



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO

Dipartimento di Scienze Mediche

Scuola di Dottorato in Fisiopatologia Medica

Ciclo XXIII

Titolo tesi:

*“CARATTERISTICHE CLINICHE E VARIANTI GENETICHE DEI
PAZIENTI CON STEATOEPATITE NON ALCOLICA E BMI
INFERIORE A 25 (“LEAN NASH”):”*

Presentata da:

dott. Ramy Younes

Tutor:

prof.ssa Elisabetta Bugianesi

Coordinatore del dottorato:

prof. Franco Veglio

Settore Scientifico Disciplinare: Gastroenterologia MED/12

ANNI ACCADEMICI 2017-2020

Sommario

INTRODUZIONE	4
EPIDEMIOLOGIA DELLA NAFLD	4
PATOGENESI DELLA NAFLD	6
Metabolismo lipidico, lipotossicità e insulino-resistenza	7
Disfunzione mitocondriale	9
Stato infiammatorio nella NAFLD: IL-6 e TNF-α	10
Disfunzione del tessuto adiposo	10
Fattori genetici	11
Fattori epigenetici	12
Fattori dietetici	13
Influenza di The Microbiota: the Gut-Liver Axis	14
STORIA NATURALE DELLA NAFLD.....	15
PAZIENTI CON BMI < 25 E STEATOSI EPATICA NON ALCOLICA: I “LEAN” NAFLD.....	18
Epidemiologia	19
Fisiopatologia	22
Tessuto adiposo in pazienti “lean” NAFLD	22
Genetica nei pazienti “lean” con NAFLD	25
Microbioma intestinale e Metabolomica in pazienti “lean” NAFLD	27
Caratteristiche Cliniche E Istopatologiche	28
Prognosi A Lungo Termine Dei Pazienti “Lean”	31
LO STUDIO (prima parte).....	33
SCOPO DEL LAVORO	33
MATERIALI E METODI	34
BMI (Body Mass Index)	35
Istologia epatica	36
Follow up	36
Analisi Statistiche	37
RISULTATI	39
Analisi Trasversale	39

Analisi longitudinale	45
LO STUDIO (Seconda Parte)	49
MATERIALI E METODI	50
LA COORTE GWAS: I CASI NAFLD	50
LA COORTE GWAS: I CONTROLLI	51
GENOTIPIZZAZIONE	52
Preparazione del DNA	52
Genome-wide Analysis, imputazione e replicazione	52
ANALISI SUI PAZIENTI “LEAN”	53
RISULTATI	54
DISCOVERY COHORT	54
REPLICATION COHORT	57
DISCUSSIONE.....	60
REFERENZE	64

INTRODUZIONE

La steatosi epatica non alcolica (NAFLD) è considerata la manifestazione epatica della sindrome metabolica ed è definita come l'accumulo di grasso a livello epatico in pazienti in cui non si verifica un consumo alcolico eccessivo. Il termine NAFLD comprende un ampio spettro di condizioni, che vanno dal semplice accumulo di grasso ("fegato grasso" o steatosi) alla steatoepatite (NASH), fino alla fibrosi e cirrosi con le sue conseguenze cliniche¹. Nella maggior parte dei pazienti che ne sono affetti, la NAFLD risulta essere una patologia asintomatica ed è associata all'obesità ed alle caratteristiche della sindrome metabolica, ovvero ipertensione, dislipidemia, adiposità centrale ed insulino-resistenza (IR) o diabete^{2,3}.

Recentemente, è stato individuato una particolare popolazione di pazienti in grado di sviluppare la NAFLD anche in assenza di obesità e con un indice di massa corporea (BMI) < 25, i cosiddetti pazienti "lean". Tuttavia, le caratteristiche clinico-patologiche così come la prognosi a lungo termine di questa categoria di pazienti non sono del tutto note.

EPIDEMIOLOGIA DELLA NAFLD

Nel corso del secolo scorso, cambiamenti nello stile di vita hanno portato a riconsiderare le priorità di salute nelle diverse aree del mondo, a causa di una crescente incidenza di malattie non trasmissibili. Nelle patologie epatiche, la nuova epidemia è legata alla NAFLD ed è in parallelo all'aumento mondiale dell'obesità. La prevalenza

globale di NAFLD è attualmente stimata al 24%⁴, con una diffusione capillare in tutti i continenti, e tassi più alti in Sud America (31%) e nel Medio Oriente (32%), seguiti da Asia (27%), USA (24%) ed Europa (23%), mentre è meno comune in Africa (14%)⁵. Essa risulta essere in costante aumento (dal 15% nel 2005 al 25% nel 2010) e, analogamente, il tasso di NASH è quasi raddoppiato nello stesso arco temporale (59,1% contro 33%)⁴. È stato dimostrato che la NAFLD, ed in particolare la NASH, può potenzialmente progredire verso e la cirrosi ed il carcinoma epatocellulare (HCC)⁶. La steatoepatite non alcolica è ora considerata la seconda indicazione per il trapianto di fegato negli Stati Uniti, dopo l'epatite cronica C, ed è in continua crescita⁶.

