenti review cliniche (Stroes et al., 2024), le prospettive di ricerca dovranno concentrarsi su studi multicentrici longitudinali con validazione esterna dei modelli metabolomici e delle piattaforme di *machine learning*. Solo attraverso questa evoluzione sarà

possibile tradurre le evidenze sperimentali in protocolli di screening di popolazione, basati su indicatori oggettivi, standardizzati e clinicamente sostenibili.

In sintesi, i risultati di questo lavoro non solo confermano la potenzialità dei profili metabolomici non invasivi nel riconoscimento precoce della MASLD pediatrica, ma indicano anche la direzione per un futuro in cui diagnosi precoce, personalizzazione e spiegabilità dei modelli predittivi possano diventare strumenti concreti di prevenzione e di medicina di precisione per le nuove generazioni. L'uso integrato di metabolomica e *machine learning* spiegabile emerge come una strategia promettente per lo sviluppo di nuovi strumenti di screening e di stratificazione del rischio in età evolutiva, ponendo le basi per il progressivo avvicinamento di queste tecnologie alla pratica clinica pediatrica.

Capitolo 5 – Conclusioni

5.1 Sintesi dei risultati principali

Il presente studio ha analizzato una coorte di 163 bambini e adolescenti di età compresa tra circa 5 e 14 anni, reclutati sul territorio tramite campagne di prevenzione e screening cardiometabolico coordinate dal Dipartimento di Pediatria, con l'obiettivo di esplorare le relazioni tra adiposità, steatosi epatica e profili metabolomici salivari e urinari, integrando dati clinici e omici mediante modelli di machine learning interpretabile.

La prevalenza complessiva di steatosi epatica è risultata pari a circa un terzo della popolazione, con un chiaro gradiente legato alla classe ponderale: dal normopeso all'obesità, fino a superare il 60% nei bambini obesi. Sia l'adiposità globale (BMI z-score) sia quella centrale (circonferenza vita z-score) sono risultate fortemente associate alla presenza di steatosi, confermando il ruolo dell'adiposità viscerale come determinante chiave della disfunzione epatica. Anche i valori pressori hanno mostrato un andamento parallelo a questi parametri, delineando un profilo di rischio cardiometabolico precoce.

Sul versante metabolomico, le analisi untargeted di saliva e urina hanno evidenziato firme metaboliche distintive nei bambini con steatosi rispetto ai controlli. Le alterazioni più consistenti hanno riguardato i pathway energetici e ossidativi – in particolare il metabolismo dei BCAA, del triptofano, della β-ossidazione e del ciclo dell'acido citrico – indicando la presenza di una disfunzione mitocondriale e di stress ossidativo sistemico.

L'applicazione del modello Double-Weighted Ensemble Machine Learning (DW-EML), arricchito da metodi di spiegabilità (SHAP), ha permesso di identificare i metaboliti più informativi, raggiungendo un'elevata accuratezza predittiva nella distinzione tra soggetti con e senza steatosi.

Nel complesso, i risultati delineano un quadro coerente in cui la MASLD pediatrica emerge come espressione precoce di una disfunzione metabolica sistemica, in accordo con i più recenti documenti di consenso internazionale (Zhang et al., 2024).

5.2 Implicazioni biologiche, cliniche e di salute pubblica

Le evidenze emerse indicano che la MASLD in età pediatrica non è soltanto una condizione epatica, ma rappresenta il versante epatometabolico di un più ampio disturbo energetico e infiammatorio. La stretta relazione tra adiposità viscerale, steatosi e alterazioni pressorie sottolinea l'importanza di considerare il fegato come un organo sentinella del rischio cardiometabolico fin dalle prime fasi dello sviluppo.

L'aspetto più innovativo di questo lavoro risiede nell'utilizzo di matrici biologiche non invasive – saliva e urina – per la rilevazione di biomarcatori metabolici associati alla disfunzione epatica. La saliva riflette in modo sensibile le variazioni metaboliche acute e lo stato redox, mentre l'urina fornisce un'integrazione temporale del metabolismo intermedio e della funzione mitocondriale. La coerenza tra i pattern osservati nelle due matrici conferma la possibilità di sviluppare futuri pannelli di screening multimatrice, utilizzabili in contesti ambulatoriali o scolastici, a supporto della diagnosi precoce della MASLD pediatrica (De Paepe et al., 2025).

Dal punto di vista della salute pubblica, l'implementazione di un modello di screening non invasivo per la MASLD in età pediatrica avrebbe potenzialmente un impatto rilevante sia in termini di carico di malattia sia di sostenibilità del sistema sanitario. La possibilità di identificare precocemente i bambini con profili metabolici a maggior rischio consentirebbe di indirizzare in modo mirato gli interventi nutrizionali, comportamentali e, quando necessario, farmacologici, concentrando le risorse sui soggetti più vulnerabili e riducendo il numero di controlli inutili nei bambini a basso rischio.

In una prospettiva di lungo periodo, la diagnosi precoce e la correzione dei determinanti metabolici alla base della MASLD potrebbero contribuire a diminuire l'incidenza in età adulta

di steatoepatite, cirrosi, carcinoma epatocellulare, diabete di tipo 2 e malattie cardiovascolari, con una riduzione indiretta ma sostanziale della spesa sanitaria associata alle complicanze croniche. Un modello di screening basato su matrici non invasive, facilmente implementabile in contesti scolastici o territoriali, si presta inoltre a essere integrato in programmi di prevenzione più ampi sull'obesità infantile, con economie di scala e un miglior rapporto costo/beneficio rispetto a strategie basate esclusivamente su indagini strumentali o di laboratorio ad alta complessità.

Resta comunque indispensabile che qualsiasi proposta di screening venga supportata da studi formali di costo–efficacia e di impatto organizzativo, in grado di valutare non solo le performance diagnostiche dei pannelli metabolici ma anche la sostenibilità economica, l'accettabilità per famiglie e operatori e le ricadute sui percorsi assistenziali. Solo in questo quadro sarà possibile tradurre le evidenze generate da studi come il presente in politiche di salute pubblica strutturate e durature.

In prospettiva, l'adozione di strumenti di screening non invasivi basati su biomarcatori metabolici potrebbe integrare le tradizionali valutazioni antropometriche e pressorie, migliorando la capacità di identificare precocemente i bambini a rischio e di monitorare la risposta a interventi nutrizionali o comportamentali.

5.3 Limiti e prospettive future

Il carattere monocentrico e trasversale dello studio rappresenta un limite intrinseco, che non consente di stabilire relazioni causali né di monitorare nel tempo l'evoluzione delle alterazioni metaboliche. La valutazione ecografica qualitativa della steatosi, pur adeguata al contesto clinico reale, non permette una quantificazione precisa del contenuto lipidico epatico. Inoltre, la numerosità campionaria, seppur sufficiente per un'analisi esplorativa, richiede conferme in coorti più ampie e diversificate.

Le prospettive future dovranno concentrarsi su:

la validazione multicentrica e longitudinale dei pannelli metabolici individuati;

la standardizzazione delle procedure di raccolta e analisi di saliva e urina;

lo sviluppo di pannelli *targeted* ridotti, trasferibili alla pratica clinica;

l'integrazione di dati multi-omici (metabolomica, microbioma, lipidomica) e comportamentali.

Infine, l'impiego di modelli di machine learning interpretabile, come quello utilizzato in questo studio, rappresenta una delle prospettive più promettenti per coniugare accuratezza predittiva e trasparenza clinica (Abdullah et al., 2021; Long et al., 2024).

5.4 Conclusione generale

In sintesi, questo lavoro contribuisce a delineare un nuovo paradigma di valutazione non invasiva della disfunzione metabolica in età pediatrica. L'integrazione tra variabili antropometriche, profili metabolomici di saliva e urina e metodi di machine learning spiegabile ha permesso di descrivere in modo coerente la relazione tra obesità, steatosi epatica e alterazioni metaboliche sistemiche.

La MASLD emerge come un segnale precoce di alterazione delle traiettorie metaboliche individuali, e la sua identificazione tempestiva offre una finestra cruciale per la prevenzione e la medicina di precisione. In prospettiva, l'uso di modelli integrati e interpretabili come il DW-EML potrebbe rappresentare un punto di svolta verso una medicina pediatrica predittiva e preventiva, in cui la metabolomica non invasiva diventa uno strumento concreto di screening e monitoraggio della salute metabolica del bambino (Schwimmer et al., 2025; Stroes et al., 2024).

