



SAPIENZA  
UNIVERSITÀ DI ROMA

# Studio prospettico sui fattori di rischio di progressione del danno epatico in una coorte di soggetti con *Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease* (MASLD)

**Dottorato di ricerca in Epato-Gastroenterologia Sperimentale e clinica,  
XXXVI Ciclo**

Coordinatore: Prof. Paolo Onori

Dipartimento di Scienze Anatomiche, Istologiche, Medico Legali e dell'Apparato Locomotore

**Candidata: Dott.ssa Alessandra Colantoni**

Matricola 1472424

**Tutor: Prof.ssa Maria Del Ben**

A.A. 2022-2023

# INDICE

Abstract.....	5
Introduzione: NAFLD, MAFLD e MASLD a confronto.....	8
Epidemiologia.....	12
Patogenesi .....	12
Metabolismo lipidico e lipotossicità.....	13
Insulino-resistenza .....	17
Obesità e infiammazione.....	18
Stress ossidativo .....	19
Dieta e asse intestino-fegato .....	20
Determinanti genetici .....	22
Diagnosi.....	24
Metodi diagnostici non invasivi.....	25
Imaging.....	25
Esami di laboratorio.....	31
Score indiretti di steatosi e fibrosi epatica .....	32
Metodi diagnostici invasivi .....	33
Comorbidità ed <i>outcome</i> epatici ed extra-epatici .....	36
Fibrosi, cirrosi epatica e HCC.....	36
Patologie cardiovascolari .....	38
Malattia renale cronica .....	40
Neoplasie.....	41
Terapia .....	42
Lifestyle Therapeutic Change e chirurgia bariatrica.....	42
Pioglitazone e Vitamina E.....	43
Trattamento delle comorbidità metaboliche .....	45
Metformina .....	45
Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analoghi.....	45
Dipeptidyl peptidase-4 (DDP-4) inibitori .....	46
Sodium glucose co-transporter 2 (SGLT-2) inibitori .....	46
Sulfaniluree e insulina .....	47

Statine .....	47
Omega3.....	48
Antipertensivi.....	48
Studio Sperimentale.....	49
Razionale e obiettivi dello studio.....	49
Metodi.....	50
Risultati.....	54
Discussione e conclusioni .....	61
Bibliografia .....	64

## Indice delle figure

Figura 1 - Criteri diagnostici di MASLD [7] .....	11
Figura 2 - Patogenesi [15] .....	13
Figura 3 - Ruolo dell'enzima LAL nel metabolismo lipidico [31] .....	15
Figura 4 - Caratteristiche della LAL-D [36] .....	16
Figura 5 - Algoritmo per la diagnosi ed il follow-up della NAFLD/NASH [1].....	25
Figura 6 - Esempi di ecografie epatiche valutate attraverso lo score di Hamaguchi [100] .....	27
Figura 7 - Rappresentazione della metodica Fibroscan® [101] .....	28
Figura 8 - Rappresentazione della metodica ARFI [110] .....	30
Figura 9 - Interpretazione dell'ARFI [111].....	30
Figura 10 - Gestione del paziente con steatosi epatica secondo le linee guida AASLD [114] .....	31
Figura 11 - Confronto tra steatosi epatica (A), caratterizzata da minimo infiltrato infiammatorio senza ballooning epatocitario, e steatoepatite (B), dove si osservano infiltrato infiammatorio lobulare e degenerazione epatocitaria [127].....	34
Figura 12 - NAFLD Activity Score (NAS).....	35
Figura 13 - Fibrosi epatica e mortalità [132] .....	36
Figura 14 - Fibrosi epatica ed eventi cardiovascolari [134] .....	37
Figura 15 - NAFLD e HCC [140] .....	38
Figura 16 - Interpretazione dell'ABI.....	39
Figura 17 - Associazione tra NAFLD e patologie cardiovascolari [155].....	40
Figura 18 - Associazione tra NAFLD/MAFLD e CKD [160] .....	41
Figura 19 - Lifestyle Therapeutic Change per il trattamento della NAFLD [180].....	43
Figura 20 - AUDIT-C .....	51
Figura 21 - Flow chart: arruolamento allo studio sperimentale .....	53
Figura 22 - Correlazione univariata tra Fib4 ed attività LAL.....	55
Figura 23 - Valori di attività LAL in accordo alle variazioni di Fib-4 (Panel A), (Panel B).....	57
Figura 24 - Valori di attività LAL nei pazienti che non sviluppano e sviluppano fibrosi avanzata (Panel A – esclusi i pazienti con fibrosi avanzata basale), (Panel B - esclusi i pazienti con fibrosi avanzata basale e che migliorano rispetto al basale).....	58
Figura 25 - Curve univariate di sopravvivenza libera da progressione di Fib4 nei pazienti senza diagnosi di fibrosi avanzata basale (Panel A) e dopo esclusione dei pazienti che migliorano rispetto al basale (Panel B), in accordo con i terzili di LAL (I vs II-III terzile).....	59
Figura 26 - Curve univariate di sopravvivenza libera da progressione in fibrosi avanzata nei pazienti senza diagnosi di fibrosi avanzata basale e dopo esclusione dei pazienti che migliorano rispetto al basale, in accordo con i terzili di LAL (I vs II-III terzile) .....	59
Figura 27 - Curve multivariate di sopravvivenza libera da progressione di Fib4 nei pazienti senza diagnosi di fibrosi avanzata basale, in accordo con i terzili di LAL (I vs II-III terzile), dopo correzione per sesso, età, classe basale di Fib4, diabete, BMI.....	60
Figura 28 - Curve multivariate di sopravvivenza libera da neo-diagnosi di fibrosi avanzata nei pazienti senza diagnosi di fibrosi avanzata basale e che non migliorano, in accordo con i terzili di LAL (I vs II-III terzile), dopo correzione per sesso, età, classe basale di Fib4, diabete, BMI.....	61

## Indice delle tabelle

Tabella 1 - Caratteristiche della popolazione in accordo al Fib4 basale .....	54
Tabella 2 - Caratteristiche della popolazione in accordo alle variazioni di Fib4.....	56
Tabella 3 - Caratteristiche della popolazione in accordo al nuovo riscontro di fibrosi avanzata (escluse fibrosi avanzate al baseline).....	57
Tabella 4 - Regressione di Cox multivariata dei predittori di progressione della fibrosi (dopo esclusione dei pazienti con diagnosi di fibrosi avanzata al basale) .....	60
Tabella 5 - Regressione di Cox multivariata dei predittori di insorgenza di fibrosi avanzata (dopo esclusione dei pazienti con diagnosi di fibrosi avanzata al basale e dei pazienti che migliorano)	61

## **Abstract**

### **Premessa e obiettivi**

La definizione di *Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease* (MASLD) è stata recentemente proposta per identificare i soggetti affetti da steatosi epatica e comorbidità metaboliche ed ha sostituito la definizione di *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease* (NAFLD). La Lipasi Acida Lisosomiale (LAL) è un enzima coinvolto nel metabolismo lipidico, che idrolizza gli esteri del colesterolo e i trigliceridi. Mutazioni del gene LIPA determinano una ridotta attività di questo enzima, determinando l'accumulo di esteri del colesterolo e trigliceridi in molti organi, compreso il fegato. Studi precedenti hanno dimostrato una riduzione dell'attività enzimatica della LAL nei pazienti con NAFLD e NASH-cirrosi.

Non vi sono in letteratura studi prospettici sulla relazione tra attività della LAL ed evoluzione della MASLD. Obiettivo dello studio è stato quello di valutare l'associazione tra l'attività enzimatica della LAL e la progressione della fibrosi epatica nei soggetti affetti da MASLD.

### **Metodi e risultati**

Lo studio è stato condotto nell'ambito dello studio PLINIO (*Progression of Liver Damage and Cardiometabolic Disorders in Non-alcoholic Fatty Liver disease: an Observational Cohort study*, ClinicalTrials.gov. Id. NCT04036357). Revisionando i criteri di inclusione nello studio in maniera concorde a quelli diagnostici di MASLD è stata identificata una coorte di 847 pazienti. Tutti i pazienti erano negativi per abuso alcolico, epatiti virali, autoimmuni o iatrogene, escludendo eziologie miste. Sono stati inclusi nell'analisi i soggetti a cui era stata dosata l'attività enzimatica della LAL all'arruolamento, e dei quali era disponibile un follow-up laboratoristico di almeno 6 mesi (n=272). Sono stati esclusi dall'analisi i pazienti con dati incompleti per il calcolo di Fib-4 in almeno due momenti successivi. La progressione della fibrosi è stata definita come la variazione dello score Fib4 da negativo (<1.3 se paziente di età <65 anni o <2.0 se età ≥65 anni) a indeterminato o positivo.

L'insorgenza di fibrosi avanzata è stata valutata come la variazione del Fib4 da  $\leq 2.67$  a  $> 2.67$ .

Il follow-up mediano è stato di 70.5 [43.8-112.2] mesi, per un totale di 1720 pazienti/anno. Al baseline l'attività LAL ed il Fib4 score sono risultati inversamente associati ( $rS = -0.126$ ,  $p = 0.038$ ). Durante il follow-up, 49 pazienti hanno mostrato progressione della fibrosi. I pazienti con progressione presentavano valori più bassi di attività di LAL all'arruolamento (0.9 [0.7-1.2] vs 0.7 [0.4-0.8] nmol/spot/h;  $p = 0.026$ ). Successivamente, la popolazione è stata suddivisa in tertili, in base ai valori basali di attività della LAL; i pazienti con più bassa attività enzimatica sono risultati essere a maggior rischio di sviluppare la progressione della fibrosi (I vs II+III tertile log-rank test  $p = 0.008$ ) e l'insorgenza di fibrosi avanzata (I vs II+III tertile log-rank test  $p = 0.028$ ). All'analisi multivariata, valori più bassi di attività LAL sono risultati essere associati sia alla progressione della fibrosi (HR [Hazard Ratio]=1.879; 95% C.I. 1.063 – 3.32;  $p = 0.030$ ) che all'insorgenza di fibrosi avanzata (HR=5.390, 95% C.I. 1.216 – 23.896, 0.027).

## **Conclusioni**

Nei pazienti affetti da MASLD, la ridotta attività enzimatica della LAL si associa al progressivo peggioramento della fibrosi epatica, fino alle forme più avanzate. Il dosaggio dell'attività enzimatica della LAL potrebbe quindi rappresentare un efficace predittore di progressione, utile a identificare il sottogruppo di pazienti MASLD a maggior rischio di progressione di malattia. Tali risultati necessitano di una conferma su popolazioni più ampie. Infine, terapie mirate al miglioramento dell'attività enzimatica della LAL, potrebbero rappresentare una nuova strategia terapeutica nei pazienti con MASLD.

**Parole chiave:** MASLD, fibrosi epatica, LAL-Deficiency

**Abbreviazioni:**

αFP – Alfa-Fetoproteina	IRS-2 – Insulin Receptors Substrate-2
ABI – Ankle-Brachial Index	LAL – Lysosomal Acid Lipase
ACC – Acetyl Co-A Carboxylase	LAL-D – Lysosomal Acid Lipase- Deficiency
ALD - Alcoholic Liver Disease	LDL – Low Density Lipoprotein
ALT – Alanina Aminotransferasi	LSM – Liver Stiffness Measurement
APRI – AST-to-platelet ratio Index	MAFLD – Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease
ARFI – Acoustic Radiation Force Imaging	MASLD – Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease
AST – Aspartato Aminotransferasi	MASH – Metabolic Dysfunction-Associated Steatohepatitis
AUDIT-C – Alcohol Use Disorders Identification Test-Consumption	MBOAT7 – Membrane Bound O-Acyltransferase Domain-Containing 7
BMI – Body Mass Index	MDA – Malondialdehyde
CAP – Controlled Attenuation Parameter	MetALD – Metabolic-Alcoholic Liver Disease
CESD – Cholesteryl Ester Storage Disease	NADPH – Nicotinammide Adenina Dinucleotide Fosfato
ChREBP – Carbohydrate Response Element-Binding Protein	NAFLD – Non-Alcoholic Fatty Liver Disease
CKD – Chronic Kidney Disease	NASH – Non-Alcoholic Steatohepatitis
CVEs – Cardiovascular Events	NFS – NAFLD Fibrosis Score
DAMPs – Damage-Associated Molecular Patterns Molecules	NF-κB – Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells
DBS – Dried Blood Spot	NLRP3 – Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Like Receptor Family, Pyrin Domain Containing 3
DM2 – Diabete Mellito di tipo 2	NOX – NADPH-Ossidasi
DNL – De-Novo Lipogenesis	oxLDL – Lipoproteine A Bassa Densità Ossidate
DPP-4 – Dipeptidyl Peptidase-4	PAMPs – Pathogen-Associated Molecular Patterns Molecules
EDTA – Acido Etilendiamminotetraacetico	PNPLA3 – Patatin-Like Phospholipase Domain-Containing Protein 3
ER – Reticolo endoplasmatico	PPAR – Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
FA – Fibrillazione Atriale	PUFAs – Polyunsaturated Fatty Acids
FAS – Fatty Acyl Synthase	ROI – Regione Di Interesse
FFAs – Free Fatty Acids	ROS – specie reattive dell'ossigeno
Fib-4 – Fibrosis-4 Index	SCDs – Steroyl Carboxy Desaturase
FLI – Fatty Liver Index	SGLT-2 – Sodium Glucose Co-Transporter 2
γGT – Gamma Glutamyl-Transpeptidasi	SOCS-3 – Suppressor of Cytokine Signaling-3
GLP-1 – Glucagon-Like Peptide-1	SREBP-1c – Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c
HBV – Hepatitis B Virus	SWE – Point Shear Wave Elastography
HCC – Hepatocellular Carcinoma	TE – Transient Elastography
HBsAg – Hepatitis B Surface Antigen	TM6SF2 – Transmembrane 6 Superfamily Member 2
HCV – Hepatitis C Virus	URP – Unfolded Protein Response
HDL – High Density Lipoprotein	VLDL – Very Low-Density Lipoprotein
HFCS – High-Fructose Corn Syrup	WD – Wolman Disease
HMG-CoA – Idrossimetilglutaril-Coenzima A	
HOMA-IR – Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance	
hs-CRP – High Sensitivity C-Reactive Protein	
HSI – Hepatic Steatosis Index	
IFG – Impaired Fasting Glucose	
IMT – Spessore Medio Intimale	
IR – Insulin-Resistance	



## **Introduzione: NAFLD, MAFLD e MASLD a confronto**

Le linee guida EASL (*European Association for the Study of the Liver*) – EASD (*European Association for the Study of Diabetes*) – EASO (*European Association for the Study of Obesity*) del 2016 [1] definiscono la NAFLD (*Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*) come una patologia caratterizzata dall'accumulo intraepatico di lipidi in assenza di coesistenti cause secondarie, quali l'abuso di alcool ( $\leq 20\text{g/die}$  per la donna e  $\leq 30\text{g/die}$  per l'uomo), le infezioni croniche da virus epatotropi, le epatiti autoimmuni, l'uso di farmaci potenzialmente steatogeni (es. amiodarone, cordarone, tamoxifene [2]) e le malattie ereditarie monogeniche (es. emocromatosi, Morbo di Wilson).

Nella definizione di NAFLD sono incluse due condizioni istopatologiche distinte [3]:

- NAFL (*Nonalcoholic Fatty Liver*), steatosi epatica semplice: caratterizzata dalla presenza di steatosi in almeno il 5% degli epatociti, con o senza infiammazione e fibrosi, in assenza di degenerazione balloniforme;
- NASH (*Nonalcoholic Steatohepatitis*), steatoepatite non alcolica: diagnosi esclusivamente istologica la cui caratteristica imprescindibile è la degenerazione balloniforme degli epatociti in presenza di steatosi, infiammazione portale e lobulare.

Nel tentativo di andare a sostituire la definizione di NAFLD, nel 2020 un panel di esperti internazionali ha proposto la definizione di MAFLD (*Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease*) [4]. La definizione di MAFLD introduceva la necessaria concomitanza dell'evidenza dell'accumulo di grasso intraepatico, diagnosticato mediante esami radiologici o istologici, e di almeno un fattore dismetabolico tra i seguenti:

- Sovrappeso o obesità ( $\text{BMI} - \text{Body Mass Index} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ );
- Diabete mellito di tipo 2 (DM2);
- In caso di paziente normopeso ( $\text{BMI} < 25 \text{ kg/m}^2$ ) e non diabetico, in presenza di almeno due alterazioni metaboliche tra le seguenti:

- Circonferenza vita  $\geq 102$ cm per gli uomini,  $\geq 88$ cm per le donne;
- Pressione arteriosa  $\geq 130/85$ mmHg o in corso di terapia;
- Trigliceridi  $\geq 150$ mg/dl ( $\geq 1.70$ mmol/l) o in corso di terapia;
- HDL-colesterolo  $< 40$ mg/dl ( $< 1.0$ mmol/l) per gli uomini,  $< 50$ mg/dl ( $< 1.3$ mmol/l) per le donne o in corso di terapia;
- Condizione di prediabete, definita come glicemia a digiuno tra 100 e 125mg/dl (5.6-6.9mmol/l) o glicemia a due ore dal pasto tra 144 e 199mg/dl (7.8-11.0mmol/l) o emoglobina glicata tra 5,7% e 6,4% (39-47mmol/mol);
- HOMA-IR (*Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*)  $\geq 2.5$ ;
- Proteina C-reattiva ad alta sensibilità (*hs-CRP, High Sensitivity C-Reactive Protein*)  $> 2$ mg/l.

Contrariamente a quanto accadeva con la diagnosi di NAFLD, permessa solamente in assenza di ulteriori potenziali cause di steatosi, gli autori proponevano per la MAFLD un processo diagnostico “positivo”, che prevedeva l’identificazione di una serie di alterazioni metaboliche che negli anni sono risultate essere correlate alla steatosi epatica. Inoltre, gli autori avevano sensibilmente ridotto i criteri di esclusione diagnostica sottolineando la possibilità del verificarsi di “*dual aetiology*”, ossia di possibili overlap eziologici di steatosi (es: MAFLD associata ad abuso di alcol e/o infezioni croniche da virus epatotropi).

Tale proposta è stata accolta con reazioni contrastanti dalla comunità scientifica. I maggiori dubbi sono stati sollevati riguardo le diagnosi di overlap e la totale esclusione dalla diagnosi di forme non associate a dismetabolismo. ([5], [6])

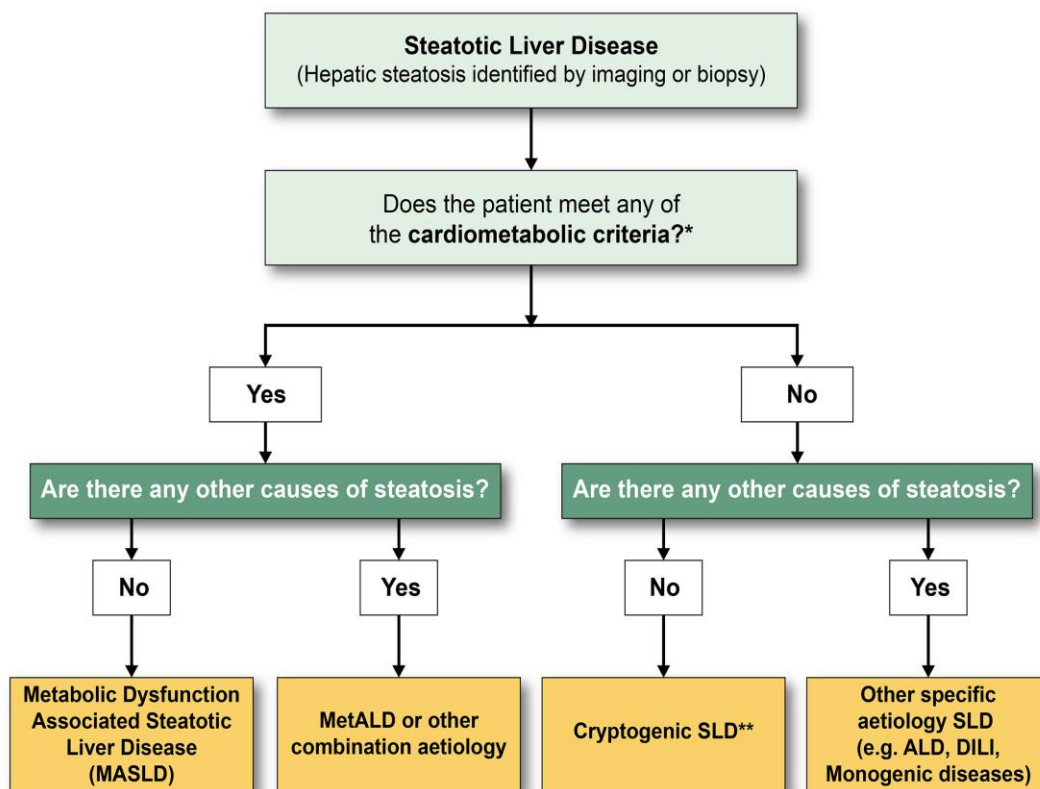
Ancor più recentemente, nel giugno del 2023, attraverso un Consensus Statement delle società scientifiche EASL, AASLD (*American Association for Study of Liver Disease*) e ALEH (*Asociación Latino-americana para el Estudio del Hígado*), sono state presentate le nuove definizioni di MASLD (*Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease*) e MASH (*Metabolic Dysfunction-Associated Steatohepatitis*). [7]

La MASLD è caratterizzata dall'accumulo di grasso intraepatico, diagnosticato mediante esami radiologici o istologici, in associazione con la presenza di alterazioni metaboliche e l'assenza di altre cause di steatosi epatica.

Le alterazioni metaboliche sono definite come la presenza di almeno 1 delle seguenti 5 condizioni:

- BMI  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup> o circonferenza vita  $\geq 94$ cm per gli uomini,  $\geq 80$ cm per le donne;
- Glicemia a digiuno  $\geq 100$ mg/dl (5.6mmol/l) o glicemia a due ore dal pasto  $\geq 140$ mg/dl (7.8mmol/l) o emoglobina glicata  $\geq 5,7\%$  (39mmol/mol) o diagnosi di diabete mellito di tipo 2 (DM2) o in corso di terapia;
- Pressione arteriosa  $\geq 130/85$ mmHg o in corso di terapia;
- Trigliceridi  $\geq 150$ mg/dl ( $\geq 1.70$ mmol/l) o in corso di terapia;
- HDL-colesterolo  $\leq 40$ mg/dl ( $< 1.0$ mmol/l) per gli uomini,  $\leq 50$ mg/dl ( $< 1.3$ mmol/l) per le donne o in corso di terapia.

Rispetto al precedente tentativo operato nel 2020, con la definizione di MASLD viene effettuata una specifica rispetto le diagnosi di sovrapposizione, creando una specifica classe diagnostica per la concomitante presenza di fattori di rischio metabolici e di abuso di alcol (pari a 140-350 g/settimana per le donne e 210-420 g/settimana per gli uomini), riconoscendo messianismi patogenetici molecolari comuni nelle due forme e definendo la condizione come *MetALD (Metabolic-Alcoholic Liver Disease)*. In caso di coesistenza con altre cause di steatosi si parla invece più genericamente di "malattia ad eziologia combinata".