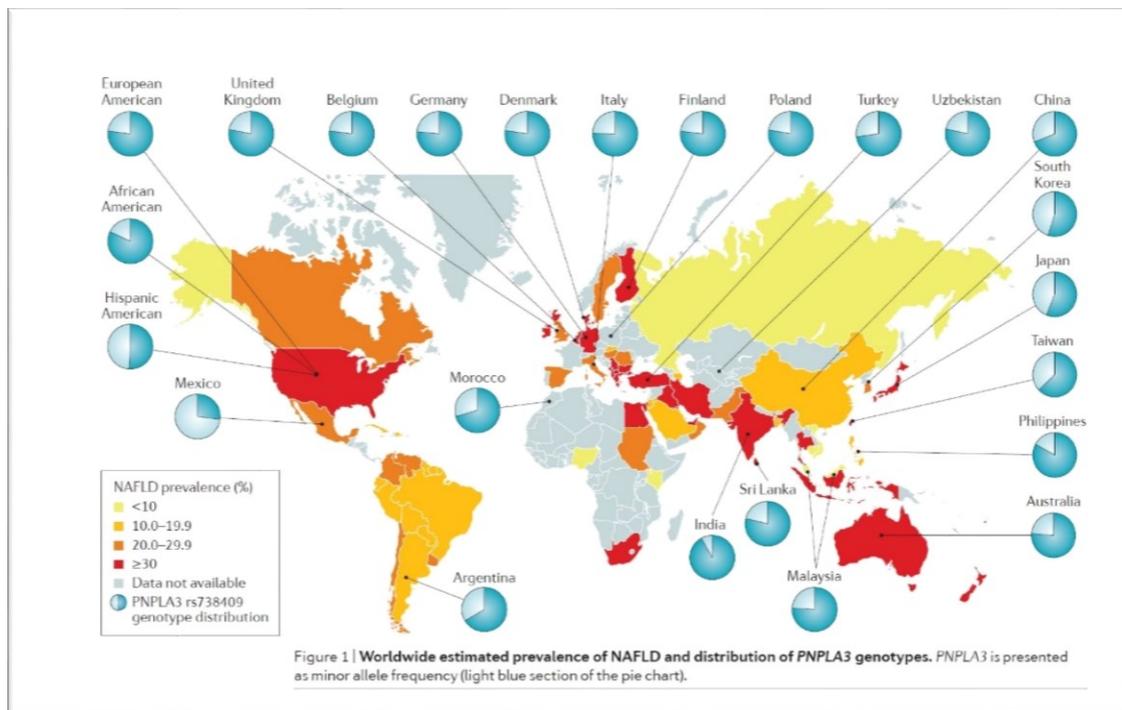


Figura 1. Epidemiologia della NAFLD. Younossi et al., Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology, 2018.

PATOGENESI DELLA NAFLD

Nonostante la sua alta prevalenza, solo una piccola percentuale di soggetti con NAFLD risulta affetto da NASH, con conseguente maggior rischio di fibrosi epatica, cirrosi e carcinoma epatocellulare (HCC) (Figura 2). I pazienti affetti da NASH hanno una ridotta sopravvivenza, dovuta principalmente a cause cardiovascolari ed epatiche, mentre i pazienti con steatosi semplice hanno un'aspettativa di vita simile alla popolazione generale. Questo concetto è stato recentemente messo in discussione da due studi con follow-up longitudinale, che hanno dimostrato che la fibrosi avanzata, ma non la presenza di NASH, predice la mortalità complessiva nei pazienti con NAFLD^{7,8}.

La diagnosi di NAFLD rimane ancora una diagnosi di esclusione e la biopsia epatica resta il gold standard per differenziare la steatosi semplice dalla steatoepatite e dalla fibrosi⁹

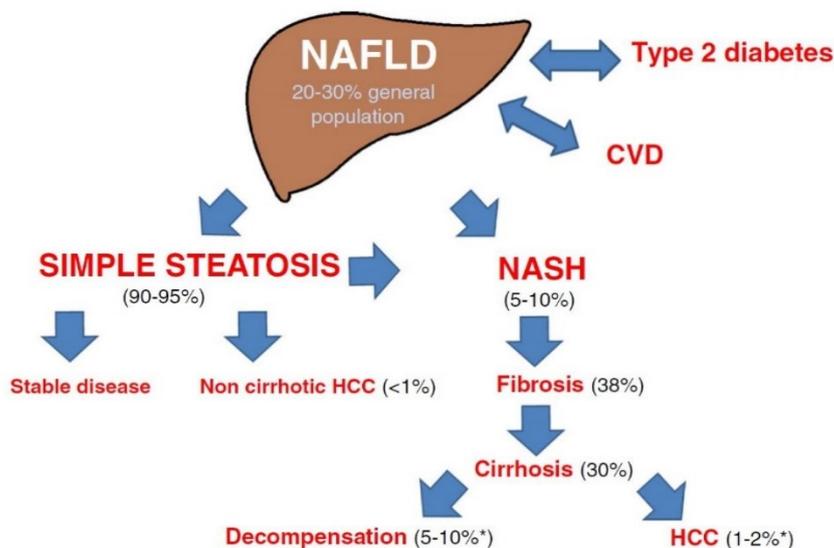


Figura 2. Progressione ed interazioni della NAFLD. Adattata da Buzzetti et al. *Metabolism*, 2015.