A livello di salute pubblica, come discusso, un modello di screening non invasivo e sostenibile per la MASLD in età pediatrica avrebbe il potenziale di ridurre nel lungo periodo il carico di

malattia epatica e cardiometabolica e la spesa correlata, contribuendo a spostare l'asse della cura verso una prevenzione strutturata e basata sulle traiettorie metaboliche individuali.

Capitolo 6. Bibliografia

Abdullah, T. A., Zahid, M. S. M., & Ali, W. (2021). A review of interpretable ML in healthcare: Taxonomy, applications, challenges, and future directions. *Symmetry*, *13*(12), 2439.

Accacha, S., Barillas-Cerritos, J., Srivastava, A., Ross, F., Drewes, W., Gulkarov, S., De Leon, J., & Reiss, A. B. (2025). From Childhood Obesity to Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease (MASLD) and Hyperlipidemia Through Oxidative Stress During Childhood. *Metabolites*, *15*(5), 287.

Adinolfi, L. E., Marrone, A., Rinaldi, L., Nevola, R., Izzi, A., & Sasso, F. C. (2025). Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD): A systemic disease with a variable natural history and challenging management. *Exploration of Medicine*, 1001281. https://doi.org/10.37349/emed.2025.1001281

Ahrens, W., Moreno, L. A., Mårild, S., Molnár, D., Siani, A., De Henauw, S., Böhmann, J., Günther, K., Hadjigeorgiou, C., Iacoviello, L., Lissner, L., Veidebaum, T., Pohlabeln, H., Pigeot, I., & on behalf of the IDEFICS consortium. (2014). Metabolic syndrome in young children: Definitions and results of the IDEFICS study. *International Journal of Obesity*, *38*(2), S4–S14. https://doi.org/10.1038/ijo.2014.130

An, T.-F., Zhang, Z.-P., Xue, J.-T., Luo, W.-M., Li, Y., Fang, Z.-Z., & Zong, G.-W. (2024). Interpretable machine learning identifies metabolites associated with glomerular filtration rate in type 2 diabetes patients. *Frontiers in Endocrinology*, *15*, 1279034. https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1279034

Andueza, N., Muñoz-Prieto, D., Romo-Hualde, A., Cuervo, M., & Navas-Carretero, S. (2024). Changes in urinary metabolomic profile show the effectiveness of a nutritional intervention in children 6–12 years old: The ALINFA study. *Food Science & Nutrition*, *12*(8), 5663–5676. https://doi.org/10.1002/fsn3.4226

Bao, X., Zhang, X., Xu, D., Wang, Y., Yin, S., & Zhang, X. (2025). Risk Heterogeneity of Liver-Related Events and Extrahepatic Outcomes Across MASLD Phenotypes and Risk Stratification by Liver Fibrosis. *International Journal of Endocrinology*, *2025*(1), 1262001. https://doi.org/10.1155/ije/1262001

Behari, J., Wang, R., Luu, H. N., McKenzie, D., Molinari, M., & Yuan, J.-M. (2024). Severe obesity is associated with worse outcomes than lean metabolic dysfunction–associated steatotic liver disease. *Hepatology Communications*, *8*(7). https://doi.org/10.1097/HC9.0000000000000471

Benedé-Ubieto, R., Cubero, F. J., & Nevzorova, Y. A. (2024). Breaking the barriers: The role of gut homeostasis in Metabolic-Associated Steatotic Liver Disease (MASLD). *Gut Microbes*, *16*(1), 2331460. https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2331460

Berdowska, I., Matusiewicz, M., & Fecka, I. (2025). A Comprehensive Review of Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease: Its Mechanistic Development Focusing on Methylglyoxal and Counterbalancing Treatment Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, *26*(6), 2394. https://doi.org/10.3390/ijms26062394

Bergheim, I., & Moreno-Navarrete, J. M. (2024). The relevance of intestinal barrier dysfunction, antimicrobial proteins and bacterial endotoxin in metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. *European Journal of Clinical Investigation*, *54*(7), e14224. https://doi.org/10.1111/eci.14224

Bifarin, O. O. (2022). *Interpretable machine learning with tree-based shapley additive explanations: Application to metabolomics datasets for binary classification*. Bioinformatics. https://doi.org/10.1101/2022.09.19.508550

Bifet, A., Read, J., & Xu, C. (2022). Linear tree shap. *Advances in Neural Information Processing Systems*, *35*, 25818–25828.

Bourganou, M. V., Chondrogianni, M. E., Kyrou, I., Flessa, C.-M., Chatzigeorgiou, A., Oikonomou, E., Lambadiari, V., Randeva, H. S., & Kassi, E. (2025). Unraveling Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease Through the Use of Omics Technologies. *International Journal of Molecular Sciences*, *26*(4), 1589. https://doi.org/10.3390/ijms26041589

Bunkhumpornpat, C., Sinapiromsaran, K., & Lursinsap, C. (2009). Safe-level-smote: Safe-level-synthetic minority over-sampling technique for handling the class imbalanced problem. *Pacific-Asia conference on knowledge discovery and data mining*, 475–482.

Bussler, S., Vogel, M., Pietzner, D., Harms, K., Buzek, T., Penke, M., Händel, N., Körner, A., Baumann, U., Kiess, W., & Flemming, G. (2018). New pediatric percentiles of liver enzyme serum levels (alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, γ-glutamyltransferase): Effects of age, sex, body mass index, and pubertal stage. *Hepatology*, *68*(4), 1319–1330. https://doi.org/10.1002/hep.29542

Chaleckis, R., Meister, I., Zhang, P., & Wheelock, C. E. (2019). Challenges, progress and promises of metabolite annotation for LC–MS-based metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology*, *55*, 44–50. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.07.010

Chawla, N. V., Bowyer, K. W., Hall, L. O., & Kegelmeyer, W. P. (2002). SMOTE: synthetic minority over-sampling technique. *Journal of artificial intelligence research*, *16*, 321–357.

Chen, V. L., Kuppa, A., Oliveri, A., Chen, Y., Ponnandy, P., Patel, P. B., Palmer, N. D., & Speliotes, E. K. (2025). Human genetics of metabolic dysfunction–associated steatotic liver disease: From variants to cause to precision treatment. *Journal of Clinical Investigation*, *135*(7), e186424. https://doi.org/10.1172/JCI186424

Choi, Y. J., Kwon, Y., Choi, S. Y., Lee, Y. M., Yoo, I. H., Kim, T. H., & Jeong, S. (2025). The role of waist-to-hip ratio for predicting nonalcoholic fatty liver disease among Korean pediatric

patients. *Acta Biomedica Atenei Parmensis*, *96*(4), 16599. https://doi.org/10.23750/abm.v96i4.16599

Chung, S. T., Krenek, A., & Magge, S. N. (2023). Childhood obesity and cardiovascular disease risk. *Current atherosclerosis reports*, *25*(7), 405–415.

Ciardullo, S., Vergani, M., Ronchetti, C., & Perseghin, G. (2023). Shaping the future of pediatric liver health: Unraveling the impact of the new metabolic-associated fatty liver disease definition. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*, *12*(4), 611–615. https://doi.org/10.21037/hbsn-23-308

Cole, T. J., & Lobstein, T. (2012). Extended international (IOTF) body mass index cut-offs for thinness, overweight and obesity. *Pediatric obesity*, *7*(4), 284–294.

Colucci, A., Rocco, M., De Anseris, A., Nazzaro, L., Vajro, P., & Mandato, C. (2021). Pediatric vs. Adult NAFLD to MAFLD transition: A welcome but tangled path. *EXPLORATION OF MEDICINE.*, *2*(4), 333–342.

Covert, I., & Lee, S.-I. (2021). Improving kernelshap: Practical shapley value estimation using linear regression. *International conference on artificial intelligence and statistics*, 3457–3465.

D'Adamo, E., Castorani, V., & Nobili, V. (2019). The liver in children with metabolic syndrome. *Frontiers in endocrinology*, *10*, 514.

