



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN:
EPATO-GASTROENTEROLOGIA SPERIMENTALE E CLINICA–XXX CICLO**

Coordinatore Prof. Paolo Onori

**Progetto di ricerca: “ASSOCIAZIONE TRA EPATOPATIA NON ALCOLICA
(NAFLD) E CANCRO DELLA MAMMELLA”**

DOTTORANDO : Dott. Alessandro De Luca

TUTOR: Prof.ssa Annamaria Pronio

Indice

1 Introduzione allo studio: NAFLD e Carcinoma della mammella

2 La NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease)

2.1 Definizione e Prevalenza

2.2 Fisiopatologia della NAFLD

2.3 Patologie e complicanze associate alla NAFLD

2.3.1 NAFLD e obesità

2.3.2 La NAFLD nei soggetti non obesi: "Lean NAFLD"

2.3.3 La NAFLD ed il rischio cardiometabolico

2.3.4 La NAFLD e l'insorgenza di tumori a sede intra-extraepatica

2.3.5 Mortalità e morbilità della NAFLD

2.3.6 Confronto tra NAFLD e MAFLD

3 Obiettivi dello studio

4 Materiali e Metodi

4.1 Valutazioni antropometriche e metaboliche

4.2 La diagnosi di NAFLD

4.2.1 La diagnosi ecografica di NAFLD

4.2.2 Indici di NAFLD

4.3 Diagnosi di MAFLD

4.4 Valutazione dell'attività fisica

4.5 Stadiazione e caratteristiche immunoistochimiche della neoplasia mammaria

4.6 Analisi statistica

5 Risultati

5.1 Caratteristiche cliniche e metaboliche delle pazienti

5.2 Prevalenza della NAFLD e della MAFLD

5.3 Associazione tra caratteristiche istologiche ed immunohistochimiche e diagnosi di NAFLD

5.4 Confronto tra i due gruppi in base all'attività fisica

5.5 BiRADs e NAFLD

5.6 Analisi di regressione logistica

6 Discussione

7 Conclusioni

1 Introduzione allo studio: NAFLD e Carcinoma della mammella

Il carcinoma mammario rappresenta la principale causa di morte per cancro nel sesso femminile (1,2). Diversi fattori di rischio sono stati ampiamente studiati e correlati con l'incidenza di tale neoplasia (3-6;7). E' ormai noto che la sindrome metabolica è associata ad un aumentato rischio di sviluppo di carcinoma mammario (8), sebbene in letteratura ancora pochi studi hanno investigato correlazioni tra tumore della mammella e malattie metaboliche. L'epatopatia non alcolica (NAFLD) è una malattia multisistemica con coinvolgimento epatico ed extraepatico (cardiologico, renale e polmonare) ed insorgenza di tumori a sede intra ed extraepatica (9-11). In pazienti affetti da NAFLD la seconda causa di morte dopo la malattia cardiovascolare è rappresentata dal cancro (12-15). L'obesità e l'iperinsulinemia sono importanti fattori di rischio per lo sviluppo di NAFLD che, allo stesso tempo, risulta strettamente associata al carcinoma mammario (5). Nonostante tale associazione, non tutte le donne con NAFLD sono pazienti obese (12). In letteratura pochi studi hanno valutato la relazione tra la NAFLD ed il carcinoma mammario. Kim et al. (16) hanno documentato che tra soggetti con diagnosi di NAFLD (n=8.721) vi è una stretta correlazione, tra marker diagnostici non invasivi di NAFLD e l'incidenza di tutti i tumori tra cui il carcinoma mammario (16). In questo studio, l'associazione tra NAFLD e lo sviluppo di carcinoma mammario è stata riscontrata in donne non obese (16). La donna obesa sviluppa carcinoma mammario attraverso un meccanismo di insulino-resistenza mediato dalle adipochine che determina uno stato pro-infiammatorio (17-19). La NAFLD simula le stesse azioni dell'obesità, svolgendo un ruolo importante nello sviluppo dell'insulino-resistenza sistemica (20-23). L'insulina, attraverso i recettori del fattore IGF-1 espressi sulle cellule della ghiandola mammaria, favorisce la proliferazione di cellule neoplastiche del carcinoma mammario (24). Inoltre, l'iperinsulinemia può aumentare la sintesi epatica di IGF-1 e diminuire l'espressione epatica delle proteine leganti l'IGF-1, portando a elevati livelli di IGF-1 libero (24-26). Pertanto, in pazienti con NAFLD, l'iperinsulinemia potrebbe determinare un aumento dell'IGF-1 libero, responsabile della proliferazione delle cellule del tessuto mammario.

Lo scopo del nostro studio e' identificare i tassi di incidenza di NAFLD in donne con diagnosi di carcinoma mammario e secondariamente identificare l'associazione tra marker diagnostici non invasivi di NAFLD e lo sviluppo di carcinoma mammario.

2 La NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease)

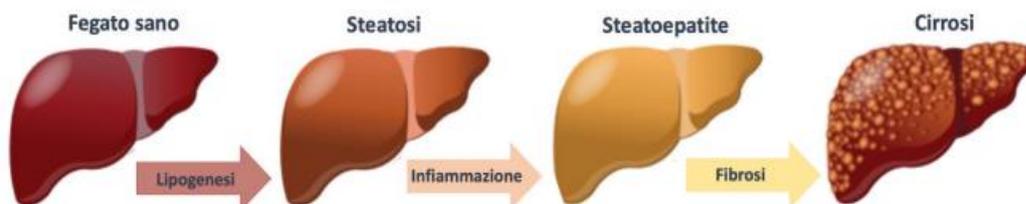
2.1 Definizione e Prevalenza

La epatopatia steatosica non alcolica (NAFLD) è attualmente l'epatopatia cronica di più frequente riscontro nella popolazione adulta dei Paesi occidentali [27]. La NAFLD è una condizione caratterizzata e definita dall'accumulo di lipidi all'interno degli epatociti in una quantità che interessi almeno il 5% del fegato. La definizione di NAFLD è tuttavia una diagnosi di esclusione perché per poter porre diagnosi è necessario escludere altre cause di malattia cronica del fegato quali infezioni da virus dell'epatite B e C ed un consumo significativo ed a rischio di alcolici (superiore a 2 unità alcoliche/die nelle donne e 3/die negli uomini [28]). La NAFLD è spesso associata a sovrappeso/obesità, diabete mellito tipo 2 ed altre alterazioni tipiche della sindrome metabolica. Dal punto di vista istopatologico, la NAFLD include una gamma di patologie epatiche che possono essere classificate come: steatosi epatica semplice (NAFLD), caratterizzata dalla presenza di steatosi in >5% degli epatociti senza infiammazione e/o danno epatocitario (balloning degli epatociti) steatoepatite (NASH), definita come steatosi epatica e infiammazione con danno epatocitario (balloning degli epatociti) con o senza presenza di fibrosi [28]. La NASH può progredire in cirrosi e, talora, in epatocarcinoma (HCC) (Figura 1 Evoluzione della NAFLD) [29]. E' ormai noto che la NAFLD si associa significativamente ad un aumentato rischio cardiovascolare (considerato che la malattia cardiovascolare rappresenta ad oggi la principale causa di morte dei pazienti affetti da NAFLD/NASH) [30] ed ad un maggiore rischio di sviluppare malattia renale cronica (CKD), indipendentemente dalla coesistenza di altri fattori di rischio cardiometabolico [31].

La prevalenza globale della NAFLD (diagnosticata mediante ecografia o con altre metodiche radiologiche) nella popolazione generale è di circa il 25% con una prevalenza più alta in Medio Oriente (32%) e Sud America (30%) e più bassa in Africa (14%) [27]. Per quanto riguarda invece la NASH, la sua prevalenza nella popolazione generale è più difficile da stimare, poiché la diagnosi prevede necessariamente il ricorso alla biopsia epatica. La NAFLD è frequentemente associata a molteplici fattori di rischio cardiometabolico, tra cui sovrappeso/obesità addominale, diabete mellito tipo 2, dislipidemia ed ipertensione arteriosa [29]. La maggior parte di queste condizioni sono tipicamente presenti nella

sindrome metabolica [32]. Circa il 50% dei pazienti con NAFLD e l'80% dei pazienti con NASH sono obesi [33] pertanto, sovrappeso ed obesità sono degli importanti fattori di rischio per la NAFLD [34]. Anche i pazienti con diabete tipo 2 hanno una prevalenza di NAFLD molto elevata, a supporto di questa evidenza due recenti meta-analisi hanno suggerito che la prevalenza della NAFLD nei pazienti con diabete tipo 2 è complessivamente del 55-60% [35]. E' stato inoltre dimostrato che la prevalenza di NAFLD e la sua severità aumentano progressivamente con l'avanzare dell'età, raggiungendo un picco nell'età compresa tra i 45 e 64 anni [36]. La coesistenza di un'inflammatione cronica ed il peggioramento dei coesistenti fattori di rischio metabolici aumentano sostanzialmente il rischio di progressione della NAFLD verso le forme più avanzate di patologia epatica [31]. Tra i pazienti con NASH, una elevata percentuale presenta una fibrosi epatica stabile, il tasso di progressione della fibrosi è piuttosto lento, ed è stato calcolato essere di 1 stadio di fibrosi in 14 anni di follow-up nei pazienti con NAFLD e 1 stadio in 7 anni di follow-up nei pazienti con NASH. Tuttavia, è importante ricordare che sono state descritte importanti variazioni individuali, con alcuni pazienti che progrediscono più velocemente in relazione alla coesistenza di diversi fattori di rischio, tra cui fattori genetici, ambientali ed inerenti allo stile di vita [32]. Importanti fattori clinici di rischio di aumentata progressione della NAFLD a NASH e cirrosi sono l'età (>45 anni), l'obesità, la sindrome metabolica, l'insulino-resistenza e la presenza di diabete mellito tipo 2 [33]. Tuttavia, solo una minoranza dei pazienti con NAFLD svilupperà complicanze epatiche severe nel corso della loro vita, e tra queste solo il 5-10% morirà per complicanze legate alla cirrosi e l'1-5% per HCC [6].

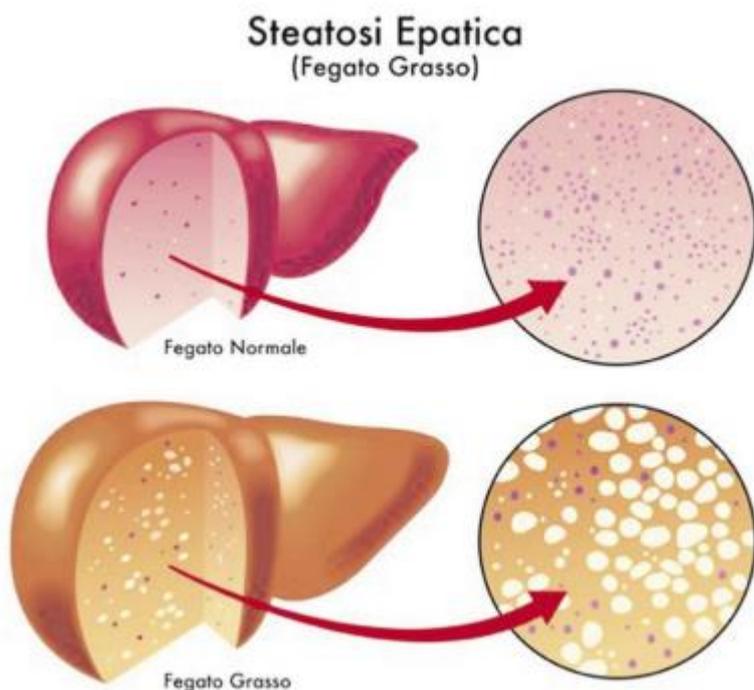
Figura 1 Evoluzione della NAFLD



2.2 Fisiopatologia della NAFLD

Istologicamente la NAFLD è definita dall'accumulo di grasso, principalmente sotto forma di trigliceridi (TG), all'interno degli epatociti (Figura 2). I TG depositati nel fegato derivano dagli acidi grassi liberi (FFA) che provengono da tre fonti principali: FFA della dieta, FFA rilasciati dalla lipolisi periferica del tessuto adiposo e FFA prodotti dalla lipogenesi epatica de novo, che favorisce la sintesi degli FFA all'interno degli epatociti, utilizzando altri substrati alternativi, ad es. carboidrati. Negli epatociti, gli FFA, tramite la acil-CoA sintetasi, vengono trasformati in acilCoA grassi, che vengono successivamente utilizzati per loro esterificazione con il glicerolo; in alternativa, se è necessaria maggiore energia negli epatociti, gli acilCoA grassi vengono ossidati a livello mitocondriale (β -ossidazione) [37]. Quando vi è un eccesso di FFA negli epatociti, la capacità di β -ossidazione si satura, e può quindi verificarsi un processo di perossidazione lipidica [34]. Il risultato di questo processo è l'aumentata produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che danneggiano il DNA e promuovono ulteriormente la perossidazione e l'infiammazione dei lipidi e proteine [38]. L'eccessivo accumulo di TG negli epatociti ostacola anche l'attività della proteina di trasferimento dei trigliceridi microsomiali (MTTP), un enzima che promuove il trasporto e l'esportazione dei TG epatici alle particelle VLDL. L'alterato trasporto/esporto dei TG può verificarsi anche a causa di mutazioni specifiche nel gene MTTP e/o come conseguenza dell'uso di alcuni farmaci [39]. Quando gli epatociti non sono più in grado di smaltire l'eccessivo afflusso di TG, la lipotossicità, la generazione di ROS, l'infiammazione e la disfunzione epatocitaria provocano lo sviluppo della NASH [40]. L'infiammazione cronica di lunga durata con associato stress ossidativo, danno al DNA ed apoptosi favoriscono l'aumento della fibrogenesi epatica, che a sua volta determina la progressione della NAFLD verso la fibrosi avanzata, cirrosi e, in taluni casi, HCC.