**\*Cardiometabolic criteria**

<u>Adult Criteria</u>	<u>Pediatric Criteria</u>
<p><b>At least 1 out of 5:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> BMI <math>\geq 25</math> kg/m<sup>2</sup> [23 Asia] <b>OR</b> WC &gt; 94 cm (M) 80 cm (F) <b>OR</b> ethnicity adjusted</li> <li><input type="checkbox"/> Fasting serum glucose <math>\geq 5.6</math> mmol/L [100 mg/dL] <b>OR</b> 2-hour post-load glucose levels <math>\geq 7.8</math> mmol/L [<math>\geq 140</math> mg/dL] <b>OR</b> HbA1c <math>\geq 5.7\%</math> [39 mmol/L] <b>OR</b> type 2 diabetes <b>OR</b> treatment for type 2 diabetes</li> <li><input type="checkbox"/> Blood pressure <math>\geq 130/85</math> mmHg <b>OR</b> specific antihypertensive drug treatment</li> <li><input type="checkbox"/> Plasma triglycerides <math>\geq 1.70</math> mmol/L [150 mg/dL] <b>OR</b> lipid lowering treatment</li> <li><input type="checkbox"/> Plasma HDL-cholesterol <math>\leq 1.0</math> mmol/L [40 mg/dL] (M) and <math>\leq 1.3</math> mmol/L [50 mg/dL] (F) <b>OR</b> lipid lowering treatment</li> </ul>	<p><b>At least 1 out of 5:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> BMI <math>\geq 85^{\text{th}}</math> percentile for age/sex [BMI z score <math>\geq +1</math>] <b>OR</b> WC &gt; 95<sup>th</sup> percentile <b>OR</b> ethnicity adjusted</li> <li><input type="checkbox"/> Fasting serum glucose <math>\geq 5.6</math> mmol/L [<math>\geq 100</math> mg/dL] <b>OR</b> serum glucose <math>\geq 11.1</math> mmol/L [<math>\geq 200</math> mg/dL] <b>OR</b> 2-hour post-load glucose levels <math>\geq 7.8</math> mmol [140 mg/dL] <b>OR</b> HbA1c <math>\geq 5.7\%</math> [39 mmol/L] <b>OR</b> already diagnosed/treated type 2 diabetes <b>OR</b> treatment for type 2 diabetes</li> <li><input type="checkbox"/> Blood pressure age &lt; 13y, BP <math>\geq 95^{\text{th}}</math> percentile <b>OR</b> <math>\geq 130/80</math> mmHg (whichever is lower); age <math>\geq 13y</math>, 130/85 mmHg <b>OR</b> specific antihypertensive drug treatment</li> <li><input type="checkbox"/> Plasma triglycerides &lt; 10y, <math>\geq 1.15</math> mmol/L [<math>\geq 100</math> mg/dL]; age <math>\geq 10y</math>, <math>\geq 1.70</math> mmol/L [<math>\geq 150</math> mg/dL] <b>OR</b> lipid lowering treatment</li> <li><input type="checkbox"/> Plasma HDL-cholesterol <math>\leq 1.0</math> mmol/L [<math>\leq 40</math> mg/dL] <b>OR</b> lipid lowering treatment</li> </ul>

Figura 1 - Criteri diagnostici di MASLD [7]

## Epidemiologia

Negli ultimi 20 anni, la NAFLD è progressivamente diventata la causa più comune di epatopatia cronica, con una prevalenza globale stimata attorno al 30% [8]. La prevalenza della NAFLD aumenta fino al 55.5% nei pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2 (DM2) e circa il 65% in caso di diagnosi concomitante di obesità e DM2 [9]. Alla NAFLD si associano comorbidità quali l'obesità, il DM 2, l'IR, la dislipidemia, l'ipertensione e la sindrome metabolica. [10]

Nonostante a causa della recente introduzione della definizione di MASLD, non vi siano dati epidemiologici che utilizzano tale nomenclatura, dati preliminari mostrano una elevata concordanza diagnostica tra NAFLD e MASLD, rendendo i dati raccolti sulla NAFLD estendibili alla MASLD. ([11], [12])

## Patogenesi

La patogenesi della NAFLD è complessa e multifattoriale. Nel 1998 fu proposta una teoria eziopatogenetica nota come *"two-hit hypothesis"*, per spiegare l'insorgenza della steatoepatite. Secondo questa teoria, l'accumulo di grasso negli epatociti sarebbe primariamente promosso dall'IR, mentre successivi stimoli ossidativi determinerebbero l'insorgenza dello stato infiammatorio e lo sviluppo di fibrosi epatica. [13]

Ad oggi sappiamo che il processo patogenico della NAFLD è molto più complesso di quanto teorizzato nel 1998, e la precedente teoria è stata sostituita da quella del *"multiple-hits hypothesis"* secondo la quale i differenti meccanismi eziopatogenetici in grado di indurre la steatosi e le sue complicanze agiscono contestualmente, favorendo tanto l'insorgenza quanto la progressione della malattia [14] (Fig.2).

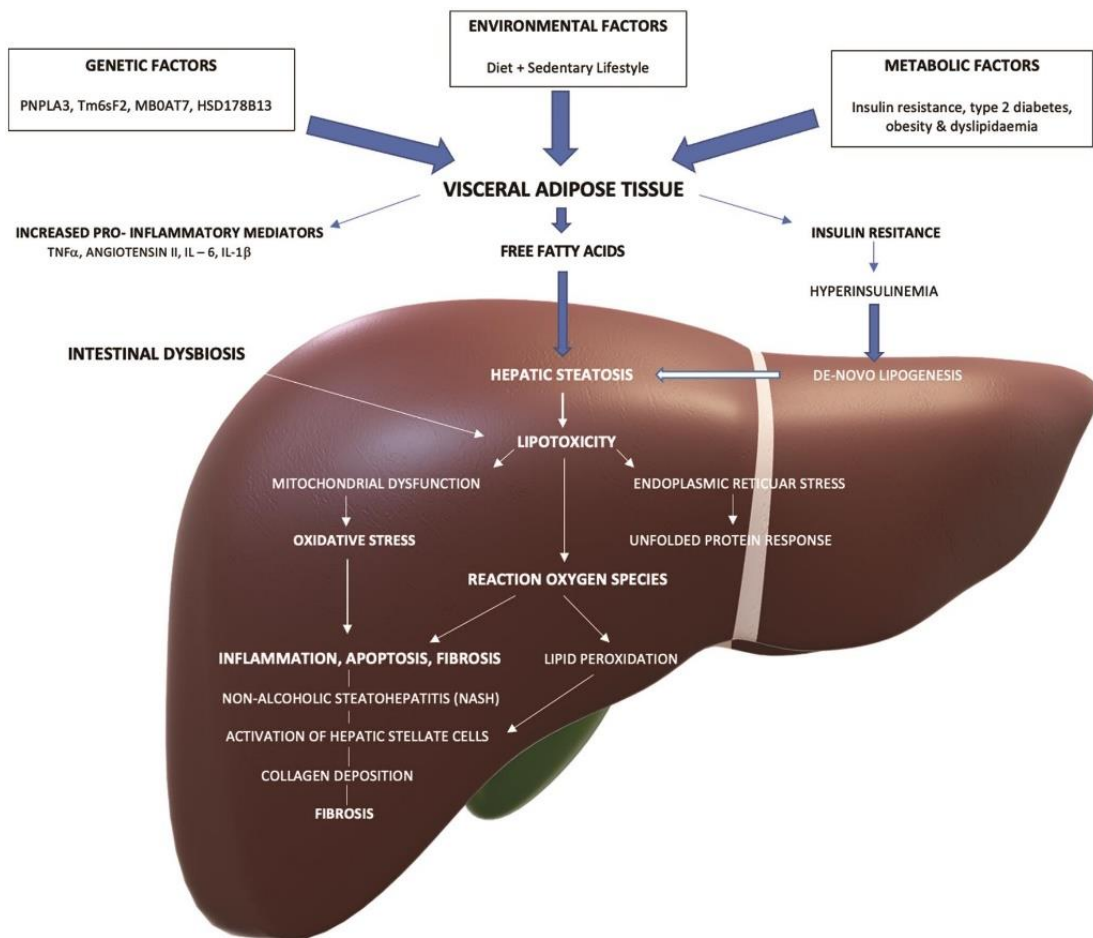


Figura 2 - Patogenesi [15]

## Metabolismo lipidico e lipotossicità

La steatosi epatica ha inizio con l'accumulo di trigliceridi all'interno degli epatociti, nei lipid droplets. I trigliceridi che si accumulano nel fegato provengono da:

- De-novo lipogenesis (DNL) del fegato: determina circa il 26% dei trigliceridi epatici ed è strettamente correlato all'IR. Attraverso la DNL l'eccesso di carboidrati è convertito in trigliceridi. Questo processo è regolato da alcuni fattori di trascrizione nucleare, tra cui, il più importante è il SREBP-1c (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein*). SREBP-1c promuove la DNL aumentando la trascrizione degli enzimi che partecipano alla lipogenesi, quali *Acetyl Co-A Carboxylase (ACC)*, *Fatty Acyl Synthase (FAS)* e *Steroyl Carboxy Desaturase (SCDs)*. La DNL si correla all'IR in quanto il recettore IRS-2 (*Insulin Receptors Substrate-2*) agisce, quando attivato, come

regolatore del fattore SREBP-1c. Negli stati di IR vi è una ridotta espressione del recettore IRS-2, determinando una up-regulation di SREBP-1c e, conseguentemente, l'aumento della DNL. ([16], [17], [18]) SREBP-1c regola, inoltre, anche l'azione dell'enzima HMG-CoA reduttasi, che catalizza la prima reazione del processo di sintesi del colesterolo. Questo spiega gli aumentati livelli di LDL (*Low Density Lipoprotein*) che si riscontrano nei pazienti affetti da steatosi epatica. ([19], [20])

Altri fattori che regolano la DNL e che risentono dell'azione dell'insulina sono la ChREBP (*Carbohydrate Response Element-Binding Protein*), che regola la produzione di Acetil-CoA partendo dal glucosio e la sintesi di FFAs (*Free Fatty Acids*) e di VLDL [21], e i recettori PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*), in particolare PPAR- $\alpha$  che regola la beta-ossidazione lipidica e PPAR- $\gamma$  che innesca la DNL [22];

- Lipolisi del tessuto adiposo: attraverso questo processo vengono mobilizzate in circolo catene di FFAs che vengono poi catturate dal fegato e costituiscono circa il 60% dei trigliceridi epatici. Nei pazienti affetti da obesità e IR si osserva un aumento della lipolisi viscerale indotta dalle catecolamine, mentre la lipolisi basale è aumentata nei pazienti affetti da IR indipendentemente dal BMI e dall'età. L'aumentato rilascio di FFAs da parte degli adipociti peggiora l'accumulo di lipidi negli organi insulino-sensibili come il fegato ([23], [24]);
- Lipidi provenienti dalla dieta: costituiscono circa il 15% dei trigliceridi epatici [16].

In condizioni fisiologiche, l'accumulo di trigliceridi per sé non è epatotossico, ma costituisce un meccanismo di difesa dall'eccessiva quantità di acidi grassi in circolo. Se aumentato, l'accumulo di trigliceridi determina un danno a carico degli epatociti, delle cellule di Kupffer (macrofagi specializzati localizzati nel fegato), delle cellule stellate e delle cellule dei sinusoidi epatici, causando fenomeni di lipotossicità [25]. Il danno epatocitario secondario all'accumulo di lipidi attiva le cellule stellate. Queste secernono la citochina TGF $\beta$  (*Transforming Grow Factor  $\beta$* ) attivando dei meccanismi di comunicazione

paracrina e la secrezione di materiale collagene nella matrice extracellulare, avviando il processo fibrogenico ([26], [27]). Il danno epatico attiva, inoltre, le cellule di Kupffer, capaci di rilasciare citochine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18) e chemochine pro-infiammatorie, contribuendo alla patogenesi della steatoepatite [28].

Un ruolo importante nel metabolismo lipidico è quello dell'enzima LAL (*Lysosomal Acid Lipase*). La LAL è codificata dal gene LIPA [29] ed agisce all'interno del lisosoma, andando ad idrolizzare gli esteri del colesterolo in colesterolo libero ed i trigliceridi in acidi grassi e glicerolo [30]. La disponibilità intracellulare di colesterolo libero e di FFAs regola l'omeostasi lipidica mediante meccanismi di feedback.

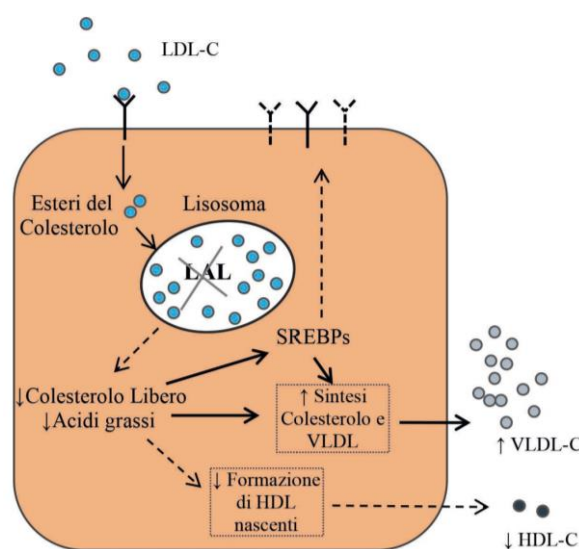


Figura 3 - Ruolo dell'enzima LAL nel metabolismo lipidico [31]

Sono state identificate diverse mutazioni del gene LIPA che possono determinare un deficit di Lipasi Acida Lisosomiale (LAL-D). In presenza di queste mutazioni l'attività enzimatica si riduce e determina un accumulo di lipidi all'interno dei lisosomi e delle cellule, fino a danneggiarle [32]. L'accumulo lisosomiale di lipidi, nei LAL-D, è caratterizzato dall'accumulo di colesterolo, con un pattern di composizione e distribuzione differente da quanto si verifica nelle forme ambientali di NAFLD. La trasmissione è autosomica recessiva e la manifestazione clinica varia a seconda del tipo di mutazione e dell'attività enzimatica residua. Si riconoscono due diversi fenotipi di malattia ([33], [34]):



- Wolman Disease (WD): ad esordio precoce e rapidamente progressiva, è causa di decesso entro l'anno di vita. L'attività enzimatica LAL è assente o fortemente ridotta (<1% della normale attività). I soggetti affetti presentano epatosplenomegalia, iperlipemia, insufficienza surrenalica, diarrea o steatorrea cronica e malassorbimento, con conseguente ritardo nella crescita e cachessia.
- Cholesteryl Ester Storage Disease (CESD): può esordire tra l'età infantile e l'età adulta, in quanto le manifestazioni cliniche dipendono dal tipo di mutazione e dall'attività enzimatica residua (1-12% della normale attività). Si manifesta con epatosplenomegalia, fibrosi epatica, dislipidemia e aterosclerosi precoce. I pazienti affetti da CESD possono manifestare steatosi epatica con caratteristiche che mimano la NAFLD, fino a quadri evolutivi di cirrosi epatica [35].

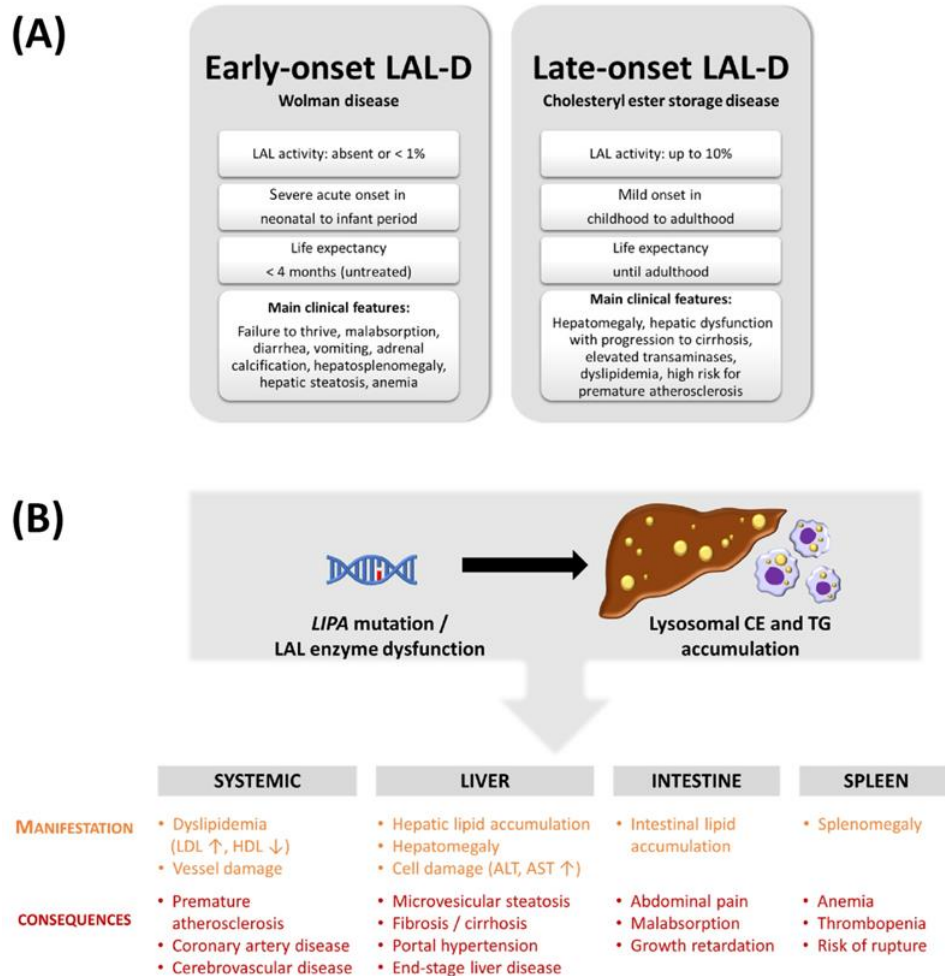


Figura 4 - Caratteristiche della LAL-D [36]

## **Insulino-resistenza**

L'IR è una condizione caratterizzata da una inadeguata risposta cellulare allo stimolo indotto dall'insulina. Per questo motivo, al fine di ottenere la risposta attesa, è necessario che le cellule vengano stimolate con quantità più elevate di insulina. [37]

L'effetto biologico dell'insulina ha inizio attraverso il legame con il suo recettore. Tale legame instaura una serie di eventi a cascata, tra i quali la fosforilazione di una tirosina sulle proteine IRS (*Insulin Receptors Substrate*) 1 e 2, che termina con la traslocazione di un trasportatore del glucosio (GLUT-4) dalla regione intracellulare alla membrana cellulare. Lungo questa complessa sequenza di eventi, i meccanismi responsabili dell'IR possono coinvolgere il legame dell'insulina con il recettore, la fosforilazione delle proteine IRS o il trasportatore GLUT4: qualsiasi sia la causa, si va ad instaurare una condizione caratterizzata dalla ridotta risposta all'insulina e dall'aumento delle concentrazioni di glucosio e di lipidi intraepatici. [38]

Come visto in precedenza, l'IR si associa ad un incremento della DNL in conseguenza dell'effetto su diversi mediatori intracellulari, in particolare su SREBP-1c. In aggiunta, l'IR determina anche una ridotta capacità delle cellule muscolari di ricevere glucosio (a causa della ridotta traslocazione di GLUT4) e di sintetizzare glicogeno, con conseguente eccesso di glucosio circolante che diventa substrato in eccesso per la DNL epatica. [39]

Anche i mediatori dell'infiammazione sistemica hanno un ruolo nell'IR: il TNF- $\alpha$ , ad esempio, favorisce l'IR attraverso la fosforilazione della serina dell'IRS-1, riducendo l'espressione di GLUT-4 [40]; invece, l'IL-6 causa un aumento dell'espressione del mediatore SOCS-3 epatico (*Suppressor Of Cytokine Signaling-3*) che a sua volta induce la degradazione delle molecole coinvolte nella segnalazione dell'insulina e l'attivazione di SREBP-1c ([41], [42], [43]).

Nel complesso lo stato di insulino-resistenza determina la soppressione della gluconeogenesi e l'aumento della DNL nel fegato, la riduzione della glicogenogenesi

muscolare e lo stress infiammatorio. Tutto ciò determina l'instaurarsi di un circolo vizioso che può favorire la comparsa e la progressione della NAFLD. [44]

## **Obesità e infiammazione**

La prevalenza della NAFLD nella popolazione affetta da sovrappeso o obesità è di circa il 55% ([8], [45]). Vi è una stretta relazione tra NAFLD, obesità e stato infiammatorio.

Il tessuto adiposo produce una serie di citochine proinfiammatorie (quali TNF- $\alpha$  e IL-6 precedentemente descritte) che concorrono all'instaurazione di uno stato infiammatorio sistemico cronico di basso grado caratteristico dei soggetti affetti da obesità. Anche l'azione del fattore di trascrizione NF-kB (*Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer Of Activated B Cells*), maggiormente attivo nei pazienti obesi, amplifica lo stato infiammatorio. NF-kB è normalmente espresso all'interno del citoplasma ma quando la proteina IKK2 fosforila la sua proteina inibitrice IKb, quest'ultima trasloca nel nucleo cellulare inducendo l'espressione di vari mediatori infiammatori. ([46], [47])

Gli adipociti secernono adipochine specializzate, quali la leptina e la adiponectina. La leptina è un ormone anoressizzante che favorisce il dispendio energetico, e nei pazienti obesi si può osservare una resistenza alla leptina a cui consegue una ridotta soppressione dell'appetito [48]. L'adiponectina svolge un'azione insulino-sensibilizzante, grazie al suo recettore AdipoR2 che a sua volta attiva PPAR- $\alpha$ , ed antinfiammatoria, come conseguenza del blocco l'attivazione di NF-kB e della secrezione di citochine antinfiammatorie [49]. Nei soggetti obesi si osserva un aumento della leptina circolante e una riduzione della adiponectina, andando nel complesso a favorire l'insorgenza e il mantenimento del processo infiammatorio cronico. ([47], [50])

L'eccesso di FFAs, lo stress ossidativo e i mediatori proinfiammatori circolanti possono determinare l'attivazione degli inflammosomi, complessi citoplasmatici multiproteici che fanno parte del sistema immunitario innato e che agiscono come sensori di patogeni

(PAMPs, *Pathogen-Associated Molecular Patterns Molecules*) o di danno (DAMPs, *Damage-Associated Molecular Patterns Molecules*) esogeni od endogeni, attivando la risposta immunitaria. Di particolare interesse è l'inflammosoma NLRP3 (*Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Like Receptor Family, Pyrin Domain Containing 3*). Nei pazienti affetti da steatoepatite si è infatti osservata una maggiore attivazione di questo inflammosoma e la conseguente attivazione delle cellule stellate epatiche. ([51], [52])

## **Stress ossidativo**

Lo stress ossidativo è una condizione caratterizzata da uno squilibrio nel sistema redox, con prevalenza delle sostanze pro-ossidanti rispetto a quelle antiossidanti.

Nelle cellule, le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono prodotte principalmente dai mitocondri e sono capaci di interferire con le strutture interne della cellula e le loro funzioni. Fisiologicamente i meccanismi antiossidanti neutralizzano i ROS in eccesso. Quando si crea una discrepanza tra la produzione di ROS e le capacità antiossidanti di difesa, possono insorgere danni cellulari e a carico del DNA. È stato dimostrato che nella NAFLD si verificano sia la riduzione delle sostanze antiossidanti [53] che l'aumento di quelle pro-ossidanti [54].

L'incremento della  $\beta$ -ossidazione dei FFAs nei mitocondri [55] e l'aumentata espressione del citocromo P450 2E1 (CYP2E1) ([56], [57]) determinano l'accumulo di ROS negli epatociti. L'accumulo di ROS favorisce la perossidazione lipidica [58] e i prodotti che ne derivano hanno effetto di lipotossicità epatica, determinando la disfunzione mitocondriale, lo stress del reticolo endoplasmatico e l'attivazione della NADPH ossidasi (NOX), enzima che catalizza la produzione dei radicali superossido [59]. A riprova di questo, è stato dimostrato che nei pazienti con NAFLD vi è un aumento della sNOX2-dp sierica, marker di attivazione della NOX2 [54].

La perossidazione dei lipidi determina inoltre la formazione di 4-HNE (*4-Hydroxy-2-Nonenal*) e MDA (*Malondialdehyde*), prodotti intermedi del processo, capaci di diffondersi nello spazio extracellulare e amplificare l'effetto dello stress ossidativo. [60]

Il danno mitocondriale secondario all'eccessiva produzione di ROS può costituire una causa scatenante l'attivazione dell'inflammosoma NLRP3 precedentemente descritto, favorendo la progressione della malattia epatica. [61]

In condizioni di stress ossidativo si può instaurare un processo noto come "stress del reticolo endoplasmatico (ER)" caratterizzato dall'accumulo di proteine mal ripiegate all'interno del lume dell'organello, a seguito del quale si attiva il gene UPR (*Unfolded Protein Response*) [62]. Lo stress del ER si correla all'aumentata espressione della Caspasi-2, necessaria per avviare l'attività di SREBP-1. Nel complesso questo fenomeno determina l'incremento della DNL e l'apoptosi degli epatociti, partecipando alla progressione della malattia epatica. ([63], [64])

## **Dieta e asse intestino-fegato**

Le cattive abitudini alimentari contribuiscono alla genesi della patologia, sia in conseguenza di un aumentato introito calorico globale ma anche del consumo di alcuni specifici nutrienti.

Nel corso dell'ultimo secolo, si è osservato un progressivo aumento della prevalenza dell'obesità e di tutte le condizioni associate (IR, dislipidemia, ipertensione, diabete, sindrome metabolica), soprattutto nei paesi industrializzati, dove più spesso l'alimentazione è caratterizzata dal consumo cibi ad elevato contenuto calorico, a basso contenuto di fibre e ricche di acidi grassi saturi e zuccheri aggiunti. [65]

Già le linee guida EASL-EASD-EASO del 2016 per la gestione della NAFLD [1] raccomandavano un cambio dello stile di vita volto alla perdita del 7-10% del peso

corporeo ed in particolare suggerivano, come pattern dietetico, l'utilizzo della dieta mediterranea, per la sua caratteristica composizione in macronutrienti.

L'aderenza alla dieta mediterranea è stata correlata ad un miglioramento della steatosi epatica e dell'IR ([66], [67]), ma anche ad una minore attivazione delle piastrine e alla minore deposizione di collagene nel fegato dei pazienti affetti da NAFLD [68].