Dame, Z. T., Aziat, F., Mandal, R., Krishnamurthy, R., Bouatra, S., Borzouie, S., Guo, A. C., Sajed, T., Deng, L., Lin, H., Liu, P., Dong, E., & Wishart, D. S. (2015). The human saliva metabolome. *Metabolomics*, *11*(6), 1864–1883. https://doi.org/10.1007/s11306-015-0840-5

Danpanichkul, P., Suparan, K., Prasitsumrit, V., Ahmed, A., Wijarnpreecha, K., & Kim, D. (2025). Long-term outcomes and risk modifiers of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease between lean and non-lean populations. *Clinical and Molecular Hepatology*, *31*(1), 74–89. https://doi.org/10.3350/cmh.2024.0631

De Boom, F., Talib, A., Roebroek, Y. G. M., Paulus, G. F., Koek, G. H., Robben, S. G. F., Winkens, B., Bouvy, N. D., & Van Heurn, L. W. E. (2024). Non-Invasive Assessment of Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease in Adolescents with Severe Obesity; Patient Characteristics and Association with Leptin—A Cross-Sectional Overview of Baseline Data from a RCT. *Children*, *11*(8), 965. https://doi.org/10.3390/children11080965

De Onis, M. (2007). Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bulletin of the World Health Organization*, *85*(09), 660–667. https://doi.org/10.2471/BLT.07.043497

De Paepe, E., Callemeyn, E., De Windt, K., Wijnant, K., Plekhova, V., Pomian, B., Vangeenderhuysen, P., De Henauw, S., Michels, N., Viljakainen, H., Leppänen, M. H., Lakka, T. A., Van De Maele, K., Baeck, N., De Bruyne, R., Lefere, S., Geerts, A., Vynck, M., & Vanhaecke, L. (2025). A repository of the salivary metabolome and its key drivers in 1436 European children. *eBioMedicine*, *122*. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2025.106019

De San-Martin, B., Ferreira, V., Bitencourt, M., Pereira, P. C., Furtado, D., Ferreira, R., Carrilho, E., Carvalho, L., & Assunção, N. (2021). *Biochemical Signatures in Growth Hormone Deficiency: A Pilot Study Using Metabolomics Approaches by Direct Infusion-mass Spectrometry*. In Review. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1021675/v1

De Souza, H. M. R., Pereira, T. T. P., De Sá, H. C., Alves, M. A., Garrett, R., & Canuto, G. A. B. (2024). Critical Factors in Sample Collection and Preparation for Clinical Metabolomics of Underexplored Biological Specimens. *Metabolites*, *14*(1), 36. https://doi.org/10.3390/metabo14010036

Demirci, S., & Sezer, S. (2025). Fatty Liver Index vs. Biochemical–Anthropometric Indices: Diagnosing Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease with Non-Invasive Tools. *Diagnostics*, *15*(5), 565. https://doi.org/10.3390/diagnostics15050565

D'Hondt, A., Rubesova, E., Xie, H., Shamdasani, V., & Barth, R. A. (2021). Liver Fat Quantification by Ultrasound in Children: A Prospective Study. *American Journal of Roentgenology*, *217*(4), 996–1006. https://doi.org/10.2214/AJR.20.24874

Di Giovanni, N., Meuwis, M.-A., Louis, E., & Focant, J.-F. (2020). Untargeted Serum Metabolic Profiling by Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography–High-Resolution Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research*, *19*(3), 1013–1028. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00535

Di Sessa, A., Guarino, S., Umano, G. R., Del Giudice, E. M., & Marzuillo, P. (2024). Uric acid in pediatric MASLD definition: Is it time to implement diagnostic criteria? *Journal of Hepatology*, *80*(6), e254–e255.

Driessen, S., Francque, S. M., Anker, S. D., Castro Cabezas, M., Grobbee, D. E., Tushuizen, M. E., & Holleboom, A. G. (2025). Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease and the heart. *Hepatology*, *82*(2), 487–503. https://doi.org/10.1097/HEP.0000000000000735

Du, L., Zhang, K., Liang, L., Yang, Y., Lu, D., Zhou, Y., Ren, T., Fan, J., Zhang, H., Wang, Y., & Jiang, L. (2025). Multi-omics analyses of the gut microbiota and metabolites in children with metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. *mSystems*, *10*(4), e01148-24. https://doi.org/10.1128/msystems.01148-24

Dunn, W. B., Broadhurst, D., Ellis, D. I., Brown, M., Halsall, A., O'Hagan, S., Spasic, I., Tseng, A., & Kell, D. B. (2008). A GC-TOF-MS study of the stability of serum and urine metabolomes during the UK Biobank sample collection and preparation protocols. *International Journal of Epidemiology*, *37*(Supplement 1), i23–i30. https://doi.org/10.1093/ije/dym281

Eslam, M., Sanyal, A. J., George, J., Sanyal, A., Neuschwander-Tetri, B., Tiribelli, C., Kleiner, D. E., Brunt, E., Bugianesi, E., Yki-Järvinen, H., Grønbæk, H., Cortez-Pinto, H., George, J., Fan, J., Valenti, L., Abdelmalek, M., Romero-Gomez, M., Rinella, M., Arrese, M., … Younossi,

Z. (2020). MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*, *158*(7), 1999-2014.e1. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.11.312

European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN), European Association for the Study of the Liver (EASL), North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (NASPGHAN), Latin-American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (LASPGHAN), Asian Pan-Pacific Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (APPSPGHAN), Pan Arab Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition (PASPGHAN), Commonwealth Association of Paediatric Gastroenterology & Nutrition (CAPGAN), & Federation of International Societies of Pediatric Hepatology, Gastroenterology and Nutrition (FISPGHAN). (2024). Paediatric steatotic liver disease has unique characteristics: A multisociety statement endorsing the new nomenclature. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *78*(5), 1190–1196. https://doi.org/10.1002/jpn3.12156

Faienza, M. F., Baima, J., Cecere, V., Monteduro, M., Farella, I., Vitale, R., Antoniotti, V., Urbano, F., Tini, S., Lenzi, F. R., & Prodam, F. (2025). Fructose Intake and Unhealthy Eating Habits Are Associated with MASLD in Pediatric Obesity: A Cross-Sectional Pilot Study. *Nutrients*, *17*(4), 631. https://doi.org/10.3390/nu17040631

Faienza, M. F., Farella, I., Khalil, M., & Portincasa, P. (2024). Converging Pathways between Metabolic Dysfunction–Associated Steatotic Liver Disease (MASLD) and Diabetes in Children. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(18), 9924. https://doi.org/10.3390/ijms25189924

Feng, X., Ye, J., Deng, H., Li, X., Xu, L., Feng, S., Dong, Z., Liao, B., Dong, Z., & Zhong, B. (2023). An Optimized Strategy Based on Conventional Ultrasound for Diagnosing Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease. *Diagnostics*, *13*(23), 3503. https://doi.org/10.3390/diagnostics13233503

Fernando, Z. T., Singh, J., & Anand, A. (2019). A study on the Interpretability of Neural Retrieval Models using DeepSHAP. *Proceedings of the 42nd international ACM SIGIR conference on research and development in information retrieval*, 1005–1008.

Ferraioli, G., & Monteiro, L. B. S. (2019). Ultrasound-based techniques for the diagnosis of liver steatosis. *World Journal of Gastroenterology*, *25*(40), 6053–6062. https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i40.6053

Flynn, J. T., Kaelber, D. C., Baker-Smith, C. M., Blowey, D., Carroll, A. E., Daniels, S. R., De Ferranti, S. D., Dionne, J. M., Falkner, B., Flinn, S. K., Gidding, S. S., Goodwin, C., Leu, M. G., Powers, M. E., Rea, C., Samuels, J., Simasek, M., Thaker, V. V., Urbina, E. M., & SUBCOMMITTEE ON SCREENING AND MANAGEMENT OF HIGH BLOOD PRESSURE IN CHILDREN. (2017). Clinical Practice Guideline for Screening and Management of High Blood Pressure in Children and Adolescents. *Pediatrics*, *140*(3), e20171904. https://doi.org/10.1542/peds.2017-1904

Ganakumar, V., Halebidu, T., Goroshi, M., & Ghatnatti, V. (2025). Diagnosis and Management of MASLD: An Metabolic Perspective of a Multisystem Disease. *International Journal of Clinical Metabolism and Diabetes*, *1*(1), 45–57. https://doi.org/10.1177/30502071231220779

Garibay-Nieto, N., Pedraza-Escudero, K., Omaña-Guzmán, I., Garcés-Hernández, M. J., Villanueva-Ortega, E., Flores-Torres, M., Pérez-Hernández, J. L., León-Hernández, M., Laresgoiti-Servitje, E., Palacios-González, B., López-Alvarenga, J. C., Lisker-Melman, M., & Vadillo-Ortega, F. (2023). Metabolomic Phenotype of Hepatic Steatosis and Fibrosis in Mexican Children Living with Obesity. *Medicina*, *59*(10), 1785. https://doi.org/10.3390/medicina59101785

Gawlik, A., Shmoish, M., Hartmann, M. F., Wudy, S. A., Olczak, Z., Gruszczynska, K., & Hochberg, Z. (2019). Steroid metabolomic signature of liver disease in nonsyndromic childhood obesity. *Endocrine Connections*, *8*(6), 764–771. https://doi.org/10.1530/EC-18-0536

Goerdten, J., Muli, S., Rattner, J., Merdas, M., Achaintre, D., Yuan, L., De Henauw, S., Foraita, R., Hunsberger, M., & Huybrechts, I. (2024). Identification and replication of urine metabolites associated with short-term and habitual intake of sweet and fatty snacks in European children and adolescents. *The Journal of Nutrition*, *154*(11), 3274–3285.