Il meccanismo che porta allo sviluppo e alla progressione della NAFLD è complesso e multifattoriale e, tra le diverse teorie che sono state formulate, per molto tempo è stata avvalorata l'ipotesi dei "due hits". In base a questa teoria, l'accumulo epatico di lipidi, secondario allo stile di vita sedentario, alla dieta ricca di grassi, all'obesità e all'insulino-resistenza agisce come primo "hit", sensibilizzando il fegato a ulteriori insulti, che agiscono come "secondo hit". Il "secondo hit" attiva le cascate infiammatorie e la fibrogenesi¹⁰. Tuttavia, è diventato evidente che questa visione è troppo semplicistica per ricapitolare la complessità della NAFLD, dove molteplici fattori paralleli, agendo sinergicamente in individui geneticamente predisposti, sono implicati nello sviluppo e nella progressione della malattia (figura 3). Di conseguenza, un'ipotesi a hits multipli ha ora sostituito l'ipotesi obsoleta dei due hits implicati nella progressione della NAFLD¹¹.

Metabolismo lipidico, lipotossicità e insulino-resistenza

Il grasso si accumula nel fegato dei pazienti con NAFLD principalmente sotto forma di trigliceridi^{12,13}, i quali derivano dall'esterificazione di glicerolo e acidi grassi liberi (FFA). Una volta sintetizzati, i trigliceridi entrano nei pool di stoccaggio o in quello secretorio, con tassi di turnover distinti. Gli FFA, d'altra parte, derivano dalla dieta o dal tessuto adiposo tramite lipolisi e/o liposintesi (de novo lipogenesis – DNL) epatica.

Una volta negli epatociti, gli FFA possono entrare nelle vie di esterificazione o di β -ossidazione¹⁴.

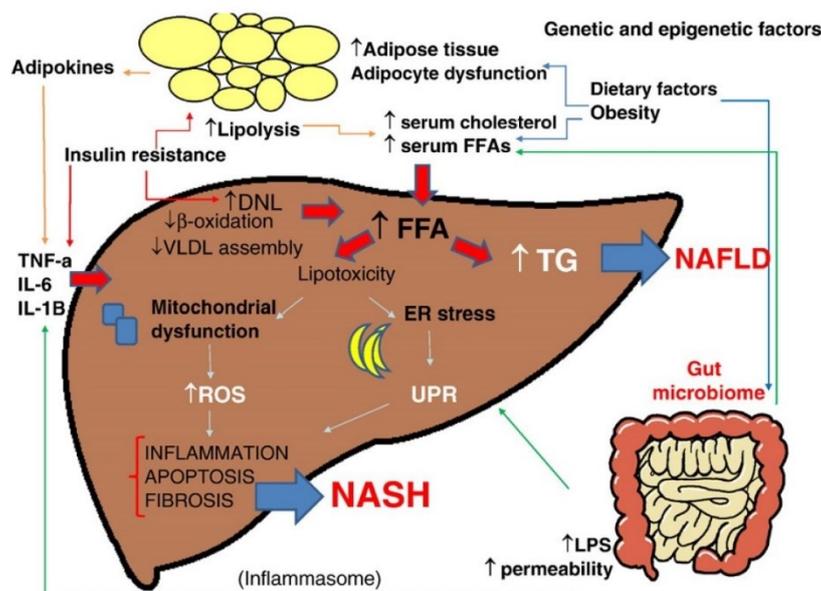


Figura 3. La “Multiple Hit Hypothesis” nella patogenesi della NAFLD. Adattata da Buzzetti et al. *Metabolism*, 2015.

L'accumulo di trigliceridi non è epatotossico di per sé e potrebbe rappresentare un meccanismo difensivo per bilanciare l'eccesso di FFA, come dimostrato nei modelli animali¹⁵; ma l'aumento della loro concentrazione si accompagna alla generazione di metaboliti tossici, lipotossicità e danno epatico¹⁶. Inoltre, indipendentemente dal meccanismo sottostante, i pazienti con NAFLD hanno un'aumentata DNL rispetto ai controlli, che non viene soppressa dal digiuno, e livelli plasmatici notturni più elevati di FFA¹⁷. Questi, attraverso l'attivazione della serinasi-chinasi, possono indurre difetti nelle vie di segnalazione dell'insulina negli epatociti e contribuire allo stato di insulino-resistenza¹⁸. Inoltre, l'insulina ha una potente azione inibente la lipolisi del tessuto

adiposo: negli stati di insulino-resistenza, questa soppressione è compromessa, con conseguente aumento del flusso di FFA nel fegato¹⁹.

La resistenza all'insulina è una caratteristica cardinale della NAFLD ed è più diffusa nella NASH rispetto alla semplice steatosi²⁰. L'insulino-resistenza è pertanto uno dei "molteplici hits" che predispone allo sviluppo della NAFLD e alla progressione verso la NASH. Nei pazienti con NAFLD, sia fattori genetici che ambientali interferiscono ulteriormente con il pathway dell'insulina e contribuiscono al mantenimento ed al peggioramento dell'insulino-resistenza^{21,22}.

Disfunzione mitocondriale

Alterazioni strutturali e funzionali mitocondriali contribuiscono alla patogenesi della NAFLD. Le alterazioni strutturali comprendono il danneggiamento del DNA mitocondriale così come cambiamenti morfologici ed ultrastrutturali. Le alterazioni funzionali, invece, riguardano la catena respiratoria e la β -ossidazione mitocondriale²³.

Se la funzione mitocondriale o perossisomale non può gestire l'aumento del flusso lipidico, l'ossidazione respiratoria può collassare con la compromissione dell'omeostasi lipidica, la generazione di metaboliti tossici e la sovrapproduzione di ROS²⁴. Queste molecole attivano percorsi infiammatori che contribuiscono alla necroinfiammazione degli epatociti²⁵ ed al peggioramento del danno mitocondriale. È stata infatti dimostrata una correlazione tra insulino-resistenza, obesità, livelli di TNF- α e disfunzione mitocondriale²⁶. Inoltre, i ROS, insieme alle LDL ossidate, possono attivare le cellule di Kupffer e le cellule stellate epatiche, portando ad infiammazione e fibrosi²⁷. La disfunzione mitocondriale è un evento patogenetico chiave nella genesi

della NAFLD e i meccanismi di alterazione del metabolismo lipidico rimangono ancora poco chiari.