Tra le variazioni dietetiche tipiche del nostro tempo, la più impattante, per la malattia epatica, è l'introduzione di elevate quantità di zuccheri aggiunti. Tra questi, preparazioni ricche in fruttosio, come lo sciroppo di mais ad elevato contenuto di fruttosio, possono avere un impatto sull'incidenza e la progressione di NAFLD (HFCS – *High-Fructose Corn Syrup*). I due tipi di HFCS usati nei processi alimentari industriali contengono il 42% e il 55% di fruttosio e sono utilizzati per dolcificare le bibite, le caramelle, i dolci ed i condimenti. Pur trattandosi della stessa molecola, nel corpo umano l'effetto delle abbondanti quantità di fruttosio contenute negli HFCS è differente rispetto a quello prodotto fruttosio ingerito con la frutta e la verdura, per via della diversa matrice alimentare all'interno del quale si trova. Le fibre, le vitamine, i sali minerali e gli antiossidanti che si trovano nei vegetali riducono l'assorbimento del fruttosio e quindi anche gli effetti metabolici da esso indotto. ([69], [70], [71], [72])

Le elevate quantità di fruttosio ingerite con la dieta stimolano la DNL attivando i fattori di trascrizione SREBP-1c e ChREBP e attraverso i metaboliti intermedi della fruttolisi che partecipano ai processi di lipogenesi. ([73], [74], [75])

Il fruttosio, inoltre, favorisce la produzione di malonil-CoA che inibisce l'ossidazione degli acidi grassi e conseguentemente favorisce l'accumulo epatico di trigliceridi. [76]

L'ingestione di elevate quantità di fruttosio determinano alterazione della flora batterica intestinale, favorendo la traslocazione batterica e conseguentemente la presenza di una elevata concentrazione di lipopolisaccaridi circolanti (LPS) nel torrente ematico [77]. Elevati livelli di LPS sono stati associati alla steatosi, all'infiammazione e alla fibrosi

epatica. È stato dimostrato che i soggetti affetti da steatoepatite presentano una più elevata espressione di LPS negli epatociti rispetto ai soggetti sani, e una contestuale maggiore attivazione del segnale NF-κB [78]. Inoltre, i pazienti con steatosi epatica ed elevati livelli di LPS circolanti presentano un aumento della sNOX2-dp sierica, marker di stress ossidativo [79].

Il microbiota intestinale è anche responsabile della conversione del fruttosio in acetato all'interno del lume intestinale stesso, fornendo acetyl-CoA indipendentemente dai processi metabolici di fruttolisi. Tutti questi processi favoriscono l'instaurarsi della steatosi epatica e della sindrome metabolica. [80]

## **Determinanti genetici**

Sono stati studiati, nel corso del tempo, diversi geni e varianti alleliche nel tentativo di identificare fattori predisponenti o protettivi verso l'insorgenza della steatosi epatica. Ad oggi, sono soprattutto due i geni le cui varianti alleliche sono associate allo sviluppo ed alla progressione della NAFLD, ossia la PNPLA3 (*Patatin-Like Phospholipase Domain-Containing Protein 3*) ed il TM6SF2 (*Transmembrane 6 Superfamily Member 2*). Altri geni che sembrano predisporre allo sviluppo della malattia, pur con effetto meno marcato, sono la GCKR (*Glucokinase Regulator Protein*) e la MBOAT7 (*Membrane Bound O-Acyltransferase Domain-Containing 7*).

**PNPLA3 (*Patatin-Like Phospholipase Domain-Containing Protein 3*):** è il gene predisponente la NAFLD più studiato, si trova sul cromosoma 22 (22q13.31) e codifica per una lipasi nota come "adiponutrina" che catalizza l'idrolisi dei trigliceridi. La variante rs738409 (C/G) I148M di PNPLA3 è caratterizzata dalla presenza di una guanina a sostituzione di una citosina che trasforma il codone 148 da isoleucina in metionina. La variante I148M predispone verso l'intero spettro delle alterazioni caratteristiche della NAFLD, dalla steatosi fino alla steatoepatite ed alla fibrosi. La mutazione, si verifica vicino al dominio catalitico, probabilmente riducendo l'attività enzimatica di PNPLA3 e

determinando così lo sviluppo di steatosi secondaria alla ridotta capacità di efflusso dei lipidi dagli epatociti. ([81], [82])

Il danno indotto da PNPLA3-I148M riguarda anche le cellule stellate epatiche. Quando quiescenti, contengono goccioline lipidiche intracellulari costituite da retinolo palmitato idrolizzato da PNPLA3, ma, in presenza della variante I148M, vi è alterazione del metabolismo di queste goccioline con conseguente maggiore attivazione delle cellule stellate. [83]

La presenza dell'allele mutato si associa complessivamente ad una evoluzione più aggressiva della malattia epatica, con maggior presenza di fibrosi e necroinfiammazione e maggior rischio di sviluppare epatocarcinoma ([84], [85]). La variante PNPLA3-I148M si associa inoltre a complicanze aterosclerotiche, indipendentemente dalla presenza di diabete ed obesità. [86]

**TM6SF2 (*Transmembrane 6 Superfamily Member 2*):** la variante allelica rs58542926 (C/T) E167K del gene TM6SF2 è stata identificata come uno dei più importanti fattori genetici in grado di modificare il contenuto di grasso epatico [87] ed è caratterizzata dalla sostituzione di una lisina con una glutammina.

Codifica per una proteina transmembrana la cui funzione non è ancora ben nota, ma che sembrerebbe essere coinvolta nella secrezione delle VLDL da parte degli epatociti. In presenza della variante rs58542926 si osserva un maggior accumulo lipidico nelle cellule epatiche ma anche dei livelli più bassi di colesterolo LDL e trigliceridi circolanti, con effetto protettivo rispetto agli eventi cardiovascolari. ([88], [89])

**GCKR (*Glucokinase Regulator Protein*):** nel fegato, la GCKR regola l'attività della glucochinasi. In presenza di elevati livelli di glucosio nel torrente ematico, la GCKR rilascia la glucochinasi che, traslocata nel citoplasma, attiva le vie di immagazzinamento del glucosio attraverso la glicogenosintesi e la DNL. [90]



La variante allelica rs1260326 (C/T) P446L di GCKR è caratterizzata dalla sostituzione di una prolina con una lisina e questo riduce la capacità di GCKR di inibire la funzione della glucochinasi. A differenza dei due precedentemente descritti, la mutazione di GCKR si associa in maniera meno significativa alla steatosi epatica [91], mentre influenza maggiormente lo sviluppo di IR e diabete [92].

**MBOAT7 (*Membrane Bound O-Acyltransferase Domain-Containing 7*):** il gene MBOAT7 codifica per l'enzima LPIAT1 (*Lysophosphatidylinositol-Acyltransferase-1*), che catalizza l'incorporazione dell'acido arachidonico nel fosfatidilinositolo. La variante allelica rs641738 (C/T) si associa all'aumento della sintesi e dell'accumulo dei trigliceridi negli epatociti, per via di un aumentato turnover del fosfatidilinositolo e del conseguente incremento della produzione di diacilglicerolo (substrato per la sintesi dei trigliceridi). [93] Alcuni studi associano questa mutazione alla steatosi e alla fibrosi epatica ([94], [95]) e all'insorgenza di HCC in pazienti non cirrotici [96], mentre altri sembrano non confermare questa evidenza [97], pertanto il suo ruolo rimane attualmente controverso.

## Diagnosi

La diagnosi di MASLD può essere posta in presenza di steatosi epatica e di alterazioni metaboliche correlate. Spesso la steatosi epatica viene riscontrata incidentalmente durante accertamenti diagnostici eseguiti per altri motivi, trattandosi di una patologia a decorso asintomatico per la maggior parte della sua evoluzione.

Già le linee guida della NAFLD del 2016, ben prima della definizione di MASLD, ponevano indicazione alla valutazione degli enzimi epatici e, se possibile, all'esecuzione una ecografia epatica o alla valutazione dei biomarker di steatosi nei soggetti con fattori di rischio metabolici (Fig.5).

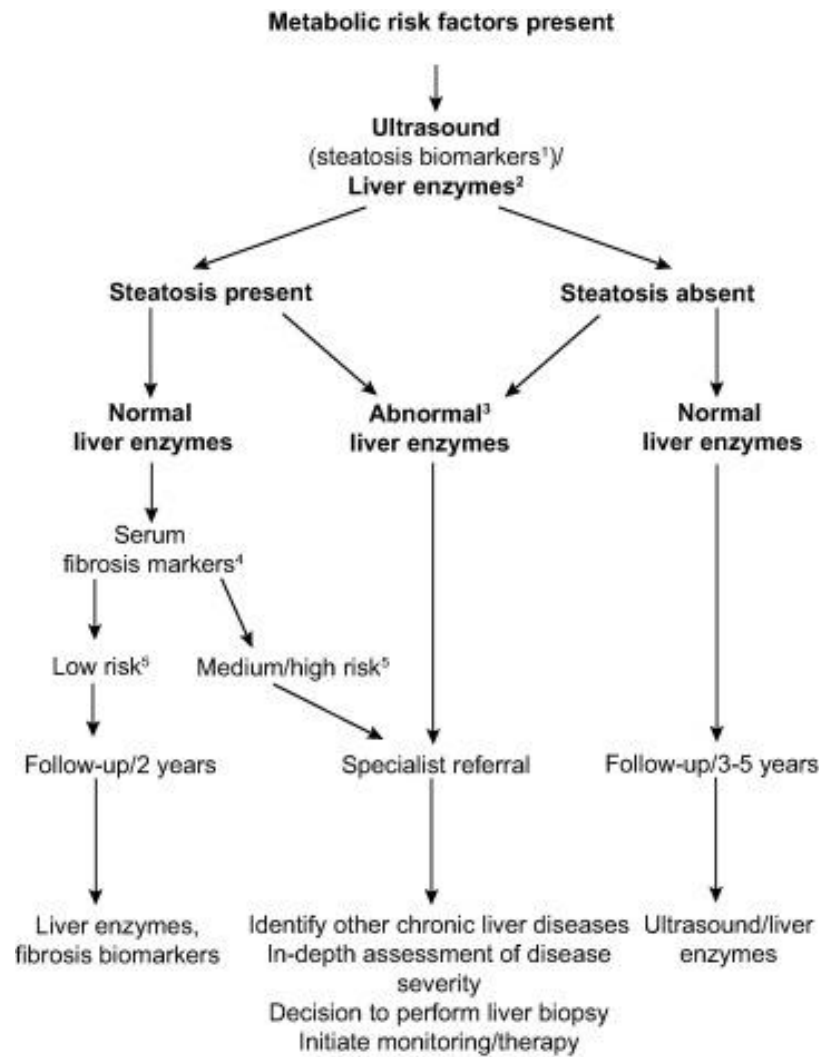


Figura 5 - Algoritmo per la diagnosi ed il follow-up della NAFLD/NASH [1]

## Metodi diagnostici non invasivi

Le metodiche diagnostiche non invasive costituiscono le prime metodiche di valutazione da applicare nel paziente con sospetto di MASLD.

### Imaging

L'ecografia rappresenta l'esame di screening utile a identificare la presenza di steatosi epatica, essendo un esame a basso costo ed ampiamente disponibile. Risulta tuttavia limitato dalla capacità di rilevare la steatosi epatica solamente se vi è interessamento di più del 20% degli epatociti, inoltre la sua applicazione può essere difficoltosa nei pazienti con steatosi severa [98].

Trattandosi di un esame fortemente operatore-dipendente, al fine di ottenere una valutazione quanto più possibile standardizzata, si utilizzano i criteri di Hamaguchi [99], mediante i quali la steatosi epatica viene valutata sulla base di tre parametri:

- Contrasto epato-renale e brillantezza epatica (0-3): si definisce contrasto epato-renale la presenza di evidente contrasto ecografico tra i due parenchimi, normalmente isoecogeni tra di loro. Si definisce “fegato brillante” il riscontro di echi particolarmente intensi del parenchima epatico.

Viene valutata come: 0 se entrambi assenti, 1 se si verifica solo una delle due condizioni, 2 se la brillantezza è lieve e vi è contrasto epato-renale, 3 se la brillantezza è severa e vi è contrasto epato-renale;

- Attenuazione profonda degli echi (0-2): si basa sull’attenuazione della penetrazione degli echi nella porzione profonda del fegato, che va a compromettere la visualizzazione del diaframma.

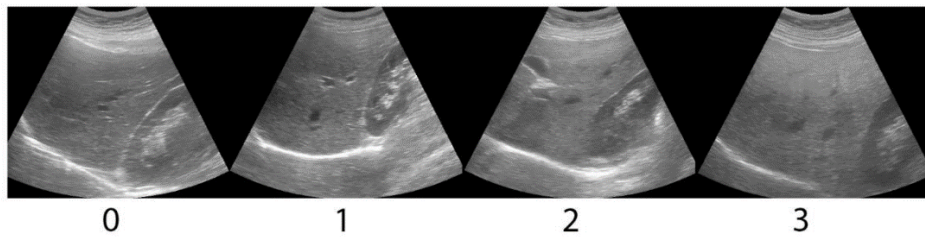
Valutato 0 se assente, 1 se la visualizzazione del diaframma non è nitida ma possibile, 2 se il diaframma è indistinguibile;

- Scarsa visibilità dei vasi intraepatici (0-1): si basa sulla scarsa visualizzazione delle pareti dei vasi intraepatici e sulla riduzione del loro lume.

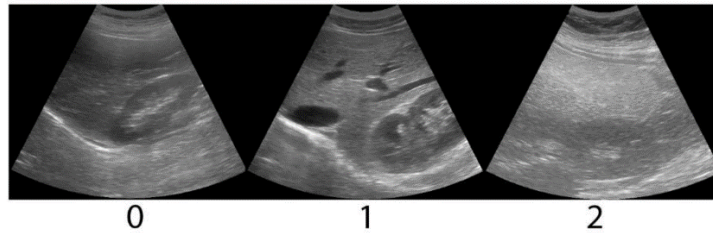
Valutato 0 se visibili, 1 se le pareti sono scarsamente visibili ed il lume è ridotto.

Il punteggio totale si ottiene dalla somma dei tre punti assegnati. La steatosi epatica è presente se il punteggio è  $\geq 1$ .

### Liver brightness and hepatorenal echo contrast



### Deep attenuation



### Vessel blurring

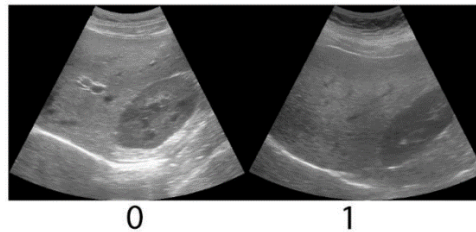


Figura 6 - Esempi di ecografie epatiche valutate attraverso lo score di Hamaguchi [100]

La risonanza magnetica nucleare rappresenta il gold standard per la diagnosi di steatosi epatica e permette di riconoscerla e quantificarla anche quando gli epatociti interessati sono circa il 5-10%. Tuttavia, nonostante la sua accuratezza, il suo utilizzo nella pratica clinica è ridotto per costi elevati, i lunghi tempi di esecuzione e la scarsa disponibilità della metodica.

Oltre la valutazione della steatosi epatica, le attuali metodiche di imaging permettono anche di valutare la fibrosi epatica mediante l'applicazione di tecniche di elastosonografia, che valutano in modo indiretto la rigidità del parenchima.

La metodica elastosonografica più diffusa è quella del Fibroscan®, o *transient elastography* (TE). L'esame si esegue sul lobo destro del fegato a paziente sdraiato, negli spazi intercostali. Il paziente deve essere a digiuno. Vibrazioni meccaniche di lieve ampiezza e

bassa frequenza (50Hz) vengono trasmesse da un trasduttore verso il fegato, inducendo un'onda di taglio che si propaga nei tessuti sottostanti. La stessa sonda, capace di rilevare gli ultrasuoni, segue la propagazione dell'onda e ne misura la velocità, la quale è direttamente proporzionale alla rigidità del tessuto: più esso è rigido, più le onde si propagano velocemente. L'esame misura la rigidità del fegato (*Liver Stiffness Measurement, LSM*) in un volume cilindrico largo 1cm e lungo 4, ad una profondità tra i 25mm ed i 65mm sotto il piano cutaneo. [101]

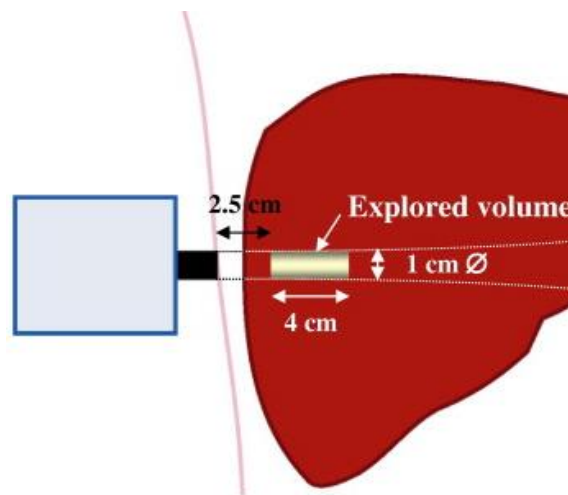


Figura 7 - Rappresentazione della metodica Fibroscan® [101]

Il risultato dell'esame è espresso in kiloPascals (kPa) e può essere categorizzato come:

- F0: <5,5 kPa;
- F1: 5,6–7,1 kPa;
- F2: 7,2–9,4 kPa;
- F3: 9,5–12,4 kPa;
- F4:  $\geq 12,5$  kPa. [101]

Le linee guida EASL del 2021 per la valutazione non invasiva delle malattie epatiche raccomandano un cut-off di LSM misurato con TE <8 kPa per escludere la fibrosi epatica avanzata nella pratica clinica [102].

Contestualmente alla valutazione della LSM, la sonda del Fibroscan® misura l'attenuazione del fascio di ultrasuoni (*Controlled Attenuation Parameter – CAP*) fornendo un'indicazione sul grado di steatosi epatica. Maggiore è la steatosi epatica, più è attenuato il fascio di ultrasuoni che attraversa il parenchima. I valori CAP vanno da 100 a 400 dB/m [103]. A differenza che per la fibrosi, non vi è attualmente una scala di CAP che valuti l'entità della steatosi; tuttavia, viene considerato suggestivo di presenza di NAFLD un valore di CAP maggiore di 247 dB/m. ([104], [105])

Come per l'esame ecografico, anche l'esame Fibroscan® CAP risulta essere vantaggioso per via del basso costo e della velocità di esecuzione. È pertanto da ritenersi molto utile per la valutazione contemporanea della steatosi e della fibrosi epatica [106]. Tuttavia, il Fibroscan® è gravato da alcune importanti limitazioni. Innanzitutto, non permette di visualizzare pre-test il cilindro di campionamento ed inoltre, nonostante la disponibilità di sonde diversamente calibrate da applicare a seconda del fenotipo del paziente, la valutazione presenta sensibilità e specificità ridotte nei pazienti obesi. Infine, una riduzione in termini di applicabilità si registra anche nei pazienti con ascite. ([107], [108], [109]).

La valutazione elastosonografica può essere eseguita anche mediante tecnica ARFI (*Acoustic Radiation Force Imaging*) o SWE (*Shear Wave Elastography*). Nella metodica ARFI viene esaminata una regione di interesse (ROI) di dimensioni di 1cm x 0,5cm posizionata dall'operatore mediante l'immagine ecografica. Piccole spinte acustiche di breve durata si propagano lungo il raggio ultrasonoro principale, determinando sollecitazioni di taglio nel tessuto in esame. Queste sollecitazioni presentano modalità e intensità differenti a seconda dell'attenuazione esercitata dal tessuto. Dagli impulsi di spinta originano le onde di taglio, che si propagano perpendicolarmente al raggio ultrasonoro principale. Dei raggi di tracciamento vanno a campionare la velocità di propagazione delle onde di taglio, fornendo un risultato in metri/secondo che può essere convertito, mediante modulo di Young in kPa. La velocità di propagazione è direttamente proporzionale alla densità e

all'elasticità del tessuto in esame: maggiore è la fibrosi, maggiore è la velocità di propagazione rilevata. [110]

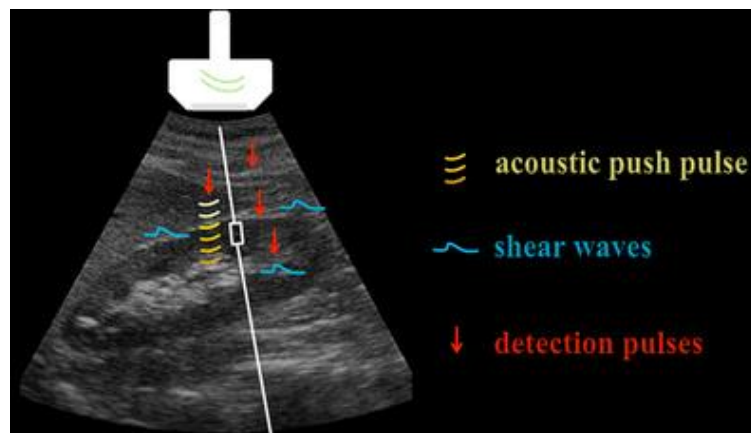


Figura 8 - Rappresentazione della metodica ARFI [110]

L'esame deve essere eseguito dopo un digiuno di almeno quattro ore. Le misurazioni devono essere effettuate sul lobo destro, nello spazio intercostale, con il paziente in posizione supina o decubito laterale sinistro, con la mano destra posizionata sopra la testa, a respiro neutro. La sonda ecografica deve essere posizionata perpendicolarmente alla capsula epatica e la ROI deve essere posizionata a 1,5-2,0 cm dalla capsula epatica per evitare artefatti da riverbero. [111]

La specificità e la sensibilità dell'ARFI è sovrapponibile a quella del Fibroscan® [112].

I cut-off di riferimento per l'interpretazione dell'ARFI epatico sono riportati in Fig.9.

<b>Table 2: Recommendation for Interpretation of Liver Stiffness Values Obtained with ARFI Techniques in Patients with Viral Hepatitis and NAFLD</b>	
Liver Stiffness Value	Recommendation
≤5 kPa (1.3 m/sec)	High probability of being normal
<9 kPa (1.7 m/sec)	In the absence of other known clinical signs, rules out cACLD. If there are known clinical signs, may need further test for confirmation
9–13 kPa (1.7–2.1 m/sec)	Suggestive of cACLD but need further test for confirmation
>13 kPa (2.1 m/sec)	Rules in cACLD
>17 kPa (2.4 m/sec)	Suggestive of CSPH

Note.—ARFI = acoustic radiation force impulse, cACLD = compensated advanced chronic liver disease, CSPH = clinically significant portal hypertension, NAFLD = non-alcoholic fatty liver disease.

Figura 9 - Interpretazione dell'ARFI [111]

## Esami di laboratorio

I pazienti con evidenza radiologica di steatosi epatica devono essere sottoposti ad esami ematochimici mirati. Una valutazione complessiva del quadro epatico e di quello metabolico richiede il dosaggio: aspartato aminotransferasi (AST), alanino aminotransferasi (ALT), gamma glutamil-transpeptidasi ( $\gamma$ GT), emocromo con formula, colesterolo totale, HDL, TG, hs-CRP, emoglobina glicata, glicemia e insulina a digiuno. Attraverso questi ultimi due esami si può valutare l'insulino resistenza calcolando l'indice HOMA-IR con la formula [113]:

$$\text{HOMA-IR} = (\text{Fasting insulin } [\mu\text{U/mL}] * (\text{Fasting glucose } [\text{mg/dL}]) / 405$$

Come indicato dalle linee guida [1], i soggetti con alterazione degli enzimi epatici devono essere inviati allo specialista, indipendentemente dalla presenza o assenza di steatosi epatica. In presenza di enzimi epatici normali e riscontro di steatosi epatica è invece consigliato l'uso di score indiretti di fibrosi. Secondo i risultati ottenuti, i pazienti a basso rischio per fibrosi avanzata possono essere sottoposti a follow-up biennale con esami ematochimici, mentre i pazienti a rischio moderato – alto vanno inviati allo specialista.

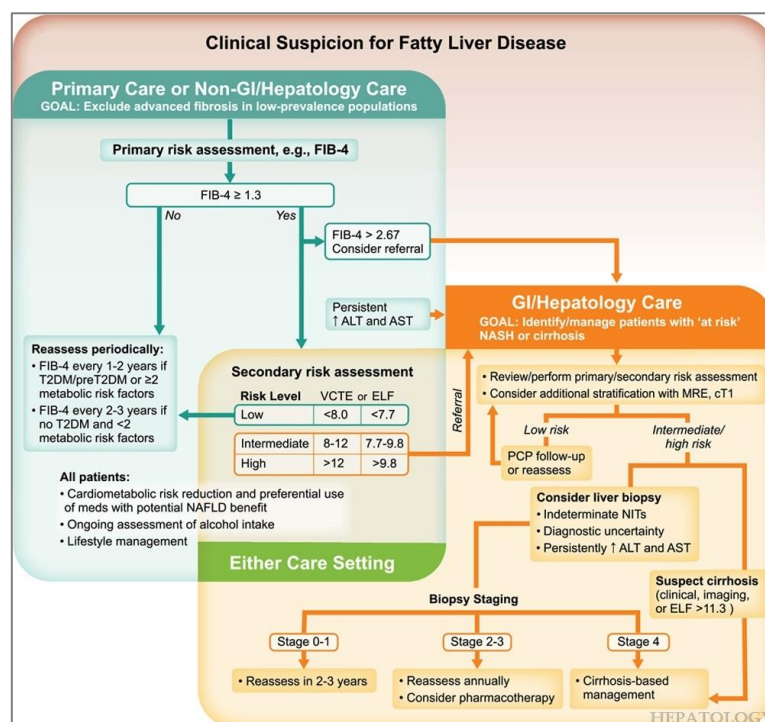


Figura 10 - Gestione del paziente con steatosi epatica secondo le linee guida AASLD [114]



## Score indiretti di steatosi e fibrosi epatica

Nel tempo, diversi score sono stati proposti per identificare i pazienti ad elevato rischio per steatosi o fibrosi epatica e che, pertanto, necessitano di un approfondimento diagnostico. Per utilizzare tali score sono sufficienti informazioni riguardanti i parametri antropometrici del paziente e gli esami ematochimici di routine; pertanto, possono essere facilmente utilizzati, negli studi epidemiologici, anche su ampie popolazioni.