Gómez-Mendoza, R., Sánchez-Hernández, F., Valentin-Cortez, F. J., & Chávez-Tapia, N. (2025). Fatty liver disease in the pediatric population: History, definitions, and challenges in nomenclature (NAFLD/MAFLD/MASLD). *Metabolism and Target Organ Damage*, *5*(2). https://doi.org/10.20517/mtod.2024.108

Gordon-Larsen, P., The, N. S., & Adair, L. S. (2010). Longitudinal Trends in Obesity in the United States From Adolescence to the Third Decade of Life. *Obesity*, *18*(9), 1801–1804. https://doi.org/10.1038/oby.2009.451

Habib, S. (2024). Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease heterogeneity: Need of subtyping. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, *15*(2). https://doi.org/10.4291/wjgp.v15.i2.92791

Hamamah, S., Iatcu, O. C., & Covasa, M. (2024). Dietary Influences on Gut Microbiota and Their Role in Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease (MASLD). *Nutrients*, *17*(1), 143. https://doi.org/10.3390/nu17010143

Hampl, S. E., Hassink, S. G., Skinner, A. C., Armstrong, S. C., Barlow, S. E., Bolling, C. F., Avila Edwards, K. C., Eneli, I., Hamre, R., Joseph, M. M., Lunsford, D., Mendonca, E., Michalsky, M. P., Mirza, N., Ochoa, E. R., Sharifi, M., Staiano, A. E., Weedn, A. E., Flinn, S. K., … Okechukwu, K. (2023). Executive Summary: Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Treatment of Children and Adolescents With Obesity. *Pediatrics*, *151*(2), e2022060641. https://doi.org/10.1542/peds.2022-060641

Hashim, M. M. A., Khan, M. A. M., Ashraf, M. U., Mohsin, S., Zahoor, K., Niazi, J., Khan, A., Muzaffar, S., Makhdumi, M., Ibad, O. A., Khan, T. K., & Khalid, S. (2025). Pathological Evolution and Internal Medicine Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in the Era of Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease (MASLD). *Cureus*. https://doi.org/10.7759/cureus.86963

Hassapidou, M., Duncanson, K., Shrewsbury, V., Ells, L., Mulrooney, H., Androutsos, O., Vlassopoulos, A., Rito, A., Farpourt, N., & Brown, T. (2023). EASO and EFAD position statement on medical nutrition therapy for the management of overweight and obesity in children and adolescents. *Obesity facts*, *16*(1), 29–52.

Hegarty, R., Kyrana, E., Fitzpatrick, E., & Dhawan, A. (2023). Fatty liver disease in children (MAFLD/PeFLD Type 2): Unique classification considerations and challenges. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*, *14*, 20420188231160388. https://doi.org/10.1177/20420188231160388

Hernandez, R., Garcia-Rodriguez, N. S., Arriaga, M. A., Perez, R., Bala, A. A., Leandro, A. C., Diego, V. P., Almeida, M., Parsons, J. G., Manusov, E. G., & Galan, J. A. (2025). The hepatocellular model of fatty liver disease: From current imaging diagnostics to innovative proteomics technologies. *Frontiers in Medicine*, *12*, 1513598. https://doi.org/10.3389/fmed.2025.1513598

Huang, Y.-L., Sun, C., Wang, Y., Cheng, J., Wang, S.-W., Wei, L., Lu, X.-Y., Cheng, R., Wang, M., Fan, J.-G., & Dong, Y. (2025). Ultrasound-guided attenuation parameter for identifying metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease: A prospective study. *Ultrasonography*, *44*(2), 134–144. https://doi.org/10.14366/usg.24204

Hudson, D., Afzaal, T., Bualbanat, H., AlRamdan, R., Howarth, N., Parthasarathy, P., AlDarwish, A., Stephenson, E., Almahanna, Y., Hussain, M., Diaz, L. A., & Arab, J. P. (2024). Modernizing metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease diagnostics: The

progressive shift from liver biopsy to noninvasive techniques. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, *17*, 17562848241276334. https://doi.org/10.1177/17562848241276334

Huneault, H. E., Gent, A. E., Cohen, C. C., He, Z., Jarrell, Z. R., Kamaleswaran, R., & Vos, M. B. (2024). Validation of a screening panel for pediatric metabolic dysfunction–associated steatotic liver disease using metabolomics. *Hepatology Communications*, *8*(3). https://doi.org/10.1097/HC9.0000000000000375

India Aldana, S., Valvi, D., Joshi, A., Lucchini, R. G., Placidi, D., Petrick, L., Horton, M., Niedzwiecki, M., & Colicino, E. (2023). Salivary Metabolomic Signatures and Body Mass Index in Italian Adolescents: A Pilot Study. *Journal of the Endocrine Society*, *7*(8), bvad091.

Jee, Y.-M., Lee, J.-Y., & Ryu, T. (2025). Chronic Inflammation and Immune Dysregulation in Metabolic-Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease Progression: From Steatosis to Hepatocellular Carcinoma. *Biomedicines*, *13*(5), 1260. https://doi.org/10.3390/biomedicines13051260

Kakazu, E., Mino, M., & Kanto, T. (2025). Role of amino acids in the regulation of hepatic gluconeogenesis and lipogenesis in metabolic dysfunctionassociated steatotic liver disease. *Clinical and Molecular Hepatology*, *31*(3), 771–795. https://doi.org/10.3350/cmh.2025.0048

Kanda, T., Sasaki-Tanaka, R., Abe, H., Kimura, N., Yoshida, T., Hayashi, K., Sakamaki, A., Yokoo, T., Kamimura, H., Tsuchiya, A., Kamimura, K., & Terai, S. (2025). Polygenic Risk Score for Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease and Steatohepatitis: A Narrative Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *26*(11), 5164. https://doi.org/10.3390/ijms26115164

Keskin, M., Arsoy, H. A., Kara, O., Sarandol, E., Koca, N., & Yilmaz, Y. (2024). Impact of Comorbid Polycystic Ovary Syndrome on Clinical and Laboratory Parameters in Female

Adolescents with Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease: A Cross-Sectional Study. *Journal of Clinical Medicine*, *13*(19), 5885. https://doi.org/10.3390/jcm13195885

Keskin, M., Aysegul Arsoy, H., Kara, O., Sarandol, E., Beyaz, A., Koca, N., & Yilmaz, Y. (2025). Metabolic and Hepatic Profiles of Non-Obese and Obese Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease in Adolescents: The Role of FibroScan Parameters,Fibroblast Growth Factor-21, and Cytokeratin-18. *Turkish Journal of Gastroenterology*, *36*(3), 152–161. https://doi.org/10.5152/tjg.2025.24760

Kline, A., Wang, H., Li, Y., Dennis, S., Hutch, M., Xu, Z., Wang, F., Cheng, F., & Luo, Y. (2022). Multimodal machine learning in precision health: A scoping review. *Npj Digital Medicine*, *5*(1), 171. https://doi.org/10.1038/s41746-022-00712-8

Koliaki, C., Dalamaga, M., Kakounis, K., & Liatis, S. (2025). Metabolically Healthy Obesity and Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease (MASLD): Navigating the Controversies in Disease Development and Progression. *Current Obesity Reports*, *14*(1), 46. https://doi.org/10.1007/s13679-025-00637-9

Kuchay, M. S., Choudhary, N. S., & Ramos-Molina, B. (2025). Pathophysiological underpinnings of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *328*(5), C1637–C1666. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00951.2024

Lahtinen, L., Hiltunen, P., Vuorela, N., Huhtala, H., Kurppa, K., & Aitokari, L. (2025). Screening and diagnosis of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease in children within public healthcare. *Pediatric Research*, 1–7.