Stato infiammatorio nella NAFLD: IL-6 e TNF- α

L'aumento dei livelli di FFA e la conseguente lipotossicità, insulino-resistenza, disfunzione periferica del tessuto adiposo ed endotossine di derivazione intestinale concorrono ad attivare e mantenere la produzione ed il rilascio di citochine pro-infiammatorie, sia a livello sistemico che a livello epatico.

La produzione epatica di citochine, con ruolo chiave nella progressione dalla steatosi alla NASH, è supportata da studi su modelli animali, i quali dimostrano che l'esposizione a livelli aumentati di citochine pro-infiammatorie porta a cambiamenti istologici tipicamente osservati nella NASH, come la necrosi e l'apoptosi degli epatociti, la chemiotassi dei neutrofili, l'attivazione delle cellule stellate epatiche e la produzione di corpi di Mallory²⁸. Inoltre, i livelli sierici ed epatici di TNF- α sono aumentati nei pazienti con NASH e sono correlati con la gravità istologica del danno epatico²⁹. Infine, l'infiammazione cronica e l'attivazione di NF- κ B possono promuovere la carcinogenesi, evidenziando come lo stato infiammatorio cronico della NAFLD possa avere un ruolo nello sviluppo dell'HCC³⁰.

Disfunzione del tessuto adiposo

Il tessuto adiposo non è inerte come tradizionalmente pensato ma ha una funzione endocrina e secerne ormoni (adipochine) come la leptina e l'adiponectina³¹. Esso contribuisce al mantenimento di stati infiammatori di basso grado, producendo citochine pro-infiammatorie: infatti i livelli sierici di IL-6 e l'espressione del TNF- α sono aumentati nei pazienti obesi e successivamente diminuiscono in seguito alla

perdita di peso^{32,33}. Inoltre, nei pazienti con NAFLD, l'aumentata espressione di geni infiammatori così come l'attivazione dei macrofagi nel tessuto adiposo sia sottocutaneo che viscerale sono correlati alla progressione dalla semplice steatosi alla NASH ed alla fibrosi.

La leptina è un ormone anoressigeno di 16-kDa, con azioni pro-infiammatorie, che impedisce l'accumulo di lipidi in siti non adiposi. Tuttavia, l'aumento della leptina nei soggetti obesi ed il suo ruolo pro-fibrogenico sono stati dimostrati in vari modelli sia in vitro che animali^{34,35}. Tuttavia, nonostante l'abbondanza di dati in modelli animali, gli effetti ed il significato dei livelli sierici della leptina nei pazienti con NAFLD o NASH non sono ancora del tutto specificati³⁶.

L'adiponectina, al contrario, migliora l'insulino-resistenza epatica e periferica ed ha attività antinfiammatorie ed epato-protettive³⁷. Gli effetti anti-infiammatori vengono ottenuti bloccando l'attivazione di NF- κ B, secernendo citochine anti-infiammatorie ed inibendo il rilascio di citochine pro-infiammatorie come TNF- α e IL-6³⁸. L'adiponectina ha anche un effetto anti fibrotico diretto³⁹, che potrebbe essere mediato dall'attivazione di AMPK⁴⁰. È stato dimostrato che la fibrosi epatica risulta essere maggiore in topi privi di adiponectina³⁹, mentre la somministrazione di adiponectina ricombinante ha migliorato significativamente la steatoepatite⁴¹. Nei pazienti obesi, ridotti livelli di adiponectina ed un aumento nei livelli di leptina possono causare steatosi epatica ed attivazione di infiammazione e fibrogenesi³⁶.

Fattori genetici

Le varianti genetiche, in particolare sotto forma di polimorfismi a singolo nucleotide, influenzano il flusso epatico di FFA, lo stress ossidativo, la risposta alle endotossine,

la produzione e l'attività di citochine e sono determinanti per lo sviluppo e la progressione della NAFLD⁴².

Studi genetici hanno stabilito il ruolo del polimorfismo del gene *PNPLA3* (patatin-like phospholipase domain-containing protein 3) nello sviluppo e nella progressione della NAFLD, in particolare la variante I148 M (rs738409 C>G). Il gene *PNPLA3* codifica per una proteina chiamata adiponutrina, la quale ha omologie significative con enzimi implicati nei processi del metabolismo lipidico e potrebbe esercitare un'attività lipolitica sui trigliceridi⁴³.

D'altra parte, una variante del gene *TM6SF2* (Transmembrane 6 superfamily 2) è anch'essa probabilmente coinvolta nella patogenesi della NAFLD⁴⁴. La proteina *TM6SF2* promuove la secrezione di VLDL, mentre la variante rs58542926, attraverso una perdita di funzione, è associata a steatosi epatica, livelli plasmatici più bassi di VLDL e livelli di ALT più elevati⁴⁵. L'allele minore di *TM6SF2* è stato associato a fibrosi epatica avanzata in due coorti di NAFLD, comprendenti rispettivamente 349 e 725 pazienti⁴⁶. Nonostante siano a più alto rischio di progressione della NASH, i portatori di questa variante sono protetti contro le malattie cardiovascolari, probabilmente a causa della riduzione dei livelli di VLDL⁴⁷.