Fatty Liver Index (FLI) [115]: permette di riconoscere i soggetti con elevata probabilità di avere steatosi epatica utilizzando la circonferenza vita, il BMI, i valori di trigliceridi e GGT.

Il FLI risulta suggestivo per la presenza di steatosi se  $\geq 60$ .

$$FLI = \frac{e^{0.953 * \log(\text{triglycerides [mg/dl]}) + 0.139 * BMI [kg/m^2] + 0.718 * \log(GGT [U/L]) + 0.053 * \text{waist circumference [cm]} - 15.745}}{(1 + e^{0.953 * \log(\text{triglycerides [mg/dl]}) + 0.139 * BMI [kg/m^2] + 0.718 * \log(GGT [U/L]) + 0.053 * \text{waist circumference [cm]} - 15.745})} * 100$$

Hepatic Steatosis Index (HSI) [116]: suggestivo per la presenza di steatosi se  $> 36.0$ .

$$HSI = 8 * (\text{ALT/AST ratio}) + \text{BMI [kg/m}^2] (+2, \text{ if female; } +2, \text{ if diabetes mellitus})$$

NAFLD Liver Fat Score [117]: suggestivo per la presenza di steatosi se  $> -0.64$ .

$$\text{NAFLD Liver Fat Score} = -2.89 + 1.18 * \text{metabolic syndrome (yes 1/no 0)} + 0.45 * \text{type 2 diabetes (yes 2/no 0)} + 0.15 * \text{insulin [mU/L]} + 0.04 * \text{AST [U/L]} - 0.94 * \text{AST/ALT}$$

AST-to-platelet ratio Index (APRI) ([118], [119]): studiato e validato inizialmente nei pazienti con epatite C; successivamente, si è dimostrato utilizzabile anche in pazienti con NAFLD per predire la presenza di fibrosi epatica significativa se  $> 0.7$  e di fibrosi epatica severa con cut-off 1.0 ([120], [121]).

$$APRI = ((\text{AST [U/L]} / \text{AST Upper Limit of Normal [U/L]}) / \text{Platelets [x10}^9/\text{L]}) * 100$$

Fibrosis-4 Index (Fib-4) ([122], [123], [124]): anch'esso inizialmente validato per pazienti affetti con epatite C, attualmente la sua valutazione riscopre un ruolo centrale nella gestione del follow-up dei pazienti con steatosi epatica. Per l'applicazione dello score sono necessarie informazioni riguardanti l'età e gli esami ematochimici (AST, ALT, piastrine). Valori di FIB4 <1.3 (se soggetto di età <65 anni) o <2.0 (se soggetto di età ≥65 anni) sono indicativi di assenza di fibrosi epatica avanzata. Viceversa, valori di FIB4 >2.67 (per qualsiasi età) sono suggestivi della presenza di fibrosi avanzata. I risultati intermedi sono considerati indeterminati e necessitano pertanto di ulteriori approfondimenti per definire la presenza e l'entità della fibrosi epatica.

$$\text{FIB-4 Score} = (\text{Age [year]} * \text{AST [U/L]}) / (\text{Platelets [x10}^9\text{/L]} * \sqrt{(\text{ALT [U/L])})}$$

NAFLD Fibrosis Score (NFS) ([124], [125]): utilizza 6 variabili, ossia l'età, il BMI, il rapporto AST/ALT, la conta piastrinica, la presenza di alterata glicemia a digiuno (IFG – *Impaired Fasting Glucose*) o di DM2 e l'albumina. Valori di NFS < -1.455 (in pazienti di età <65 anni) o < 0.12 (in pazienti di età ≥ 65 anni) indicano assenza di fibrosi avanzata, mentre NFS >0.675 (per qualsiasi età) è suggestivo per la presenza di fibrosi avanzata. Analogamente al FIB4, anche in questo caso i valori intermedi sono considerati indeterminati e necessitano di ulteriori approfondimenti.

$$\text{NAFLD Fibrosis Score} = -1.675 + (0.037 * \text{age [years]}) + (0.094 * \text{BMI [kg/m}^2\text{]}) + (1.13 * \text{IFG/diabetes [yes 1/ no 0]}) + (0.99 * \text{AST/ALT ratio}) - (0.013 * \text{platelet count [x10}^9\text{/L]}) - (0.66 * \text{albumin [g/dl]})$$

## **Metodi diagnostici invasivi**

La biopsia epatica è l'unica metodica che permette di porre diagnosi di NASH [102]. Trattandosi di un esame invasivo con dei rischi procedurali correlati, le linee guida europee raccomandano l'esecuzione della biopsia solo quando le metodiche non invasive suggeriscono la presenza di fibrosi epatica severa. [1]

Attraverso l'esame istologico è possibile distinguere la steatosi epatica semplice dalla NASH, analizzando diverse caratteristiche [126]:

- Steatosi: micro-, medio- o macro- vescicolare; stimata quantitativamente in percentuale. Si localizza soprattutto nella zona 3 (centrolobulare) del fegato oppure può essere periportale, azonale o diffusa;
- Danno epatocellulare: ballooning epatocitario, presenza di corpi apoptotici o di corpi di Mallory (inclusioni ialine);
- Infiammazione: locale (portale, periportale, lobulare) o estesa;
- Fibrosi: locale (perisinusoidale – più frequente nelle fasi iniziali, perivenulare, lobulare) o estesa (focale, con briglie fibrose e modificazioni dell'architettura epatica);
- Nuclei vacuolati e megamitocondri.

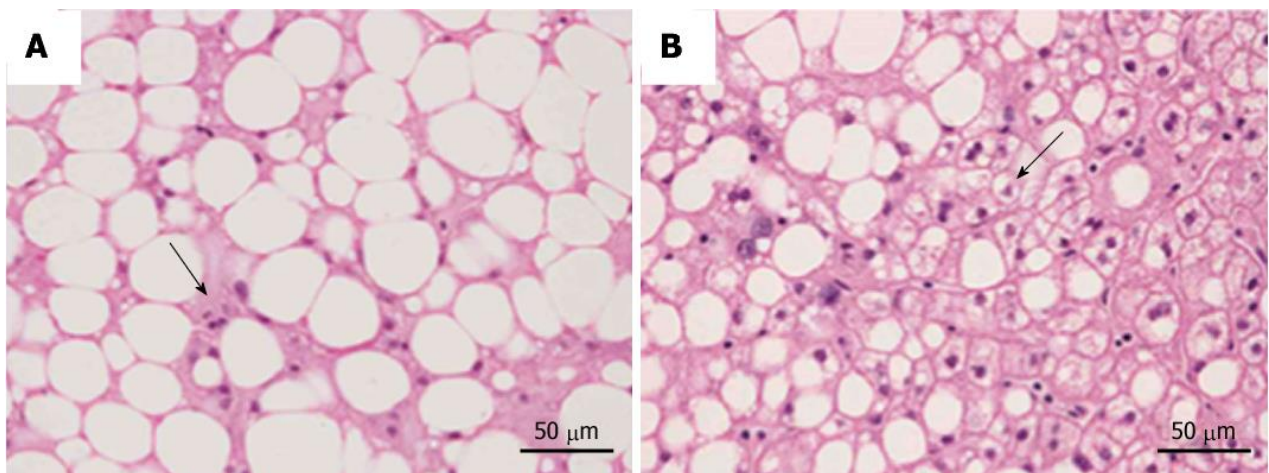


Figura 11 - Confronto tra steatosi epatica (A), caratterizzata da minimo infiltrato infiammatorio senza ballooning epatocitario, e steatoepatite (B), dove si osservano infiltrato infiammatorio lobulare e degenerazione epatocitaria [127]

Per valutare in modo standardizzato i risultati ottenuti alla biopsia epatica, la NASH Clinical Research Network Pathology Committee nel 2005 ha sviluppato e validato il NAFLD Activity Score (NAS) [128].

Il NAS è uno score semiquantitativo che valuta tre caratteristiche sul campione bioptico: la steatosi (0-3), l'infiammazione (0-3) e la degenerazione balloniforme (0-2). Ne risulta un punteggio da 0 a 8 e viene posta diagnosi di NASH in presenza di valori  $\geq 5$ , in presenza di degenerazione balloniforme. Punteggi di 3-4 sono considerati borderline, mentre punteggi  $< 3$  permettono di escludere la presenza di steatoepatite.

<b>Histological features</b>	<b>Description</b>	<b>Score</b>
Steatosis (%)	$\leq 5$	0
	5-33	1
	33-66	2
	$\geq 66$	3
Lobular inflammation	No	0
	$\leq 2$ foci	1
	2-4 foci	2
	$\geq 4$ foci	3
Hepatocellular ballooning	No	0
	Moderate ballooning	1
	Evident ballooning	2

*Figura 12 - NAFLD Activity Score (NAS)*

All'uso del NAS si associa lo staging della fibrosi [129], definita come:

- F0: assente;
- F1: lieve, distinta in 1a o 1b se interessa la zona perisinusoidale e 1c per la zona portale;
- F2: moderata, in presenza di fibrosi perisinusoidale e periportale;
- F3: avanzata, se vi sono briglie fibrose;
- F4: in presenza di cirrosi epatica.

## Comorbidity ed *outcome* epatici ed extra-epatici

### Fibrosi, cirrosi epatica e HCC

Il riscontro della steatosi epatica è frequentemente occasionale, decorrendo asintomatica fino alla comparsa della fibrosi e della cirrosi epatica. È particolarmente importante valutare la presenza e l'entità della fibrosi epatica poiché essa costituisce il principale predittore a lungo termine di outcome epatici ed extra epatici [130]. È stato infatti dimostrato che al peggiorare del grado di fibrosi epatica aumenta la mortalità generale e la mortalità per eventi epato-relati, e questo incremento si verifica già dagli stadi iniziali di malattia (F2 – fibrosi moderata – in Fig.13) ([131], [132]).

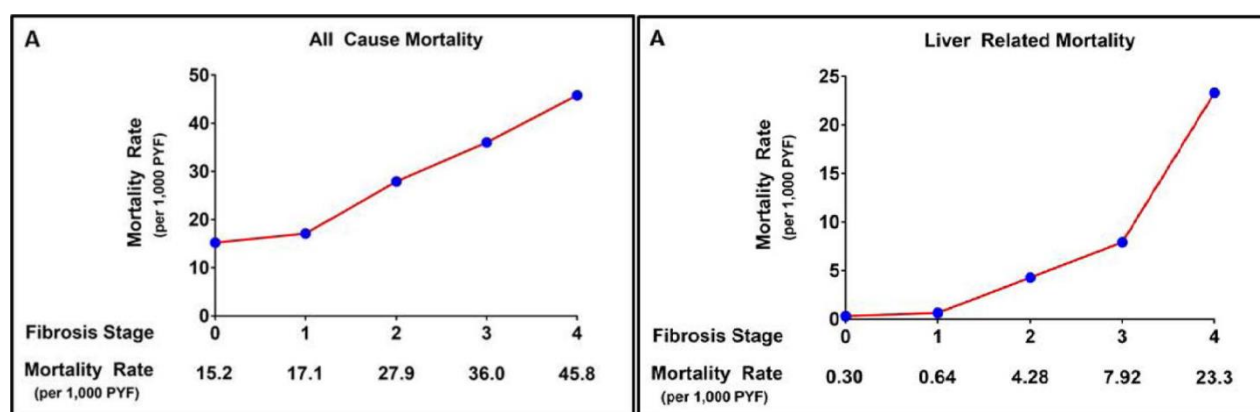


Figura 13 - Fibrosi epatica e mortalità [132]

Anche la probabilità che si verifichino eventi cardiovascolari aumenta al peggiorare del grado di fibrosi epatica: i pazienti con NAFLD presentano un rischio due volte maggiore di andare incontro ad eventi cardiovascolari, e questo rischio aumenta fino a quattro volte in presenza di fibrosi. ([133], [134])

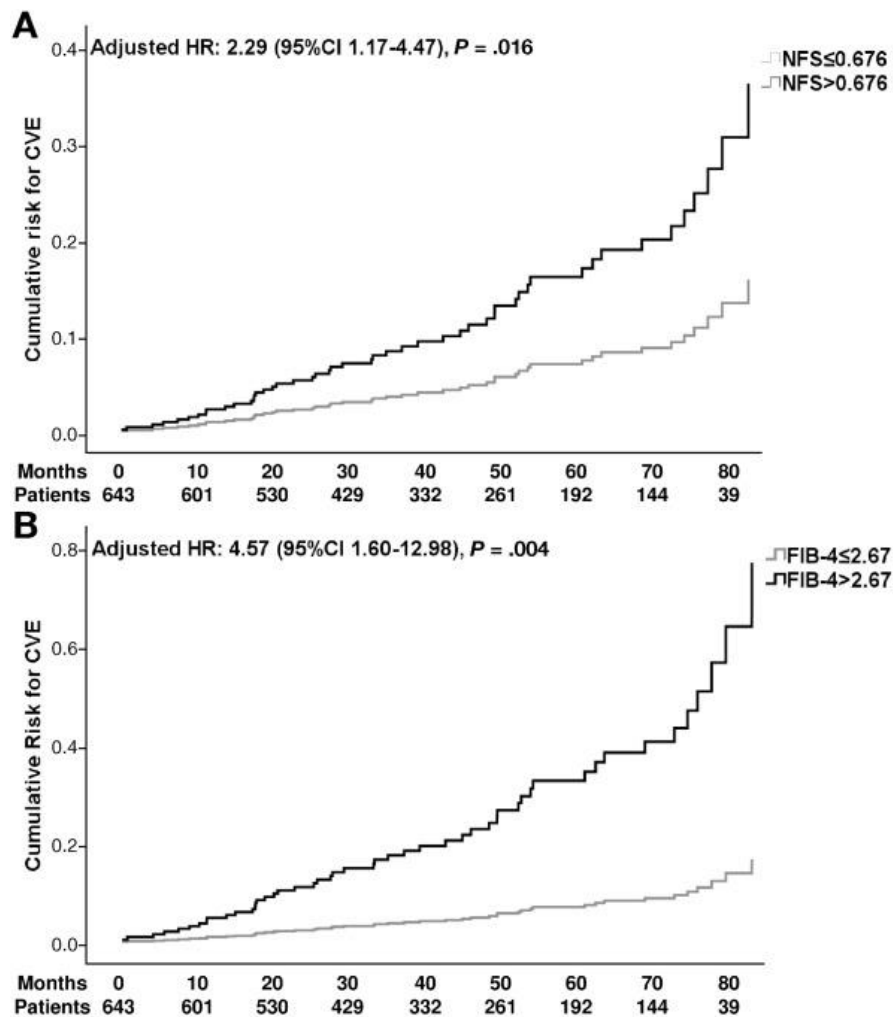


Figura 14 - Fibrosi epatica ed eventi cardiovascolari [134]

In termini di evoluzione della malattia epatica, circa il 20% di pazienti con fibrosi avanzata progredisce in cirrosi in circa 2 anni e, in un arco temporale simile, circa il 20% dei pazienti con cirrosi compensata progredisce in malattia scompensata [135]. Il numero di cirrosi NASH-relate è in progressivo aumento e parimenti sono in progressivo aumento i trapianti dovuti a questa condizione [136].

I pazienti con cirrosi NASH-relata, al pari di quelli con cirrosi da altra causa eziologica, presentano un maggior rischio di insorgenza di epatocarcinoma (HCC). Per questo motivo i pazienti devono essere sottoposti ad un programma di sorveglianza attiva per l'identificazione in fase precoce dell'HCC, da attuare attraverso l'ecografia del fegato e



La relazione tra malattia epatica e metabolica è complessa ed è difficile identificare il percorso che porta alla comparsa degli eventi cardiovascolari.

Se è vero che gli eventi CV si sviluppano per via dei fattori di rischio tradizionali presenti negli individui affetti da NAFLD/MASLD, bisogna anche tener conto che l'infiammazione sistemica di basso grado, le alterazioni del metabolismo lipidico specifiche e lo stress ossidativo possono a loro volta favorire la disfunzione endoteliale ([143], [144]).

I pazienti con NAFLD presentano un profilo lipidico definito "aterogeno", caratterizzato dalla riduzione delle HDL e dall'aumento di TG, LDL e VLDL [145], che favorisce la comparsa e la progressione dell'aterosclerosi [146]. L'aterosclerosi è una malattia infiammatoria cronica caratterizzata dalla formazione di placche neo-intimali nelle grandi arterie, dovuta all'accumulo di lipoproteine a bassa densità ossidate (oxLDL) [147]. La NAFLD si associa così all'aumento dello spessore medio intimale (IMT) delle carotidi, alla presenza di calcificazioni coronarie e alla disfunzioni dell'endotelio vascolare ([148], [149]), che a loro volta predispongono all'insorgenza di eventi cardiovascolari maggiori quali l'infarto del miocardio e l'ictus.

Una valutazione rapida e a basso costo dell'aterosclerosi subclinica può essere effettuata attraverso l'Ankle-Brachial Index (ABI). Si ottiene facendo il rapporto tra la pressione arteriosa sistolica misurata alla caviglia e quella misurata all'arteria brachiale. L'ABI costituisce un marker prognostico della compromissione vascolare e del rischio di sviluppare eventi cardiovascolari, anche in assenza di sintomi di arteriopatía periferica. [150]

<u>ABI Value</u>	<u>Interpretation</u>	<u>Recommendation</u>
<b>Greater than 1.4</b>	<b>Calcification/Vessel Hardening</b>	<b>Refer to vascular specialist</b>
1.0-1.4	Normal	None
0.9-1.0	Acceptable	None
0.8-0.9	Some Arterial Disease	Treat risk factors
<b>0.5-0.8</b>	<b>Moderate Arterial Disease</b>	<b>Refer to vascular specialist</b>
<b>Less than 0.5</b>	<b>Severe Arterial Disease</b>	<b>Refer to vascular specialist</b>

Figura 16 - Interpretazione dell'ABI



Inoltre, per quanto riguarda le malattie cardiache non-aterosclerotiche, la NAFLD si associa inoltre alla comparsa di fibrillazione atriale (FA) ([151], [152]), alla sclerosi valvolare aortica [153] e alla disfunzione diastolica del ventricolo sinistro [154], come riassunto in Fig.17.

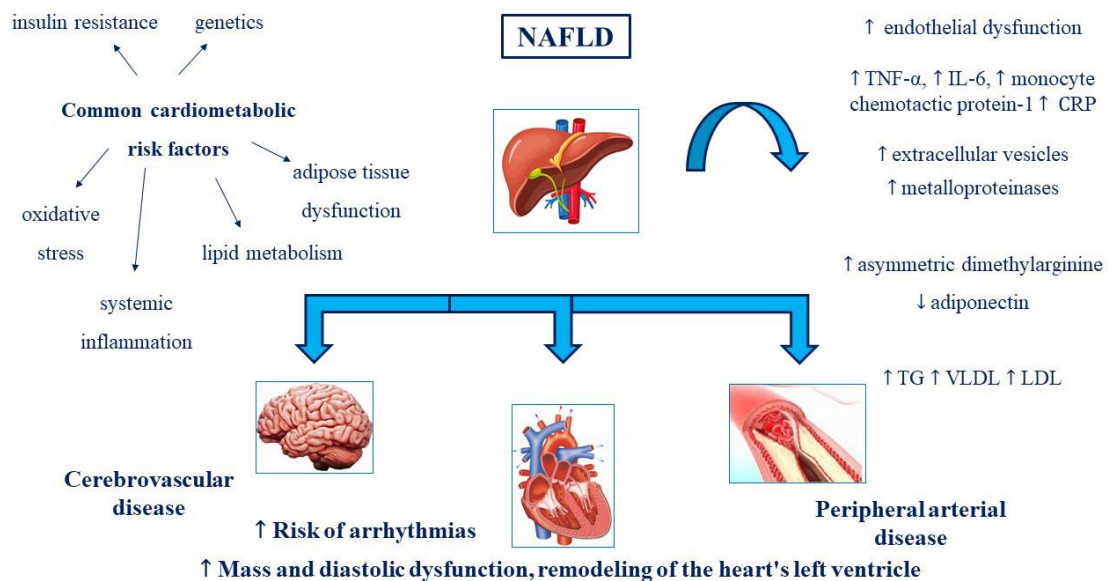


Figura 17 - Associazione tra NAFLD e patologie cardiovascolari [155]

## Malattia renale cronica

Una recente metanalisi ha ribadito l'associazione statisticamente significativa tra la NAFLD e la malattia renale cronica (CKD) con eGFR <60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> [156]. La compromissione della funzionalità renale si associa alla gravità della malattia epatica e alla presenza di diabete [157]. Il collegamento tra queste due condizioni sembrerebbe risiedere proprio nelle caratteristiche dismetaboliche dei pazienti con NAFLD che possono potenzialmente determinare od aggravare il danno renale ([158], [159]).

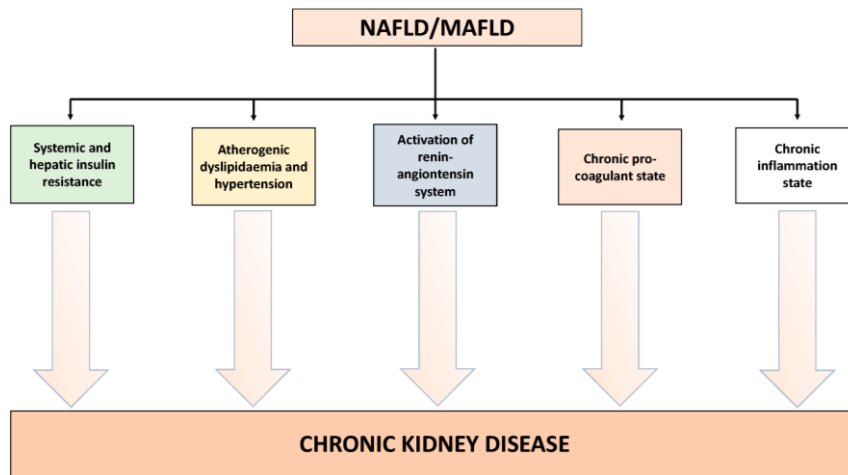


Figura 18 - Associazione tra NAFLD/MAFLD e CKD [160]

## Neoplasie

Le neoplasie costituiscono la seconda causa di morte nei pazienti con NAFLD [161]. Dopo l'epatocarcinoma, già descritto, i tumori più frequenti sono il cancro del colon-retto negli uomini e quello della mammella nelle donne. Possono presentarsi anche altri tumori gastrointestinali (esofago, stomaco, pancreas), polmonari, ginecologici e del sistema urinario, indipendentemente da altri fattori di rischio. ([162], [163], [164]). Inoltre, la NAFLD si associa all' aumentato del rischio di colangiocarcinoma [165].

È stato ipotizzato che il principale meccanismo di promozione delle neoplasie sia lo stato infiammatorio cronico, intraepatico e sistemico, in particolare per quanto riguarda i tumori del tratto gastrointestinale [166]. L'eccesso adiposo, l'IR e le adipochine circolanti costituiscono alcuni dei fattori favorenti la comparsa di carcinoma colon-rettale ([167], [168]). È interessante evidenziare che la presenza della NAFLD sembrerebbe determinare una aumentata incidenza di tumori indipendentemente dall'obesità [169].

L'alterazione del microbiota intestinale che si verifica nei pazienti con NAFLD sembrerebbe essere coinvolto nella patogenesi dei tumori correlati ([170], [171]), ma ulteriori approfondimenti dovranno essere condotti a riguardo.

## Terapia

Ad oggi non vi sono terapie efficaci ed approvate per il trattamento della MASLD. Per questo motivo, la gestione di questi pazienti si concentra sulle modifiche dello stile di vita ed il trattamento delle comorbidità metaboliche.

### **Lifestyle Therapeutic Change e chirurgia bariatrica**

L'evidenza clinica supporta fortemente il ruolo della modifica dello stile di vita come terapia primaria per la gestione di NAFLD e NASH.

Le linee guida EASL-EASD-EASO del 2016 [1] raccomandano una perdita di peso dal 7% al 10% affinché si osservi un miglioramento degli enzimi e dell'istologia epatica, da ottenere preferibilmente applicando un pattern dietetico di aderenza alla dieta mediterranea e mediante l'esclusione dalla dieta di alimenti arricchiti in fruttosio. In questo elaborato è stato già descritto il ruolo della dieta e del fruttosio sulla malattia epatica. In particolare, la perdita di peso si associa al miglioramento delle ALT, della steatosi epatica e del NAFLD Activity Score al controllo bioptico; tuttavia, non vi sono evidenze specifiche sulla riduzione della fibrosi epatica [172]. Numerose evidenze suggeriscono che le diete a basso contenuto di carboidrati possano migliorare l'insulino resistenza [173] e ridurre il rischio cardiovascolare [174]. Tuttavia, ulteriori studi sono necessari per confermare tali evidenze anche nei pazienti affetti da NAFLD/MASLD.

Le linee guida raccomandano inoltre l'esecuzione di attività fisica aerobica ad intensità medio-moderata per 150-200 minuti a settimana. L'attività fisica determina il miglioramento della malattia epatica [175] e la riduzione dei trigliceridi intraepatici, anche in assenza di perdita di peso o di variazione della percentuale di grasso corporeo ([176], [177]), il miglioramento dell'insulino resistenza [178] e la riduzione della mortalità per tutte le cause [179].