Figura 2 La Steatosi Epatica



Diversi fattori, come la predisposizione genetica, le alterazioni epigenetiche, gli stimoli anabolici, le variazioni delle adipochine, le modificazioni del microbiota intestinale possono essere implicati nella progressione della NAFLD verso forme di epatopatia più avanzata [41;42]. In particolare, in base all'ipotesi del "parallel multiple-hit model", vari fattori di rischio come obesità, stile di vita sedentario, dieta ricca di grassi, insulino-resistenza, accumulo di lipidi epatici ed alterazioni del microbiota intestinale possono agire contemporaneamente ed in maniera sinergica, portando allo sviluppo di steatosi, infiammazione e fibrosi epatica [43]. Una dieta ricca di carboidrati e/o grassi porta frequentemente all'iper-accumulo di grasso nel fegato, fornendo il punto di partenza della patogenesi della NAFLD [44]. Il tessuto adiposo è considerato un importante organo endocrino, che è in grado di produrre e secernere molteplici adipochine, come adiponectina e leptina, e citochine pro-infiammatorie, come l'interleuchina-6 (IL-6) ed il fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α) [45]. L'adiponectina esercita attività insulino-sensibilizzanti, anti-infiammatorie ed anche effetti anti-fibrotici, sopprimendo la produzione di citochine pro-infiammatorie principalmente attraverso l'inibizione del fattore nucleare κ B (NF- κ B) [46]. Ridotti livelli di adiponectina sono frequentemente associati all'obesità ed alla severità della NAFLD [47]. La leptina stimola l'ossidazione degli FFA e l'uptake del glucosio ed è in grado di prevenire l'accumulo

degli FFA nel fegato, riducendo l'espressione di SREBP-1 [48]. Contrariamente all'adiponectina, i livelli di leptina sono positivamente associati all'obesità ed alla severità della NAFLD [49]. L'obesità porta ad ipertrofia degli adipociti che, diventando disfunzionali, producono e rilasciano in circolo un eccesso di citochine pro-infiammatorie con riduzione di quelle anti-infiammatorie e inducendo di conseguenza nel fegato una condizione di infiammazione cronica di basso grado [45]. Un fattore chiave nella patogenesi della NAFLD è la insulino-resistenza sistemica (IR), che da un lato induce una aumentata lipolisi nel tessuto adiposo con conseguente aumentato afflusso epatico di FFA [37] e dall'altro promuove la lipogenesi epatica de novo, con conseguente ulteriore accumulo di TG nel fegato [50]. L'IR è anche strettamente associata alla resistenza alla leptina che si incontra comunemente negli individui obesi ed all'infiltrazione epatica di macrofagi che producono citochine pro-infiammatorie [51]. La predisposizione genetica può potenziare l'effetto deleterio dei suddetti fattori di rischio sullo sviluppo della NAFLD, attraverso la modulazione ed espressione di molteplici geni, che promuovono la disfunzione epatocellulare, l'iperaccumulo epatico di TG, l'infiammazione cronica, l'apoptosi e la fibrosi. I due principali geni i cui polimorfismi sono stati associati ad un aumentato rischio di sviluppo e progressione della NAFLD sono il PNPLA3 (patatin-like phospholipase domain-containing protein 3) e TM6SF2 (trans-membrane 6 superfamily member 2). PNPLA3 codifica per l'adiponutrina, che è un enzima con attività di idrolasi dei TG, altamente espressa negli epatociti ed adipociti dove questa proteina è principalmente coinvolta nel rimodellamento dei TG e dei fosfolipidi in risposta all'alimentazione. In particolare, un polimorfismo comune in PNPLA3, rs738409 (I148 M), è stato fortemente associato ad un aumento del rischio di NAFLD, cirrosi e HCC [52]. Al contrario, il ruolo esatto del TM6SF2 nella patogenesi della NAFLD non è ancora del tutto chiarito, ma è stato riportato che la variante rs58542926 (E167 K) è associata ad un aumento del contenuto di TG intraepatici e ad una ridotta secrezione di VLDL-C, che sono entrambe delle alterazioni in grado di favorire la comparsa di steatosi epatica [53]. I soggetti maggiormente a rischio di progressione della NAFLD presentano un'infiammazione cronica potenziata da coesistenti fattori di rischio metabolico [54]. La progressione della fibrosi è un processo sostanzialmente lento e graduale che può essere accelerato dalla presenza di fattori di rischio genetici [55-56].

2.3 Patologie e complicanze associate alla NAFLD

2.3.1 NAFLD e obesità

Le evidenze scientifiche dimostrano che l'obesità ha un ruolo rilevante sia nel processo iniziale che determina la comparsa della NAFLD, sia nella sua progressione verso la NASH [44]. Quando la capacità del tessuto adiposo di immagazzinare l'energia in eccesso è limitata, come accade nei soggetti obesi, gli epatociti svolgono una funzione simile agli adipociti, immagazzinando i lipidi in eccesso, principalmente sotto forma di trigliceridi, favorendo così lo sviluppo della NAFLD [57]. L' eccesso di acidi FFA risultante dalla lipolisi accelerata e dal ridotto assorbimento di acidi grassi nel tessuto adiposo sottocutaneo porta all'accumulo di grasso ectopico (specie nel fegato e muscolo scheletrico) e, successivamente, all'insulino-resistenza [58]. Gli FFA rappresentano il principale substrato per la sintesi dei TG intraepatici. Gli FFA derivano in parte dalla dieta (circa il 15%) ed in gran parte dalla lipolisi del tessuto adiposo (circa il 60%), ma anche dalla lipogenesi de novo all'interno dell'epatocita (circa il 25%) [59]. La lipotossicità e la glucotossicità, due processi che iniziano con l'esposizione degli epatociti a livelli elevati di lipidi e carboidrati, rispettivamente, giocano un ruolo centrale sia nello sviluppo della NAFLD che nella successiva progressione a NASH. Una dieta ricca di grassi e carboidrati, tipica del soggetto obeso, predispone ad un aumentato rischio di sviluppare NAFLD e NASH. Il rilascio di FFA da adipociti disfunzionali e resistenti all'insulina porta a lipotossicità, che è indotta dall'accumulo ectopico di metaboliti tossici derivati dai trigliceridi e dalla conseguente attivazione di vie infiammatorie, disfunzione cellulare e lipo-apoptosi; la mancanza della capacità degli epatociti di smaltire gli FFA in eccesso induce apoptosi, che è una caratteristica essenziale della NASH [60]. Se l'obesità non viene trattata, la NAFLD può progredire verso la NASH attraverso l'avvio di un processo pro-infiammatorio epatico che può essere considerato come la conseguenza di un processo adattativo contro-regolatorio non riuscito per limitare lo sviluppo della steatosi epatica [44]. Durante tale processo, le cellule epatiche deputate all'immunità innata: le cellule di Kupffer, le cellule dendritiche e le cellule stellate (HSC) vengono attivate e il fegato viene progressivamente infiltrato da cellule immunitarie, inclusi neutrofili,

monociti, linfociti T e principalmente macrofagi [61]. In tale contesto le cellule immunitarie rilasciano molteplici citochine che potenziano ulteriormente il processo infiammatorio, e contribuiscono alla fibrosi epatica [45]. A seguito di un danno epatico, le cellule immunitarie “dialogano” con quelle riparatrici, ossia le cellule endoteliali attivate, i mio-fibroblasti e le cellule progenitrici degli epatociti, agendo in maniera sincrona e mirando alla rigenerazione dei tessuti [62]. In circostanze normali, questo meccanismo contro-regolatorio riesce a sostituire gli epatociti che sono andati incontro a necrosi ed apoptosi. Quando questo meccanismo fallisce (ad esempio in caso di obesità severa), si attiva la fibrogenesi epatica, forse come uno tentativo infruttuoso di riparare il danno epatico e di indurre la rigenerazione dei tessuti. La cirrosi e l’HCC sono i risultati finali di risposte persistenti e mal adattative di questi processi. L’associazione indipendente tra obesità e NAFLD è stata convalidata da due meta-analisi, una composta da 21 studi di coorte [63] e l’altra composta da 21 studi osservazionali, principalmente studi caso-controllo e cross sectional [64]. Nel primo studio, i soggetti obesi avevano un rischio relativo di NAFLD 3,5 volte più alto rispetto agli individui magri indipendentemente dalla coesistenza di altri fattori di rischio. Nello stesso studio è stata documentata la presenza di un’associazione dose-dipendente tra BMI e rischio di NAFLD, con un incremento del rischio relativo di NAFLD che aumentava di 1,2 per ogni aumento di 1 unità in BMI [63]. La seconda meta-analisi ha invece dimostrato da un lato un rischio relativo aumentato di oltre due volte di sviluppare NAFLD in persone con BMI e circonferenza vita elevati [64] dall’altro un’associazione dose-dipendente tra BMI e/o circonferenza della vita e rischio di NAFLD, essendo di 1.3 e 1.1 l’aumento del rischio di NAFLD per ogni aumento rispettivamente di 1 unità BMI e circonferenza della vita [64]. L’obesità è stata associata ad un aumentato rischio di cancro in generale e all’HCC in particolare [65], i soggetti obesi infatti presentano una malattia epatica che ha una prognosi peggiore rispetto ai pazienti NAFLD non obesi. Più specificamente, durante un follow-up di 4 anni, i tassi di eventi clinici importanti, inclusi morte, ictus, infarto miocardico, HCC e altri tumori maligni, erano complessivamente più elevati negli obesi con NAFLD rispetto a quelli non obesi (12% e 8%, rispettivamente); in particolare, i decessi (2,6%) e lo sviluppo di HCC (0,9%) era osservato solo nel gruppo degli obesi [66]. Negli obesi è quindi mandatorio il follow-up ed il trattamento anche della NAFLD. È importante trattare l’eccesso ponderale, in primis con

dieta ed esercizio fisico, e se non sono sufficienti, è raccomandata attualmente la terapia farmacologica nei soggetti con BMI ≥ 30 kg / m² o in quelli con BMI ≥ 27 kg / m² e comorbidità correlate all'obesità. Se anche la combinazione di modifica dello stile di vita e farmacoterapia dovesse fallire, è necessario prendere in considerazione la chirurgia bariatrica in particolare nei soggetti con BMI ≥ 40 kg / m² o in quelli con BMI ≥ 35 kg / m² e comorbidità correlate all'obesità [67].

2.3.2 La NAFLD nei soggetti non obesi: "Lean NAFLD"

Il termine NAFLD "magra" (Lean NAFLD) si riferisce a pazienti con un BMI all'interno del cut-off etnico specifico del peso normale. È verosimile che la NAFLD "magra" comprenda una coorte di soggetti NAFLD eterogenea, associata a fattori ambientali e genetici, nonché differenze nella distribuzione del grasso e nella composizione corporea [68]. Essa rappresenta il 5-26% dei casi totali di NAFLD nella popolazione asiatica ed il 7-20% nelle aree occidentali [68]. Una recente meta-analisi di 33 studi osservazionali su popolazioni originarie di 14 differenti Stati hanno riportato una prevalenza globale di NAFLD in soggetti magri (BMI < 23 kg/m² per soggetti Asiatici e BMI < 25 kg/m² per soggetti non Asiatici) del 9.7% (95% CI: 7,7-11,8%), con un trend in crescita fra il 1988 ed il 2017 [69]. Il tasso di comorbidità nei soggetti Lean-NAFLD è inferiore rispetto ai pazienti obesi, ma superiore rispetto ai controlli sani [70, 71]. I dati sulla gravità istologica sono controversi; questi pazienti possono comunque sviluppare l'intero spettro delle malattie del fegato associate alla NASH [72] ed hanno simili outcomes negativi sulla salute se esaminati longitudinalmente [73, 74].

2.3.3 La NAFLD ed il rischio cardiometabolico

La NAFLD rappresenta un fattore di rischio cardiovascolare indipendente. Da studi prospettici condotti su larga popolazione è stato evidenziato che l'incidenza di morte o eventi cardiovascolari è quasi doppia nei pazienti con livelli più elevati di transaminasi rispetto ai soggetti con livelli normali. L'associazione tra NAFLD e vasculopatia (carotidea precoce ed avanzata) è risultata indipendente dai classici fattori di rischio, dal controllo glicemico, dall'uso dei farmaci e dalla presenza di sindrome metabolica (75-79).

Esistono, quindi, numerosi indizi a favore di una correlazione patogenetica tra NAFLD e aterosclerosi anche se manca una dimostrazione rigorosa, basata su studi prospettici condotti sulla popolazione generale. Lo spettro delle complicanze cardiovascolari associate alla NAFLD comprende inoltre ipertrofia del ventricolo sinistro con disfunzione ventricolare sinistra e conseguente scompenso cardiaco congestizio ed aumentato rischio di aritmie (principalmente fibrillazione atriale)(75-79). Pertanto i soggetti affetti da NAFLD dovrebbero periodicamente sottoporsi ad indagini clinico-strumentali volte a valutare la presenza di cofattori di rischio cardiovascolare (ipertensione arteriosa, dislipidemia, diabete mellito) ed il grado di interessamento cardiovascolare (ecocolordoppler dei tronchi sovra-aortici, ecocardiografia, test da sforzo). In presenza di vasculopatia e diabete, è da tenere inoltre presente l'aumentato rischio di insufficienza renale cronica (75-79) .

2.3.4 La NAFLD e l'insorgenza di tumori a sede intra-extraepatica

La NAFLD è la terza causa più comune di HCC negli Stati Uniti, dopo l'epatite C e le malattie alcol correlate, rappresentando il 14,1% di tutti i casi [80]. L'incidenza cumulativa dell'HCC associato alla NAFLD varia dal 2,4% al 12,8% in un periodo di follow-up mediano di 3,2-7,2 anni [47 81], corrispondente a 0,44 (intervallo 0,29-0,66) per 1.000 anni-persona, in aumento ad un tasso annuo del 9% [80;82]. I pazienti NAFLD con fibrosi agli stadi F3 e F4 hanno un rischio di HCC quasi 7 volte maggiore rispetto alle persone senza malattia epatica [81] ed il rischio è 10 volte maggiore in associazione a DM2 ed obesità [83], cosa che rende la NAFLD la seconda causa principale di trapianto di fegato (LT) per HCC negli Stati Uniti e l'indicazione al trapianto in più rapido aumento [84]. Alla diagnosi, i pazienti con HCC correlato a NAFLD sono più anziani, hanno una maggiore prevalenza di comorbidità extraepatiche ma una minore prevalenza di cirrosi (assenza di cirrosi fino a 1/3 dei casi) e un tempo di sopravvivenza più breve [81], avendo maggiore probabilità di morire per il loro tumore epatico primitivo rispetto ad altri pazienti con HCC [80]. Queste situazioni sono probabilmente condizionate da una sorveglianza meno sistematica, che porta ad una diagnosi in stadi più avanzati e ad un minor numero di trattamenti [85]. Altri tumori extraepatici sono allo stesso modo aumentati, vale a dire i tumori uterini (IRR = 2,3; IC 95% 1,4, 4,1),

gastrici (IRR = 2,3; IC 95% 1,3, 4,1), pancreatici (IRR = 2,0; IC 95% 1.2, 3.3) e del colon (IRR = 1.8; 95% CI 1.1, 2.8)[85]. L'associazione con il rischio di cancro è più forte nella NAFLD che nell'obesità [85].