Fattori epigenetici

Gli studi clinici sulla riprogrammazione epigenetica nella NASH stanno cominciando ad emergere in questo ultimo periodo. Le modificazioni epigenetiche sono stabili cambiamenti a livello trascrizionale, che evidenziano un alto grado di plasticità evolutiva guidata dall'ambiente, e comprendono la metilazione del DNA, le modificazioni degli istoni e l'attività dei micro-RNA (miRNA), senza alterare la

sequenza di basi azotate del DNA e contribuendo all'omeostasi cellulare⁴⁸. È stato ipotizzato che l'interruzione di questo equilibrio possa determinare un'aumentata suscettibilità alla NAFLD⁴⁹. In uno studio su modelli animali è stata osservata un'associazione tra modificazioni epigenetiche, ovvero la perdita particolarmente pronunciata di sequenze genomiche e ripetitive di citosina, e lo sviluppo di NASH⁵⁰.

Fattori dietetici

I fattori dietetici, sia in termini di quantità che di apporto calorico, ma anche di nutrienti specifici, contribuiscono allo sviluppo della steatosi epatica non alcolica.

Il fruttosio è un fattore dietetico pro-infiammatorio e lipogenico, inducendo stress ossidativo e sovra-regolazione del TNF- α ⁵¹. Nei modelli murini, la NAFLD indotta dal fruttosio è associata ad eccessiva crescita batterica e ad aumentata permeabilità intestinale⁵². Nei pazienti con NAFLD, l'ingestione giornaliera di fruttosio è associata ad un aumento della fibrosi⁵³ ed è stato suggerito che ciò sia dovuto principalmente al fruttosio industriale piuttosto che a quello derivato dalla frutta naturale. Bevande zuccherate contenenti fruttosio sotto forma di saccarosio o sciroppo di mais sono associate ad un aumentato rischio di sviluppare steatosi e NASH, specialmente negli individui sovrappeso/obesi⁵⁴.

Al contrario, il caffè sembra avere un ruolo protettivo nei pazienti con NAFLD⁵⁵; questa azione è dovuta ai vari agenti antiossidanti contenuti nella bevanda ma anche alla caffeina in sé.

I grassi monoinsaturi, tipici di una dieta di tipo mediterraneo, hanno anch'essi confermato il loro ruolo protettivo.

Influenza di The Microbiota: the Gut-Liver Axis

È sempre più riconosciuto che il microbioma intestinale è implicato nella patogenesi e nella progressione della NAFLD, attraverso il cosiddetto asse intestino-fegato. Un'analisi dettagliata del microbioma umano ha portato alla luce l'esistenza di "enterotipi" distinti⁵⁶. In modelli animali è stato dimostrato un microbioma "obeso", ovvero con una maggiore capacità di estrarre energia dalla dieta⁵⁷. Inoltre, questa caratteristica dell'obesità è trasmissibile, poiché la colonizzazione di topi privi di germi con il "microbioma obeso" determina un significativo aumento del grasso corporeo totale rispetto alla colonizzazione con un "microbioma magro"⁵⁷.

Ricevendo più del 50% del suo apporto sanguigno dal distretto splancnico, il fegato è uno degli organi più esposti alle tossine derivate dall'intestino e rappresenta anche la prima linea di difesa contro i prodotti derivati da batteri. I pazienti con NAFLD hanno un aumento significativo della permeabilità intestinale ed una maggiore proliferazione batterica dell'intestino tenue rispetto ai controlli sani⁵⁸. Tuttavia, la correlazione tra crescita batterica intestinale eccessiva e sviluppo e progressione della NASH è stata osservata anche in assenza di aumentata permeabilità della mucosa intestinale⁵⁹.

Come mostrato in uno studio recente, la disbiosi del microbiota può promuovere la NASH riducendo i livelli di colina o aumentando i livelli di metilamina⁶⁰. Un altro meccanismo attraverso il quale il microbiota intestinale promuove la NAFLD è l'alterazione del metabolismo degli acidi biliari, interferendo con la segnalazione del recettore del farnesoide X (FXR) e quindi con processi quali l'esportazione dei prodotti della DNL epatica e delle VLDL⁶¹.

Il microbiota intestinale è anche la principale fonte di produzione di alcol endogeno e, nei modelli animali, le anomalie del microbioma intestinale associate all'obesità sono state correlate con livelli elevati di alcol rilevati con test del respiro⁶².

STORIA NATURALE DELLA NAFLD

Negli studi di follow up a lungo termine, la steatosi semplice mostra una prognosi simile alla popolazione generale di uguale età e sesso, mentre i soggetti con steatoepatite non alcolica mostrano una ridotta aspettativa di vita.

La NASH, infatti, segue un decorso potenzialmente progressivo con un rischio più elevato di morbilità e mortalità epato-relata⁶³. (Figura 4). L'insulino-resistenza, il diabete mellito di tipo 2, un indice di massa corporea elevato (*Body Mass Index* - BMI, superiore a 30 kg/m²) e altri fattori della sindrome metabolica, la familiarità o presenza di fattori di rischio genetici (in particolare l'omozigosi per variante Ile148Met di PNPLA3) sono fattori di rischio riconosciuti per lo sviluppo di una patologia epatica avanzata⁶⁴.