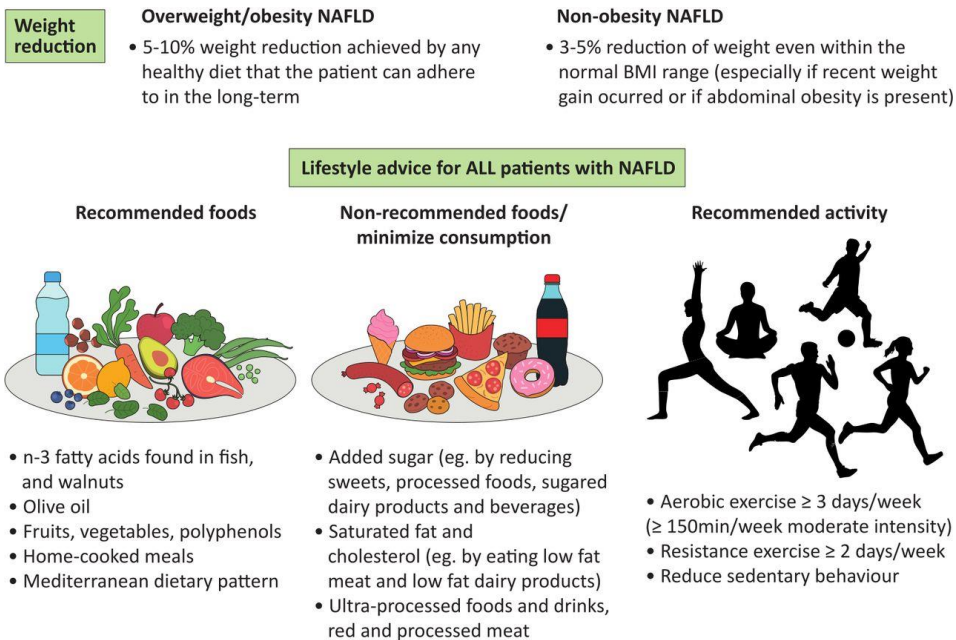


Figura 19 - Lifestyle Therapeutic Change per il trattamento della NAFLD [180]

Nei pazienti non complianti con il cambiamento dello stile di vita, sia le linee guida EASL che le linee guida AASLD considerano la chirurgia bariatrica una possibile opzione terapeutica per la riduzione del peso corporeo. ([1], [114])

Possono essere eseguite sia procedure endoscopiche (es. Intragastic Balloon o Endoscopic Sleeve Gastroplasty) che chirurgiche (es. Gastric Bypass o Sleeve Gastrectomy). Gli studi condotti sui pazienti affetti da NAFLD e sottoposti a procedure bariatriche mostrano, oltre alla perdita di peso, il miglioramento delle transaminasi, del NAFLD activity score, della steatosi e della fibrosi epatica. ([181], [182], [183], [184])

## Pioglitazone e Vitamina E

Gli unici due farmaci che le linee guida indicano efficaci nella NASH, seppur in assenza di una chiara indicazioni (livello di evidenza B2), sono il pioglitazone e la vitamina E.

L'uso della vitamina E è stato studiato nei pazienti con NAFLD per la sua efficacia antiossidante.

Il pioglitazone fa parte della famiglia dei tiazolidindioni, farmaci capaci di legare il recettore nucleare PPAR- $\gamma$  espresso dagli adipociti, dagli epatociti e dai miociti. Attraverso questo legame agisce sul metabolismo lipidico e migliora l'insulino sensibilità [185]. Inoltre, nei pazienti con DM2 riduce la mortalità e il rischio di infarto o stroke ([186], [187]).

Il principale studio che ha indagato l'efficacia di questi due farmaci è lo studio PIVENS (*Pioglitazone versus Vitamin E versus Placebo for Treatment of Nondiabetic Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis*) [188]. Nei pazienti sottoposti a terapia con vitamina E si è osservato un miglioramento significativo della steatosi, della steatoepatite e dei livelli sierici di ALT e AST. Anche il pioglitazone ha prodotto effetti benefici sull'istologia epatica, in particolare riducendo la steatosi e l'infiammazione lobulare. Tuttavia, entrambi i farmaci non hanno mostrato efficacia sulla fibrosi.

Risultati simili sono stati ottenuti da studi più recenti eseguiti per valutare l'efficacia sulla NAFLD della somministrazione del pioglitazone nei pazienti diabetici ([189], [190]) e della vitamina E [191].

Più recentemente, uno studio condotto su pazienti affetti da DM2 e NASH ha mostrato che l'utilizzo contemporaneo di entrambi i farmaci determina risultati maggiori per il miglioramento del NAS e dell'istologia, ma è stata confermata l'assenza di efficacia sulla fibrosi [192]. Tuttavia, bisogna tener conto del fatto che l'utilizzo del pioglitazone è gravato dall'aumento del peso corporeo, effetto collaterale che potrebbe compromettere l'efficacia sulla NAFLD nel trattamento a lungo termine ([193], [194]).

Anche la vitamina E deve essere utilizzata con cautela, per via degli effetti collaterali osservati. Tra questi l'incremento della mortalità [195], il rischio di stroke emorragico [196] e di cancro della prostata [197] osservati per elevati dosaggi (simili a quelli indicati per il trattamento della NASH).

## **Trattamento delle comorbidità metaboliche**

### **Metformina**

Farmaco insulino sensibilizzante della famiglia delle biguanidi, di prima linea nel trattamento del DM2. La sua azione principale è la riduzione della gluconeogenesi in conseguenza della diminuzione della trasformazione mitocondriale del lattato in piruvato [198].

I dati attualmente disponibili mostrano che la metformina non determina effetti sulla NAFLD o sulla NASH ([199], [200]), tuttavia il suo uso può essere di aiuto per ridurre l'insulino resistenza e favorire la perdita di peso [201]. Inoltre, l'uso della metformina sembra diminuire il rischio di comparsa di HCC nei pazienti affetti da DM2 ([202], [203]).

### **Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analoghi**

Il glucagon-like peptide-1 (GLP-1) è un ormone prodotto dall'intestino e rilasciato in risposta ai pasti, capace di stimolare la secrezione di insulina, inibire il rilascio di glucagone e mantenere l'omeostasi glucidica. Gli analoghi del GLP-1 sono farmaci ipoglicemizzanti capaci di resistere maggiormente agli enzimi di degradazione, migliorando così il controllo glicemico. Determinano inoltre la riduzione dell'infiammazione sistemica, la riduzione dell'appetito e rallentano lo svuotamento gastrico, con conseguente perdita di peso. [204]

Lo studio LEAN (*Liraglutide Efficacy and Action In Non-Alcoholic Steatohepatitis*) [205] ha dimostrato che la liraglutide è capace di migliorare la steatosi ed il ballooning, ma non l'infiammazione né la fibrosi epatica. La liraglutide inoltre determina la riduzione del BMI e dei livelli sierici dei trigliceridi [206]. Il miglioramento della steatosi, ma non della fibrosi epatica, si è osservato anche utilizzando la semaglutide [207] e la dulaglutide [208]. Per questi motivi l'utilizzo di questi farmaci è considerato efficace solo nei pazienti con DM2 con forme iniziali di NAFLD.

### **Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inibitori**

Il dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) è un enzima responsabile della degradazione delle incretine come il GLP-1. I farmaci inibitori del DPP-4 agiscono andando ad inibire questa attività enzimatica, cosicché l'azione delle incretine possa essere prolungata nel tempo.

La maggior parte degli studi presenti in letteratura sull'uso di questi farmaci nella NAFLD è effettuato su modelli murini che mostrano la riduzione dell'infiammazione e della steatosi epatica ([209], [210]). Gli studi condotti in vivo con sitagliptin hanno avuto invece dei risultati deludenti ([211], [212]) e per questo, al momento, questa classe di farmaci non è indicata come benefica sulla NAFLD nei pazienti con DM2.

### **Sodium glucose co-transporter 2 (SGLT-2) inibitori**

Il cotrasportatore sodio-glucosio (SGLT-2) è presente sul tubulo contorto prossimale del rene e riassume il glucosio durante la formazione delle urine. Gli inibitori di SGLT-2, chiamati anche "gliflozine", riducono il riassorbimento del glucosio da parte del rene e determinano così una maggiore eliminazione di glucosio con le urine.

L'utilizzo di questi farmaci nei pazienti con DM2 e NAFLD determina la perdita di peso, il miglioramento della steatosi e dei livelli sierici di AST, ALT e  $\gamma$ GT [213]. Questi effetti sono degli effetti di classe e si verificano sia con il dapagliflozin ([214], [215]) che con il canagliflozin ([216], [217]) e l'empagliflozin ([218], [219]).

Un primo studio sull'uso di empagliflozin in pazienti con NAFLD non diabetici ha mostrato un miglioramento dei livelli sierici di AST e ALT, della steatosi e della fibrosi epatica [220]. Ulteriori studi dovranno essere condotti a riguardo per capire se questa classe di farmaci potrà essere usata per il trattamento specifico della NAFLD.

### **Sulfaniluree e insulina**

L'insulina esogena e i farmaci che stimolano la secrezione di insulina dalle cellule  $\beta$ -pancreatiche, come le sulfaniluree, sono direttamente correlati alla presenza di fibrosi epatica [221] e si associano ad un aumentato rischio di HCC ([222], [223]). Inoltre, l'uso dell'insulina [224] e, in modo minore, delle sulfaniluree [225] induce un aumento di peso che potrebbe peggiorare la NAFLD.

Per questi motivi, insuline e sulfaniluree non sono considerati i farmaci ideali per il trattamento del DM2 nei pazienti con NAFLD.

### **Statine**

Le statine sono farmaci che inibiscono la sintesi del colesterolo endogeno agendo sull'enzima HMG-CoA reduttasi e sono farmaci di prima linea per il trattamento delle dislipidemie, anche grazie alla loro capacità di ridurre il rischio cardiovascolare in questi pazienti ([226], [227]).

Nei soggetti con NAFLD si osserva frequentemente il fenomeno della "*under-prescription*" delle statine come conseguenza della diffusa credenza riguardo la loro epatotossicità [228]. Per smentire questa errata convinzione, sono condotti molti studi. Solamente il 3% dei pazienti che assume statine va incontro ad un rialzo delle transaminasi dovuto al farmaco, ed comunque ancora più raro che questo fenomeno progredisca in un danno clinicamente significativo [229]. Al contrario, nella maggior parte dei casi, l'uso delle statine si associa al miglioramento dei livelli sierici di AST, ALT e GGT [230].

Attualmente i dati presenti in letteratura riguardo gli effetti delle statine sull'istologia epatica sono limitati e per questo le linee guida non raccomandano il loro utilizzo per il trattamento della NAFLD/NASH. Tuttavia, il loro utilizzo è fortemente consigliato nei pazienti con epatopatia e dislipidemia proprio per il loro effetto protettivo cardiovascolare [231].



### **Omega3**

Gli omega-3 sono acidi grassi polinsaturi essenziali (PUFAs – *Polyunsaturated Fatty Acids*) derivanti dall'acido  $\alpha$ -linoleico, capaci di modulare il metabolismo lipidico; inoltre hanno anche una azione antinfiammatoria e promuovono l'insulino sensibilità [232].

Per via del loro meccanismo di azione, è stata più volte valutata la possibilità di utilizzare una supplementazione di acido docosaesaenoico (*docosahaexenoic acid* – DHA) e acido eicosapentaenoico (*eicosapentaenoic acid* – EPA) per il trattamento della NAFLD. Ne è emerso che il trattamento con omega-3 determina la riduzione dei fenomeni di stress ossidativo e il miglioramento del metabolismo lipidico ([233], [234]), ma non produce effetti sui livelli sierici di ALT né sulla stiffness epatica [235].

I risultati controversi [236] non permettono di raccomandare questa classe di farmaci per il trattamento della steatoepatite; tuttavia, possono essere un'opzione terapeutica per ridurre i livelli di lipidi circolanti nelle fasi iniziali di malattia.

### **Antipertensivi**

Il trattamento dell'ipertensione, frequentemente associata alla NAFLD, deve avvenire secondo quanto riportato nelle rispettive linee guida [237] affinché si ottenga una riduzione del rischio cardiovascolare. Attualmente non vi sono indicazioni sulla scelta di particolari classi di farmaci da preferire nei pazienti con NAFLD/MASLD.

## Studio Sperimentale

### Razionale e obiettivi dello studio

La fibrosi epatica rappresenta la caratteristica che maggiormente si associa alla prognosi cardiovascolare ed epato-relata dei pazienti affetti da NAFLD.

L'utilizzo di score indiretti di fibrosi, come il Fib4, oltre ad essere un valido strumento per il follow-up clinico dei pazienti, permette di valutare su ampie casistiche, senza ricorrere a metodiche invasive, la presenza di fibrosi epatica.

Precedenti studi, pubblicati dal nostro gruppo, hanno evidenziato una associazione tra la presenza di steatosi epatica e la riduzione di attività della LAL.

Nel 2015, è stato evidenziato che nei pazienti con NAFLD era presente una ridotta attività della LAL rispetto ai soggetti sani [238], con valori di 0.78 [0.61-1.01] nmol/spot/h vs 1.15 [0.94-1.72] nmol/spot/h,  $p < 0.001$ . Una riduzione ancor più marcata era stata osservata nei pazienti con NASH istologica (0.67 [0.51-0.77] nmol/spot/h,  $p < 0.001$  vs. soggetti sani;  $p < 0.001$  tra i gruppi). Inoltre, i pazienti con NAFLD che presentavano attività enzimatica al di sotto della mediana avevano valori più elevati di colesterolo totale ( $p < 0.05$ ), colesterolo LDL ( $p < 0.05$ ), e di enzimi epatici (ALT,  $p < 0.001$ ; AST,  $p < 0.01$ ; GGT,  $p < 0.01$ ).

Questo risultato è stato successivamente confermato da uno studio pubblicato nel 2019, nel quale si è osservato che l'attività della LAL decresce progressivamente con la severità della NAFLD, raggiungendo i valori più bassi nella cirrosi criptogenetica ( $p < 0.001$ ). Nello specifico, l'attività della LAL risultava ridotta nel 10% dei soggetti con NAFL, nel 20% con NASH e nel 50% dei soggetti con cirrosi criptogenetica. [239]

Dall'insieme di queste evidenze è nata l'ipotesi che una riduzione ambientale dell'attività della LAL (in nessuno di questi studi è stata evidenziata una riduzione di attività della LAL compatibile con forme genetiche di LAL-D) potesse rappresentare un marker di severità nei pazienti con NAFLD [240].

Alla luce di quanto esposto e della introduzione della nuova definizione di MASLD, il presente studio si pone come obiettivi di:

- Valutare l'attività della LAL in un campione di pazienti affetti da MASLD;
- Correlare l'attività della LAL con la fibrosi epatica, definita tramite lo score FIB4;
- Valutare l'associazione tra il deficit dell'attività enzimatica LAL e l'evoluzione nel tempo della fibrosi epatica.

## Metodi

Lo studio è stato condotto nel contesto dello studio PLINIO (*Progression of Liver Damage and Cardiometabolic Disorders in Non-alcoholic Fatty Liver disease: an Observational Cohort study*. ClinicalTrials.gov. Id. NCT04036357) che al momento consta di 1154 soggetti consecutivi arruolati presso la UOSD Interdipartimentale Degenza Medica a Ciclo breve del Policlinico Umberto I di Roma.

È stata raccolta l'anamnesi, sono state effettuate le misure antropometriche (peso, altezza, circonferenza vita) ed eseguito l'esame obiettivo. Nel corso della visita di arruolamento, sono state registrate le informazioni riguardanti le abitudini di vita, la storia di eventi cardiovascolari, la farmacoterapia. È stata valutata la presenza di ipertensione, diabete, dislipidemia e sindrome metabolica in accordo con le linee guida internazionali ([237], [241], [242]).

Sono stati eseguiti dosaggi biochimici di routine e registrati i risultati, tra i quali AST, ALT, GGT, colesterolo totale, HDL, trigliceridi, glicemia e insulinemia a digiuno, emoglobina glicata, albumina, creatinina, emocromo.

È stata valutata la presenza di insulino-resistenza mediante il calcolo dell'HOMA-IR (*Homeostasis Model Of Insulin Resistance*) mediante la seguente formula [113]:

$$\text{HOMA-IR} = (\text{Fasting insulin } [\mu\text{U/mL}]) * (\text{Fasting glucose } [\text{mg/dL}]) / 405$$

È stato calcolato il Fib4 utilizzando la seguente formula:

$$\text{FIB-4 Score} = (\text{Age [year]} * \text{AST [U/L]}) / (\text{Platelets [x10}^9\text{/L]} * \sqrt{(\text{ALT [U/L]})})$$

Fib4 <1.3 (se soggetto di età <65 anni) o <2.0 (se soggetto di età ≥65 anni) sono stati considerati come indicativi dell'assenza di fibrosi avanzata (≤ F2). Valori di FIB4 >2.67 sono stati considerati indicativi di fibrosi avanzata (F3-F4) [124].

La presenza di steatosi epatica è stata definita all'esame ecografico mediante i criteri ecografici di Hamaguchi (come descritti a pag.24). L'ecografia del fegato è stata effettuata da un singolo operatore mediante un ecografo Siemens Acuson Juniper equipaggiato con sonda convex 3,5 MHz.

Sono stati considerati motivo di esclusione:

- La presenza di epatiti virali B e C, valutate con negatività per HBsAg e HCV-Ab, o di altre patologie epatiche di qualsiasi natura;
- L'uso di farmaci con potere steatogeno noto (es. amiodarone);
- L'abuso alcolico, valutato mediante il test di screening AUDIT-C (*Alcohol Use Disorders Identification Test-Consumption*) [243]. Il test è stato considerato negativo se risultato <4 punti per gli uomini e <3 punti per le donne.

					SCORE
<b>How often do you have a drink containing alcohol?</b>					
Never (0 points)	Monthly or less (1 point)	Two to four times per month (2 points)	Two to three times per week (3 points)	Four or more times per week (4 points)	
<b>How many alcoholic drinks do you have on a typical day where you are drinking?</b>					
1-2 (0 points)	3-4 (1 point)	5-6 (2 points)	7-9 (3 points)	10 or more (4 points)	
<b>How often do you have 6 or more alcoholic drinks on a single occasion?</b>					
Never (0 points)	Less than monthly (1 point)	Monthly (2 points)	Weekly (3 points)	Daily or almost daily (4 points)	
<b>TOTAL SCORE (a sum of the three questions, with scores ranging from 0-12 points)</b>					
Non-drinkers (0 points)		Drinkers (1-3 points for females, 1-4 points for males)		At risk drinkers (≥4 for females, ≥5 for males)	

Figura 20 - AUDIT-C

Applicando i criteri di MASLD, nella popolazione PLINIO sono stati indentificati 847 casi e 307 controlli.

I pazienti con diagnosi di MASLD sono stati sottoposti a follow-up telefonici semestrali e visite di controllo annuali.

Nel corso del follow-up sono stati raccolti dati riguardanti i markers di progressione del danno epatico ed è stato ripetuto il calcolo del Fib4.

La progressione della fibrosi è stata valutata come la variazione del Fib4 da negativo ( $<1.3$  se paziente di età  $<65$  anni o  $<2.0$  se età  $\geq 65$  anni) a indeterminato o positivo. L'insorgenza di fibrosi avanzata è stata valutata come la variazione del Fib4 da  $\leq 2.67$  a  $>2.67$

Sono stati esclusi dall'analisi i soggetti con un follow-up di durata inferiore a 6 mesi e quelli che non disponevano del valore di Fib4 al baseline e/o al follow-up, ottenendo dati di follow-up completi in 423 pazienti MASLD. Tra questi pazienti, 272 in era stato effettuato il dosaggio dell'attività enzimatica della LAL all'arruolamento (in Fig.21 è riportato l'intero processo di selezione dei pazienti inclusi nell'analisi).

L'attività della LAL è stata misurata attraverso un test su sangue essiccato (DBS – Dried Blood Spot) raccolto su appositi cartoncini (Whatman 903 Protein Saver Card). Il campione è stato raccolto da sangue intero venoso in EDTA (acido etilendiamminotetraacetico). Una goccia di sangue è stata applicata su ciascuno dei cinque cerchi presenti sull'apposito cartoncino. Il campione è stato lasciato asciugare per una notte a temperatura ambiente, dopodiché riposto in una busta di plastica sigillata con essiccante. Il campione è stato conservato a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino alla sua analisi. Sul campione è stata misurata l'attività lipasica totale e quella in presenza di LALISTAT2, inibitore specifico dell'enzima LAL. Il risultato dell'esame è espresso in nmol/spot/h ed è stato considerato normale se superiore a 0.8 nmol/spot/h. [244]

Il dosaggio su DBS è stato effettuato presso l'Ospedale Bambino Gesù di Roma. Il tecnico che ha eseguito il dosaggio era in cieco rispetto alle caratteristiche dei pazienti.

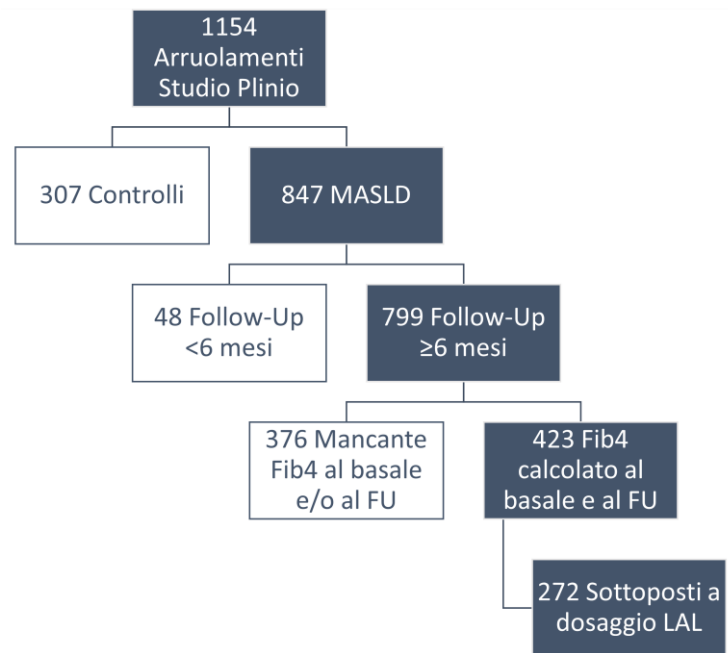


Figura 21 - Flow chart: arruolamento allo studio sperimentale

Il protocollo dello studio è stato approvato dal Comitato Etico locale della Sapienza, ed è stato condotto nel rispetto dei principi della dichiarazione di Helsinki. Tutti i pazienti hanno sottoscritto il consenso informato.

I dati rappresentativi delle frequenze sono stati espressi in percentuale, le variabili continue normali in media  $\pm$  deviazione standard, e quelle non-normali in mediana e range interquartile. Le differenze tra le percentuali sono state valutate con il test del Chi-Quadro. Le significatività sono state calcolate con il t di student, il test ANOVA, il “Mann-Withney” ed il “Kruskal-Wallis” quando opportuno. La correlazione tra il Fib4 al baseline e l’attività della LAL è stata valutata mediante l’analisi di correlazione di Spearman. L’analisi univariata tempo dipendente per la comparsa di progressione della fibrosi o di fibrosi avanzata di neodiagnosi nel è stata condotta mediante l’analisi di sopravvivenza di Kaplan-Meier, utilizzando come variabile indipendente i terzili di LAL (I vs. II-III terzile). È stata infine condotta un’analisi di regressione di Cox multivariata, per valutare il ruolo di diversi predittori di progressione sulla fibrosi epatica (età, sesso, classe di Fib4 al basale, BMI, diabete, I terzile di LAL). Per l’elaborazione e l’analisi statistica dei dati è stata utilizzata la versione 28 del software SPSS (*Statistical Package for Social Science*) della IBM.

## Risultati

Nello studio sono stati arruolati 272 pazienti per una durata mediana di 70.5 [43.8-112.2] mesi, equivalenti a 1720 pazienti/anno. L'età media era di  $55.6 \pm 10.4$  anni e il 36.4% dei pazienti erano donne.

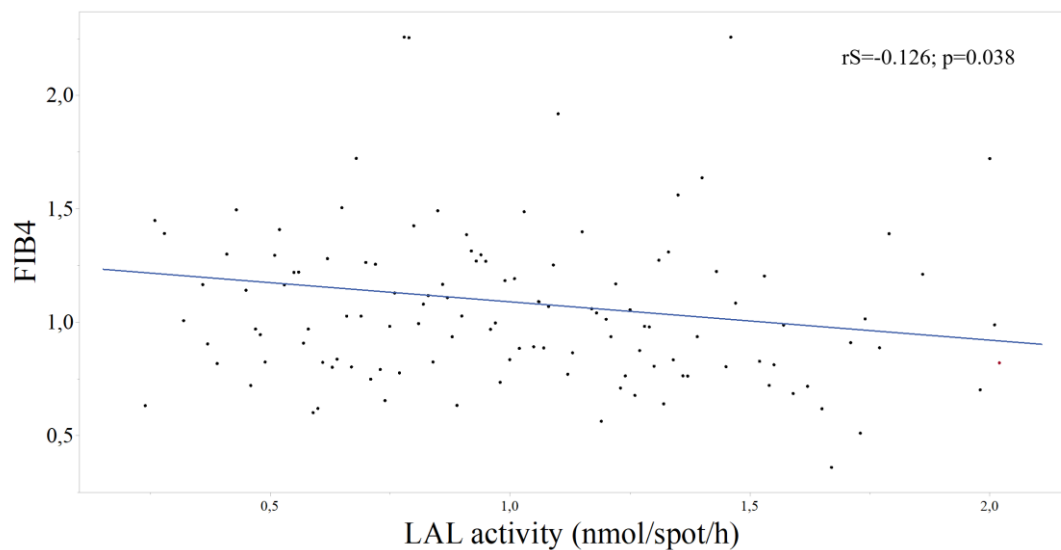
In tabella 1 sono riportate le caratteristiche della popolazione, in accordo al Fib-4 basale.