2.3.5 Mortalità e morbilità della NAFLD

I pazienti con NAFLD hanno un aumento della mortalità complessiva rispetto alle popolazioni di controllo senza NAFLD [27, 28 86;87]. La presenza di NASH (hazard ratio aggiustato [adjHR], 9.16), l'avanzare dell'età (adjHR, 1.06) e la presenza di DMT2 (adjHR, 2.09) aumentano la mortalità. La mortalità fegato-correlata è stimata a 0,8 per 1.000 anni-persona (intervallo 0,3-1,8) nella NAFLD e 11,8 (intervallo 7,1-19,5) nella NASH [88]. La malattia cardiovascolare (cardiovascular disease: CVD) resta la causa di morte più comune, indipendentemente da altre comorbidità metaboliche [29, 30 89;90], sostenuta dal profilo aterogeno e dalle complicanze cardiovascolari diffuse [90-92], indipendentemente da altri fattori di rischio noti [14;93]. Lo stadio di fibrosi è dimostrato essere il più forte predittore di mortalità per CVD e patologie fegato-correlate in una coorte di NAFLD diagnosticata con biopsia dopo un follow-up massimo di 33 anni [94].

2.3.6 Confronto tra NAFLD e MAFLD

Quando la Steatosi epatica risulta essere associata ad una delle seguenti condizioni cliniche: obesità, diabete o ipertensione arteriosa, si parla di steatosi epatica associata a disfunzione metabolica. La steatosi epatica metabolica (MAFLD, metabolic-dysfunction associated fatty liver disease) è un nuovo concetto proposto da una consensus internazionale nel 2020 [95]. La diagnosi di MAFLD è significativamente diversa dai precedenti criteri diagnostici per la NAFLD. Le due differenze più importanti e significative tra MAFLD e NAFLD sono che per la diagnosi di MAFLD da un lato non è richiesta l'esclusione di pazienti con assunzione di alcol o con presenza di malattie epatiche croniche e dall'altro la presenza di anomalie metaboliche è un criterio necessario per la diagnosi stessa [96;97]. Ad oggi tuttavia risulta ancora molto difficile sostituire il concetto di NAFLD con quello di MAFLD in

quanto sebbene i pazienti con diagnosi di MAFLD e NAFLD per lo più si sovrappongono, le popolazioni MAFLD e NAFLD non sono identiche.

3. Obiettivi dello studio

- investigare la prevalenza di NAFLD e della MAFLD in una popolazione di donne affette da carcinoma della mammella rispetto a donne con patologia mammaria benigna;
- valutare la possibile associazione tra carcinoma mammario, steatosi epatica e fibrosi epatica esaminando fattori clinico-metabolici ed istologici in pazienti con prima diagnosi di carcinoma mammario.

4. Materiali e Metodi

Abbiamo condotto uno studio prospettico, monocentrico, caso-controllo, considerando pazienti con patologia senologica afferenti al Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Sapienza Università di Roma, Italia. Tutte le donne arruolate sono state sottoposte ad intervento chirurgico senologico in elezione nel periodo compreso tra novembre 2019 e giugno 2022. Nella fase preoperatoria è stata eseguita una accurata valutazione radiologica tramite ecografia mammaria e mammografia bilaterale, e successiva attribuzione del BIRADS. Le donne con neof ormazione mammaria BIRADS 3,4,5 sono state, poi, sottoposte a biopsia tru-cut preoperatoria per una diagnosi istologica. L'indicazione chirurgica ed il tipo di intervento sono stati pianificati durante gli incontri del team senologico multidisciplinare. I criteri di esclusione prevedevano un consumo eccessivo di alcol (assunzione di > 20 g/die), storia di malattie croniche (i.e. epatopatia cronica, cirrosi epatica, pancreatite cronica, malattia renale cronica, AIDS), disturbi metabolici causati da trattamento farmacologico nell'ultimo anno, terapia ormonale sostitutiva, malattia metastatica e/o storia di pregressa neoplasia maligna. Previo consenso informato di tutte le pazienti arruolate, dati demografici, antropometrici e clinici sono stati registrati ed inseriti in forma anonima in un database in attesa di successiva elaborazione. Sulla base dell'esame istologico definitivo

dell'intervento chirurgico le pazienti sono state suddivise in due gruppi: diagnosi di carcinoma mammario (Gruppo M) e diagnosi di neoplasia mammaria benigna (Gruppo B).

4.1 Valutazioni antropometriche e metaboliche

Sono stati raccolti i dati relativi all'età, all'altezza (cm), al peso (kg), all'indice di massa corporea (BMI Kg/m²), alla circonferenza vita (cm). In accordo con i criteri della World Health Organization, un BMI \geq 30 è stato considerato deponente per obesità, \geq 25 per sovrappeso e $<$ 25 per normopeso [99]. La circonferenza vita è stata misurata mediante un centimetro posizionato orizzontalmente intorno all'addome a livello del punto medio tra l'ultima costa e la cresta iliaca. Un cut-off $>$ 88 cm è stato considerato deponente per obesità viscerale [100-102].

A digiuno le pazienti hanno eseguito un prelievo ematico per emocromo, glicemia, insulinemia, emoglobina glicata, transaminasi, GGT, bilirubina totale, diretta ed indiretta, albuminemia, colesterolemia totale e HDL e LDL, trigliceridi sierici, LDH, HbsAg e HCvAb. La valutazione del *Homeostasis Model Assessment-IR* è stato calcolato mediante la formula $HOMA-IR = [insulinemia\ a\ digiuno\ (\mu U/l) \times glicemia\ a\ digiuno\ (mg/dl) \times 0.0555] / 22.5$ ed un valore di HOMA-IR uguale o superiore a 2.5 è stato considerato indice di insulino-resistenza [103,104]. Una condizione di sindrome metabolica è stata documentata in accordo con i criteri ATP III (NCEP) [105], ossia presenza di almeno 3 dei seguenti 5 criteri: circonferenza vita $>$ 88 cm nelle donne; valore di trigliceridi sierici \geq 150 mg/dL, colesterolo HDL $<$ 50 mg/dL nelle donne, glicemia $>$ 110 mg/dL e pressione \geq 130/85 mmHg. I valori pressori sistoliche sono stati misurati tre volte, in accordo all' *US Preventive Services Task Force Recommendation Statement* (2015) [106] ricorrendo ad uno sfigmomanometro standard. L'ipertensione arteriosa sistemica è stata considerata in caso di assunzione di antiipertensivi riferita dalla paziente o in caso di valori sistoliche \geq 130/85 mmHg, in accordo ai criteri ATP III per la sindrome metabolica.

4.2 Diagnosi di NAFLD

Tutte le pazienti sono state sottoposte ad ecografia epatica con elastosonografia, eseguita con ecografo Siemens Healthineers Acuson Juniper GE e sonda convex 5C1 3,4 MHz. Le valutazioni ultrasonografiche di nostro interesse sono state: lo Score di Hamaguchi e l'esame elastosonografico ARFI, eseguite in cieco da un singolo ecografista con un'*expertise* superiore a 5 anni, al fine di abbattere l'intervariabilità operatore-dipendente. Si è proceduto, inoltre, al calcolo del Hepatic Steatosis Index (HSI) e del Fatty Liver Index (FLI), indici di steatosi epatica derivati a partire dagli esami ematochimici.

4.2.1 La diagnosi ecografica di NAFLD

L'ecografia epatica rappresenta la prima linea diagnostica per la valutazione della steatosi epatica, essendo una metodica più diffusa e più economica rispetto alla risonanza magnetica "proton density fat fraction" (PDFF) considerata il gold standard diagnostico per steatosi epatica. Durante le scansioni ecografiche secondo tecnica di Hamaguchi [107] il radiologo attribuisce dei punteggi (Figura 3) alle seguenti variabili: A) il contrasto epato-renale e la brillantezza epatica (punteggio da 0 a 3), B) l'attenuazione profonda degli echi ecografici (punteggio da 0 a 2) e C) la scarsa visibilità dei vasi intraepatici (punteggio da 0 a 1). Un punteggio totale, identificato come Hamaguchi Score, superiore o uguale ad 1 ci permette una diagnosi di NAFLD, punteggi compresi tra 1 e 2 sono indicativi di steatosi lieve, 3 e 4 steatosi moderata, 5 e 6 steatosi severa [107]. La tecnica sec. ARFI [108], invece, permette la misurazione dell'elasticità epatica nel corso di un'ecografia convenzionale ed ha come obiettivo quello di valutare la "stiffness" epatica che rappresenta un segno diretto di fibrosi epatica. L'esame viene eseguito in decubito laterale sinistro, in respiro spontaneo o in apnea. Il radiologo esegue 10 misurazioni a 3 cm di profondità dalla capsula glissoniana. Il punteggio finale è la mediana delle 10 misurazioni eseguite ed è espresso in kPa [109]. Valori < 8 kPa indicano un basso rischio di fibrosi, valori compresi tra 8-12 kPa un rischio intermedio di fibrosi, valori > 12 kPa un alto rischio di fibrosi [108,109].

Figura 3 Hamaguchi Score

A: Bright liver and hepatorenal echo contrast	Score of A
0: Bright liver and hepatorenal echo contrast were negative	<input type="text"/>
1: Either bright liver was positive or hepatorenal echo contrast was positive.	
2: Bright liver was mild, and hepatorenal echo contrast was positive.	
3: Bright liver was severe, and hepatorenal echo contrast was positive.	
B: Deep attenuation	Score of B
0: Deep attenuation was negative.	<input type="text"/>
1: Visualization of the diaphragm was obscure, but a observer could distinguish the diaphragm.	
2: A observer couldn't distinguish the diaphragm.	
C: Vessel blurring	Score of C
0: Vessel blurring was negative.	<input type="text"/>
1: The borders of intrahepatic vessels were unclear and the lumen of intrahepatic vessels was narrowed.	

Sum score of A, B, and C, if score of A is more than one.	Total score
Total score is 0, if score of A is zero.	<input type="text"/>

4.2.2 Indici di NAFLD

FLI (Fatty Liver Index) e HSI (Hepatic Steatosis Index) rappresentano due accurati indicatori di steatosi epatica in assenza di dati radiologici ed istologici (Figura 4). L'indice FLI è un algoritmo che correla le seguenti variabili: trigliceridi, BMI, CV e gGT, e fornisce una valutazione facilmente accessibile e riproducibile della NAFLD con una elevata accuratezza (0.84; intervallo di confidenza al 95% [CI], 0,81–0,87)[110]. Valori di FLI < 30 ci permettono di escludere steatosi epatica con una sensibilità dell' 87%, mentre valori di FLI ≥ 60 indicano la presenza di steatosi con una specificità dell' 86% [110]. L'indice HSI invece considera le seguenti variabili: transaminasi, BMI, sesso, presenza o meno di diabete mellito. Valori di HSI < 30 ci permettono di escludere la steatosi nel 93.1% dei casi (sensibilità) al contrario valori di HSI > 36 indicano steatosi nel 92.4% casi (specificità) [111].

Figura 4 Indici di Steatosi epatica: FLI e HSI

Score	Scopo	Calcolo	Soglie
FLI = Fatty Liver Index	Determinazione presenza steatosi	$\frac{e^{0.953 \cdot \log_e(\text{trigliceridi} + 0.139 \cdot \text{BMI} + 0.718 \cdot \log_e(\text{gGT}) + 0.053 \cdot \text{circonferenza addominale} - 15.745)}}{1 + e^{0.953 \cdot \log_e(\text{trigliceridi} + 0.139 \cdot \text{BMI} + 0.718 \cdot \log_e(\text{gGT}) + 0.053 \cdot \text{circonferenza addominale} - 15.745)}} \cdot 100$	< 30 esclude steatosi ≥ 60 indica steatosi
HSI = Hepatic Steatosis Index	Determinazione presenza steatosi	$8 \times (\text{ALT/AST ratio}) + \text{BMI}$ (+2, se donna; +2, se diabetico)	< 30 esclude steatosi > 36 indica steatosi

4.3 Diagnosi di MAFLD

In pieno accordo con quanto definito dalla Consensus del 2020 [95-97] una condizione di MAFLD è stata documentata in caso di steatosi epatica e coesistenza di almeno uno dei seguenti tre criteri aggiuntivi:

- Sovrappeso/Obesità
- DMD2 (Diabete Mellito di tipo 2)
- Evidenza di alterazioni metaboliche che includono aumento della CV, ipertensione arteriosa, dislipidemia ed insulino resistenza

4.4 Valutazione dell'attività fisica

Tutte le pazienti sono state sottoposte alla valutazione dello stato di attività fisica mediante somministrazione del questionario General Practice Physical Activity Questionnaire (GPPAQ) (Figura 5) [112]. Il GPPAQ è un breve questionario di autovalutazione che indaga 3 diversi campi: i) attività fisica legata alla propria professione, ii) attività fisica di tipo non agonistico nel tempo libero (es. esercizio fisico, ciclismo, lavori domestici, giardinaggio), iii) passo della camminata. In base alle risposte le pazienti sono state classificate in quattro categorie: "attive", "moderatamente attive", "moderatamente inattive", "inattive" [112-124].

Figura 5 General Practice Physical Activity Questionnaire



General Practice Physical Activity Questionnaire

Date.....

Name.....

1. Please tell us the type and amount of physical activity involved in your work.

		Please mark one box only
a	I am not in employment (e.g. retired, retired for health reasons, unemployed, full-time carer etc.)	
b	I spend most of my time at work sitting (such as in an office)	
c	I spend most of my time at work standing or walking. However, my work does not require much intense physical effort (e.g. shop assistant, hairdresser, security guard, childminder, etc.)	
d	My work involves definite physical effort including handling of heavy objects and use of tools (e.g. plumber, electrician, carpenter, cleaner, hospital nurse, gardener, postal delivery workers etc.)	
e	My work involves vigorous physical activity including handling of very heavy objects (e.g. scaffolder, construction worker, refuse collector, etc.)	