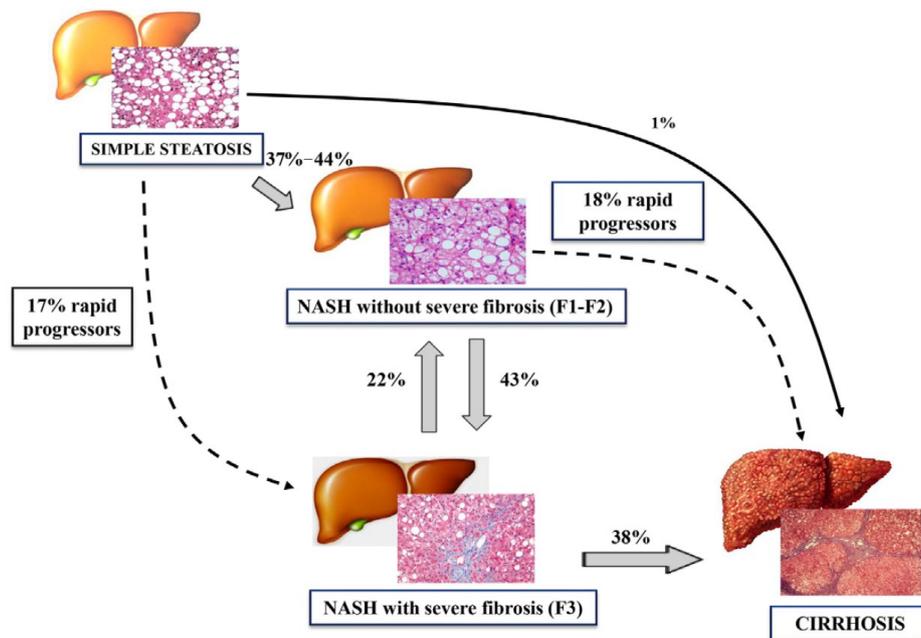


Figura 4. Storia naturale della NAFLD. Adattata da Marengo et al. Clin Liv Dis 2016.

In circa il 10-25% dei casi la NASH progredisce verso la cirrosi ed è considerata una possibile causa di cirrosi criptogenetica (CC). Nel 74% delle biopsie epatiche eseguite in una coorte di pazienti con diagnosi di cirrosi criptogenetica è possibile distinguere almeno una caratteristica istologica della NASH. Anche qualora le caratteristiche della NASH non siano più riconoscibili a livello istologico, è stata documentata una prevalenza di obesità e diabete mellito di tipo 2 nei pazienti con cirrosi criptogenetica simile alla prevalenza documentata nella NASH e significativamente superiore alla prevalenza documentata nelle cirrosi post-virali o autoimmuni. Inoltre, è frequente l'insorgenza *de novo* di NAFLD o NASH nei pazienti sottoposti a trapianto di fegato per cirrosi criptogenetica⁶⁵. La presenza di cirrosi aumenta il rischio di carcinoma epatocellulare (HCC)⁶⁵, tuttavia nei pazienti con NASH l'HCC può insorgere anche in forme istologiche meno avanzate⁶⁶. La prevalenza di epatocarcinoma correlato a

NAFLD è in aumento: in Occidente il 4-22% dei casi di HCC è attribuibile a NAFLD⁶⁷ e l'incidenza annuale di HCC nella NASH è stimata intorno allo 0.3%⁶⁸. Il rischio di HCC dipende dalla gravità della sottostante patologia epatica: i soggetti con NASH hanno un rischio di HCC aumentato rispetto ai soggetti che presentano steatosi semplice⁶⁷. Un aumentato rischio di HCC è associato non solo alla presenza di NAFLD, ma anche ai fattori metabolici a essa correlati, come diabete mellito e obesità⁶⁸. Inoltre, una aumentata suscettibilità all'insorgenza di HCC è legata alla presenza della mutazione Ile148Met del gene PNPLA3⁶⁷.

PAZIENTI CON BMI < 25 E STEATOSI EPATICA NON ALCOLICA: I “LEAN” NAFLD

La pandemia dell'obesità ha portato a una diffusione mondiale della steatosi epatica non alcolica (NAFLD) e nuovi dati mostrano che la NAFLD ha avuto un aumento quasi esponenziale della sua prevalenza oltre che nei paesi occidentali, in Sud America, Asia e Medio Oriente⁵.

La steatosi epatica non alcolica è una condizione patologica che classicamente colpisce i pazienti con anomalie metaboliche, per lo più in sovrappeso o obesi, con un indice di massa corporea (BMI) maggiore di 25 kg/m² o maggiore di 30 kg/m².

Negli ultimi anni, prove crescenti hanno descritto un diverso fenotipo di pazienti, i Metabolically-Obese-Normal-Weight (MONW), cioè pazienti con un BMI normale, ma che presentano caratteristiche patologiche e cliniche normalmente riscontrate in pazienti con obesità⁶⁹.

In questi pazienti, la steatoepatite non alcolica (NASH) è un comune riscontro e fa parte delle alterazioni metaboliche, essendo riconosciuta come manifestazione epatica della sindrome metabolica⁷⁰.

Questi pazienti, definiti “lean”, ed identificati con un indice BMI <25, presentano alterazioni caratteristiche della sindrome metabolica, sebbene possano anche essere totalmente asintomatici. Possono inoltre presentare steatosi all'esame ecografico ed alterazione degli enzimi epatici⁷¹.

Alla biopsia epatica, i pazienti “lean” possono presentare l'intero spettro delle caratteristiche istopatologiche tipiche della steatoepatite non alcolica, vale a dire steatosi, infiammazione lobulare, degenerazione epatocitaria e/o fibrosi⁷².