Differenze tra i gruppi sono state registrate in termini di età ( $p=0.004$ ), creatinina sierica ( $p=0.046$ ) e aminotransferasi (AST  $p < 0.001$ ; ALT  $p=0.028$ ; GGT  $p=0.007$ ). Non si sono rilevate differenze significative riguardo all'assetto lipidico, il BMI, la presenza di diabete e la prevalenza di sindrome metabolica.

	<b>Fib4 basale negativo</b> [<1.3 se <65aa; <2 se ≥ 65aa] (n = 217)	<b>Fib4 basale indeterminato</b> [1.3-2.67 se <65aa; 2.0-2.67 se ≥ 65aa] (n = 50)	<b>Fib4 basale positivo</b> [>2.67] (n = 5)	<b>p tra i gruppi</b>	<b>p 1 vs 3</b>
<b>Età (anni)</b>	54.6 ± 10.6	58.8 ± 7.8	65.4 ± 11.8	0.004	0.061
<b>Circonferenza vita (cm)</b>	106.5 ± 10.8	109.5 ± 13.4	109.8 ± 15.3	0.212	1.000
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	30.3 ± 4.5	30.9 ± 4.3	29.5 ± 3.8	0.664	1.000
<b>HOMA-IR</b>	3.5 [2.7-5.7]	4.0 [2.5-6.3]	2.6 [1.7-8.6]	0.771	0.538
<b>Colesterolo totale (mg/dl)</b>	197.7 ± 38.3	189.2 ± 43.4	188.8 ± 34.1	0.358	1.000
<b>LDL (mg/dl)</b>	119.5 ± 33.8	111.7 ± 37.1	197.6 ± 35.1	0.294	1.000
<b>Trigliceridi (mg/dl)</b>	138.0 [103.5-180.0]	136.5 [103.0-180.0]	218.0 [122.0-253.0]	0.357	0.148
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.1	0.046	0.219
<b>GGT (U/L)</b>	26.0 [17.0-40.0]	36.5 [22.8-77.3]	30.0 [24.5-44.0]	0.007	0.434
<b>AST (U/L)</b>	21.0 [17.5-27.0]	29.0 [21.8-40.8]	44.0 [38.5-83.5]	<0.001	<0.001
<b>ALT (U/L)</b>	28.0 [20.0-43.5]	39.5 [24.0-55.3]	32.0 [24.5-77]	0.028	0.367
<b>Albumina (g/dl)</b>	4.4 ± 0.3	4.4 ± 0.3	4.4 ± 0.2	0.885	1.000
<b>LAL activity (nmol/spot/h)</b>	0.9 [0.7-1.2]	0.8 [0.6-1.0]	0.8 [0.7-0.9]	0.066	0.367
<b>Sesso femminile (%)</b>	39.2	28.0	0.0	0.078	0.075
<b>Diabete (%)</b>	30.9	32.0	40.0	0.902	0.663
<b>Statine (%)</b>	37.3	60.0	60.0	0.010	0.301
<b>Sindrome metabolica (%)</b>	66.8	60.0	40.0	0.326	0.210
<b>GFR &lt;60 (%)</b>	4.1	10.0	0.0	0.209	0.642

Tabella 1 - Caratteristiche della popolazione in accordo al Fib4 basale

Al basale, il Fib4 e l'attività enzimatica della LAL sono risultati inversamente correlati ( $rS=-0.126$ ,  $p=0.038$ ) (Fig.24).



*Figura 22 - Correlazione univariata tra Fib4 ed attività LAL*

Successivamente, comparando i valori di FIB4 all'inizio dell'arruolamento e quelli al follow-up è stata valutata la progressione nel tempo della fibrosi. Sono stati così identificati 49 pazienti che hanno avuto un peggioramento dello score di fibrosi nel corso del follow-up (18.0% della popolazione).

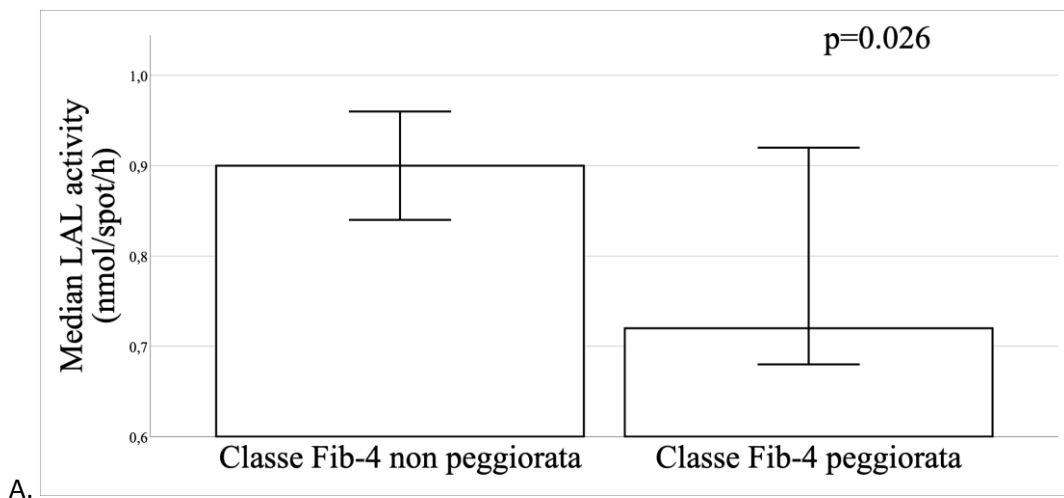
In tabella 2 sono riportate le caratteristiche della popolazione, in accordo alla variazione del Fib4.



	Fib4 stabile/migliorato (n = 223)	Fib4 peggiorato (n = 49)	p
Età (anni)	55.5 ± 10.4	56.1 ± 10.3	0.699
Circonferenza vita (cm)	107.0 ± 11.5	107.8 ± 11.11.3	0.644
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	30.4 ± 4.5	30.7 ± 4.6	0.675
HOMA-IR	3.4 [2.7-5.5]	4.4 [3.1-6.5]	0.073
Colesterolo totale (mg/dl)	197.5 ± 39.1	189.0 ± 39.6	0.173
LDL (mg/dl)	119.5 ± 34.6	110.8 ± 33.1	0.112
Trigliceridi (mg/dl)	140.0 [106.0-184.0]	135.0 [99.0-167.0]	0.219
Creatinina (mg/dl)	0.88 ± 0.2	0.90 ± 0.2	0.302
GGT (U/L)	28.0 [18.0-43.0]	30.0 [17.0-44.3]	0.921
AST (U/L)	21.0 [18.0-31.0]	21.0 [18.5-25.5]	0.986
ALT (U/L)	31.0 [20.0-47.0]	27.0 [23.0-40.0]	0.995
Albumina (g/dl)	4.4 ± 0.3	4.4 ± 0.3	0.898
Sesso femminile (%)	37.7	30.6	0.353
Diabete (%)	29.6	38.8	0.209
Statine (%)	42.6	38.8	0.623
Sindrome metabolica (%)	65.5	63.3	0.769
GFR <60 (%)	4.9	6.1	0.733

Tabella 2 - Caratteristiche della popolazione in accordo alle variazioni di Fib4

I soggetti con un peggioramento della classe di Fib4 presentavano una minore attività LAL al basale se paragonati a coloro con FIB4 stabile o migliorato (Fig.23 panel A, p=0.026). Differenze di attività LAL sono state registrate anche quando le tre categorie di variazione del Fib-4 sono state considerate separatamente (Fig.23 panel B, p=0.006), evidenziando un'attività LAL ridotta sia nei pazienti che hanno sperimentato un miglioramento (p vs. FIB4 stabile = 0.022) che in quelli che hanno sperimentato un peggioramento (p vs. FIB4 stabile = 0.011).



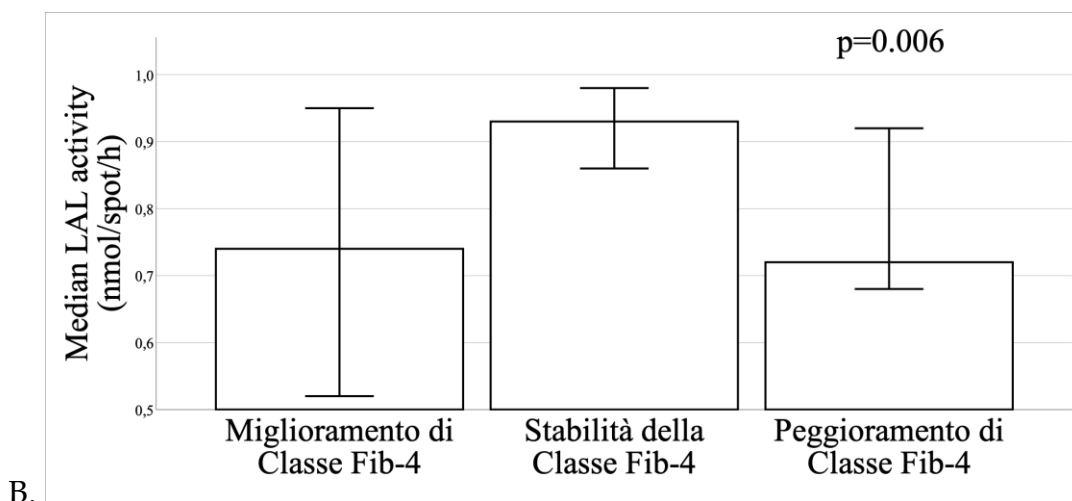


Figura 23 - Valori di attività LAL in accordo alle variazioni di Fib-4 (Panel A), (Panel B)

Un'ulteriore suddivisione della popolazione è stata effettuata individuando i pazienti che hanno avuto una progressione del Fib4 fino a valori >2.67, valori suggestivi di fibrosi avanzata. Andando a confrontare le loro caratteristiche con il resto della popolazione, l'unica differenza statisticamente significativa tra i due gruppi è proprio il valore mediano di LAL-activity (0.9 [0.7-1.2] vs 0.7 [0.4-0.8], p=0.026), come riportato in tabella 3 e figura 24.

	Non progressione in fibrosi avanzata (n = 257)	Progressione in fibrosi avanzata (n = 10)	p
Età (anni)	55.2 ± 10.0	59.5 ± 16.4	0.195
Circonferenza vita (cm)	106.9 ± 11.4	109.6 ± 11.7	0.466
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	30.4 ± 4.5	31.5 ± 5.0	0.446
HOMA-IR	3.6 [2.7-5.7]	4.2 [2.4-5.4]	0.884
Colesterolo totale (mg/dl)	197.3 ± 39.0	167.1 ± 36.1	0.017
LDL (mg/dl)	119.1 ± 34.5	89.6 ± 15.5	0.008
Trigliceridi (mg/dl)	138.0 [104.8-181.3]	138.0 [94.3-46.3]	0.452
Creatinina (mg/dl)	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.511
GGT (U/L)	28.0 [17.0-42.0]	34.5 [29.8-46.3]	0.138
AST (U/L)	21.0 [18.0-29.0]	24.0 [19.0-50.3]	0.184
ALT (U/L)	30.0 [21.0-44.3]	34.0 [21.8-67.3]	0.359
Albumina (g/dl)	4.4 ± 0.3	4.5 ± 0.3	0.690
LAL activity (nmol/spot/h)	0.9 [0.7-1.2]	0.7 [0.4-0.8]	0.026
Sesso femminile (%)	37.2	30.0	0.643
Diabete (%)	31.0	30.0	0.946
Statine (%)	42.2	30.0	0.441
Sindrome metabolica (%)	65.5	60.0	0.720
GFR <60 (%)	5.0	10.0	0.489

Tabella 3 - Caratteristiche della popolazione in accordo al nuovo riscontro di fibrosi avanzata (escluse fibrosi avanzate al baseline)

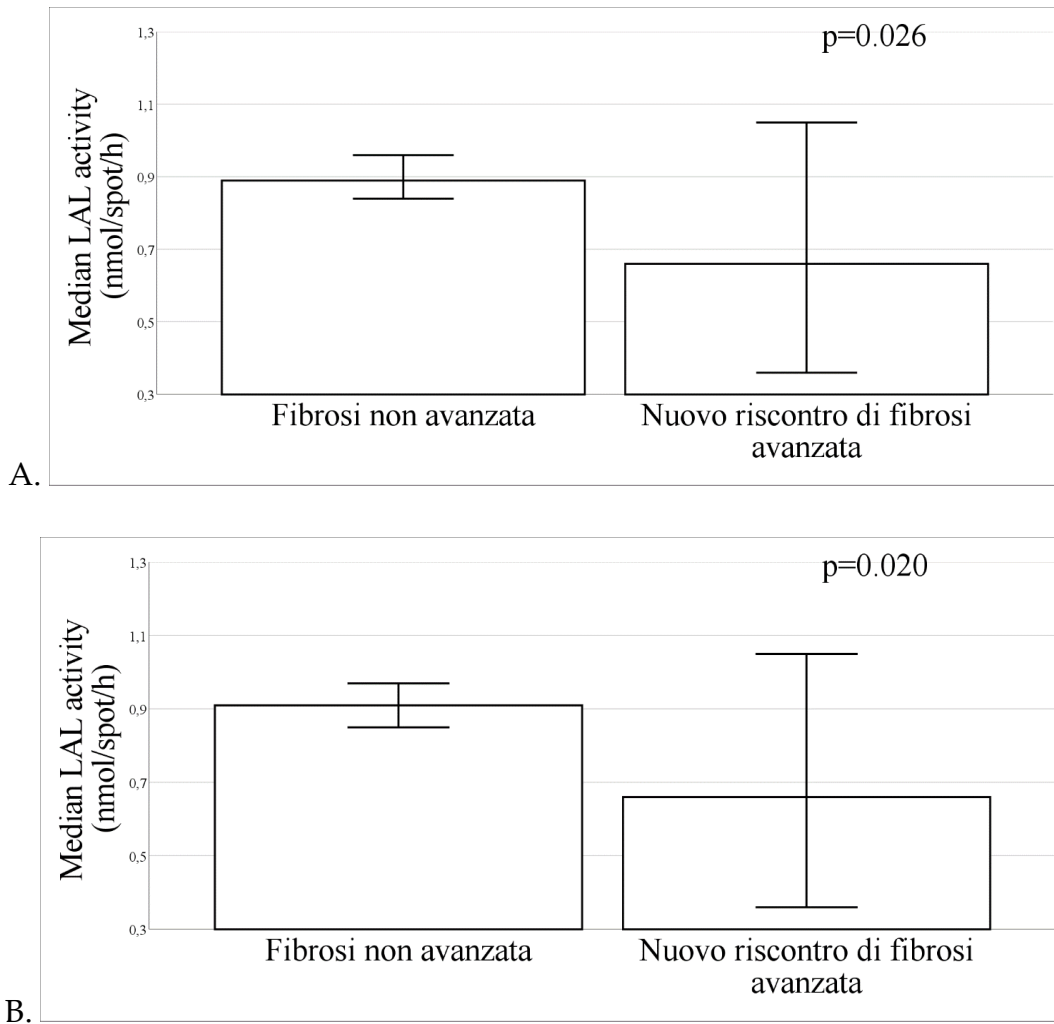
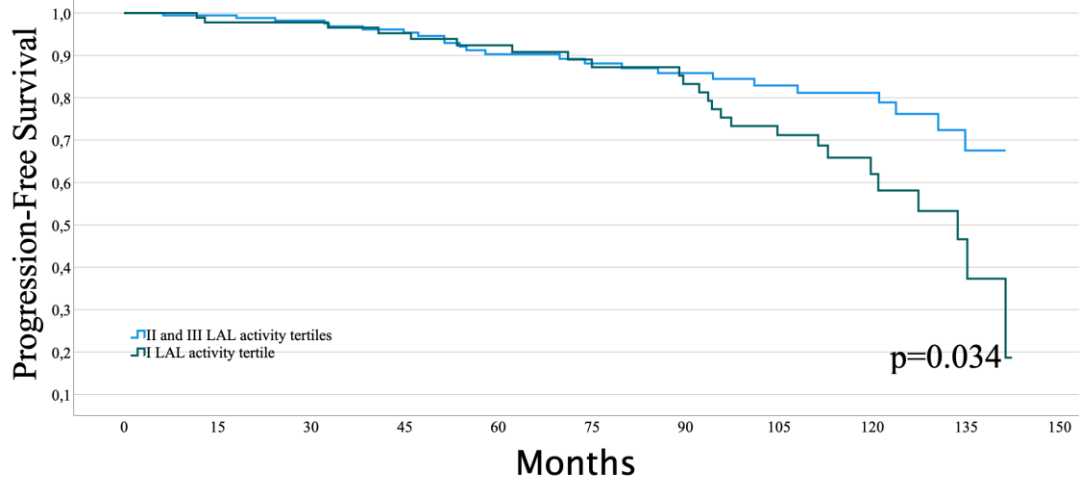
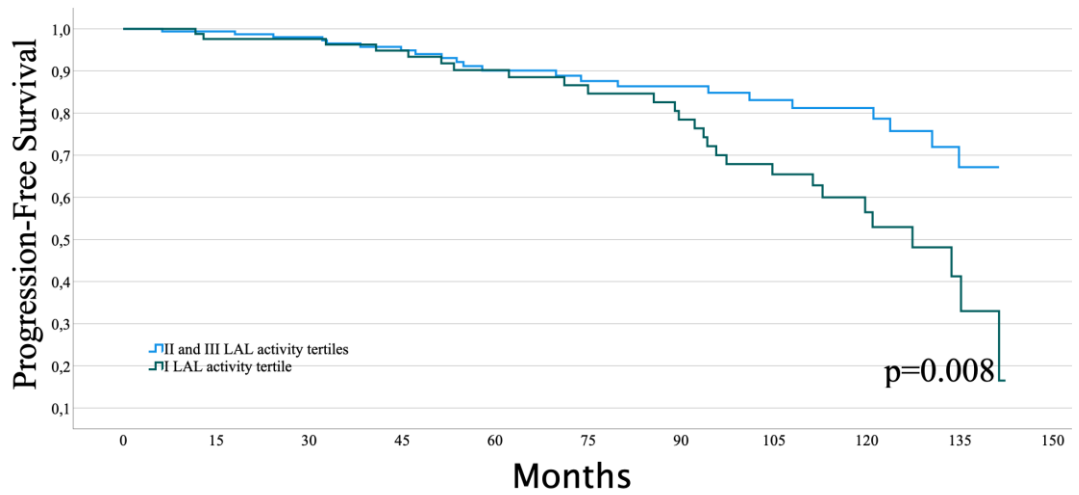


Figura 24 - Valori di attività LAL nei pazienti che non sviluppano e sviluppano fibrosi avanzata (Panel A – esclusi i pazienti con fibrosi avanzata basale), (Panel B - esclusi i pazienti con fibrosi avanzata basale e che migliorano rispetto al basale)

Le analisi tempo dipendenti, univariate e multivariate, sono state condotte in accordo ai terzili di attività della LAL. All'analisi univariata, le curve di sopravvivenza mostrano che i soggetti con valori di LAL più bassi (I LAL activity tertile), dopo esclusione dei pazienti con fibrosi avanzata basale, presentano maggiore probabilità di progressione della fibrosi sia includendo nella popolazione i pazienti che migliorano (log-rank test  $p=0.034$ ; Fig.25 Panel A), che escludendoli (log-rank test  $p=0.008$ ; Fig.25 Panel B). Un andamento simile delle curve è stato registrato valutando la sopravvivenza libera dallo sviluppo di fibrosi avanzata (I vs II+III tertile log-rank test  $p=0.028$ ; Fig.26).



A.



B.

Figura 25 - Curve univariate di sopravvivenza libera da progressione di Fib4 nei pazienti senza diagnosi di fibrosi avanzata basale (Panel A) e dopo esclusione dei pazienti che migliorano rispetto al basale (Panel B), in accordo con i tertili di LAL (I vs II-III tertile)

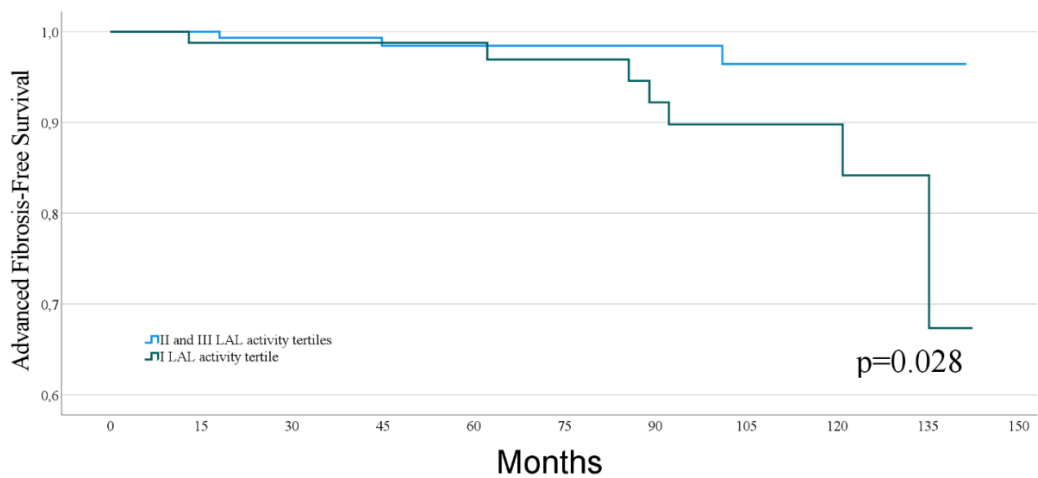


Figura 26 - Curve univariate di sopravvivenza libera da progressione in fibrosi avanzata nei pazienti senza diagnosi di fibrosi avanzata basale e dopo esclusione dei pazienti che migliorano rispetto al basale, in accordo con i tertili di LAL (I vs II-III tertile)

All'analisi multivariata di Cox, vi è evidenza dell'associazione tra la progressione della fibrosi con la classe di Fib4 di partenza (aHR [adjusted Hazard Ratio]=0.374; 95% C.I. 0.147 – 0.956; p=0.040) e con il terzile più basso di LAL activity (aHR=1.879; 95% C.I. 1.063 – 3.32; p=0.030), indipendentemente dalle altre variabili in esame (sesso femminile, età, diabete, BMI) (Tabella 4, Figura 27).

	aHR	95% C.I. for aHR		p
<b>Sesso Femminile</b>	0.615	0.325	1.163	0.135
<b>Classe Fib4 basale</b>	0.374	0.147	0.956	0.040
<b>Età</b>	1.023	0.992	1.054	0.150
<b>Diabete</b>	1.131	0.614	2.081	0.693
<b>BMI</b>	1.013	0.953	1.077	0.681
<b>I LAL tertile</b>	1.879	1.063	3.322	0.030

Tabella 4 - Regressione di Cox multivariata dei predittori di progressione della fibrosi (dopo esclusione dei pazienti con diagnosi di fibrosi avanzata al basale)

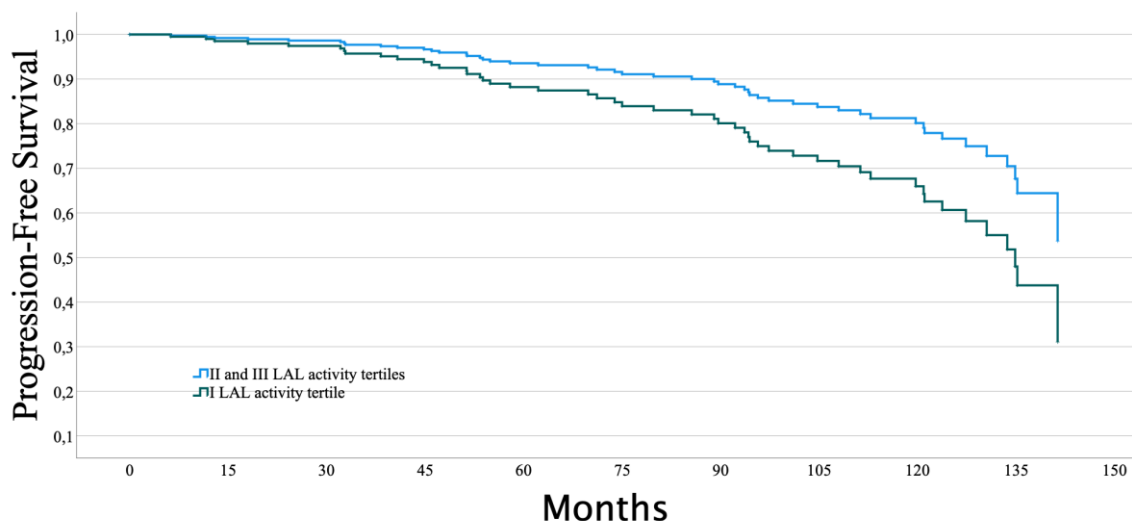


Figura 27 - Curve multivariate di sopravvivenza libera da progressione di Fib4 nei pazienti senza diagnosi di fibrosi avanzata basale, in accordo con i terzili di LAL (I vs II-III terzile), dopo correzione per sesso, età, classe basale di Fib4, diabete, BMI