2. During the *last week*, how many hours did you spend on each of the following activities?
Please answer whether you are in employment or not

Please mark one box only on each row

		None	Some but less than 1 hour	1 hour but less than 3 hours	3 hours or more
a	Physical exercise such as swimming, jogging, aerobics, football, tennis, gym workout etc.				
b	Cycling, including cycling to work and during leisure time				
c	Walking, including walking to work, shopping, for pleasure etc.				
d	Housework/Childcare				
e	Gardening/DIY				

3. How would you describe your usual walking pace? Please mark one box only.

Slow pace (i.e. less than 3 mph)	<input type="checkbox"/>	Steady average pace	<input type="checkbox"/>
Brisk pace	<input type="checkbox"/>	Fast pace (i.e. over 4mph)	<input type="checkbox"/>

4.5 Stadiazione e caratteristiche immunoistochimiche della neoplasia mammaria

L' estensione tumorale, il coinvolgimento linfonodale e la stadiazione sono state stabilite in accordo con l'ottava edizione del sistema di stadiazione prognostica dell' American Joint Committee [125]. La valutazione dell'aggressività tumorale e la sottoclassificazione del carcinoma mammario nei diversi bioprofili è stata eseguita in accordo con la consensus internazionale di St. Gallen [126]:

- Luminal A: ER e/o PgR + HER2 - ; Ki-67 basso(<14%)
- Luminal B : (HER2 negativi) ER e/o PgR + ; HER2 - ; Ki-67 alto ($\geq 14\%$)
(HER2 positivi) ER e/o PgR + ; qualunque Ki-67; HER2 amplificato
- "HER2 positivi (non luminali)": HER2 amplificato ER e PgR assenti
- Basal-like' "Triplo negativo": ER e PgR assenti, HER2 non amplificato

4.6 Analisi statistica

Le variabili quantitative sono state descritte utilizzando media e deviazione standard. Il t-student è stato utilizzato per confrontare le variabili quantitative tra i due gruppi. Le variabili qualitative sono state presentate in termini di frequenze assolute e percentuali. Il Chi-quadro o il test esatto di Fisher sono stati utilizzati come test di confronto delle variabili qualitative. Al fine di valutare la capacità degli score HSI, FLI (HSI > 36; FLI > 60) e dei criteri diagnostici di MAFLD nel riconoscere correttamente la condizione di NAFLD diagnosticata mediante elastosonografia epatica, sono state calcolate la sensibilità e la specificità delle tre metodiche. Allo scopo di valutare eventuali fattori di rischio o di protezione per la diagnosi di Carcinoma mammario è stato utilizzato un modello di regressione logistica multivariata in cui sono stati inseriti in modo progressivo tutti i fattori di rischio risultati statisticamente significativi nel modello univariato. L'analisi statistica è stata eseguita mediante il SAS® version 9.4 (SAS Institute Inc. 100 SAS Campus Drive Cary, NC, USA) and Stata™ version 8.2 (StataCorp LLC, College Station, TX, USA). Un p-value < 0.05 è stato considerato il cut off di significatività statistica.

5. Risultati

5.1 Caratteristiche cliniche e metaboliche delle pazienti

Un totale di 62 pazienti sono state arruolate, suddivise in 2 gruppi in base alla diagnosi istologica definitiva dell'intervento chirurgico senologico: 31 pazienti con diagnosi di carcinoma mammario (Gruppo M) e 31 pazienti con diagnosi di patologia mammaria benigna (Gruppo B). Le caratteristiche cliniche e metaboliche delle pazienti sono riportate nella **Tabella 1**. I due gruppi non differiscono per età (età media 53 anni nel Gruppo M vs età media 54 anni nel Gruppo B), altezza (altezza media 164 cm nel Gruppo M vs altezza media 163 cm nel Gruppo B), e per stato menopausale. Nel Gruppo M abbiamo registrato valori di CV e di BMI maggiori rispetto al Gruppo B ($p < 0.0001$ e $p = 0.0003$, rispettivamente), con una percentuale di donne in sovrappeso (BMI > 25 kg/m²) significativamente più alta nel gruppo M (65%) rispetto al gruppo B (10%) ($p < 0.0001$) (Tabella 1). In base alle comorbidità riferite e documentate durante l'arruolamento, le pazienti del gruppo M hanno presentato più frequentemente una diagnosi di ipertensione arteriosa ed un valore di glicemia a digiuno > 110 mg/dL rispetto alle pazienti del Gruppo B (Tabella 1). Relativamente all'insulino resistenza ed alle alterazioni del metabolismo lipidico abbiamo riscontrato valori di HOMA-IR index > 2.6 e di HDL < 50 mg/dL più frequentemente nel Gruppo M rispetto al gruppo B ($p = 0.05$). In accordo con i criteri di diagnosi di sindrome metabolica [105], nel Gruppo M abbiamo riscontrato tale condizione nel 19.3% delle pazienti mentre nessuna paziente del Gruppo B ne è risultata affetta ($p = 0.02$).

5.2 Prevalenza della NAFLD e della MAFLD

La condizione di NAFLD valutata attraverso l'ecotomografia addominale con elastosonografia epatica secondo lo score di Hamaguchi è stata documentata nel 61% delle pazienti del gruppo M e nel 26% delle pazienti appartenenti al Gruppo B ($p < 0.005$) (Tabella 2). In accordo alla severità clinica, nel gruppo M il 29% dei casi ha presentato steatosi lieve (Hamaguchi score 1), il 29 % ha presentato una steatosi moderata (Hamaguchi score 2) e il 3% dei casi una steatosi grave (Hamaguchi score 3). Al contrario, le

donne appartenenti al gruppo B presentavano nel 22.6 % dei casi una steatosi lieve (Hamaguchi score 1) e nel 3% una steatosi moderata (Hamaguchi score 2). Nessuna paziente del Gruppo B presentava steatosi grave con Hamaguchi score 3. Attraverso l'utilizzo degli indici HSI e FLI abbiamo documentato la condizione di NAFLD nel 19.3% delle donne del Gruppo M ed in nessuna paziente del Gruppo B con una significatività uguale per entrambi gli score ($p= 0.02$) (Tabella 2). La prevalenza della MAFLD, diagnosticata secondo i criteri diagnostici dell' international consensus panel [95] è risultata maggiore nel Gruppo M (48%) rispetto al Gruppo B (3.23%) ($p< 0.0001$) (Tabella 2). Successivamente è stata valutata nel nostro campione la specificità e la sensibilità sia degli score HSI ed FLI ($HSI> 36; FLI > 60$) sia dei criteri diagnostici di MAFLD rispetto alla diagnosi ecografica di NAFLD. La specificità e la sensibilità rilevata per gli score HSI ed FLI è stata rispettivamente del 100% e del 22.2% sia per un valore di HSI >36 e di FLI > 60 mentre la specificità e la sensibilità dei criteri diagnostici di MAFLD rispetto alla diagnosi ecografica di steatosi, sono risultate pari al 100% e al 59% rispettivamente.

5.3 Associazione tra caratteristiche istologiche ed immunoistochimiche e diagnosi di NAFLD

Le caratteristiche istologiche ed immunoistochimiche e la stadiazione neoplastica delle donne con diagnosi di carcinoma mammario sono riportate nelle **Tabelle 3 e 4**. Le pazienti appartenenti al Gruppo M sono state sottoposte a chirurgia mammaria conservativa e mastectomia rispettivamente nel 55% e nel 45% dei casi; la biopsia del linfonodo sentinella è stata eseguita nel 58% delle pazienti, la dissezione linfonodale nel 35% e nel 7% dei casi non c'era alcuna indicazione ad eseguire la chirurgia ascellare. L'esame istologico definitivo ha rivelato nel 16% delle pazienti la presenza di carcinoma in situ e nell' 84% la diagnosi di carcinoma infiltrante. Nello specifico, il bioprofilo più frequentemente riscontrato è stato l'istotipo luminale (Luminal A like 31%, Luminal B like 48%). La maggior parte delle pazienti presentava un early Breast Cancer (eBC): stadio pT1 nel 54,84% e pN0 nel 73,33% dei casi (Tabella 4). Valutando l'aggressività del tumore in base all'indice di proliferazione misurato con lo score ki-67 (cut-off $\geq 14\%$) [126], abbiamo riscontrato che le pazienti con diagnosi di NAFLD presentavano una neoplasia mammaria più aggressiva rispetto alle pazienti senza diagnosi di NAFLD ($p = 0.05$) (Tabella 5). Infine

nella stadiazione tumorale post-operatoria, le pazienti affette da NAFLD presentavano una neoplasia con dimensioni maggiori o uguale a 2 cm (T2) nel 42% dei casi rispetto alle donne senza NAFLD (8%) ($p=0.08$). Non sono emerse differenze significative in termini di coinvolgimento linfonodale, grading e bioprofilo tumorale (Tabella 5). Considerando la variabile menopausa infine, non sono emerse differenze significative in termini di caratteristiche tumorali nelle donne con carcinoma mammario e contestuale diagnosi di NAFLD (Tabella 5).

5.4 BiRADs e NAFLD

Prendendo in considerazione lo score radiologico preoperatorio abbiamo constatato che le donne con diagnosi di NAFLD avevano una maggiore percentuale di reperti BiRADS5 (40%) rispetto alle donne senza steatosi (5%) ($p=0.0001$) nelle quali, al contrario è più frequente uno score radiologico pre bioptico BiRADS3 (77% vs 25%; $p=0.0001$).

5.5 Confronto tra i due gruppi in base allo stato di attività fisica

Il 9% delle pazienti del gruppo M ha riportato un'attività fisica di tipo moderato al contrario il 42% delle donne con diagnosi di patologia mammaria benigna si è dimostrata "**moderatamente attiva**" al questionario GPPAQ (9% Gruppo M vs 42% Gruppo B, $p = 0.0037$) (Tabella 1).

Inoltre, solo il 3% delle pazienti del Gruppo M ha riportato un calo ponderale negli ultimi 6 mesi rispetto al 22,5 % del Gruppo B ($p = 0.05$) (Tabella 1).

5.6 Analisi di regressione logistica

Nella Tabella 6 è riportata l'analisi di regressione logistica univariata e multivariata.

Nel modello di regressione univariata il BMI >25 kg/m², l'aumento di peso corporeo, l'aumento della CV, valori elevati di insulina, valori di HOMA-IR index >2.6 , valori di HSI > 36 , valori di FLI > 60 , la diagnosi ecografica di NAFLD e una diagnosi di MAFLD risultano essere potenziali fattori di rischio associati alla diagnosi di carcinoma mammario. L'attività fisica, al contrario, si è dimostrata essere un fattore

protettivo. Nel modello multivariato, le variabili che risultano associate in modo significativo al rischio di carcinoma mammario sono la presenza di MAFLD (Adj OR 18.94), l'incremento della circonferenza vita (Adj OR 1.15, con un incremento di rischio del 15% per ogni cm di circonferenza vita in più) e l'incremento dell'indice HOMA (Adj OR 10.71, un incremento di rischio di quasi 11 volte maggiore per ogni incremento dell'indice di 1 punto).

6. Discussione

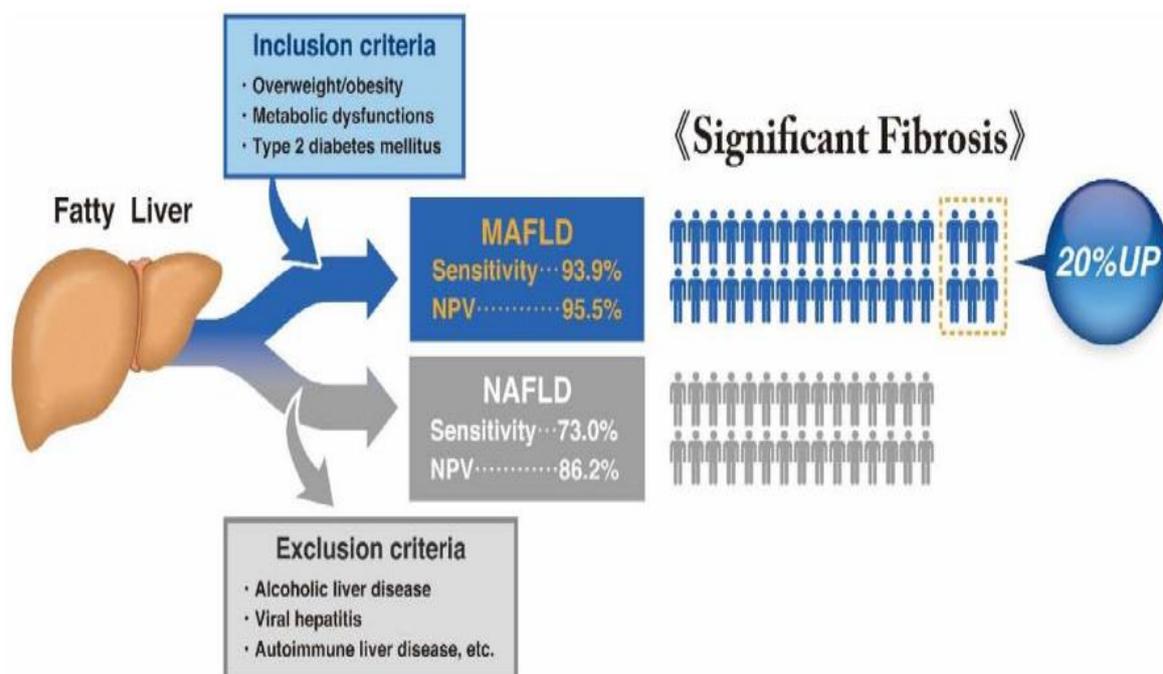
Questo è il primo studio che valuta la prevalenza della NAFLD e della MAFLD e l'associazione preoperatoria di tali condizioni con fattori clinico-metabolici ed istologici in donne candidate a chirurgia mammaria per tumore maligno e per patologia mammaria benigna. La maggior parte degli studi condotti ha investigato l'associazione della NAFLD con il carcinoma mammario in pazienti precedentemente sottoposte a terapia ormonale adiuvante [127-136]. Un numero esiguo di studi ha indagato l'associazione tra NAFLD ed il carcinoma mammario di nuova insorgenza [15,16,25,20,137] mentre un unico studio ha valutato l'associazione tra la MAFLD e il carcinoma mammario [138].

Nel nostro studio la prevalenza della NAFLD è risultata essere del 61% nelle donne con nuova diagnosi di carcinoma mammario e del 26% nelle donne con patologia mammaria benigna. Stratificando le pazienti in base allo score di Hamaguchi per la valutazione della steatosi epatica, le donne con patologia mammaria benigna presentavano solo un quadro di steatosi epatica lieve; al contrario, circa la metà delle pazienti con NAFLD e nuova diagnosi di carcinoma mammario presentavano un quadro di steatosi moderata. Questi dati sono in accordo con quanto riportato dalla letteratura. Bilici et al. [15] nel loro campione di studio ($n:45$) avevano documentato una prevalenza di NAFLD del 63% nelle donne con nuova diagnosi di tumore della mammella, mentre Nseir et al. [25] avevano riportato una prevalenza del 45 % in una corte di 133 donne con nuova diagnosi di carcinoma mammario.

L'utilizzo degli indici HSI e FLI si è rivelato uno strumento con una specificità del 100% per l'identificazione dei soggetti senza steatosi epatica ma non in grado di sostituire l'ecografia addominale con tecnica di elastosonografia, presentando una sensibilità del 22%. In nessuna delle donne arruolate è stata riscontrata la presenza di fibrosi epatica (Ecografia con elastosonografia sec. ARFI).