La maggior parte degli studi che descrivono le caratteristiche dei pazienti “lean” sono stati effettuati nel continente asiatico; non tutti questi studi hanno però adottato i giusti criteri di inclusione nel reclutamento dei pazienti “lean” con NAFLD. Infatti, mentre la maggior parte di questi studi confrontava pazienti con un BMI < 25 come cut-off, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) stabilisce che per l'etnia asiatica un BMI <23 indica una persona con peso normale, un BMI tra 23 e 25 indica sovrappeso, mentre un BMI > 25 indica una persona affetta da obesità. Pertanto, nelle coorti asiatiche il termine "lean" dovrebbe essere usato solo quando negli studi vengono inseriti pazienti con un BMI <23, mentre i pazienti con BMI <25 saranno comunemente indicati come "non-obesi"⁷³.

Epidemiologia

La biopsia epatica è lo strumento più accurato per la diagnosi di NAFLD, specialmente quando evolve verso la forma infiammatoria di NASH⁶³. In considerazione dei suoi costi, rischi e impraticabilità, questo strumento diagnostico non può essere applicato su larga scala.

L'assenza di un marker biologico non invasivo richiede l'utilizzo di tecniche surrogate che non sempre hanno i requisiti necessari di precisione e accuratezza⁷⁴. L'ecografia addominale è stato lo strumento più utilizzato per definire la steatosi epatica e per

accompagnare la diagnosi di NAFLD quando non ci sono evidenze di altre patologie epatiche o dati in anamnesi che possano giustificare la steatosi. Benché ampiamente diffusa, l'ecografia rimane una tecnica operatore-dipendente e la sua sensibilità e specificità nel rilevare la steatosi non supera rispettivamente il 73% e il 70%⁷⁵, rappresentando il limite maggiore di gran parte degli studi condotti finora per identificare la prevalenza e le caratteristiche dei pazienti “lean” con NAFLD.

In Asia, uno dei primi studi che descrivono la NAFLD in una popolazione di soggetti non obesi è stato condotto a Taiwan nel 2006⁷⁶. In questo studio, gli sperimentatori hanno raccolto dati clinici e biochimici di 2520 residenti della municipalità di Shengang, sottoposti a ecografia addominale.

Utilizzando un indice BMI di 25 come cut-off, hanno scoperto che 61 soggetti dei 1.444 partecipanti non obesi presentavano steatosi all'esame ecografico (4,2%), senza altri segni di malattia epatica cronica. In un successivo studio epidemiologico condotto in un'area molto povera e rurale del Bengala Occidentale, in India, il tasso di soggetti con un BMI <25 era di circa il 93%. La NAFLD è stata identificata solo nell'8,6% della popolazione complessiva; tuttavia, il 75% dei soggetti con NAFLD apparteneva al gruppo di non obesi⁷⁷. Dopo questi due studi epidemiologici pionieristici, sono stati condotti molti studi che hanno indagato il pattern “non-obeso” nella popolazione asiatica.

In Cina, lo studio Zhejiang Zhenhai ha avuto lo scopo di valutare prevalenza e fattori di rischio per la steatosi epatica non alcolica tra la popolazione di non obesi (BMI <25). Sono state arruolate 6.905 persone non obese e la NAFLD è stata diagnosticata nel 7,27% dei partecipanti allo studio⁷⁸. Tra i 2.000 soggetti che sono stati sottoposti

ad esami annuali di routine in un altro centro cinese, la steatosi epatica non alcolica è stata riscontrata in quasi il 18% dei soggetti non obesi (BMI <24) che ha eseguito l'ecografia addominale⁷⁹. In un ampio studio condotto nella popolazione coreana, sono stati reclutati 29.994 volontari; tra questi, il 12,6% dei non-obesi (n =3.014) ha riportato una diagnosi di NAFLD⁸⁰. Questi risultati sono stati confermati da un altro programma coreano di check-up collettivo dove, su una popolazione di 2.307 partecipanti, 1.487 erano non obesi e tra questi 333 (il 22,4%) presentava una diagnosi di NAFLD al basale⁸¹.

Utilizzando la spettroscopia a risonanza magnetica (MRS) per rilevare il tessuto adiposo epatico, uno studio di Hong Kong ha diagnosticato la NAFLD nel 19,3% dei candidati non obesi⁸².

Confrontati con le indagini asiatiche descritte sopra, gli studi nella popolazione caucasica sono meno numerosi e, in generale, coinvolgono un numero minore di soggetti. Nel 2000, uno studio italiano che indagava la prevalenza della steatosi epatica in soggetti obesi e bevitori vs controlli sani, ha rilevato che quasi il 16% dei 67 controlli non obesi e non bevitori aveva una steatosi all'ecografia addominale⁸³.

In Islanda, gli sperimentatori dello studio AGES-Reykjavik hanno evidenziato un'associazione tra il grasso viscerale, in particolare quello localizzato a livello epatico, con la sindrome metabolica in pazienti "lean" caucasici⁸⁴. In questo studio, i pazienti sono stati sottoposti a misurazione mediante TC del grasso viscerale e hanno mostrato steatosi e sindrome metabolica anche i pazienti con un BMI mediano di 22.7.