Lee, M. S. (2024). The prevalence and prevention strategies of pediatric obesity: A narrative review. *Journal of Yeungnam Medical Science*, *41*(3), 141–149. https://doi.org/10.12701/jyms.2024.00346

Li, X., Chen, W., Jia, Z., Xiao, Y., Shi, A., & Ma, X. (2025). Mitochondrial Dysfunction as a Pathogenesis and Therapeutic Strategy for Metabolic-Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *26*(9), 4256. https://doi.org/10.3390/ijms26094256

Liebeke, M., & Puskás, E. (2019). Drying Enhances Signal Intensities for Global GC–MS Metabolomics. *Metabolites*, *9*(4), 68. https://doi.org/10.3390/metabo9040068

Lin, Y., Liao, F., Chao, H., Chen, A., Jeng, Y., Lin, C., Tiao, M., Yang, Y., Yeung, C., Chen, H., & Ni, Y. (2025). Consensus Statement on Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease in Children and Adolescents From the Joint TASL-TSPGHAN Expert Committee. *JGH Open*, *9*(6), e70137. https://doi.org/10.1002/jgh3.70137

Lin, Y.-C., Wu, C.-C., & Ni, Y.-H. (2020). New Perspectives on Genetic Prediction for Pediatric Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Frontiers in Pediatrics*, *8*, 603654. https://doi.org/10.3389/fped.2020.603654

Liu, Q., Lyu, X., Ren, H., Wang, M., Liu, Y., Tang, R., & Liu, J. (2025). Assessment of hepatic steatosis in children with metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease using ultrasound derived fat fraction: First large-scale clinical evaluation. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, *15*(6), 5582–5592. https://doi.org/10.21037/qims-24-2393

Liu, Y., Wang, Y., Xing, Y., Wolters, M., Shi, D., Zhang, P., Dang, J., Chen, Z., Cai, S., Wang, Y., Liu, J., Wang, X., Zhou, H., Xu, M., Guo, L., Li, Y., Song, J., Li, J., Dong, Y., … Song, Y. (2024). Establish a noninvasive model to screen metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease in children aged 6–14 years in China and its applications in high-obesity-risk countries and regions. *The Lancet Regional Health – Western Pacific*, *49*. https://doi.org/10.1016/j.lanwpc.2024.101150

Lombardi, M., Abenante, V., Cavallo, P., Symes, S. J. K., Richards, S. M., Pizzorno, G., Scala, G., Guida, M., & Troisi, J. (2024). Metabolomic Profiling as a Promising Tool for the Noninvasive Detection of Endometrial Cancer. In N. Rezaei (A c. Di), *Gynecological Cancers: An Interdisciplinary Approach* (Vol. 17, pp. 141–163). Springer Nature Switzerland. https://doi.org/10.1007/16833_2024_463

Long, Q., Luo, F., Li, B., Li, Z., Guo, Z., Chen, Z., Wu, W., & Hu, M. (2024). Gut microbiota and metabolic biomarkers in metabolic dysfunction–associated steatotic liver disease. *Hepatology Communications*, *8*(3). https://doi.org/10.1097/HC9.0000000000000310

Lowry, S. B., Joseph, S., Psoter, K. J., Dunn, E., Mansoor, S., Smith, S. K., Karnsakul, W., Naguib, G., Ng, K., & Scheimann, A. O. (2024). Efficacy of Ultrasound for the Detection of Possible Fatty Liver Disease in Children. *Diagnostics*, *14*(15), 1652. https://doi.org/10.3390/diagnostics14151652

Lu, M.-Y., Wei, Y.-J., Wang, C.-W., Liang, P.-C., Yeh, M.-L., Tsai, Y.-S., Tsai, P.-C., Ko, Y.-M., Lin, C.-C., Chen, K.-Y., Lin, Y.-H., Jang, T.-Y., Hsieh, M.-Y., Lin, Z.-Y., Huang, C.-F., Huang, J.-F., Dai, C.-Y., Chuang, W.-L., & Yu, M.-L. (2025). Mitochondrial mt12361A>G increased risk of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease among non-diabetes. *World Journal of Gastroenterology*, *31*(10). https://doi.org/10.3748/wjg.v31.i10.103716

Lubrecht, J. W., Van Giesen, G. H. J., Jańczyk, W., Zavhorodnia, O., Zavhorodnia, N., Socha, P., Moran-Lev, H., Vreugdenhil, A. C. E., & the ESPGHAN Fatty Liver Special Interest Group. (2024). Pediatricians' practices and knowledge of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease: An international survey. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *78*(3), 524–533. https://doi.org/10.1002/jpn3.12124

Lundberg, S. M., & Lee, S.-I. (2017). A unified approach to interpreting model predictions. *Advances in neural information processing systems*, *30*.

Maffeis, C., Piona, C., Morandi, A., Marigliano, M., Morotti, E., Mancioppi, V., Caiazza, E., Zusi, C., Emiliani, F., Mantovani, A., Colecchia, A., & Targher, G. (2024). Glycaemic control metrics and metabolic dysfunction–associated steatotic liver disease in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *26*(12), 5896–5905. https://doi.org/10.1111/dom.15961

Mann, J. P., Valenti, L., Scorletti, E., Byrne, C. D., & Nobili, V. (2018). Nonalcoholic fatty liver disease in children. *Seminars in liver disease*, *38*(01), 001–013.

Mari, L., Lazzer, S., Gatti, A., D'Alleva, M., Zaccaron, S., Stafuzza, J., Rejc, E., Vandoni, M., Bondesan, A., Caroli, D., Frigerio, F., Abbruzzese, L., Ventura, E., & Sartorio, A. (2025). Visceral Adiposity, Anthropometric and Liver Function Indexes for Identifying Metabolic Dysfunction Associated Steatotic Liver Disease (MASLD) in Adolescents with Obesity: Which Performs Better? *Journal of Clinical Medicine*, *14*(6), 2085. https://doi.org/10.3390/jcm14062085

Martias, C., Baroukh, N., Mavel, S., Blasco, H., Lefèvre, A., Roch, L., Montigny, F., Gatien, J., Schibler, L., Dufour-Rainfray, D., Nadal-Desbarats, L., & Emond, P. (2021). Optimization of Sample Preparation for Metabolomics Exploration of Urine, Feces, Blood and Saliva in Humans Using Combined NMR and UHPLC-HRMS Platforms. *Molecules*, *26*(14), 4111. https://doi.org/10.3390/molecules26144111

Masarone, M., Motta, B. M., Torre, P., Aquino, M., Belladonna, F., Lombardi, M., Troisi, J., & Persico, M. (2024). Evaluating cardiovascular risk in metabolic steatosis with precision medicine non-invasive approaches: Insights from a cohort study. *Internal and Emergency Medicine*, *19*(8), 2293–2307. https://doi.org/10.1007/s11739-024-03626-3

Masarone, M., Troisi, J., Aglitti, A., Torre, P., Colucci, A., Dallio, M., Federico, A., Balsano, C., & Persico, M. (2021). Untargeted metabolomics as a diagnostic tool in NAFLD: Discrimination of steatosis, steatohepatitis and cirrhosis. *Metabolomics*, *17*(2), 12. https://doi.org/10.1007/s11306-020-01756-1

Miccheli, A., Capuani, G., Marini, F., Tomassini, A., Praticò, G., Ceccarelli, S., Gnani, D., Baviera, G., Alisi, A., Putignani, L., & Nobili, V. (2015). Urinary 1H-NMR-based metabolic profiling of children with NAFLD undergoing VSL#3 treatment. *International Journal of Obesity*, *39*(7), 1118–1125. https://doi.org/10.1038/ijo.2015.40