Nella nostra coorte la prevalenza della MAFLD è risultata essere del 48% nelle donne con carcinoma mammario, un valore inferiore rispetto alla prevalenza della NAFLD e maggiore se confrontato con la prevalenza di MAFLD stimata nella popolazione sana del continente europeo ed asiatico (39%) [139]. Sebbene la MAFLD e la NAFLD condividano molte alterazioni metaboliche (ref una già detta [138,140]), non è possibile sovrapporre totalmente i soggetti affetti da NAFLD con quelli che presentano MAFLD. La diagnosi di MAFLD è indipendente dal consumo alcolico e dalle coesistenti cause di malattia epatica cronica [96,97]. Pertanto, non stupisce che la prevalenza delle due condizioni non coincida. Nel nostro studio, avendo utilizzato dei criteri di esclusione, possiamo classificare i soggetti con NAFLD in due sottogruppi: donne con NAFLD senza alterazione metaboliche associate e donne affette da NAFLD con alterazioni metaboliche associate (MAFLD). I risultati ottenuti dall'analisi multivariata da noi condotta, in cui la MAFLD è risultata un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo del carcinoma mammario, possono essere spiegati dal fatto che i criteri diagnostici di MAFLD sono in grado di identificare un gruppo omogeneo di pazienti ad alto rischio di disfunzioni metaboliche [141] ed un maggior coinvolgimento epatico (Figura 6) [142].

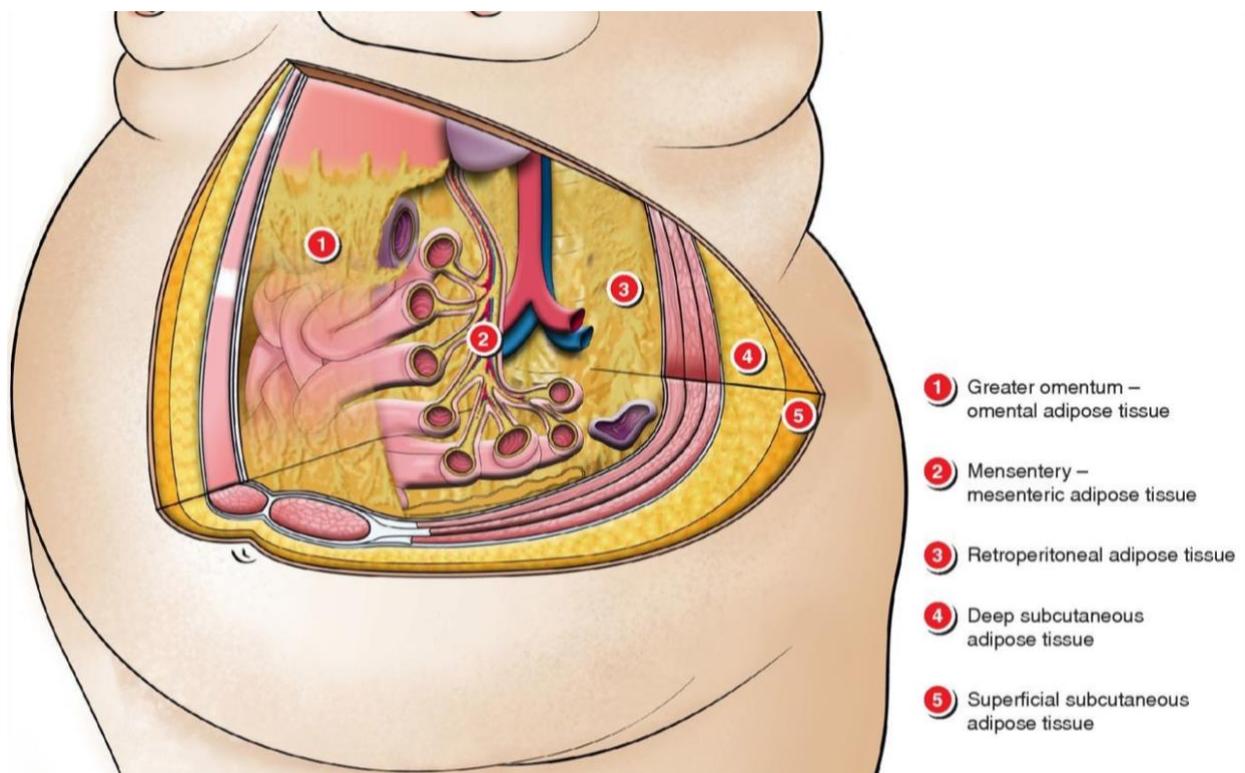
Figura 6 MAFLD identifies patients with significant hepatic fibrosis better than NAFLD. Yamamura S et al. Liver Int. 2020 Dec



Inoltre, nel nostro studio i due gruppi di pazienti differivano per caratteristiche antropometriche e bio-metaboliche. In particolare, le donne con diagnosi di carcinoma mammario (Gruppo M) presentavano una CV ed un BMI significativamente maggiore rispetto alle pazienti con patologia mammaria benigna, con una percentuale di donne in sovrappeso (BMI > 25) significativamente maggiore nel gruppo M. All'analisi di regressione multivariata la CV è risultata essere un fattore di rischio indipendente per carcinoma mammario con un incremento del rischio del 15% per ogni cm di CV in più. Questo dato è in linea con quanto riportato dalla letteratura più recente. E' ormai noto che la CV a differenza della misurazione dei "fianchi" (*hip circumference*) e del rapporto CV/fianchi è un importante fattore di rischio per carcinoma mammario, indipendente dal BMI [143]. In particolare, nella popolazione affetta da MAFLD il BMI>25 non rappresenta un fattore di rischio di fibrosi epatica [142] e, come documentato da una recente meta-analisi [144], circa il 40% della popolazione affetta da steatosi epatica con alterazioni metaboliche non è obesa [144,145]. In generale, il BMI correla con il fenotipo obeso, che è spesso, ma non sempre, associato alla presenza di NAFLD [20], mentre la CV è uno strumento più accurato per documentare la presenza di obesità centrale, o viscerale, condizione intrinsecamente legata alla steatosi epatica e che è mal valutabile con la semplice misurazione del BMI [20]. Una CV > 88 cm è associata al fenotipo "Lean-NAFLD", ovvero soggetti affetti da steatosi epatica apparentemente magri e con BMI nella norma, ma che presentano una aumentata adiposità viscerale. Tale fenotipo viene anche definito "Thin outside, fat inside" o "Metabolically obese normal weight" [146,147]. Nel nostro campione, oltre alla CV, le pazienti con carcinoma mammario presentavano percentuali maggiori di insulino-resistenza e di sindrome metabolica. In particolar modo l'insulino-resistenza, espressa con valori di HOMA-IR index >2.6, si è dimostrata essere un fattore di rischio del carcinoma mammario sia all'analisi univariata che multivariata. Questi dati supportano l'ipotesi per cui nelle donne con NAFLD e/o MAFLD l'insulino-resistenza e l'obesità viscerale, documentate rispettivamente da valori maggiori di HOMA-IR index e da un aumento della CV, sono alla base delle disfunzioni metaboliche che sottendono la cancerogenesi [138,148]. L'insulina, ormone pleiotropico, è in grado di promuovere la cancerogenesi attraverso diversi meccanismi. Da un lato, infatti, l'iperinsulinemia aumenta l'attivazione dei recettori IGF-1 con conseguente stimolo mitotico [100,149] e dall'altro determina un aumento delle

concentrazioni di estrogeni liberi attraverso una riduzione della SHBG (globulina legante gli ormoni sessuali) e un aumento dell'aromatasi [149]. L'obesità viscerale (Figura 7), invece, potenzia l'insulino resistenza e favorisce uno stato pro-infiammatorio [150-152].

Figura 7 Rappresentazione dei principali depositi di tessuto adiposo in regione addominale "Obesità viscerale". Pathophysiology of human visceral obesity: an update. Tchernof A et all.



Nelle donne con steatosi epatica lo squilibrio tra consumo ed apporto energetico determina un eccesso di acidi grassi (FFA) negli epatociti tale da saturare la capacità di β -ossidazione [34]. Si verifica un processo di perossidazione lipidica [34] con una aumentata produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che danneggiano il DNA e promuovono ulteriormente la perossidazione e l'infiammazione dei lipidi e delle proteine [38]. Gli adipociti ipertrofici stimolano la secrezione del $\text{TNF}\alpha$ da parte dei macrofagi e dell' IL-6 da parte del tessuto adiposo viscerale [153], entrambi responsabili dello stato proinfiammatorio associato all'insorgenza del carcinoma mammario [154]. Nella pratica clinica l'indicazione ad eseguire attività fisica rappresenta il primo valido strumento che abbiamo per ridurre

l'insulino-resistenza e contrastare l'obesità viscerale [155]. Nel nostro studio, infatti, l'attività fisica si conferma essere un fattore protettivo per carcinoma mammario [156] e non stupisce che le donne con patologia mammaria benigna rispetto alle donne con diagnosi di carcinoma mammario prediligano uno stile di vita meno sedentario e più dinamico con una percentuale maggiore di donne che ha riferito un decremento ponderale nei sei mesi antecedenti l'intervento chirurgico. In linea con quanto precedentemente espresso, abbiamo riscontrato che la maggior parte delle donne con carcinoma mammario presentava valori di HDL < 50 mg/dL, un risultato che conferma quanto documentato dalla letteratura. Valori ematici di colesterolo-HDL, quota colesterolemica ateroprotettiva, tendono ad aumentare progressivamente in caso di attività fisica regolare [157]. Nello specifico, alcuni studi hanno riportato che dopo 12-24 settimane di attività fisica aerobica regolare non solo aumentano i livelli circolanti, ma migliora anche la funzionalità del colesterolo HDL [157,158].

Analizzando le caratteristiche istologiche ed immuno-istochimiche delle pazienti del gruppo M, abbiamo riscontrato che le donne con carcinoma mammario e contestuale diagnosi di NAFLD presentavano all'esame istologico definitivo una neoplasia mammaria più aggressiva, di dimensioni maggiori ed una maggiore frequenza del bioprofilo tumorale Luminal B like. Nelle donne con NAFLD l'insulino-resistenza e l'iperinsulinemia svolgono una funzione mitotica ed agiscono come fattori di crescita stimolando la proliferazione cellulare [159,160] della ghiandola mammaria sia nelle cellule sane che in quelle tumorali [161]. Questi meccanismi potrebbero spiegare la presenza, nelle donne con NAFLD, di tumori di dimensioni maggiori e con un indice di replicazione maggiore ($ki-67 \geq 14$). Houghton SC. et al. [143] hanno dimostrato che valori maggiori della CV e del rapporto CV/girovita sono associati ad una maggiore incidenza di tumori luminal B-like nelle donne in postmenopausa. Nonostante il tessuto adiposo sottocutaneo rappresenti circa l'85% dei depositi di grasso presenti nel nostro organismo [162], solo l'incremento del tessuto adiposo viscerale è associato al rischio di tumori mammari luminali [163]. L'obesità viscerale più di quella sottocutanea [164] è caratterizzata da uno stato di infiammazione cronica e da una eccessiva produzione di estrogeni che aumentano il rischio di tumore mammario Er+/PgR+ [163,165]. Normalmente l'estrone rappresenta l'ormone estrogenico predominante nel tessuto adiposo viscerale. Al contrario, le concentrazioni del 17beta-estradiolo sono simili nel tessuto

adiposo viscerale e sottocutaneo [165]. L'incremento della CV influenza positivamente le concentrazioni di estradiolo nel tessuto adiposo viscerale suggerendo una maggiore azione dell'enzima 17beta-estradiolo reductasi [165]. Ciò determinerebbe una maggiore produzione di Estrone e di Estradiolo da parte del tessuto adiposo viscerale ed una conseguente sovraesposizione della ghiandola mammaria agli estrogeni [166,167]. Questi dati potrebbero spiegare, in parte, il motivo per cui nel nostro studio abbiamo riscontrato una maggiore percentuale di tumori luminal B like ed un incremento del rischio di tumorigenesi del 15% per ogni cm in più di CV.

7 Conclusioni

Questo studio dimostra che la NAFLD e la MAFLD sono significativamente associate alla diagnosi di carcinoma mammario indipendentemente dall'aumento del BMI. Nelle donne con steatosi epatica l'adiposità viscerale documentata da un aumento della CV rappresenta un fattore di rischio per carcinoma mammario. Tutte le donne con nuova diagnosi di carcinoma mammario dovrebbero essere sottoposte a valutazione della presenza di steatosi epatica. Nella pratica clinica gli indicatori HSI ed FLI potrebbero essere utilizzati per individuare le donne con carcinoma mammario ma senza steatosi. Tutte le donne con valori di HSI > 36 e di FLI > 60 dovrebbero essere sottoposte ad ecografia epatica con elastosonografia per confermare la diagnosi di steatosi epatica. La diagnosi precoce della NAFLD e/o MAFLD nelle donne con carcinoma mammario potrebbe migliorare la prognosi e l'aderenza alle eventuali terapie adiuvanti.

Tabella 1. Confronto tra Gruppo M e Gruppo B per le caratteristiche cliniche e metaboliche

Totale (N = 62)	Gruppo M (N = 31)	Gruppo B (N = 31)	p-value
Età (anni) ± DS	52.6 ± 12.1	54.3 ± 7.2	0.52
Peso (kg) ± DS	70.9 ± 12.4	61.8 ± 5.8	0.0005
Altezza (cm) ± DS	164.5 ± 7.3	163 ± 5.8	0.41
Menopausa (%)	58.8% (17/31)	58 % (18/31)	0.79
Circonferenza vita (cm) ± DS	79.1 ± 8.4	68.9 ± 6.1	< .0001
BMI (kg/m²) ± DS	26.1 ± 3.8	23.2 ± 1.7	0.0003
BMI > 25 (%)	9.7% (3/31)	64.5 % (20/31)	< .0001
Ipertensione arteriosa** (%)	25.8 % (8/31)	9.68% (3/31)	0.09
Glicemia > 110 mg/dl (%)	25.8 % (8/31)	9.68% (3/31)	0.09
HOMA-IR (%)	16.1% (5/31)	0%	0.05
Colesterolo HDL < 50 mg/dl	22.5%	3%	0.05
Trigliceridi mg/dl ± DS	123.5 ± 62.5	105.8 ± 44.7	0.21
Sindrome metabolica* (%)	19.3% (6/31)	0%	0.02
Attività fisica moderata sec GPPAQ	9%	42%	0.004
Calo ponderale (%)	3.2% (1/31)	22.6% (7/31)	0.05

Confronto tra Gruppo M e Gruppo B per le caratteristiche cliniche e metaboliche. Le variabili quantitative sono state presentate con media ± DS. Le variabili qualitative sono state presentate in termini di frequenze. Abbreviazioni: IMC = indice di massa corporea; HOMA-IR = insulino-resistenza da HOMA index > 2.6. Sindrome metabolica*, definita secondo i criteri ATP III (presenza di almeno 3 su 5 criteri riportati: circonferenza vita > 88 cm nelle donne; trigliceridi ≥ 150 mg/dl; colesterolo HDL < 50 mg/dl nelle donne; ipertensione arteriosa ≥ 130/85 mmHg; glicemia > 110 mg/dl); ipertensione arteriosa** per valori sisto-diastolici ≥ 130/85 mmHg come da ATP III o per riferita assunzione di terapia farmacologica antiipertensiva; Attività fisica: GPPAQ questionario (General Practice Physical Activity Questionnaire). Calo ponderale: riferito dalle pazienti negli ultimi 6 mesi.