Analogamente, all'analisi multivariata dei fattori associati all'insorgenza di fibrosi avanzata, vi è evidenza dell'associazione con la classe di Fib4 di partenza (aHR=8.887, 95% C.I. 2.162 – 36.526, p=0.002), l'età (aHR=1.088, 95% C.I. 1.004 – 1.178, p=0.039) e il terzile più basso di attività LAL (aHR=5.390, 95% C.I. 1.216 – 23.896, 0.027) (Tabella 5, Figura 28).

	aHR	95% C.I. for aHR		p
Sesso Femminile	0.868	0.203	3.713	0.849
Classe Fib4 basale	8.887	2.162	36.526	0.002
Età	1.088	1.004	1.178	0.039
Diabete	0.826	0.192	3.560	0.798
BMI	1.092	0.938	1.270	0.257
I LAL tertile	5.390	1.216	23.896	0.027

Tabella 5 - Regressione di Cox multivariata dei predittori di insorgenza di fibrosi avanzata (dopo esclusione dei pazienti con diagnosi di fibrosi avanzata al basale e dei pazienti che migliorano)

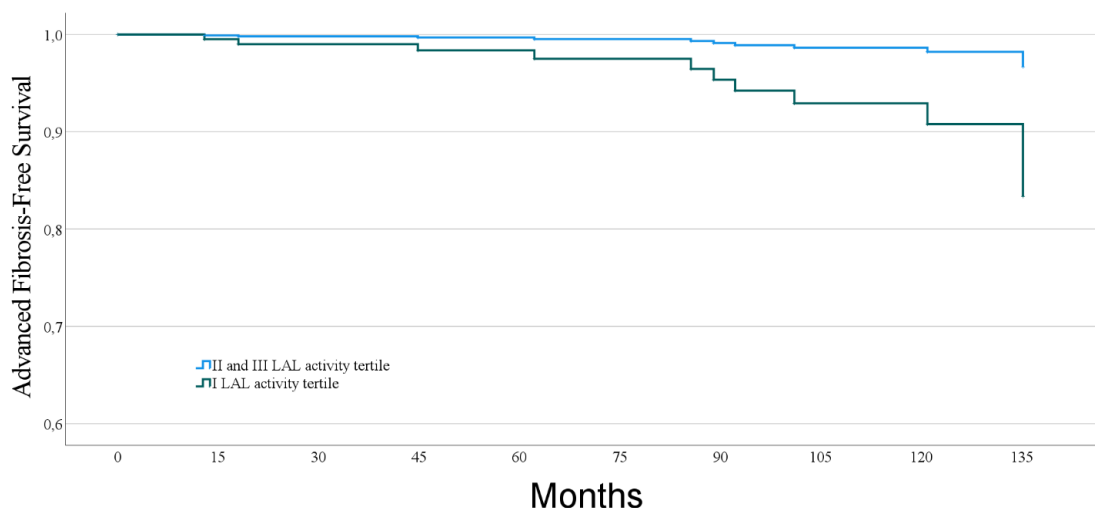


Figura 28 - Curve multivariate di sopravvivenza libera da neo-diagnosi di fibrosi avanzata nei pazienti senza diagnosi di fibrosi avanzata basale e che non migliorano, in accordo con i tertili di LAL (I vs II-III tertile), dopo correzione per sesso, età, classe basale di Fib4, diabete, BMI

## Discussione e conclusioni

I risultati principali dello studio sperimentale mostrano che i bassi valori di LAL-activity predicono la progressione della fibrosi epatica nei pazienti con MASLD.

Sebbene la correlazione inversa tra il Fib4 e l'attività LAL al basale sia un risultato atteso, in quanto il nostro gruppo aveva già dimostrato che quest'ultima decresce progressivamente al peggiorare della fibrosi epatica e della severità della NAFLD [239], lo studio sperimentale mostra per la prima volta l'associazione prospettica tra i più bassi valori di LAL e la progressione della fibrosi epatica nel tempo. Tali dati sono confermati anche dopo correzione per i fattori di rischio classici per la progressione di fibrosi, come l'età, il sesso, la classe di rischio di partenza, il BMI e la diagnosi di diabete. Riguardo alle

correlazioni osservate all'analisi multivariate, se è vero che la progressione della fibrosi risulta associata inversamente alla classe Fib4 di partenza, le neodiagnosi di fibrosi avanzata presentano una correlazione diretta con la stessa. Questo dato, contraddittorio ad una prima lettura, si può invece spiegare con il fatto che l'avanzamento di classe avviene nella maggior parte dei casi da valori di rule out ( $FIB4 < 1.3$  nei pazienti di età  $< 65$  anni e  $< 2.0$  nei pazienti di età  $\geq 65$  anni – codificato con valore di variabile = 1) a quelli che ricadono nella classe indeterminata (valore di variabile = 2) piuttosto che un passaggio dalla classe intermedia a quella avanzata (codificata con valore di variabile = 3). Al contrario, la maggior parte dei pazienti in cui viene effettuata la neodiagnosi di fibrosi avanzata ( $FIB4 \geq 2.67$ ), presentavano una classe di rischio intermedia al momento dell'arruolamento (dati non mostrati). Infine, all'analisi multivariata per i fattori associati alla progressione della fibrosi (ma non in quella per la neodiagnosi di fibrosi avanzata), l'età correla direttamente ed indipendentemente con la progressione della fibrosi. Già il GOASIA study aveva dimostrato una maggiore presenza di fibrosi avanzata nei pazienti NAFLD di età  $\geq 60$  anni [245]. Alcuni autori avevano inizialmente sollevato dei dubbi sull'affidabilità dei marcatori indiretti di fibrosi nel paziente anziano. Tuttavia, l'individuazione di cut-off specifici per fasce di età, come quelli applicati in questo studio, ha ridotto fortemente l'influenza dell'età come fattore confondente [124]. Nessuna associazione tra sesso, BMI, diagnosi di diabete e gli outcome oggetto di studio è stata osservata, nonostante diversi studi abbiano identificato il diabete come un fattore di rischio per la comparsa e progressione di fibrosi epatica nei pazienti con NAFLD/MASLD [246].

Il dosaggio dell'attività enzimatica della LAL potrebbe quindi rappresentare un efficace marker biochimico per identificare il sottogruppo di soggetti affetti da MASLD a maggior rischio di progressione di fibrosi.

Il nostro studio presenta alcuni punti di forza, relativi soprattutto alla valutazione prospettica dell'evoluzione della fibrosi epatica. Alcune limitazioni sono invece rappresentate dal numero relativamente contenuto di soggetti inclusi nello studio,

dall'utilizzo dei soli score indiretti di fibrosi per la definizione degli outcome e la natura osservazionale dello studio che non permette di definire in maniera univoca il ruolo del deficit di attività enzimatica della LAL nella patogenesi della MASLD.

Studi più ampi, e su coorti differenti, saranno necessari per confermare i nostri risultati. Inoltre, qualora i nostri risultati fossero confermati, si potrebbe ipotizzare uno studio d'intervento, con terapia sostitutiva o con ipotetici modulatori dell'attività LAL, al fine di valutarne gli effetti sulla MASLD.



## Bibliografia

1. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*, 2016. **64**(6): p. 1388-402.
2. Patel, V. and A.J. Sanyal, *Drug-induced steatohepatitis*. *Clin Liver Dis*, 2013. **17**(4): p. 533-46, vii.
3. Lindenmeyer, C.C. and A.J. McCullough, *The Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-An Evolving View*. *Clin Liver Dis*, 2018. **22**(1): p. 11-21.
4. Eslam, M., et al., *A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement*. *J Hepatol*, 2020. **73**(1): p. 202-209.
5. Younossi, Z.M., et al., *From NAFLD to MAFLD: Implications of a Premature Change in Terminology*. *Hepatology*, 2021. **73**(3): p. 1194-1198.
6. Kang, S.H., et al., *From nonalcoholic fatty liver disease to metabolic-associated fatty liver disease: Big wave or ripple?* *Clin Mol Hepatol*, 2021. **27**(2): p. 257-269.
7. Rinella, M.E., et al., *A multi-society Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature*. *J Hepatol*, 2023.
8. Le, M.H., et al., *2019 Global NAFLD Prevalence: A Systematic Review and Meta-analysis*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2022. **20**(12): p. 2809-2817.e28.
9. Younossi, Z.M., et al., *The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis*. *J Hepatol*, 2019. **71**(4): p. 793-801.
10. Younossi, Z.M., et al., *Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes*. *Hepatology*, 2016. **64**(1): p. 73-84.
11. Hagström, H., et al., *99% of patients with NAFLD meet MASLD criteria and natural history is therefore identical*. *J Hepatol*, 2023.
12. Chan, W.K., et al., *Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease: A State-of-the-Art Review*. *J Obes Metab Syndr*, 2023.
13. Day, C.P. and O.F. James, *Steatohepatitis: a tale of two "hits"?* *Gastroenterology*, 1998. **114**(4): p. 842-5.
14. Tilg, H. and A.R. Moschen, *Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis*. *Hepatology*, 2010. **52**(5): p. 1836-46.
15. Clare, K., J.F. Dillon, and P.N. Brennan, *Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathogenesis of MAFLD*. *J Clin Transl Hepatol*, 2022. **10**(5): p. 939-946.
16. Donnelly, K.L., et al., *Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(5): p. 1343-51.
17. Stefan, N., K. Kantartzis, and H.U. Häring, *Causes and metabolic consequences of Fatty liver*. *Endocr Rev*, 2008. **29**(7): p. 939-60.
18. Musso, G., R. Gambino, and M. Cassader, *Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis*. *Prog Lipid Res*, 2013. **52**(1): p. 175-91.
19. Min, H.K., et al., *Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of nonalcoholic fatty liver disease*. *Cell Metab*, 2012. **15**(5): p. 665-74.
20. Luu, W., et al., *The role of signalling in cellular cholesterol homeostasis*. *IUBMB Life*, 2013. **65**(8): p. 675-84.
21. Iizuka, K., K. Takao, and D. Yabe, *ChREBP-Mediated Regulation of Lipid Metabolism: Involvement of the Gut Microbiota, Liver, and Adipose Tissue*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020. **11**: p. 587189.

22. Souza-Mello, V., *Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat non-alcoholic fatty liver disease*. World J Hepatol, 2015. **7**(8): p. 1012-9.
23. Girousse, A., et al., *Partial inhibition of adipose tissue lipolysis improves glucose metabolism and insulin sensitivity without alteration of fat mass*. PLoS Biol, 2013. **11**(2): p. e1001485.
24. Morigny, P., et al., *Adipocyte lipolysis and insulin resistance*. Biochimie, 2016. **125**: p. 259-66.
25. Neuschwander-Tetri, B.A., *Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites*. Hepatology, 2010. **52**(2): p. 774-88.
26. Puche, J.E., Y. Saiman, and S.L. Friedman, *Hepatic stellate cells and liver fibrosis*. Compr Physiol, 2013. **3**(4): p. 1473-92.
27. Khomich, O., A.V. Ivanov, and B. Bartosch, *Metabolic Hallmarks of Hepatic Stellate Cells in Liver Fibrosis*. Cells, 2019. **9**(1).
28. Chen, J., et al., *Kupffer Cells in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Friend or Foe?* Int J Biol Sci, 2020. **16**(13): p. 2367-2378.
29. Anderson, R.A., et al., *In situ localization of the genetic locus encoding the lysosomal acid lipase/cholesterol esterase (LIPA) deficient in Wolman disease to chromosome 10q23.2-q23.3*. Genomics, 1993. **15**(1): p. 245-7.
30. Dubland, J.A. and G.A. Francis, *Lysosomal acid lipase: at the crossroads of normal and atherogenic cholesterol metabolism*. Front Cell Dev Biol, 2015. **3**: p. 3.
31. Angelico, F., et al., *Lysosomal acid lipase deficiency: an often non-diagnosed cause of liver disease and hyperlipidemia*. Giornale Italiano dell'Arteriosclerosi, 2017. **8** (1): p. 62-68.
32. Li, F. and H. Zhang, *Lysosomal Acid Lipase in Lipid Metabolism and Beyond*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019. **39**(5): p. 850-856.
33. Fasano, T., et al., *Lysosomal lipase deficiency: molecular characterization of eleven patients with Wolman or cholesterol ester storage disease*. Mol Genet Metab, 2012. **105**(3): p. 450-6.
34. Pericleous, M., et al., *Wolman's disease and cholesterol ester storage disorder: the phenotypic spectrum of lysosomal acid lipase deficiency*. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2017. **2**(9): p. 670-679.
35. Carter, A., et al., *The global prevalence and genetic spectrum of lysosomal acid lipase deficiency: A rare condition that mimics NAFLD*. J Hepatol, 2019. **70**(1): p. 142-150.
36. Korbilius, M., et al., *Recent insights into lysosomal acid lipase deficiency*. Trends Mol Med, 2023. **29**(6): p. 425-438.
37. Livingston, J.N., B.J. Purvis, and D.H. Lockwood, *Insulin induced changes in insulin binding and insulin-sensitivity of adipocytes*. Metabolism, 1978. **27**(12 Suppl 2): p. 2009-14.
38. Bugianesi, E., A.J. McCullough, and G. Marchesini, *Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease*. Hepatology, 2005. **42**(5): p. 987-1000.
39. Petersen, K.F., et al., *The role of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(31): p. 12587-94.
40. Peraldi, P. and B. Spiegelman, *TNF-alpha and insulin resistance: summary and future prospects*. Mol Cell Biochem, 1998. **182**(1-2): p. 169-75.
41. Torisu, T., et al., *The dual function of hepatic SOCS3 in insulin resistance in vivo*. Genes Cells, 2007. **12**(2): p. 143-54.
42. Sabio, G., et al., *A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance*. Science, 2008. **322**(5907): p. 1539-43.
43. Coulon, S., et al., *Evaluation of inflammatory and angiogenic factors in patients with non-alcoholic fatty liver disease*. Cytokine, 2012. **59**(2): p. 442-9.

44. Fujii, H., N. Kawada, and Japan Study Group Of Nafld Jsg-Nafld, *The Role of Insulin Resistance and Diabetes in Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(11).
45. Huh, Y., Y.J. Cho, and G.E. Nam, *Recent Epidemiology and Risk Factors of Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. J Obes Metab Syndr, 2022. **31**(1): p. 17-27.
46. Lee, B.C. and J. Lee, *Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(3): p. 446-62.
47. Kawai, T., M.V. Autieri, and R. Scalia, *Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity*. Am J Physiol Cell Physiol, 2021. **320**(3): p. C375-C391.
48. Dalamaga, M., et al., *Leptin at the intersection of neuroendocrinology and metabolism: current evidence and therapeutic perspectives*. Cell Metab, 2013. **18**(1): p. 29-42.
49. Yamauchi, T., et al., *Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions*. Nat Med, 2007. **13**(3): p. 332-9.
50. Tsochatzis, E., et al., *Serum adipokine levels in chronic liver diseases: association of resistin levels with fibrosis severity*. Scand J Gastroenterol, 2008. **43**(9): p. 1128-36.
51. Gaul, S., et al., *Hepatocyte pyroptosis and release of inflammasome particles induce stellate cell activation and liver fibrosis*. J Hepatol, 2021. **74**(1): p. 156-167.
52. de Carvalho Ribeiro, M. and G. Szabo, *Role of the Inflammasome in Liver Disease*. Annu Rev Pathol, 2022. **17**: p. 345-365.
53. Yesilova, Z., et al., *Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic Fatty liver disease*. Am J Gastroenterol, 2005. **100**(4): p. 850-5.
54. Del Ben, M., et al., *NOX2-generated oxidative stress is associated with severity of ultrasound liver steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease*. BMC Gastroenterol, 2014. **14**: p. 81.
55. Miele, L., et al., *Hepatic mitochondrial beta-oxidation in patients with nonalcoholic steatohepatitis assessed by 13C-octanoate breath test*. Am J Gastroenterol, 2003. **98**(10): p. 2335-6.
56. Emery, M.G., et al., *CYP2E1 activity before and after weight loss in morbidly obese subjects with nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2003. **38**(2): p. 428-35.
57. Guengerich, F.P., *Cytochrome P450 2E1 and its roles in disease*. Chem Biol Interact, 2020. **322**: p. 109056.
58. Sumida, Y., et al., *Involvement of free radicals and oxidative stress in NAFLD/NASH*. Free Radic Res, 2013. **47**(11): p. 869-80.
59. Rolo, A.P., J.S. Teodoro, and C.M. Palmeira, *Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(1): p. 59-69.
60. Kuchay, M.S., N.S. Choudhary, and S.K. Mishra, *Pathophysiological mechanisms underlying MAFLD*. Diabetes Metab Syndr, 2020. **14**(6): p. 1875-1887.
61. Zhang, N.P., et al., *Impaired mitophagy triggers NLRP3 inflammasome activation during the progression from nonalcoholic fatty liver to nonalcoholic steatohepatitis*. Lab Invest, 2019. **99**(6): p. 749-763.
62. Malhotra, J.D. and R.J. Kaufman, *The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response*. Semin Cell Dev Biol, 2007. **18**(6): p. 716-31.
63. Malhi, H. and R.J. Kaufman, *Endoplasmic reticulum stress in liver disease*. J Hepatol, 2011. **54**(4): p. 795-809.
64. Kim, J.Y., et al., *ER Stress Drives Lipogenesis and Steatohepatitis via Caspase-2 Activation of S1P*. Cell, 2018. **175**(1): p. 133-145.e15.

65. Engin, A., *The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome*. Adv Exp Med Biol, 2017. **960**: p. 1-17.
66. Ryan, M.C., et al., *The Mediterranean diet improves hepatic steatosis and insulin sensitivity in individuals with non-alcoholic fatty liver disease*. J Hepatol, 2013. **59**(1): p. 138-43.
67. Baratta, F., et al., *Adherence to Mediterranean Diet and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Effect on Insulin Resistance*. Am J Gastroenterol, 2017. **112**(12): p. 1832-1839.
68. Baratta, F., et al., *High Compliance to Mediterranean Diet Associates with Lower Platelet Activation and Liver Collagen Deposition in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. Nutrients, 2022. **14**(6).
69. White, J.S., L.J. Hobbs, and S. Fernandez, *Fructose content and composition of commercial HFCS-sweetened carbonated beverages*. Int J Obes (Lond), 2015. **39**(1): p. 176-82.
70. Choo, V.L., et al., *Food sources of fructose-containing sugars and glycaemic control: systematic review and meta-analysis of controlled intervention studies*. BMJ, 2018. **363**: p. k4644.
71. Tajima, R., et al., *No association between fruits or vegetables and non-alcoholic fatty liver disease in middle-aged men and women*. Nutrition, 2019. **61**: p. 119-124.
72. Ayoub-Charette, S., et al., *Important food sources of fructose-containing sugars and incident gout: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies*. BMJ Open, 2019. **9**(5): p. e024171.
73. Dekker, M.J., et al., *Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **299**(5): p. E685-94.
74. Herman, M.A. and V.T. Samuel, *The Sweet Path to Metabolic Demise: Fructose and Lipid Synthesis*. Trends Endocrinol Metab, 2016. **27**(10): p. 719-730.
75. Tappy, L. and R. Rosset, *Fructose Metabolism from a Functional Perspective: Implications for Athletes*. Sports Med, 2017. **47**(Suppl 1): p. 23-32.
76. McGarry, J.D., *Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes*. Diabetes, 2002. **51**(1): p. 7-18.
77. Perdomo, C.M., G. Frühbeck, and J. Escalada, *Impact of Nutritional Changes on Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. Nutrients, 2019. **11**(3).
78. Carpino, G., et al., *Increased Liver Localization of Lipopolysaccharides in Human and Experimental NAFLD*. Hepatology, 2020. **72**(2): p. 470-485.
79. Baratta, F., et al., *Poor Adherence to Mediterranean Diet and Serum Lipopolysaccharide are Associated with Oxidative Stress in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*. Nutrients, 2020. **12**(6).
80. Coronati, M., et al., *Added Fructose in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and in Metabolic Syndrome: A Narrative Review*. Nutrients, 2022. **14**(6).
81. Huang, Y., et al., *A feed-forward loop amplifies nutritional regulation of PNPLA3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(17): p. 7892-7.
82. Huang, Y., J.C. Cohen, and H.H. Hobbs, *Expression and characterization of a PNPLA3 protein isoform (I148M) associated with nonalcoholic fatty liver disease*. J Biol Chem, 2011. **286**(43): p. 37085-93.
83. Martin, K., et al., *Genetic Contribution to Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Prognostic Implications*. Curr Diab Rep, 2021. **21**(3): p. 8.
84. Sookoian, S. and C.J. Pirola, *Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2011. **53**(6): p. 1883-94.

85. Anstee, Q.M., et al., *Genome-wide association study of non-alcoholic fatty liver and steatohepatitis in a histologically characterised cohort*. *J Hepatol*, 2020. **73**(3): p. 505-515.
86. Petta, S., et al., *PNPLA3 GG genotype and carotid atherosclerosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease*. *PLoS One*, 2013. **8**(9): p. e74089.
87. Kozlitina, J., et al., *Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease*. *Nat Genet*, 2014. **46**(4): p. 352-6.
88. Dongiovanni, P., et al., *Transmembrane 6 superfamily member 2 gene variant disentangles nonalcoholic steatohepatitis from cardiovascular disease*. *Hepatology*, 2015. **61**(2): p. 506-14.
89. Pirola, C.J. and S. Sookoian, *The dual and opposite role of the TM6SF2-rs58542926 variant in protecting against cardiovascular disease and conferring risk for nonalcoholic fatty liver: A meta-analysis*. *Hepatology*, 2015. **62**(6): p. 1742-56.
90. Raimondo, A., M.G. Rees, and A.L. Gloyn, *Glucokinase regulatory protein: complexity at the crossroads of triglyceride and glucose metabolism*. *Curr Opin Lipidol*, 2015. **26**(2): p. 88-95.
91. Di Costanzo, A., et al., *Evaluation of Polygenic Determinants of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) By a Candidate Genes Resequencing Strategy*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 3702.
92. Vaxillaire, M., et al., *The common P446L polymorphism in GCKR inversely modulates fasting glucose and triglyceride levels and reduces type 2 diabetes risk in the DESIR prospective general French population*. *Diabetes*, 2008. **57**(8): p. 2253-7.
93. Tanaka, Y., et al., *LPIAT1/MBOAT7 depletion increases triglyceride synthesis fueled by high phosphatidylinositol turnover*. *Gut*, 2021. **70**(1): p. 180-193.
94. Mancina, R.M., et al., *The MBOAT7-TMC4 Variant rs641738 Increases Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Individuals of European Descent*. *Gastroenterology*, 2016. **150**(5): p. 1219-1230.e6.
95. Teo, K., et al., *rs641738C>T near MBOAT7 is associated with liver fat, ALT and fibrosis in NAFLD: A meta-analysis*. *J Hepatol*, 2021. **74**(1): p. 20-30.
96. Donati, B., et al., *MBOAT7 rs641738 variant and hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic individuals*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 4492.
97. Sookoian, S., et al., *Lack of evidence supporting a role of TMC4-rs641738 missense variant-MBOAT7- intergenic downstream variant-in the Susceptibility to Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 5097.
98. Saadeh, S., et al., *The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease*. *Gastroenterology*, 2002. **123**(3): p. 745-50.
99. Hamaguchi, M., et al., *The severity of ultrasonographic findings in nonalcoholic fatty liver disease reflects the metabolic syndrome and visceral fat accumulation*. *Am J Gastroenterol*, 2007. **102**(12): p. 2708-15.
100. Ibañeta, C., et al., *Accuracy of a Semi-Quantitative Ultrasound Method to Determine Liver Fat Infiltration in Early Adulthood*. *Diagnostics (Basel)*, 2020. **10**(6).
101. Castera, L., X. Forns, and A. Alberti, *Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography*. *J Hepatol*, 2008. **48**(5): p. 835-47.
102. *EASL Clinical Practice Guidelines on non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis - 2021 update*. *J Hepatol*, 2021. **75**(3): p. 659-689.
103. Shi, K.Q., et al., *Controlled attenuation parameter for the detection of steatosis severity in chronic liver disease: a meta-analysis of diagnostic accuracy*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2014. **29**(6): p. 1149-58.
104. Jun, B.G., et al., *A prospective comparative assessment of the accuracy of the FibroScan in evaluating liver steatosis*. *PLoS One*, 2017. **12**(8): p. e0182784.