Mierzwa, M., Malczyk, Ż., Bik-Multanowski, M., Brandt-Heunemann, S., Flehmig, B., Małecka-Tendera, E., Mazur, A., Petriczko, E., Ranke, M. B., Wabitsch, M., Wójcik, M., Domżol, A., & Zachurzok, A. (2025). High Prevalence of Metabolic-Associated Fatty Liver Disease (MAFLD) in Children and Adolescents with Severe Obesity. *Journal of Clinical Medicine*, *14*(10), 3565. https://doi.org/10.3390/jcm14103565

Mosca, A., Pietrobattista, A., & Maggiore, G. (2024). Metabolic-Associated Steatotic Liver Disease (MASLD): A New Term for a More Appropriate Therapy in Pediatrics? *Pediatric Reports*, *16*(2), 288–299. https://doi.org/10.3390/pediatric16020025

Mostafa, A. M., Fouad, Y., Gaber, Y., Alem, S. A., Pan, Z., & Eslam, M. (2025). Differential risk factors of fibrosis between lean and obese MAFLD. *Clinical and Experimental Medicine*, *25*(1), 211. https://doi.org/10.1007/s10238-025-01749-1

Mullin, S. M., Kelly, A. J., Ní Chathail, M. B., Norris, S., Shannon, C. E., & Roche, H. M. (2025). Macronutrient Modulation in Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease—The Molecular Role of Fatty Acids compared with Sugars in Human Metabolism and Disease Progression. *Advances in Nutrition*, *16*(3), 100375. https://doi.org/10.1016/j.advnut.2025.100375

Munk Lauridsen, M., Ravnskjaer, K., Gluud, L. L., & Sanyal, A. J. (2025). Disease classification, diagnostic challenges, and evolving clinical trial design in MASLD. *Journal of Clinical Investigation*, *135*(10), e189953. https://doi.org/10.1172/JCI189953

Nardone, paola, Ciardullo, S., Spinelli, A., Mandolini, D., Salvatore, M. A., & Andreozzi, S. (2025). Stato ponderale e stili di vita di bambine e bambini: I risultati di OKkio alla SALUTE 2023. *Istituto Superiore di Sanità*, *25*, 1.

Nguyen, M., Asgharpour, A., Dixon, D. L., Sanyal, A. J., & Mehta, A. (2024). Emerging therapies for MASLD and their impact on plasma lipids. *American Journal of Preventive Cardiology*, *17*, 100638. https://doi.org/10.1016/j.ajpc.2024.100638

Nohara, Y., Matsumoto, K., Soejima, H., & Nakashima, N. (2019). Explanation of Machine Learning Models Using Improved Shapley Additive Explanation. *Proceedings of the 10th ACM International Conference on Bioinformatics, Computational Biology and Health Informatics*, 546–546. https://doi.org/10.1145/3307339.3343255

Noon, S. L., Chun, L. F., Lam, T. B. N., Thai, N. Q. N., Dunn, W., & Schwimmer, J. B. (2025). Prevalence and Predictors of Suspected Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease in Adolescents in the United States. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, *61*(9), 1479–1488. https://doi.org/10.1111/apt.70022

Olivier, C., Allen, B., & Luies, L. (2023). Optimising a urinary extraction method for non-targeted GC–MS metabolomics. *Scientific Reports*, *13*(1), 17591. https://doi.org/10.1038/s41598-023-44690-7

Panganiban, J., Kehar, M., Ibrahim, S. H., Hartmann, P., Sood, S., Hassan, S., Ramirez, C. M., Kohli, R., Censani, M., Mauney, E., Cuda, S., & Karjoo, S. (2025). Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) in children with obesity: An Obesity Medicine Association (OMA) and expert joint perspective 2025. *Obesity Pillars*, *14*, 100164. https://doi.org/10.1016/j.obpill.2025.100164

Paolini, E., Longo, M., Meroni, M., Podini, P., Maggioni, M., Quattrini, A., Fracanzani, A. L., & Dongiovanni, P. (2025). A Defective Circulating Mitochondrial Bioenergetics Profile Reflects

the Hepatic One and Outlines Genetic MASLD. *Antioxidants*, *14*(6), 618. https://doi.org/10.3390/antiox14060618

Pei, Y., & Goh, G. B.-B. (2025). Genetic Risk Factors for Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease. *Gut and Liver*, *19*(1), 8–18. https://doi.org/10.5009/gnl240407

Piras, I. S., Don, J., Schork, N. J., & DiStefano, J. K. (2025). Genetic variants influencing liver fat in normal-weight individuals of European ancestry. *JHEP Reports*, *7*(8), 101453. https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2025.101453

Pîrvu, B. F., Clenciu, D., Department of Diabetes, Nutrition and Metabolic Diseases, Faculty of Medicine, University of Medicine and Pharmacy of Craiova, Romania, Beldie, L. A., Department of Diabetes, Nutrition and Metabolic Diseases, Emergency County Clinical Hospital, Craiova, Romania, Dica, C. C., Department of Diabetes, Nutrition and Metabolic Diseases, Emergency County Clinical Hospital, Craiova, Romania, Burticală, M. A., Department of Diabetes, Nutrition and Metabolic Diseases, Emergency County Clinical Hospital, Craiova, Romania, Țenea-Cojan, T. Ş., Department of General Surgery, Faculty of Medicine, University of Medicine and Pharmacy of Craiova, Romania, Mitrea, A., Department of Diabetes, Nutrition and Metabolic Diseases, Faculty of Medicine, University of Medicine and Pharmacy of Craiova, Romania, Amzolini, A. M., Department of Medical Semiology, Faculty of Medicine, University of Medicine and Pharmacy of Craiova, Romania, Efrem, I. C., & Department of Medical Semiology, Faculty of Dentistry, University of Medicine and Pharmacy of Craiova, Romania. (2025). The burden of cancer in metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, *65*(4), 627–635. https://doi.org/10.47162/RJME.65.4.09

Polti, G., Frigerio, F., Del Gaudio, G., Pacini, P., Dolcetti, V., Renda, M., Angeletti, S., Di Martino, M., Iannetti, G., Perla, F. M., Poggiogalle, E., & Cantisani, V. (2023). Quantitative ultrasound fatty liver evaluation in a pediatric population: Comparison with magnetic resonance

imaging of liver proton density fat fraction. *Pediatric Radiology*, *53*(12), 2458–2465. https://doi.org/10.1007/s00247-023-05749-9

Putri, R. R. (2025). The evolving landscape of pediatric obesity and metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. *Frontiers in Pediatrics*, *13*, 1675713. https://doi.org/10.3389/fped.2025.1675713

Putri, R. R., Casswall, T., Danielsson, P., Marcus, C., & Hagman, E. (2024). Steatotic Liver Disease in Pediatric Obesity and Increased Risk for Youth-Onset Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, *47*(12), 2196–2204. https://doi.org/10.2337/dc24-1236

Riekki, H., Aitokari, L., Kivelä, L., Lahti, S., Hiltunen, P., Vuorela, N., Huhtala, H., Lakka, T. A., & Kurppa, K. (2023). Prevalence and associated factors of metabolic-associated fatty liver disease in overweight Finnish children and adolescents. *Frontiers in Endocrinology*, *14*, 1090344. https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1090344

Rinella, M. E., Lazarus, J. V., Ratziu, V., Francque, S. M., Sanyal, A. J., Kanwal, F., Romero, D., Abdelmalek, M. F., Anstee, Q. M., Arab, J. P., Arrese, M., Bataller, R., Beuers, U., Boursier, J., Bugianesi, E., Byrne, C. D., Castro Narro, G. E., Chowdhury, A., Cortez-Pinto, H., … Newsome, P. N. (2023). A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *Journal of Hepatology*, *79*(6), 1542–1556. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.06.003

Rocha, S., Oliveira, C. P., Stefano, J. T., Yokogawa, R. P., Gomes-Gouvea, M., Zitelli, P. M. Y., Silva-Etto, J. M. K., Martins, E. D., Pessoa, M. G., Alcantara, F. F., Azevedo, R. S., & Rebello Pinho, J. R. (2025). Polymorphism's MBOAT7 as Risk and MTARC1 as Protection for Liver Fibrosis in MASLD. *International Journal of Molecular Sciences*, *26*(13), 6406. https://doi.org/10.3390/ijms26136406

Rosner, B., Cook, N., Portman, R., Daniels, S., & Falkner, B. (2008). Determination of Blood Pressure Percentiles in Normal-Weight Children: Some Methodological Issues. *American Journal of Epidemiology*, *167*(6), 653–666. https://doi.org/10.1093/aje/kwm348