Tabella 2. Confronto tra Gruppo M e Gruppo B: Prevalenza della NAFLD e della MAFLD

Totale (N = 62)	Gruppo M (N = 31)	Gruppo B (N = 31)	p-value
NAFLD by Hamaguchi score > 1 (%)	61.3% (19/31)	25.8% (8/31)	< 0.005
Hamaguchi score (%)			
>1	29% (9/31)	22.58% (7/31)	0.01
>2	29% (9/31)	3.2% (1/31)	
>3	3.2% (1/31)	0%	
HSI* > 36 (%)	19.35% (6/31)	0%	0.02
FLI** > 60 (%)	19.35% (6/31)	0%	0.02
MAFLD (%)	48.4% (15/31)	3.2% (1/31)	< 0.0001

Le variabili qualitative sono state presentate in termini di frequenze. HSI* Hepatic Steatosis Index, diagnostico per NAFLD se > 36; FLI** Fatty Liver Index, diagnostico per NAFLD se > 60;

Tabella 3. Caratteristiche immunoistochimiche nelle pazienti del Gruppo M (N=31)

Carcinoma in situ	16.13% (5/31)
Carcinoma infiltrante	83.9 % (26/31)
Luminal A like	31% (9/31)
Luminal B like	48.3% (14/31)
HER2	10.3% (3/31)
TNC	10.3 % (3/31)
Grading G1	6.45% (2/31)
Grading G2	29% (9/31)
Grading G3	64.5% (20/31)

Caratteristiche tumorali post-operatorie all'esame istologico definitivo. Le variabili qualitative sono state presentate in termini di frequenze. Abbreviazioni: TNC = Triplo Negativo;

Tabella 4. Stadiazione tumorale nelle pazienti del Gruppo M (N=31)

Stadio pT (TNM) Tis	16.13% (5/31)
Stadio pT (TNM) T1	54.8% (17/31)
Stadio pT (TNM) T2	29% (9/31)
Stadio pN (TNM) N0	73.3% (22/31)
Stadio pN (TNM) N1	26.7% (8/31)

Dettagli della stadiazione tumorale post-operatoria. Le variabili sono state presentate in termini di frequenze. *TNM = The American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM staging system*

Tabella 5. Associazione tra caratteristiche istologiche ed immunoistochimiche e diagnosi di NAFLD all'ecografia

Caratteristiche tumorali	NAFLD no (N = 12)	NAFLD si (N = 19)	p value
Istologia			
Carcinoma in situ	6	3	0.018
Carcinoma infiltrante	10	16	
Dimensioni tumorali			
pTis	2	3	0.08
pT1	10	8	
pT2	1	8	
Stato linfonodale			
pN0	8	14	0.6779*
pN1	4	4	
Indice proliferativo			
Ki67 \geq 14	7	15	0.05
Grading			
G1	0	2	0.42
G2	3	6	
G3	9	11	
Bioprofilo			
Luminal A like	5	4	0.46
Luminal B like	4	10	
TNC	2	1	
HER2	1	2	

I dati sono stati presentati in termini di frequenze. Abbreviazioni: TNC = triplo negativo;

*Test Esatto di Fisher

Tabella 6. Regressione logistica univariata e multivariata dei fattori associati con il rischio di carcinoma mammario

Fattori Associati	OR Univariato	95% CI	OR Adj	95% CI
BMI				
< 25	Riferimento			
> 25	16.97	(4.19-68.79)		
Attività fisica regolare				
No	Riferimento			
Si	0.15	(0.04-0.59)		
NAFLD by Hamaguchi score > 1				
No	Riferimento			
Si	4.55	(1.54-13.42)		
MAFLD				
No	Riferimento		Riferimento	
Si	28.13	(3.40-232.73)	18.94	(1.16-308.64)
Peso (kg)	1.11	(1.04-1.19)		
Circonferenza vita (cm)	1.19	(1.09-1.29)	1.15	(1.03-1.28)
Insulinemia	2.36	(1.51-3.67)		
HOMA	18.99	(4.21-85.63)	10.71	(1.89-60.79)
HSI*	1.32	(1.11-1.57)		
FLI**	1.18	(1.08-1.28)		

OR= Odds Ratio; 95% CI = 95% Confidence Interval; OR Adj = Odds Ratio Adjusted. HSI* Hepatic Steatosis Index, diagnostico per NAFLD se > 36; FLI** Fatty Liver Index, diagnostico per NAFLD se > 60;

Tutte le variabili presenti nel modello multivariate sono reciprocamente aggiustate.

Bibliografia

1. American Cancer Society. Global cancer facts and figures 2008. http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiology_surveillance/documents/document/acspc027766.pdf
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer Incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136:E359–86.
3. Cornejo-Moreno BA, Uribe-Escamilla D, Salamanca-Gomez F. Breast cancer genes: looking for BRAC's lost brother. *IMAJ* 2014; 16: 787-92.
4. Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, et al. Consumption of vegetables and fruits and risk of breast cancer. *JAMA* 1993; 279: 535-40
5. Toro AL, Costantino NS, Shriver CD, Ellsworth DL, Ellsworth RE. Effect of obesity on molecular characteristics of invasive breast tumors: gene expression analysis in a large cohort of female patients. *BMC Obes* 2016; 3: 22.
6. Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, et al. Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *JAMA* 1998; 279: 535-40.
7. Physical activity, sedentary behaviour, diet, and cancer: an update and emerging new evidence Prof Jacqueline Kerr, PhD Cheryl Anderson, PhD Prof Scott M Lippman, MD *Lancet Oncol.* 2017 Aug;18(8):e457-e471).

8. Berrino F, Villarini A, Traina A, Bonanni B, Panico S, Mano MP, et al. Metabolic syndrome and breast cancer prognosis. *Breast Cancer Res Treat.* 2014 Aug;147(1):159-65. doi: 10.1007/s10549-014-3076-6.
9. G. Vernon, A. Baranova, Z.M. Younossi. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults *Aliment Pharmacol Ther*, 34 (2011), pp. 274-285
10. C.D. Byrne, G. Targher NAFLD: a multisystem disease *J Hepatol*, 62 (2015), pp. S47 S64.
11. C. Sanna, C. Rosso, M. Marietti, E. Bugianesi Non-Alcoholic fatty liver disease and extra-Hepatic cancers *Int J Mol Sci*, 17 (2016)
12. K.K. Tsilidis, J.C. Kasimis, D.S. Lopez, E.E. Ntzani, J.P. Ioannidis Type 2 diabetes and cancer: umbrella review of meta-analyses of observational studies *BMJ*, 350 (2015)
13. European Association for the Study of the Liver European Association for the Study of European Association for the Study of O. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2016;64:1388–1402.
14. Kim D, Kim WR, Kim HJ, Therneau TM. Association between non invasive fibrosis markers and mortality among adults with nonalcoholic fatty liver disease in the United States. *Hepatology* 2013;57:1357–1365
15. Bilici A, Ozguroglu M, Mihmanli I, Turna H, Adaltli I. A case-control study of non-alcoholic fatty liver disease in breast cancer. *Med Oncol* 2007; 24: 367-71.)

16. Kim GA, Lee HC, Choe J, Kim MJ, Lee MJ, Chang HS, Bae IY, Kim HK, An J, Shim JH, Kim KM, Lim YS. *J Hepatol*. 2017 Nov 2. pii: S0168-8278(17)32294-8. doi: 10.1016/j.jhep.2017.09.012. [Epub ahead of print] Association between non-alcoholic fatty liver disease and cancer incidence rate.
17. Rosato V, Bosetti C, Talamini R, Levi F, Montella M, Giacosa A, et al. Metabolic syndrome and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *Ann Oncol* 2011;22:2687–2692.
18. Agnoli C, Berrino F, Abagnato CA, Muti P, Panico S, Crosignani P, et al. Metabolic syndrome and postmenopausal breast cancer in the ORDET cohort: a nested case-control study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010;20:41–48.
19. Lawlor DA, Smith GD, Ebrahim S. Hyperinsulinaemia and increased risk of breast cancer: findings from the British Women’s Heart and Health Study. *Cancer Causes Control* 2004;15:267–275.
20. Min-Sun Kwaka, Jeong Yoon Yima,*, Ann Yi b, Goh-Eun Chunga, Jong In Yanga, Donghee Kimc, Joo Sung Kima, Dong-Young Nohd. Liver, Pancreas and Biliary Tract “Nonalcoholic fatty liver disease is associated with breast cancer in non obese women”
- 21 Samuel VT, Shulman GI. Nonalcoholic fatty liver disease as a nexus of metabolic and hepatic diseases. *Cell Metab* 2018;27:22–41. [41] Lonardo A, Nascimbeni F, Mantovani A, Targher G. Hypertension, diabetes, atherosclerosis and NASH
- 22 Petersen MC, Vatner DF, Shulman GI. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 2017;13:572–87.
- 23 Lonardo A, Ballestri S, Marchesini G, Angulo P, Loria P. Nonalcoholic fatty liver disease: a precursor of the metabolic syndrome. *Dig Liver Dis* 2015;47:181–90.

24 Laudisio D, Muscogiuri G, Barrea L, Savastano S, Colao A. Obesity and breast cancer in premenopausal women: Current evidence and future perspectives. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2018;230:217–21.

25. Nseir W, Abu-Rahmeh Z, Tsipis A, Mograbi J, Mahamid M. Relationship between non-alcoholic fatty liver disease and breast cancer. *Isr Med Assoc J* 2017;19:242–5

26. Khan S, Shukla S, Sinha S, Meeran SM. Role of adipokines and cytokines in obesity-associated breast cancer: therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev* 2013;24:503–13.

27 Z. Younossi et al., “Global burden of NAFLD and NASH: Trends, predictions, risk factors and prevention,” *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, vol. 15, no. 1. pp. 11–20, 2018.

28 European Association for the Study of the Liver (EASL), “EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver

29 N. Chalasani et al., “The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases,” *Hepatology*, vol. 67, no. 1. pp. 328–357, 2018.

30 V. G. Athyros et al., “The use of statins alone, or in combination with pioglitazone and other drugs, for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis and related cardiovascular risk. An Expert Panel Statement,” *Metabolism: Clinical and Experimental*, vol. 71. pp. 17–32, 2017.

31 G. Musso et al., "Association of Non-alcoholic Fatty Liver Disease with Chronic Kidney Disease: A Systematic Review and Meta-analysis," *PLoS Medicine*, vol. 11, no. 7. 2014

32 C. I. Ardern, P. T. Katzmarzyk, I. Janssen, T. S. Church, and S. N. Blair, "Revised adult treatment panel III guidelines and cardiovascular disease mortality in men attending a preventive medical clinic," *Circulation*, vol. 112, no. 10. pp. 1478– 1485, 2005.

33 Z. M. Younossi, A. B. Koenig, D. Abdelatif, Y. Fazel, L. Henry, and M. Wymer, "Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes," *Hepatology*, vol. 64, no. 1. pp. 73–84, 2016

34 S. E. Keating, D. A. Hackett, J. George, and N. A. Johnson, "Exercise and nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis," *Journal of Hepatology*, vol. 57, no. 1. pp. 157–166, 2012.

35 Z. M. Younossi et al., "The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis," *Journal of Hepatology*, vol. 71, no. 4. pp. 793–801, 2019.

36 E. M. Koehler et al., "Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in the elderly: Results from the Rotterdam study," *Journal of Hepatology*, vol. 57, no. 6. pp. 1305–1311, 2012.

37 S. Polyzos, J. Kountouras, and C. Zavos, "Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Pathogenetic Roles of Insulin Resistance and Adipocytokines," *Current Molecular Medicine*, vol. 9, no. 3. pp. 299–314, 2009

38 C. Koliaki et al., "Adaptation of Hepatic Mitochondrial Function in Humans with Non-Alcoholic Fatty Liver Is Lost in Steatohepatitis," *Cell Metabolism*, vol. 21, no. 5. pp. 739–746, 2015.

39 K. Yamaguchi et al., "Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis," *Hepatology*, vol. 45, no. 6. pp. 1366–1374, 2007.

40 J. P. Arab, M. Arrese, and M. Trauner, "Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease," *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, vol. 13. pp. 321–350, 2018.

41 P. S.A., K. J., D. G., Z. C., and M. C.S., "The emerging role of endocrine disruptors in pathogenesis of insulin resistance: A concept implicating nonalcoholic fatty liver disease," *Current Molecular Medicine*, vol. 12, no. 1. pp. 68–82, 2012

42 Cano R, Pérez JL, Dávila LA, Ortega Á, Gómez Y, Valero-Cedeño NJ, Parra H, Manzano A, Véliz Castro TI, Albornoz MPD, Cano G, Rojas-Quintero J, Chacín M, Bermúdez V. Role of Endocrine-Disrupting Chemicals in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci*. 2021 May 1;22(9):4807. doi: 10.3390/ijms22094807.

43 E. Buzzetti, M. Pinzani, and E. A. Tsochatzis, "The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)," *Metabolism: Clinical and Experimental*, vol. 65, no. 8. pp. 1038–1048, 2016.

44 S. A. Polyzos, J. Kountouras, and C. S. Mantzoros, "Adipose tissue, obesity and non-alcoholic fatty liver disease," *Minerva Endocrinologica*, vol. 42, no. 2. pp. 92–108, 2017

45 A. Baranova, A. Birerdinc, and Z. M. Younossi, "Adipokines in nonalcoholic fatty liver disease," *Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease: Second Edition*. pp. 249–283, 2014.

46 M. A. Tilg H, "Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity.," Nature reviews. Immunology, vol. 6, no. 10. pp. 772–783, 2006.