105. Petroff, D., et al., *Assessment of hepatic steatosis by controlled attenuation parameter using the M and XL probes: an individual patient data meta-analysis*. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2021. **6**(3): p. 185-198.
106. Oeda, S., et al., *Diagnostic Accuracy of FibroScan and Factors Affecting Measurements*. *Diagnostics (Basel)*, 2020. **10**(11).
107. Castéra, L., et al., *Pitfalls of liver stiffness measurement: a 5-year prospective study of 13,369 examinations*. *Hepatology*, 2010. **51**(3): p. 828-35.
108. Myers, R.P., et al., *Feasibility and diagnostic performance of the FibroScan XL probe for liver stiffness measurement in overweight and obese patients*. *Hepatology*, 2012. **55**(1): p. 199-208.
109. Osman, A.M., A. El Shimy, and M.M. Abd El Aziz, *2D shear wave elastography (SWE) performance versus vibration-controlled transient elastography (VCTE/fibroscan) in the assessment of liver stiffness in chronic hepatitis*. *Insights Imaging*, 2020. **11**(1): p. 38.
110. D'Onofrio, M., et al., *Acoustic radiation force impulse of the liver*. *World J Gastroenterol*, 2013. **19**(30): p. 4841-9.
111. Barr, R.G., et al., *Update to the Society of Radiologists in Ultrasound Liver Elastography Consensus Statement*. *Radiology*, 2020. **296**(2): p. 263-274.
112. Bota, S., et al., *Meta-analysis: ARFI elastography versus transient elastography for the evaluation of liver fibrosis*. *Liver Int*, 2013. **33**(8): p. 1138-47.
113. Matthews, D.R., et al., *Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man*. *Diabetologia*, 1985. **28**(7): p. 412-9.
114. Rinella, M.E., et al., *AASLD Practice Guidance on the clinical assessment and management of nonalcoholic fatty liver disease*. *Hepatology*, 2023. **77**(5): p. 1797-1835.
115. Bedogni, G., et al., *The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population*. *BMC Gastroenterol*, 2006. **6**: p. 33.
116. Lee, J.H., et al., *Hepatic steatosis index: a simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease*. *Dig Liver Dis*, 2010. **42**(7): p. 503-8.
117. Kotronen, A., et al., *Prediction of non-alcoholic fatty liver disease and liver fat using metabolic and genetic factors*. *Gastroenterology*, 2009. **137**(3): p. 865-72.
118. Wai, C.T., et al., *A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C*. *Hepatology*, 2003. **38**(2): p. 518-26.
119. Khan, D.A., et al., *Evaluation of diagnostic accuracy of APRI for prediction of fibrosis in hepatitis C patients*. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 2008. **20**(4): p. 122-6.
120. Lee, J., et al., *Prognostic accuracy of FIB-4, NAFLD fibrosis score and APRI for NAFLD-related events: A systematic review*. *Liver Int*, 2021. **41**(2): p. 261-270.
121. Amernia, B., et al., *FIB-4, APRI, and AST/ALT ratio compared to FibroScan for the assessment of hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease in Bandar Abbas, Iran*. *BMC Gastroenterol*, 2021. **21**(1): p. 453.
122. Sterling, R.K., et al., *Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection*. *Hepatology*, 2006. **43**(6): p. 1317-25.
123. Shah, A.G., et al., *Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2009. **7**(10): p. 1104-12.
124. McPherson, S., et al., *Age as a Confounding Factor for the Accurate Non-Invasive Diagnosis of Advanced NAFLD Fibrosis*. *Am J Gastroenterol*, 2017. **112**(5): p. 740-751.
125. Angulo, P., et al., *The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD*. *Hepatology*, 2007. **45**(4): p. 846-54.

126. Bedossa, P., *Diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: Why liver biopsy is essential*. *Liver Int*, 2018. **38 Suppl 1**: p. 64-66.
127. Leoni, S., et al., *Current guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review with comparative analysis*. *World J Gastroenterol*, 2018. **24(30)**: p. 3361-3373.
128. Kleiner, D.E., et al., *Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease*. *Hepatology*, 2005. **41(6)**: p. 1313-21.
129. Brunt, E.M., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions*. *Am J Gastroenterol*, 1999. **94(9)**: p. 2467-74.
130. Angulo, P., et al., *Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. *Gastroenterology*, 2015. **149(2)**: p. 389-97.e10.
131. Ekstedt, M., et al., *Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up*. *Hepatology*, 2015. **61(5)**: p. 1547-54.
132. Dulai, P.S., et al., *Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis*. *Hepatology*, 2017. **65(5)**: p. 1557-1565.
133. Simon, T.G., et al., *The nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) fibrosis score, cardiovascular risk stratification and a strategy for secondary prevention with ezetimibe*. *Int J Cardiol*, 2018. **270**: p. 245-252.
134. Baratta, F., et al., *Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Fibrosis Associated With Increased Risk of Cardiovascular Events in a Prospective Study*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2020. **18(10)**: p. 2324-2331.e4.
135. Loomba, R. and L.A. Adams, *The 20% Rule of NASH Progression: The Natural History of Advanced Fibrosis and Cirrhosis Caused by NASH*. *Hepatology*, 2019. **70(6)**: p. 1885-1888.
136. Golabi, P., et al., *Liver Transplantation (LT) for Cryptogenic Cirrhosis (CC) and Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) Cirrhosis: Data from the Scientific Registry of Transplant Recipients (SRTR): 1994 to 2016*. *Medicine (Baltimore)*, 2018. **97(31)**: p. e11518.
137. Reig, M., et al., *Should Patients With NAFLD/NASH Be Surveyed for HCC? Transplantation*, 2019. **103(1)**: p. 39-44.
138. Huang, D.Q., H.B. El-Serag, and R. Loomba, *Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021. **18(4)**: p. 223-238.
139. Mohamad, B., et al., *Characterization of hepatocellular carcinoma (HCC) in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) patients without cirrhosis*. *Hepatol Int*, 2016. **10(4)**: p. 632-9.
140. Baffy, G., E.M. Brunt, and S.H. Caldwell, *Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace*. *J Hepatol*, 2012. **56(6)**: p. 1384-91.
141. Motamed, N., et al., *Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and 10-year risk of cardiovascular diseases*. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2017. **41(1)**: p. 31-38.
142. Cai, J., et al., *Nonalcoholic Fatty Liver Disease Pandemic Fuels the Upsurge in Cardiovascular Diseases*. *Circ Res*, 2020. **126(5)**: p. 679-704.
143. Francque, S.M., D. van der Graaff, and W.J. Kwanten, *Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk: Pathophysiological mechanisms and implications*. *J Hepatol*, 2016. **65(2)**: p. 425-43.
144. Lonardo, A., et al., *Hypertension, diabetes, atherosclerosis and NASH: Cause or consequence? J Hepatol*, 2018. **68(2)**: p. 335-352.

145. Siddiqui, M.S., et al., *Severity of nonalcoholic fatty liver disease and progression to cirrhosis are associated with atherogenic lipoprotein profile*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2015. **13**(5): p. 1000-8.e3.
146. Vekic, J., et al., *Atherosclerosis Development and Progression: The Role of Atherogenic Small, Dense LDL*. Medicina (Kaunas), 2022. **58**(2).
147. Libby, P., et al., *Atherosclerosis*. Nat Rev Dis Primers, 2019. **5**(1): p. 56.
148. Oni, E.T., et al., *A systematic review: burden and severity of subclinical cardiovascular disease among those with nonalcoholic fatty liver; should we care?* Atherosclerosis, 2013. **230**(2): p. 258-67.
149. Zhou, Y.Y., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease contributes to subclinical atherosclerosis: A systematic review and meta-analysis*. Hepatol Commun, 2018. **2**(4): p. 376-392.
150. Aboyans, V., et al., *Measurement and interpretation of the ankle-brachial index: a scientific statement from the American Heart Association*. Circulation, 2012. **126**(24): p. 2890-909.
151. Mantovani, A., et al., *Association between non-alcoholic fatty liver disease and risk of atrial fibrillation in adult individuals: An updated meta-analysis*. Liver Int, 2019. **39**(4): p. 758-769.
152. Cai, X., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease is associated with increased risk of atrial fibrillation*. Liver Int, 2020. **40**(7): p. 1594-1600.
153. Di Minno, M.N., et al., *Aortic valve sclerosis as a marker of atherosclerosis: Novel insights from hepatic steatosis*. Int J Cardiol, 2016. **217**: p. 1-6.
154. Wijarnpreecha, K., et al., *Association between diastolic cardiac dysfunction and nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis*. Dig Liver Dis, 2018. **50**(11): p. 1166-1175.
155. Galiero, R., et al., *Pathophysiological mechanisms and clinical evidence of relationship between Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and cardiovascular disease*. Rev Cardiovasc Med, 2021. **22**(3): p. 755-768.
156. Mantovani, A., et al., *Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident chronic kidney disease: an updated meta-analysis*. Gut, 2022. **71**(1): p. 156-162.
157. Nampoothiri, R.V., et al., *Renal Dysfunction in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease is Related to the Presence of Diabetes Mellitus and Severity of Liver Disease*. J Clin Exp Hepatol, 2019. **9**(1): p. 22-28.
158. Marcuccilli, M. and M. Chonchol, *NAFLD and Chronic Kidney Disease*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(4): p. 562.
159. Byrne, C.D. and G. Targher, *NAFLD as a driver of chronic kidney disease*. J Hepatol, 2020. **72**(4): p. 785-801.
160. Mantovani, A., et al., *MAFLD and CKD: An Updated Narrative Review*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(13).
161. Kim, D., et al., *Association between noninvasive fibrosis markers and mortality among adults with nonalcoholic fatty liver disease in the United States*. Hepatology, 2013. **57**(4): p. 1357-65.
162. Kim, G.A., et al., *Association between non-alcoholic fatty liver disease and cancer incidence rate*. J Hepatol, 2017.
163. Mantovani, A., et al., *Association between nonalcoholic fatty liver disease and colorectal tumours in asymptomatic adults undergoing screening colonoscopy: a systematic review and meta-analysis*. Metabolism, 2018. **87**: p. 1-12.
164. Mantovani, A., et al., *Non-alcoholic fatty liver disease and increased risk of incident extrahepatic cancers: a meta-analysis of observational cohort studies*. Gut, 2022. **71**(4): p. 778-788.



165. Wongjarupong, N., et al., *Non-alcoholic fatty liver disease as a risk factor for cholangiocarcinoma: a systematic review and meta-analysis*. BMC Gastroenterol, 2017. **17**(1): p. 149.
166. Marchesini, G., M.L. Petroni, and H. Cortez-Pinto, *Adipose tissue-associated cancer risk: Is it the fat around the liver, or the fat inside the liver?* J Hepatol, 2019. **71**(6): p. 1073-1075.
167. Kyrgiou, M., et al., *Adiposity and cancer at major anatomical sites: umbrella review of the literature*. BMJ, 2017. **356**: p. j477.
168. Seo, J.Y., et al., *The Risk of Colorectal Adenoma in Nonalcoholic or Metabolic-Associated Fatty Liver Disease*. Biomedicines, 2021. **9**(10).
169. Allen, A.M., et al., *The risk of incident extrahepatic cancers is higher in non-alcoholic fatty liver disease than obesity - A longitudinal cohort study*. J Hepatol, 2019. **71**(6): p. 1229-1236.
170. Zhang, X., et al., *Dietary cholesterol drives fatty liver-associated liver cancer by modulating gut microbiota and metabolites*. Gut, 2021. **70**(4): p. 761-774.
171. Liao, Y., et al., *Emerging trends and hotspots in metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD) research from 2012 to 2021: A bibliometric analysis*. Front Endocrinol (Lausanne), 2023. **14**: p. 1078149.
172. Koutoukidis, D.A., et al., *Association of Weight Loss Interventions With Changes in Biomarkers of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-analysis*. JAMA Intern Med, 2019. **179**(9): p. 1262-1271.
173. Ludwig, D.S. and C.B. Ebbeling, *The Carbohydrate-Insulin Model of Obesity: Beyond "Calories In, Calories Out"*. JAMA Intern Med, 2018. **178**(8): p. 1098-1103.
174. Dong, T., et al., *The effects of low-carbohydrate diets on cardiovascular risk factors: A meta-analysis*. PLoS One, 2020. **15**(1): p. e0225348.
175. Keating, S.E., et al., *Exercise and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis*. J Hepatol, 2012. **57**(1): p. 157-66.
176. Sullivan, S., et al., *Randomized trial of exercise effect on intrahepatic triglyceride content and lipid kinetics in nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2012. **55**(6): p. 1738-45.
177. Golabi, P., et al., *Effectiveness of exercise in hepatic fat mobilization in non-alcoholic fatty liver disease: Systematic review*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(27): p. 6318-27.
178. van der Windt, D.J., et al., *The Effects of Physical Exercise on Fatty Liver Disease*. Gene Expr, 2018. **18**(2): p. 89-101.
179. Wen, C.P., et al., *Minimum amount of physical activity for reduced mortality and extended life expectancy: a prospective cohort study*. Lancet, 2011. **378**(9798): p. 1244-53.
180. Dufour, J.F., et al., *Current therapies and new developments in NASH*. Gut, 2022. **71**(10): p. 2123-34.
181. Chandan, S., et al., *Efficacy and Safety of Intrahepatic Balloon (IGB) in Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): a Comprehensive Review and Meta-analysis*. Obes Surg, 2021. **31**(3): p. 1271-1279.
182. Nunes, B.C.M., et al., *Impact of Endoscopic Sleeve Gastroplasty in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: a Systematic Review and Meta-analysis*. Obes Surg, 2023. **33**(9): p. 2917-2926.
183. de Brito E Silva, M.B., et al., *Gastric Bypass Compared with Sleeve Gastrectomy for Nonalcoholic Fatty Liver Disease: a Systematic Review and Meta-analysis*. Obes Surg, 2021. **31**(6): p. 2762-2772.
184. Zhou, H., et al., *Bariatric Surgery Improves Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Systematic Review and Meta-Analysis*. Obes Surg, 2022. **32**(6): p. 1872-1883.

185. Spengler, E.K. and R. Loomba, *Recommendations for Diagnosis, Referral for Liver Biopsy, and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis*. Mayo Clin Proc, 2015. **90**(9): p. 1233-46.
186. Dormandy, J.A., et al., *Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial*. Lancet, 2005. **366**(9493): p. 1279-89.
187. Spence, J.D., et al., *Pioglitazone Therapy in Patients With Stroke and Prediabetes: A Post Hoc Analysis of the IRIS Randomized Clinical Trial*. JAMA Neurol, 2019. **76**(5): p. 526-535.
188. Sanyal, A.J., et al., *Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis*. N Engl J Med, 2010. **362**(18): p. 1675-85.
189. Della Pepa, G., et al., *Pioglitazone even at low dosage improves NAFLD in type 2 diabetes: clinical and pathophysiological insights from a subgroup of the TOSCA.IT randomised trial*. Diabetes Res Clin Pract, 2021. **178**: p. 108984.
190. Lian, J. and J. Fu, *Pioglitazone for NAFLD Patients With Prediabetes or Type 2 Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis*. Front Endocrinol (Lausanne), 2021. **12**: p. 615409.
191. Amanullah, I., et al., *Effect of vitamin E in non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials*. Postgrad Med J, 2019. **95**(1129): p. 601-611.
192. Bril, F., et al., *Role of Vitamin E for Nonalcoholic Steatohepatitis in Patients With Type 2 Diabetes: A Randomized Controlled Trial*. Diabetes Care, 2019. **42**(8): p. 1481-1488.
193. Mantovani, A., et al., *Efficacy and safety of anti-hyperglycaemic drugs in patients with non-alcoholic fatty liver disease with or without diabetes: An updated systematic review of randomized controlled trials*. Diabetes Metab, 2020. **46**(6): p. 427-441.
194. Lian, J. and J. Fu, *Efficacy of Various Hypoglycemic Agents in the Treatment of Patients With Nonalcoholic Liver Disease With or Without Diabetes : A Network Meta-Analysis*. Front Endocrinol (Lausanne), 2021. **12**: p. 649018.
195. Bjelakovic, G., et al., *Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis*. JAMA, 2007. **297**(8): p. 842-57.
196. Schürks, M., et al., *Effects of vitamin E on stroke subtypes: meta-analysis of randomised controlled trials*. BMJ, 2010. **341**: p. c5702.
197. Klein, E.A., et al., *Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT)*. JAMA, 2011. **306**(14): p. 1549-56.
198. Ferrannini, E., *The target of metformin in type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2014. **371**(16): p. 1547-8.
199. Rakoski, M.O., et al., *Meta-analysis: insulin sensitizers for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis*. Aliment Pharmacol Ther, 2010. **32**(10): p. 1211-21.
200. Lavine, J.E., et al., *Effect of vitamin E or metformin for treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: the TONIC randomized controlled trial*. JAMA, 2011. **305**(16): p. 1659-68.
201. Tacelli, M., et al., *Antidiabetic Drugs in NAFLD: The Accomplishment of Two Goals at Once?* Pharmaceuticals (Basel), 2018. **11**(4).
202. Chen, H.P., et al., *Metformin decreases hepatocellular carcinoma risk in a dose-dependent manner: population-based and in vitro studies*. Gut, 2013. **62**(4): p. 606-15.
203. Cholankeril, G., et al., *Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis: Current knowledge and implications for management*. World J Hepatol, 2017. **9**(11): p. 533-543.
204. Campbell, J.E. and D.J. Drucker, *Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action*. Cell Metab, 2013. **17**(6): p. 819-837.

205. Armstrong, M.J., et al., *Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study*. *Lancet*, 2016. **387**(10019): p. 679-690.
206. Kalogirou, M.S., et al., *Liraglutide in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2021. **45**(3): p. 101568.
207. Newsome, P.N., et al., *A Placebo-Controlled Trial of Subcutaneous Semaglutide in Nonalcoholic Steatohepatitis*. *N Engl J Med*, 2021. **384**(12): p. 1113-1124.
208. Kuchay, M.S., et al., *Effect of dulaglutide on liver fat in patients with type 2 diabetes and NAFLD: randomised controlled trial (D-LIFT trial)*. *Diabetologia*, 2020. **63**(11): p. 2434-2445.
209. Shen, T., et al., *Sitagliptin reduces insulin resistance and improves rat liver steatosis via the SIRT1/AMPK $\alpha$  pathway*. *Exp Ther Med*, 2018. **16**(4): p. 3121-3128.
210. Sakai, Y., et al., *DPP-4 Inhibition with Anagliptin Reduces Lipotoxicity-Induced Insulin Resistance and Steatohepatitis in Male Mice*. *Endocrinology*, 2020. **161**(10).
211. Cui, J., et al., *Sitagliptin vs. placebo for non-alcoholic fatty liver disease: A randomized controlled trial*. *J Hepatol*, 2016. **65**(2): p. 369-76.
212. Joy, T.R., et al., *Sitagliptin in patients with non-alcoholic steatohepatitis: A randomized, placebo-controlled trial*. *World J Gastroenterol*, 2017. **23**(1): p. 141-150.
213. Arase, Y., et al., *Effect of Sodium Glucose Co-Transporter 2 Inhibitors on Liver Fat Mass and Body Composition in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Type 2 Diabetes Mellitus*. *Clin Drug Investig*, 2019. **39**(7): p. 631-641.
214. Eriksson, J.W., et al., *Effects of dapagliflozin and n-3 carboxylic acids on non-alcoholic fatty liver disease in people with type 2 diabetes: a double-blind randomised placebo-controlled study*. *Diabetologia*, 2018. **61**(9): p. 1923-1934.
215. Shimizu, M., et al., *Evaluation of the effects of dapagliflozin, a sodium-glucose co-transporter-2 inhibitor, on hepatic steatosis and fibrosis using transient elastography in patients with type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease*. *Diabetes Obes Metab*, 2019. **21**(2): p. 285-292.
216. Inoue, M., et al., *Effects of canagliflozin on body composition and hepatic fat content in type 2 diabetes patients with non-alcoholic fatty liver disease*. *J Diabetes Investig*, 2019. **10**(4): p. 1004-1011.
217. Seko, Y., et al., *Efficacy and safety of canagliflozin in type 2 diabetes mellitus patients with biopsy-proven nonalcoholic steatohepatitis classified as stage 1-3 fibrosis*. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2018. **11**: p. 835-843.
218. Sattar, N., et al., *Empagliflozin is associated with improvements in liver enzymes potentially consistent with reductions in liver fat: results from randomised trials including the EMPA-REG OUTCOME<sup>®</sup> trial*. *Diabetologia*, 2018. **61**(10): p. 2155-2163.
219. Kahl, S., et al., *Empagliflozin Effectively Lowers Liver Fat Content in Well-Controlled Type 2 Diabetes: A Randomized, Double-Blind, Phase 4, Placebo-Controlled Trial*. *Diabetes Care*, 2020. **43**(2): p. 298-305.
220. Taheri, H., et al., *Effect of Empagliflozin on Liver Steatosis and Fibrosis in Patients With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Without Diabetes: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial*. *Adv Ther*, 2020. **37**(11): p. 4697-4708.
221. Nascimbeni, F., et al., *Statins, antidiabetic medications and liver histology in patients with diabetes with non-alcoholic fatty liver disease*. *BMJ Open Gastroenterol*, 2016. **3**(1): p. e000075.
222. Singh, S., et al., *Anti-diabetic medications and the risk of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis*. *Am J Gastroenterol*, 2013. **108**(6): p. 881-91; quiz 892.

223. McGlynn, K.A., J.L. Petrick, and H.B. El-Serag, *Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma*. *Hepatology*, 2021. **73 Suppl 1**(Suppl 1): p. 4-13.
224. Larger, E., *Weight gain and insulin treatment*. *Diabetes Metab*, 2005. **31**(4 Pt 2): p. 4S51-4S56.
225. Khunti, K., et al., *Do sulphonylureas still have a place in clinical practice?* *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2018. **6**(10): p. 821-832.
226. Oesterle, A., U. Laufs, and J.K. Liao, *Pleiotropic Effects of Statins on the Cardiovascular System*. *Circ Res*, 2017. **120**(1): p. 229-243.
227. Mach, F., et al., *2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk*. *Eur Heart J*, 2020. **41**(1): p. 111-188.
228. Del Ben, M., et al., *Under-prescription of statins in patients with non-alcoholic fatty liver disease*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2017. **27**(2): p. 161-167.
229. Meurer, L. and S.M. Cohen, *Drug-Induced Liver Injury from Statins*. *Clin Liver Dis*, 2020. **24**(1): p. 107-119.
230. Pastori, D., et al., *Statin liver safety in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and metanalysis*. *Br J Clin Pharmacol*, 2022. **88**(2): p. 441-451.
231. Nascimbeni, F., et al., *Statins and nonalcoholic fatty liver disease in the era of precision medicine: More friends than foes*. *Atherosclerosis*, 2019. **284**: p. 66-74.
232. Calder, P.C., *Mechanisms of action of (n-3) fatty acids*. *J Nutr*, 2012. **142**(3): p. 592S-599S.
233. Okada, L.S.D.R., et al., *Omega-3 PUFA modulate lipogenesis, ER stress, and mitochondrial dysfunction markers in NASH - Proteomic and lipidomic insight*. *Clin Nutr*, 2018. **37**(5): p. 1474-1484.
234. Manousopoulou, A., et al., *Marine omega-3 fatty acid supplementation in non-alcoholic fatty liver disease: Plasma proteomics in the randomized WELCOME\* trial*. *Clin Nutr*, 2019. **38**(4): p. 1952-1955.
235. Climax, J., et al., *Effects of Epeleuton, a Novel Synthetic Second-Generation n-3 Fatty Acid, on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, Triglycerides, Glycemic Control, and Cardiometabolic and Inflammatory Markers*. *J Am Heart Assoc*, 2020. **9**(16): p. e016334.
236. Yang, J., et al., *Oxidative Stress and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Effects of Omega-3 Fatty Acid Supplementation*. *Nutrients*, 2019. **11**(4).
237. Williams, B., et al., *2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension*. *Eur Heart J*, 2018. **39**(33): p. 3021-3104.
238. Baratta, F., et al., *Reduced Lysosomal Acid Lipase Activity in Adult Patients With Non-alcoholic Fatty Liver Disease*. *EBioMedicine*, 2015. **2**(7): p. 750-4.
239. Baratta, F., et al., *Lysosomal acid lipase activity and liver fibrosis in the clinical continuum of non-alcoholic fatty liver disease*. *Liver Int*, 2019. **39**(12): p. 2301-2308.
240. Baratta, F., et al., *Reduced lysosomal acid lipase activity: A new marker of liver disease severity across the clinical continuum of non-alcoholic fatty liver disease?* *World J Gastroenterol*, 2019. **25**(30): p. 4172-4180.
241. Cosentino, F., et al., *2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD*. *Eur Heart J*, 2020. **41**(2): p. 255-323.
242. Members, A.T.F., E.C.f.P.G. (CPG), and E.N.C. Societies, *2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk*. *Atherosclerosis*, 2019. **290**: p. 140-205.
243. Bush, K., et al., *The AUDIT alcohol consumption questions (AUDIT-C): an effective brief screening test for problem drinking. Ambulatory Care Quality Improvement Project (ACQUIP). Alcohol Use Disorders Identification Test*. *Arch Intern Med*, 1998. **158**(16): p. 1789-95.

244. Lukacs, Z., M. Barr, and J. Hamilton, *Best practice in the measurement and interpretation of lysosomal acid lipase in dried blood spots using the inhibitor Lalistat 2*. *Clin Chim Acta*, 2017. **471**: p. 201-205.
245. Pitisuttithum, P., et al., *Predictors of advanced fibrosis in elderly patients with biopsy-confirmed nonalcoholic fatty liver disease: the GOASIA study*. *BMC Gastroenterol*, 2020. **20**(1): p. 88.
246. Targher, G., et al., *The complex link between NAFLD and type 2 diabetes mellitus - mechanisms and treatments*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021. **18**(9): p. 599-612.