Rotaru, A., Stratina, E., Huiban, L., Girleanu, I., Minea, H., Sfarti, C., Chiriac, S., & Trifan, A. V. (2025). Beyond BMI: Revealing metabolic risk in lean MASLD. *Archive of Clinical Cases*, *12*(3), 110–118. https://doi.org/10.22551/2025.48.1203.10322

Sanchez-Torres, C., Ramirez Tovar, A., Chatman, K., Morris, H. L., Yu, F., Mospan, A. R., Diehl, A. M., Leung, D. H., Viswanathan, P., Squires, J. E., Palle, S., & Vos, M. B. (2024). Concordance of MASLD and NAFLD nomenclature in youth participating in the TARGET-NASH real-world cohort. *Hepatology Communications*, *8*(11). https://doi.org/10.1097/HC9.0000000000000546

Sandireddy, R., Sakthivel, S., Gupta, P., Behari, J., Tripathi, M., & Singh, B. K. (2024). Systemic impacts of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) and metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH) on heart, muscle, and kidney related diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *12*, 1433857. https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1433857

Santana, E., Ibrahimi, E., Ntalianis, E., Cauwenberghs, N., & Kuznetsova, T. (2024). Integrating Metabolomics Domain Knowledge with Explainable Machine Learning in Atherosclerotic Cardiovascular Disease Classification. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(23), 12905. https://doi.org/10.3390/ijms252312905

Schwimmer, J. B., Biddinger, S. B., & Ibrahim, S. H. (2025). MASLD in children: Integrating epidemiological trends with mechanistic and translational advances. *Journal of Clinical Investigation*, *135*(13), e186422. https://doi.org/10.1172/JCI186422

Semmler, G., Balcar, L., Wernly, S., Völkerer, A., Semmler, L., Hauptmann, L., Wernly, B., Aigner, E., Niederseer, D., & Datz, C. (2023). Insulin resistance and central obesity determine hepatic steatosis and explain cardiovascular risk in steatotic liver disease. *Frontiers in Endocrinology*, *14*, 1244405. https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1244405

Shi, G.-X., Qian, Y.-S., Jiang, C.-M., Liu, Z.-Z., Yang, X., Xu, Y.-W., Jin, S.-S., Chu, J.-G., Qian, G.-Q., & Yang, N.-B. (2024). Prevalence of steatotic liver disease (MASLD, MetALD, ALD) and clinically significant fibrosis in US adolescents: Authors' name. *Scientific Reports*, *14*(1), 25724. https://doi.org/10.1038/s41598-024-76922-9

Shin, S., Kim, J., Lee, J. Y., Kim, J., & Oh, C.-M. (2023). Mitochondrial Quality Control: Its Role in Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease (MASLD). *Journal of Obesity & Metabolic Syndrome*, *32*(4), 289–302. https://doi.org/10.7570/jomes23054

Siedlecki, W., & Sklansky, J. (1989). A note on genetic algorithms for large-scale feature selection. *Pattern recognition letters*, *10*(5), 335–347.

Skolnik, N. (2023). The American Academy of Pediatrics Obesity Guidelines-A Critical Appraisal. *JAMA Pediatrics*, *177*(8), 747–748. https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2023.1577

Song, K., Seol, E. G., Yang, H., Jeon, S., Shin, H. J., Chae, H. W., Kim, E.-K., Kwon, Y.-J., & Lee, J.-W. (2024). Bioelectrical impedance parameters add incremental value to waist-to-hip ratio for prediction of metabolic dysfunction associated steatotic liver disease in youth with overweight and obesity. *Frontiers in Endocrinology*, *15*, 1385002. https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1385002

Sood, V., Alam, S., Nagral, A., Srivastava, A., Deshmukh, A., Bavdekar, A., Acharyya, B. C., Geetha, S. M., Gupte, G., Bhatia, I., Tiwari, K., Bharadia, L., Sathiyasekaran, M., Kaur, P., Khanna, R., Shrivastava, R., Poyekar, S., Pandey, S., Ramakrishna, S. H., … Dhawan, A. (2024).

Practice Recommendations for Metabolic Dysfunction–Associated Steatotic Liver Disease by the Indian Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ISPGHAN). *Indian Pediatrics*, *61*(10), 919–934. https://doi.org/10.1007/s13312-024-3290-1

Stefan, N., Yki-Järvinen, H., & Neuschwander-Tetri, B. A. (2025). Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease: Heterogeneous pathomechanisms and effectiveness of metabolism-based treatment. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, *13*(2), 134–148. https://doi.org/10.1016/S2213-8587(24)00318-8

Stenlid, R., El Amrani, S., Cerenius, S. Y., Aydin, B. K., Manell, H., Mörwald, K., Lischka, J., Gomahr, J., Pixner, T., Ciba, I., James, S. K., Forslund, A., Weghuber, D., & Bergsten, P. (2025). Cardiometabolic risk stratification in pediatric obesity: Evaluating the clinical utility of fasting insulin and BMI-SDS. *Cardiovascular Diabetology*, *24*(1), 324. https://doi.org/10.1186/s12933-025-02882-7

Stenwig, E., Salvi, G., Rossi, P. S., & Skjærvold, N. K. (2022). Comparative analysis of explainable machine learning prediction models for hospital mortality. *BMC Medical Research Methodology*, *22*(1), 53. https://doi.org/10.1186/s12874-022-01540-w

Stevens, V. L., Hoover, E., Wang, Y., & Zanetti, K. A. (2019). Pre-Analytical Factors that Affect Metabolite Stability in Human Urine, Plasma, and Serum: A Review. *Metabolites*, *9*(8), 156. https://doi.org/10.3390/metabo9080156

Stroes, A.-S. R., Vos, M., Benninga, M. A., & Koot, B. G. (2024). Pediatric MASLD: Current understanding and practical approach. *European Journal of Pediatrics*, *184*(1), 29.

Svobodová, G., Horní, M., Velecká, E., & Boušová, I. (2025). Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease-induced changes in the antioxidant system: A review. *Archives of Toxicology*, *99*(1), 1–22. https://doi.org/10.1007/s00204-024-03889-x

Tacke, F., Horn, P., Wai-Sun Wong, V., Ratziu, V., Bugianesi, E., Francque, S., Zelber-Sagi, S., Valenti, L., Roden, M., Schick, F., Yki-Järvinen, H., Gastaldelli, A., Vettor, R., Frühbeck, G., & Dicker, D. (2024). EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines on the management of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD). *Journal of Hepatology*, *81*(3), 492–542. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2024.04.031

Tan, E. Y., Muthiah, M. D., & Sanyal, A. J. (2024). Metabolomics at the cutting edge of risk prediction of MASLD. *Cell Reports Medicine*, *5*(12), 101853. https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2024.101853

Troisi, J., Belmonte, F., Bisogno, A., Pierri, L., Colucci, A., Scala, G., Cavallo, P., Mandato, C., Di Nuzzi, A., Di Michele, L., Delli Bovi, A., Guercio Nuzio, S., & Vajro, P. (2019). Metabolomic Salivary Signature of Pediatric Obesity Related Liver Disease and Metabolic Syndrome. *Nutrients*, *11*(2), 274. https://doi.org/10.3390/nu11020274

Troisi, J., Mollo, A., Lombardi, M., Scala, G., Richards, S. M., Symes, S. J. K., Travaglino, A., Neola, D., De Laurentiis, U., Insabato, L., Di Spiezio Sardo, A., Raffone, A., & Guida, M. (2022). The Metabolomic Approach for the Screening of Endometrial Cancer: Validation from a Large Cohort of Women Scheduled for Gynecological Surgery. *Biomolecules*, *12*(9), 1229. https://doi.org/10.3390/biom12091229

Troisi, J., Pierri, L., Landolfi, A., Marciano, F., Bisogno, A., Belmonte, F., Palladino, C., Guercio Nuzio, S., Campiglia, P., & Vajro, P. (2017). Urinary Metabolomics in Pediatric Obesity and NAFLD Identifies Metabolic Pathways/Metabolites Related to Dietary Habits and Gut-Liver Axis Perturbations. *Nutrients*, *9*(5), 485. https://doi.org/10.3390/nu9050485

Troisi, J., Tafuro, M., Lombardi, M., Scala, G., Richards, S. M., Symes, S. J., Ascierto, P. A., Delrio, P., Tatangelo, F., & Buonerba, C. (2022). A metabolomics-based screening proposal for colorectal cancer. *Metabolites*, *12*(2), 110.