47 S. A. Polyzos, K. A. Toulis, D. G. Goulis, C. Zavos, and J. Kountouras, "Serum 55 total adiponectin in nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis," Metabolism: Clinical and Experimental, vol. 60, no. 3. pp. 313– 326, 2011.

48 E. Tsochatzis, G. V. Papatheodoridis, and A. J. Archimandritis, "The evolving role of leptin and adiponectin in chronic liver diseases," American Journal of Gastroenterology, vol. 101, no. 11. pp. 2629–2640, 2006.

49 S. A. Polyzos, K. N. Aronis, J. Kountouras, D. D. Raptis, M. F. Vasiloglou, and C. S. Mantzoros, "Circulating leptin in non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis," Diabetologia, vol. 59, no. 1. pp. 30–43, 2016.

50 A. Guilherme, J. V. Virbasius, V. Puri, and M. P. Czech, "Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes," Nature Reviews Molecular Cell Biology, vol. 9, no. 5. pp. 367–377, 2008.

51 S. A. Polyzos, J. Kountouras, C. Zavos, and G. Deretzi, "The potential adverse role of leptin resistance in nonalcoholic fatty liver disease: A hypothesis based on critical review of the literature," Journal of Clinical Gastroenterology, vol. 45, no. 1. pp. 50–54, 2011.

52 R. Xu, A. Tao, S. Zhang, Y. Deng, and G. Chen, "Association between PatatinLike Phospholipase Domain Containing 3 Gene (PNPLA3) Polymorphisms and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A HuGE Review and Meta-Analysis," Scientific Reports, vol. 5. 2015.

53 H. Mahdessian et al., "TM6SF2 is a regulator of liver fat metabolism influencing triglyceride secretion and hepatic lipid droplet content," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 111, no. 24. pp. 8913–8918, 2014.

54 R. Pais et al., "A systematic review of follow-up biopsies reveals disease progression in patients with non-alcoholic fatty liver," *Journal of Hepatology*, vol. 59, no. 3. pp. 550–556, 2013.

55 S. Singh, A. M. Allen, Z. Wang, L. J. Prokop, M. H. Murad, and R. Loomba, "Fibrosis Progression in Nonalcoholic Fatty Liver vs Nonalcoholic Steatohepatitis: A Systematic Review and Meta-analysis of Paired-Biopsy 56 Studies," *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, vol. 13, no. 4. pp. 643- 654.e9, 2015.

56 G. A. Makar, "The NAFLD Fibrosis Score: A Noninvasive System That Identifies Liver Fibrosis in Patients with NAFLD," *Yearbook of Gastroenterology*, vol. 2007. pp. 281–283, 2007.

57 S. A. Polyzos and C. S. Mantzoros, "Leptin in Health and Disease: Facts and Expectations at its Twentieth Anniversary," *Metabolism: Clinical and Experimental*, vol. 64, no. 1. pp. 5–12, 2015

58 F. Magkos and C. S. Mantzoros, "Body fat redistribution and metabolic abnormalities in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy: Novel insights into pathophysiology and emerging opportunities for treatment," *Metabolism: Clinical and Experimental*, vol. 60, no. 6. pp. 749–753, 2011.

59 K. L. Donnelly, C. I. Smith, S. J. Schwarzenberg, J. Jessurun, M. D. Boldt, and E. J. Parks, "Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 115, no. 5. pp. 1343–1351, 2005.

60 N. Mendez-Sanchez, V. C. Cruz-Ramon, O. L. Ramirez-Perez, J. P. Hwang, B. Barranco-Fragoso, and J. Cordova-Gallardo, "New aspects of lipotoxicity in nonalcoholic steatohepatitis," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 7. 2018.

61 M. Nati, D. Haddad, A. L. Birkenfeld, C. A. Koch, T. Chavakis, and A. Chatzigeorgiou, "The role of immune cells in metabolism-related liver inflammation and development of non-alcoholic steatohepatitis (NASH)," *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, vol. 17, no. 1. pp. 29–39, 2016.

62 P. Angulo, M. V. Machado, and A. M. Diehl, "Fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Mechanisms and clinical implications," *Seminars in Liver Disease*, vol. 35, no. 2. pp. 132–145, 2015

63 B. W. L Li , D-W Liu , H-Y Yan , Z-Y Wang , S-H Zhao, "Obesity is an independent risk factor for non-alcoholic fatty liver disease_ evidence from a meta-analysis of 21 cohort studies -." pp. 510–519, 2016.

64 C. L. 1 Qing Pang, Jing-Yao Zhang , Si-Dong Song , Kai Qu , Xin-Sen Xu , Su-Shun Liu , "Central obesity and nonalcoholic fatty liver disease risk after adjusting for body mass index -." pp. 1650–1662, 2015.

65 E. E. Calle, C. Rodriguez, K. Walker-Thurmond, and M. J. Thun, "Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults," *New England Journal of Medicine*, vol. 348, no. 17. pp. 1625–1638, 2003.

66 J. C. F. Leung et al., "Histological severity and clinical outcomes of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese patients," *Hepatology*, vol. 65, no. 1. pp. 54–64, 2017

67 V. Yumuk et al., "European Guidelines for Obesity Management in Adults," *Obesity Facts*, vol. 8, no. 6. pp. 402–424, 2015.

68 Younes R, Bugianesi E. NASH in lean individuals. *Semin Liver Dis.* 2019;39:86-95.

69 Lu FB, Zheng KI, Rios RS, et al. Global epidemiology of lean non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2020;35:2041-50.

70 Feldman A, Eder SK, Felder TK, et al. Clinical and metabolic characterization of lean caucasian subjects with non-alcoholic fatty liver. *The American journal of gastroenterology.* 2017;112:102-10.

71 Younossi ZM, Otgonsuren M, Venkatesan C, et al. In patients with non-alcoholic fatty liver disease, metabolically abnormal individuals are at a higher risk for mortality while metabolically normal individuals are not. *Metabolism.* 2013;62:352-60.

72 Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi E, et al. Risk of nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease and low visceral adiposity. *J Hepatol.* 2011;54:1244-9.

73 Dela Cruz AC, Bugianesi E, George J, et al. Characteristics and long-term prognosis of lean patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2014;146:S-909.

74 Hagstrom H, Nasr P, Ekstedt M, et al. Risk for development of severe liver disease in lean patients with nonalcoholic fatty liver disease: A long-term follow-up study. *Hepatol Commun.* 2018;2:48-57.

75 Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol.* 2010 Aug;53(2):372-84.

76 Loria P, Adinolfi LE, Bellentani S, Bugianesi E, Grieco A, Fargion S, Gasbarrini A, Loguercio C, Lonardo A, Marchesini G, Marra F, Persico M, Prati D, Baroni GS; NAFLD Expert Committee of the Associazione Italiana per lo studio del Fegato. Practice guidelines for the diagnosis and management of nonalcoholic

fatty liver disease. A decalogue from the Italian Association for the Study of the Liver (AISF) Expert Committee. *Dig Liver Dis.* 2010 Apr;42(4):272-82.

77 Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology.* 2012 Jun;55(6):2005-23.

78 Nascimbeni F1, Pais R, Bellentani S, Day CP, Ratziu V, Loria P, Lonardo A. From NAFLD in clinical practice to answers from guidelines. *J Hepatol.* 2013 Oct;59(4):859-71.

79 Review Team, LaBrecque DR, Abbas Z, Anania F, Ferenci P, Khan AG, Goh KL, Hamid SS, Isakov V, Lizarzabal M, Peñaranda MM, Ramos JF, Sarin S, Stimac D, Tomson AB, Umar M, Krabshuis J, LeMair A; World Gastroenterology Organisation. World Gastroenterology Organisation global guidelines: Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol.* 2014 Jul;48(6):467-73.

80 Younossi ZM, Otgonsuren M, Henry L, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) with hepatocellular carcinoma (HCC) in the United States from 2004 to 2009. *Hepatology.* 2015;62:1723-30.

81 Younes R, Bugianesi E. Should we undertake surveillance for HCC in patients with NAFLD? *J Hepatol.* 2018;68:326-34.

82 Ioannou GN, Green P, Kerr KF, et al. Models estimating risk of hepatocellular carcinoma in patients with alcohol or NAFLD-related cirrhosis for risk stratification. *J Hepatol.* 2019;71:523-33.

83 Dyson J, Jaques B, Chattopadhyay D, et al. Hepatocellular cancer: the impact of obesity, type 2 diabetes and a multidisciplinary team. *J Hepatol.* 2014;60:110-7.

84 Wong RJ, Cheung R, Ahmed A. Nonalcoholic steatohepatitis is the most rapidly growing indication for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the U.S. *Hepatology.* 2014;59:2188-95.

85 Piscaglia F, Svegliati-Baroni G, Barchetti A, et al. Clinical patterns of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver disease: A multicenter prospective study. *Hepatology.* 2016;63:827-38. (52)

Allen AM, Hicks SB, Mara KC, et al. The risk of incident extrahepatic cancers is higher in nonalcoholic fatty liver disease than obesity - A longitudinal cohort study. *J Hepatol.* 2019;71:1229-36.

86 Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology.* 2005;129:113-21.

87 Younossi Z, Henry L. Contribution of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease to the burden of liver-related morbidity and mortality. *Gastroenterology.* 2016;150:1778-85.

88 Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology.* 2016;64:73-84

89 Spahillari A, Mukamal KJ, DeFilippi C, et al. The association of lean and fat mass with all-cause mortality in older adults: The Cardiovascular Health Study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2016;26:1039-47.

90 Stepanova M, Younossi ZM. Independent association between nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease in the US population. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2012;10:646-50.

91 Bhatia LS, Curzen NP, Calder PC, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: a new and important cardiovascular risk factor? *European heart journal*. 2012;33:1190-200.

92 Lonardo A, Nascimbeni F, Mantovani A, et al. Hypertension, diabetes, atherosclerosis and NASH: Cause or consequence? *J Hepatol*. 2018;68:335-52.

93 Targher G, Byrne CD, Lonardo A, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: A meta-analysis. *J Hepatol*. 2016;65:589-600.

94 Ekstedt M, Hagstrom H, Nasr P, et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology*. 2015;61:1547-54

95 Eslam M, Sanyal AJ, George J, et al. MAFLD: a consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2020;158:1999-2014

.

96 Valenti L, Pelusi S. Redefining fatty liver disease classification in 2020. *Liver Int*. 2020;40:1016-1017.

97 Fouad Y, Waked I, Bollipo S, Gomaa A, Ajlouni Y, Attia D. What's in a name? Renaming 'NAFLD' to 'MAFLD'. *Liver Int*. 2020;40(6):1254-1261.

98. Eda Kaya 1, Yusuf Yilmaz Metabolic-associated Fatty Liver Disease (MAFLD): A Multi-systemic Disease Beyond the Liver doi: 10.14218/JCTH.2021.00178. Epub 2021 Oct 19. Review *J Clin Transl Hepatol* 2022 Apr 28;10(2):329-338.

99 Katzmarzyk PT, Bray GA, Greenway FL, Johnson WD, Newton RL Jr, Ravussin E, Ryan DH, Bouchard C. Ethnic-specific BMI and waist circumference thresholds. *Obesity (Silver Spring)*. 2011 Jun;19(6):1272-8. doi: 10.1038/oby.2010.319. Epub 2011 Jan 6. PMID: 21212770; PMCID: PMC3933952.

100 Rose DP, Gracheck PJ, Vona-Davis L. The Interactions of Obesity, Inflammation and Insulin Resistance in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2015 Oct 26;7(4):2147-68. doi:10.3390/cancers7040883. PMID: 26516917; PMCID: PMC4695883.

101 Park, Y.-M.M., White, A.J., Nichols, H.B., O'Brien, K.M., Weinberg, C.R. and Sandler, D.P. (2017), The association between metabolic health, obesity phenotype and the risk of breast cancer. *Int. J. Cancer*, 140: 2657-2666. <https://doi.org/10.1002/ijc.30684>

102 Ross R, Neeland IJ, Yamashita S, Shai I, Seidell J, Magni P, Santos RD, Arsenault B, Cuevas A, Hu FB, Griffin BA, Zambon A, Barter P, Fruchart JC, Eckel RH, Matsuzawa Y, Després JP. Waist circumference as a vital sign in clinical practice: a Consensus Statement from the IAS and ICCR Working Group on Visceral Obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2020 Mar;16(3):177-189. doi: 10.1038/s41574-019-0310-7. Epub 2020 Feb 4. PMID: 32020062; PMCID: PMC7027970.

103 27. Matthews DR, Hosker JP, Rudeski AS et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and b-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28:412-419

104 Burrows, R.; Correa-Burrows, P.; Reyes, M.; Blanco, E.; Albala, C.; Gahagan, S. Healthy Chilean Adolescents with HOMA-IR \geq 2.6 Have Increased Cardiometabolic Risk: Association with Genetic, Biological, and Environmental Factors. *J. Diabetes Res*. 2015, 2015, 1–8.

105 National Cholesterol Education Program (NCEP): Expert Panel on Detection and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (2002). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 106, 3143–3421

106 Albert L Siu, U S Preventive Services Task Force; Screening for Abnormal Blood Glucose and Type 2 Diabetes Mellitus: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement Epub 2015 Oct 27. *Ann Intern Med.* 2015 Dec 1;163(11):861-8. doi: 10.7326/M15-2345.

107 Masahide Hamaguchi , Takao Kojima, Yoshito Itoh, Yuichi Harano, Kota Fujii, Tomoaki Nakajima, Takahiro Kato, Noriyuki Takeda, Junichi Okuda, Kazunori Ida, Yutaka Kawahito, Toshikazu Yoshikawa, Takeshi Okanoue *Am J* The severity of ultrasonographic findings in nonalcoholic fatty liver disease reflects the metabolic syndrome and visceral fat accumulation 2007 Dec;102(12):2708-15. doi: 10.1111/j.1572-0241.2007.01526.x. Epub 2007 Sep 25.

108 Mireen Friedrich-Rust, Katrin Wunder, Susanne Kriener, Fariba Sotoudeh, Swantje Richter, Joerg Bojunga, Eva Herrmann, Thierry Poynard, Christoph F Dietrich, Johannes Vermehren, Stefan Zeuzem, Christoph Sarrazin Liver fibrosis in viral hepatitis: noninvasive assessment with acoustic radiation force impulse imaging versus transient elastography. 2009 Aug;252(2):595-604. doi: 10.1148/radiol.2523081928

109 Simona Bota , Harald Herkner, Ioan Sporea, Petra Salzl, Roxana Sirli, Adriana M Neghina, Markus Peck-Radosavljevic Affiliations expand. *Liver Int.* 2013 Sep;33(8):1138-47. doi: 10.1111/liv.12240. Epub 2013 Jul 16. Meta-analysis: ARFI elastography versus transient elastography for the evaluation of liver fibrosis

110 Giorgio Bedogni , Stefano Bellentani, Lucia Miglioli, Flora Masutti, Marilena Passalacqua, Anna Castiglione, Claudio Tiribelli The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population BMC Gastroenterol. 2006 Nov 2;6:33. doi: 10.1186/1471-230X-6-33.