Uwaezuoke, S. N. (2019). Association of Pediatric Obesity with Adult Cardiovascular Disease: A Narrative Review of Published Evidence. *Interventions in Obesity & Diabetes*, *3*(3). https://doi.org/10.31031/IOD.2019.03.000561

Vajravelu, M. E., Tas, E., & Arslanian, S. (2023). Pediatric obesity: Complications and current day management. *Life*, *13*(7), 1591.

Valerio, G., Di Bonito, P., Calcaterra, V., Cherubini, V., Corica, D., De Sanctis, L., Di Sessa, A., Faienza, M. F., Fornari, E., Iughetti, L., Licenziati, M. R., Manco, M., del Giudice, E. M., Morandi, A., Salerno, M., Street, M. E., Umano, G. R., Wasniewska, M., & Maffeis, C. (2024). Cardiometabolic risk in children and adolescents with obesity: A position paper of the Italian Society for Pediatric Endocrinology and Diabetology. *Italian Journal of Pediatrics*, *50*(1), 205. https://doi.org/10.1186/s13052-024-01767-x

Van Kleef, L. A., Pustjens, J., Savas, M., Ayada, I., Li, P., Pan, Q., Van Rossum, E. F. C., Janssen, H. L. A., & Brouwer, W. P. (2025). MASLD, At-Risk MASH and Increased Liver Stiffness Are Associated With Young Adulthood Obesity Without Residual Risk After Losing Obesity. *Liver International*, *45*(4), e16169. https://doi.org/10.1111/liv.16169

Verduci, E., Bronsky, J., Embleton, N., Gerasimidis, K., Indrio, F., Köglmeier, J., De Koning, B., Lapillonne, A., Moltu, S. J., & Norsa, L. (2021). Role of dietary factors, food habits, and lifestyle in childhood obesity development: A position paper from the European society for paediatric gastroenterology, hepatology and nutrition committee on nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *72*(5), 769–783.

Vimalesvaran, S., Vajro, P., & Dhawan, A. (2024). Pediatric metabolic (dysfunction)-associated fatty liver disease: Current insights and future perspectives. *Hepatology International*, *18*(S2), 873–883. https://doi.org/10.1007/s12072-024-10691-5

Vos, M. B., Abrams, S. H., Barlow, S. E., Caprio, S., Daniels, S. R., Kohli, R., Mouzaki, M., Sathya, P., Schwimmer, J. B., Sundaram, S. S., & Xanthakos, S. A. (2017). NASPGHAN Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children: Recommendations from the Expert Committee on NAFLD (ECON) and the North American Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (NASPGHAN). *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*, *64*(2), 319–334. https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001482

Wang, C.-W., Huang, P.-C., Dai, C.-Y., Huang, J.-F., & Yu, M.-L. (2024). Comparative evaluation of pediatric fatty liver disease criteria: MASLD, ESPGHAN, NASPGHAN, and NAFLD – identifying the optimal pediatric label. *Journal of Hepatology*, *80*(4), e157–e159. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2024.01.004

Xing, Y., Fan, J., Wang, H.-J., & Wang, H. (2023). Comparison of MAFLD and NAFLD Characteristics in Children. *Children*, *10*(3), 560. https://doi.org/10.3390/children10030560

Xu, Q., Wang, W., Li, Y., Cui, J., Zhu, M., Liu, Y., & Liu, Y. (2025). The oral-gut microbiota axis: A link in cardiometabolic diseases. *npj Biofilms and Microbiomes*, *11*(1), 11.

Yagin, F. H., Al-Hashem, F., Ahmad, I., Ahmad, F., & Alkhateeb, A. (2024). Pilot-Study to Explore Metabolic Signature of Type 2 Diabetes: A Pipeline of Tree-Based Machine Learning and Bioinformatics Techniques for Biomarkers Discovery. *Nutrients*, *16*(10), 1537. https://doi.org/10.3390/nu16101537

Yanai, H., Adachi, H., Hakoshima, M., Iida, S., & Katsuyama, H. (2023). Metabolic-Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease—Its Pathophysiology, Association with Atherosclerosis and Cardiovascular Disease, and Treatments. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(20), 15473. https://doi.org/10.3390/ijms242015473

Yang, M., Liu, S., Hao, T., Ma, C., Chen, H., Li, Y., Wu, C., Xie, J., Qiu, H., Li, J., Yang, Y., & Liu, C. (2024). Development and validation of a deep interpretable network for continuous acute kidney injury prediction in critically ill patients. *Artificial Intelligence in Medicine*, *149*, 102785. https://doi.org/10.1016/j.artmed.2024.102785

Yang, W.-Q., Xue, L.-L., & Wang, J.-L. (2025). Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease: Mechanisms, metabolic reprogramming, and therapeutic insights. *World Journal of Gastroenterology*, *31*(26). https://doi.org/10.3748/wjg.v31.i26.108814

Yodoshi, T. (2024). Exploring non-invasive diagnostics and non-imaging approaches for pediatric metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, *30*(47), 5070–5075. https://doi.org/10.3748/wjg.v30.i47.5070

Younossi, Z. M., Kalligeros, M., & Henry, L. (2025). Epidemiology of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. *Clinical and Molecular Hepatology*, *31*(Suppl), S32–S50. https://doi.org/10.3350/cmh.2024.0431

Zdanowicz, K., Kopiczko, N., Flisiak-Jackiewicz, M., Bobrus-Chociej, A., Kowalczuk-Kryston, M., & Lebensztejn, D. (2024). Uric acid as a potential marker of cardiometabolic risk in children and adolescents with metabolic dysfunction associated steatotic liver disease. *Clinical and Experimental Hepatology*, *10*(3), 188–193. https://doi.org/10.5114/ceh.2024.143066

Zhang, L., El-Shabrawi, M., Baur, L. A., Byrne, C. D., Targher, G., Kehar, M., Porta, G., Lee, W. S., Lefere, S., & Turan, S. (2024). An international multidisciplinary consensus on pediatric metabolic dysfunction-associated fatty liver disease. *Med*, *5*(7), 797-815. e2.

Zhao, D., Zheng, X., Wang, L., Xie, Y., Chen, Y., & Zhang, Y. (2025). Overlap prevalence and interaction effect of cardiometabolic risk factors for metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. *Nutrition & Metabolism*, *22*(1), 10. https://doi.org/10.1186/s12986-025-00903-6

Zhao, X., Chen, X., Zhou, Z., Zheng, J., Lin, Y., Zheng, Y., Xu, R., Hu, S., & Cui, L. (2025). Advancements and challenges in salivary metabolomics for early detection and monitoring of systemic diseases. *MedComm*, *6*(10), e70395.

Zimmet, P., Alberti, G., Kaufman, F., Tajima, N., Silink, M., Arslanian, S., Wong, G., Bennett, P., Shaw, J., & Caprio, S. (2007). The metabolic syndrome in children and adolescents. *The Lancet*, *369*(9579), 2059–2061. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60958-1

Zisis, M., Chondrogianni, M. E., Androutsakos, T., Rantos, I., Oikonomou, E., Chatzigeorgiou, A., & Kassi, E. (2025). Linking Cardiovascular Disease and Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease (MASLD): The Role of Cardiometabolic Drugs in MASLD Treatment. *Biomolecules*, *15*(3), 324. https://doi.org/10.3390/biom15030324

Zöggeler, T., Kavallar, A. M., Pollio, A. R., Aldrian, D., Decristoforo, C., Scholl-Bürgi, S., Müller, T., & Vogel, G. F. (2025). Meta-analysis of shotgun sequencing of gut microbiota in obese children with MASLD or MASH. *Gut Microbes*, *17*(1), 2508951. https://doi.org/10.1080/19490976.2025.2508951

Zong, X., Kelishadi, R., Kim, H. S., Schwandt, P., Matsha, T. E., Mill, J. G., Caserta, C. A., Medeiros, C. C. M., Kollias, A., Whincup, P. H., Pacifico, L., López-Bermejo, A., Zhao, M., Zheng, M., & Xi, B. (2024). A proposed simplified definition of metabolic syndrome in children and adolescents: A global perspective. *BMC Medicine*, *22*(1), 190. https://doi.org/10.1186/s12916-024-03406-y