111 Jeong-Hoon Lee , Donghee Kim, Hwa Jung Kim, Chang-Hoon Lee, Jong In Yang, Won Kim, Yoon Jun Kim, Jung-Hwan Yoon, Sang-Heon Cho, Myung-Whun Sung, Hyo-Suk Lee Dig Liver Dis Hepatic steatosis. index: a simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease. 2010 Jul;42(7):503-8. doi: 10.1016/j.dld.2009.08.002. Epub 2009 Sep 18.

112 United Kingdom Government 2009 General practice physical activity questionnaire (GPPAQ). https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/192453/GPPAQ_-_guidance.pdf.

113 Department of Health (2009) Be Active Be Healthy London: Department of Health.

114 Department of Health (2000). National Service Framework for Coronary Heart Disease. London: Department of Health.

115 Department of Health (2004). At least five a week: Evidence on the impact of physical activity and its relationship to health. Department of Health, London, 2004.

116 National Institute for Health and Clinical Excellence. Four commonly used methods to increase physical activity: brief interventions in primary care, exercise referral schemes, pedometers and community-based exercise programmes for walking and cycling – Public health Intervention Guidance no.2. London: National Institute for Health and Clinical Excellence; 2006

117 Khaw KT, Jakes R, Bingham S, Welch A, Luben R, Day N, Wareham N. Work and leisure time physical activity assessed using a simple, pragmatic, validated questionnaire and incident cardiovascular and all-cause mortality in men and women: The European Prospective Investigation into Cancer in Norfolk prospective population study. *Int J Epidemiol.* (2006, in press)

118 Miller WR. Enhancing Patient Motivation for Health Behavior Change *Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation* 2005;25:207-209

119 Rollnick S, Butler CC, Stott N. Helping smokers make decisions: the enhancement of brief intervention for general medical practice. *Patient Education and Counseling* 1997; 31:191-203

120 Resnicow K, Diiorio C, Soet JE, Ernst D, Borrelli B, & Hecht J. Motivational interviewing in health promotion: it sounds like something is changing. *Health Psychology* 2002;21:444-451.

121 Rollnick S, Mason P, Butler C. (1999) *Health Behaviour Change: A guide for practitioners*, London: Churchill Livingstone.

122 Rollnick S, Butler CC, McCambridge J, Kinnersley P, Elwyn G, Resnicow K. Consultations about changing behaviour., *British Medical Journal* 2005;331;961-963

123 Rubak S, Sandbaek A, Lauritzen T, Christensen B. Motivational interviewing: a systematic review and meta-analysis. *Br J Gen Pract.* 2005; 55:305–312

124 Wareham NJ, Jakes RW, Renni KL, Schuit J, Mitchell J, Hennings S, Day NE. Validity and repeatability of a simple index derived from the short physical activity questionnaire used in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Public Health Nutrition* 2002; 6:407-413..

125 Pei-Dong Yang, Qing-Qin Peng, Wei-Bin Lian, Fang-Meng Fu, Chuan Wang, Debo Chen. Validation of the Eighth American Joint Committee on Cancer Anatomic and Prognostic Staging System for Breast Cancer Surg Res. 2022 Feb;270:539-546. doi: 10.1016/j.jss.2021.09.025. Epub 2021 Nov 20.

126 A Goldhirsch, W C Wood, A S Coates, R D Gelber, B Thürlimann, H-J Senn, Panel members. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. Ann Oncol 2011 Aug;22(8):1736-47. doi: 10.1093/annonc/mdr304. Epub 2011 Jun 27.

127 Cortez-Pinto H, Baptista A, Camilo ME, et al. Tamoxifen-associated steatohepatitis-report of three cases. J Hepatol 1995;23:95-7 10. Pratt DS, Knox TA, Erban J. Tamoxifen-induced steatohepatitis. Ann Int Med 1995;123:236

128 Cai Q, Bensen M, Greene R, et al. Tamoxifen-induced transient multifocal hepatic fatty infiltration. Am J Gastroenterol 2000;95:277-9

129 Floren LC, Hebert MF, Venook AP, et al. Tamoxifen in liver disease: potential exacerbation of dysfunction. Ann Oncol 1998;9:1123-6

130 Ahmed MH, Osman KA. Tamoxifen induced-non-alcoholic steatohepatitis (NASH): has the time come for the oncologist to be diabetologist. Breast Cancer Res Treat 2006;97:223-4

131 Elefsinitios IS, Pantazis KD, Ilias A, Pallis L, Mariolis A, Glynou I, Kada H, Moulakasis A. Tamoxifen induced hepatotoxicity in breast cancer patients with preexisting liver steatosis: the role of glucose intolerance. Eur J Gastroenterol Hepatol 2004;16:593-8

132 Coskun U, Toruner FB, Gunel N. Tamoxifen therapy and hepatic steatosis. *Neoplasma* 2002;49:61–4

134 Nguyen MC, Stewart RB, Banerji MA, Gordon DH, Kral JG. Relationship between tamoxifen use, liver fat and body fat distribution in women with breast cancer. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25:296–8

135 Nemoto Y, Saibara T, Ogawa Y, Zhang T, Xu N, Ono M, Akisawa N, Iwasaki S, Maeda T, Onishi S. Tamoxifen-induced nonalcoholic steatohepatitis in breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen. *Intern Med* 2002;41:345–50.

136 Murata Y, Ogawa Y, Saibara T, Nishioka A, Takeuchi N, Kariya S, Onishi S, Yoshida S. Tamoxifen-induced non-alcoholic steatohepatitis in patients with breast cancer: determination of a suitable biopsy site for diagnosis. *Oncol Rep* 2003;97–100

137 Allen AM, Hicks SB, Mara KC, Larson JJ, Therneau TM. The risk of incident extrahepatic cancers is higher in non-alcoholic fatty liver disease than obesity - a longitudinal cohort study. *J Hepatol*. 2019;71:1229–36.

138 Zhenqiu Liu, Chunqing Lin, Chen Suo, Renjia Zhao, Li Jin, Tiejun Zhang, Xingdong Chen. Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease and the risk of 24 specific cancers. 2022 Feb;127:154955. doi: 10.1016/j.metabol.2021.154955. Epub 2021 Dec 14.

139 Grace En Hui Lim, Ansel Tang, Cheng Han Ng, Yip Han Chin, Wen Hui Lim, Darren Jun Hao Tan, Jie Ning Yong, Jieling Xiao, Chloe Wen-Min Lee, Mark Chan, Nicholas Ws Chew, Eunice Xiang Xuan Tan, Mohammad Shadab Siddiqui, Daniel Huang, Mazen Nouredin, Arun J Sanyal, Mark D Muthiah. An

Observational Data Meta-analysis on the Differences in Prevalence and Risk Factors Between MAFLD vs NAFLD
Gastroenterol Hepatol. 2021 Dec 4;S1542-3565(21)01276-3. doi: 10.1016/j.cgh.2021.11.038.

140 Takumi Kawaguchi, Tsubasa Tsutsumi, Dan Nakano, Takuji Torimura Res. MAFLD: Renovation of clinical practice and disease awareness of fatty liver . 2022 May;52(5):422-432. doi: 10.1111/hepr.13706. Epub 2021 Sep 17.

141 Lin S, Huang J, Wang M, et al. Comparison of MAFLD and NAFLD diagnostic criteria in real world. *Liver Int.* 2020;40(9):2082-2089.

142 Yamamura S, Eslam M, Kawaguchi T, Tsutsumi T, Nakano D, Yoshinaga S, Takahashi H, Anzai K, George J, Torimura T. MAFLD identifies patients with significant hepatic fibrosis better than NAFLD. *Liver Int.* 2020 Dec;40(12):3018-3030. doi:10.1111/liv.14675.

143 Serena C. Houghton , PhD, MPH, Heather Eliassen, Rulla M. Tamimi , Walter C. Willett ,Bernard A. Rosner , Susan E. Hankinson. Central Adiposity and Subsequent Risk of Breast Cancer by Menopause Status. *JNCI J Natl Cancer Inst* (2021) 113(7): djaa197 doi: 10.1093/jnci/djaa197

144 Kim Y, Chang Y, Cho YK, Ahn J, Shin H, Ryu S. Metabolically healthy versus unhealthy obesity and risk of fibrosis progression in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 2019;39:1884-1894. 27.

145 Eslam M, Fan JG, Mendez-Sanchez N. Non-alcoholic fatty liver disease in non-obese individuals: the impact of metabolic health. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020;5:713-715

146 Machado MV. Nonalcoholic fatty liver disease in lean subjects: is it all metabolic-associated fatty liver disease?. *Hepatoma Res* 2020;6:84. <http://dx.doi.org/10.20517/2394-5079.2020.90>

147 Du T, Yu X, Zhang J, Sun X. Lipid accumulation product and visceral adiposity index are effective markers for identifying the metabolically obese normal-weight phenotype. *Acta Diabetol.* 2015 Oct;52(5):855-63. doi: 10.1007/s00592-015-0715-2. Epub 2015 Feb 19. PMID: 25690647.

148 Role of Insulin Resistance in MAFLD. Yoshitaka Sakurai, Naoto Kubota , Toshimasa Yamauchi, Takashi Kadowaki *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 16;22(8):4156. doi: 10.3390/ijms22084156.

149 Gupta, K., Krishnaswamy, G., Karnad, A., & Peiris, A. N. (2002). Insulin: A Novel Factor in Carcinogenesis. *The American Journal of the Medical Sciences*, 323(3), 140–145. doi:10.1097/00000441

150 Tchernof A, Després JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev.* 2013 Jan;93(1):359-404. doi: 10.1152/physrev.00033.2011.Review.

151 Dieli-Conwright CM, Parmentier JH, Sami N, Lee K, Spicer D, Mack WJ, Sattler F, Mittelman SD. Adipose tissue inflammation in breast cancer survivors: effects of a 16-week combined aerobic and resistance exercise training intervention. *Breast Cancer Res Treat.* 2018 Feb;168(1):147-157. doi: 10.1007/s10549-017-4576-y. Epub 2017 Nov 22

152 Silveira EA, Kliemann N, Noll M, Sarrafzadegan N, de Oliveira C. Visceral obesity and incident cancer and cardiovascular disease: An integrative review of the epidemiological evidence. *Obes Rev.* 2021 Jan;22(1):e13088. doi: 10.1111/obr.13088. Epub 2020 Jul 21.

153 Zhang, H.H.; Halbleib, M.; Ahmad, F.; Manganiello, V.C.; Greenberg, A.S. Tumor necrosis factor- α stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. *Diabetes* 2002, 51, 2929–2935.

154 Christina M Dieli-Conwright, Kerry S Courneya, Wendy Demark-Wahnefried, Nathalie Sami, Kyuwan Lee, Thomas A Buchanan, Darcy V Spicer, Debu Tripathy, Leslie Bernstein, Joanne E Mortimer. Effects of Aerobic and Resistance Exercise on Metabolic Syndrome, Sarcopenic Obesity, and Circulating Biomarkers in Overweight or Obese Survivors of Breast Cancer: A Randomized Controlled Trial
J Clin Oncol. 2018 Mar 20;36(9):875-883. doi: 10.1200/JCO.2017.75.7526. Epub 2018 Jan 22.

155 Ivy JL: Role of exercise training in the prevention and treatment of insulin resistance and noninsulin-dependent diabetes mellitus. Sports Med 24:321-336, 1997

156 Pudkasam S, Polman R, Pitcher M, Fisher M, Chinlumprasert N, Stojanovska L, Apostolopoulos V. Maturitas. Physical activity and breast cancer survivors: Importance of adherence, motivational interviewing and psychological health. 2018 Oct;116:66-72. doi: 10.1016/j.maturitas.2018.07.010. Epub 2018 Jul 23.

157 Sanna Tiainen, Riitta Luoto, Markku Ahotupa , Jani Raitanen , Tommi Vasankari. 6-mo aerobic exercise intervention enhances the lipid peroxide transport function of HDL. Free Radic Res. 2016;50(11):1279-1285. doi: 10.1080/10715762.2016.1252040. Epub 2016 Nov 23.

158 LeMura LM, von Duvillard SP, Andreacci J, Klebez JM, Chelland SA, Russo J. Lipid and lipoprotein profiles, cardiovascular fitness, body composition, and diet during and after resistance, aerobic and combination training in young women. Eur J Appl Physiol. 2000 Aug;82(5-6):451-8. doi: 10.1007/s004210000234. PMID: 10985600 Clinical Trial.

159 Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI, Trudeau ME, Koo J, Madarnas Y, Hartwick W, Hoffman B and Hood N: Fasting insulin and outcome in early-stage breast cancer: results of a prospective cohort study. J Clin Oncol. 20:42-51. 2002.

160 Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, et al. Diabetes and cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2009;16:1103–1123.

161 Weichhaus M, Broom J, Wahle K, et al. A novel role for insulin resistance in the connection between obesity and postmenopausal breast cancer. *Int J Oncol*. 2012;41:745–752.

162 Thomas EL, Saeed N, Hajnal JV, Brynes A, Goldstone AP, Frost G, Bell JD. Magnetic resonance imaging of total body fat. *J Appl Physiol* (1985). 1998;85(5):1778–1785.

163 Rose DP, Vona-Davis L. Interaction between menopausal status and obesity in affecting breast cancer risk. *Maturitas*. 2010;66(1):33–38.

164 Janssen I, Heymsfield SB, Allison DB, Kotler DP, Ross R. Body mass index and waist circumference independently contribute to the prediction of non abdominal, abdominal subcutaneous, and visceral fat. *Am J Clin Nutr* . 2002 Apr;75(4):683-8. doi: 10.1093/ajcn/75.4.683.

165 Hetemaki N, Savolainen-Peltonen H, Tikkanen MJ, et al. Estrogen metabolism in abdominal subcutaneous and visceral adipose tissue in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(12):4588–4595.

166 Lovejoy JC, Champagne CM, de Jonge L, Xie H, Smith SR. Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition. *Int J Obes*. 2008;32(6):949–958.

167 Toth MJ, Tchernof A, Sites CK, Poehlman ET. Effect of menopausal status on body composition and abdominal fat distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000;24(2):226–231.