Ad oggi, il più grande studio epidemiologico che ha analizzato la prevalenza e le caratteristiche dei pazienti "lean" NAFLD caucasici è stato condotto negli Stati Uniti,

utilizzando i dati del National Health and Nutrition Examination Survey III (NHANES III)⁷¹. Tra gli 11.613 soggetti che hanno soddisfatto i criteri di inclusione, 4.457 erano “lean” (caucasici con BMI <25); di questi, 431 (7,4%) ha evidenziato una diagnosi di NAFLD, intesa come presenza di steatosi all'esame ecografico in assenza di qualsiasi altra malattia epatica.

Fisiopatologia

I meccanismi patologici che sono alla base dello sviluppo della steatosi epatica non alcolica in soggetti “lean” non sono del tutto chiari. Tuttavia, studi sulle funzioni del tessuto adiposo, analisi genetiche, studi in vitro e in vivo su modelli animali e infine la ricerca sul microbioma intestinale hanno permesso di formulare alcune ipotesi sui meccanismi fisiopatologici.

Tessuto adiposo in pazienti “lean” NAFLD

Un tessuto adiposo disfunzionale è stato collegato all'incidenza e alla progressione della NAFLD indipendentemente da altri fattori di rischio metabolici⁸⁵. Considerando il tessuto adiposo come un organo a sé, esso è in grado di produrre citochine pro-infiammatorie, ad esempio IL-6 e TNF- α , ed è un terreno fertile per l'attivazione dei macrofagi che favoriscono lo sviluppo della fibrosi⁸⁶⁻⁸⁸.

In un contesto di insulino-resistenza e sindrome metabolica, l'interazione delle diverse componenti rafforza l'attività patologica⁸⁹. A questo proposito, interpretare i valori di

BMI come una semplice associazione tra basso BMI e basso contenuto di grasso corporeo potrebbe essere fuorviante. Dato lo stesso indice di massa corporea, la popolazione asiatica ha una percentuale più alta di grasso corporeo rispetto ai caucasici. Allo stesso modo, considerando lo stesso valore di BMI, vi è un'ampia differenza nella quantità di tessuto adiposo nell'ambito della stessa popolazione asiatica⁷³. Questa diversità percentuale non è solo un confronto formale: soggetti con lo stesso indice di massa corporea hanno outcome metabolici e cardiovascolari diversi a seconda della quantità di grasso corporeo, soprattutto viscerale⁷³.

Gli studi sul turnover degli adipociti hanno dimostrato che il numero totale di adipociti è influenzato dalla qualità della dieta ed è determinato già nell'infanzia o nella prima età adulta e rimane costante durante la vita, nonostante una significativa perdita o aumento di peso. Al contrario, il volume degli adipociti cambia continuamente ed è influenzato dal BMI⁹⁰. Dal momento che sia il numero degli adipociti che il volume contribuiscono alla determinazione della massa grassa, è possibile che la prevalenza di soggetti "lean" affetti da NAFLD in Asia e nei paesi in via di sviluppo sia dovuta ad una dieta ipercalorica durante l'età adulta, piuttosto che a un apporto energetico elevato durante l'infanzia, tipico dei paesi occidentali sviluppati. La presenza di un numero minore di adipociti durante la prima fase della vita fa sì che la popolazione magra modifichi maggiormente il volume degli adipociti nell'età adulta, sviluppando le caratteristiche della sindrome metabolica con una inferiore massa grassa.

Altre ricerche hanno portato, invece, all'ipotesi di una diversa compartimentazione del grasso negli individui "lean". Dal confronto tra i soggetti sud-asiatici ed europei, sembra che i soggetti "lean" abbiano una maggiore quantità di tessuto adiposo sottocutaneo, il quale ha le stesse caratteristiche del tessuto adiposo viscerale, ovvero

rappresenta un ambiente metabolicamente disfunzionale^{91,92}. Ciò potrebbe parzialmente spiegare l'insorgenza di alterazioni metaboliche tipiche dell'obesità, compresa la sindrome metabolica e la steatoepatite, in pazienti “lean”. Inoltre, un riscontro di NASH è stato individuato nel 55% dei pazienti con diagnosi bioptica di NAFLD e circonferenza della vita (generalmente accettata come surrogato del grasso viscerale) ≤ 94 cm e ≤ 80 cm rispettivamente per maschi e femmine. In quegli stessi pazienti non è stata riscontrata alcuna correlazione tra grasso viscerale, NASH o fibrosi, presupponendo un'interazione con il tessuto adiposo di altri compartimenti⁹³. Inoltre, indipendentemente dalla quantità di grasso viscerale, rispetto ai soggetti sovrappeso o obesi, i pazienti “lean” sembrano avere un tessuto adiposo più attivo, come emerso dal calcolo del “visceral adiposity index”, un indicatore delle funzioni del grasso viscerale associato al rischio cardio-metabolico^{79,94}.

D'altra parte, una recente revisione sistemica ha riportato che i pazienti “lean”, nonostante un peso normale, mostrano un eccesso di tessuto adiposo addominale rispetto ai soggetti obesi⁹⁵. Questa osservazione sottolinea un'interpretazione non univoca della compartimentazione del tessuto adiposo nei pazienti “lean” ed enfatizza l'ipotesi di differenti patterns di soggetti “lean” nelle diverse etnie.

In uno studio recente, i soggetti “lean” sono stati anche associati a un più alto tasso di lipoproteine ossidate a bassa densità (oxLDL), che promuovono lo stress ossidativo e sono in grado di generare anticorpi. Sebbene lo studio abbia considerato, in modo inappropriato, come individui “lean” soggetti con un BMI <30 , è interessante la correlazione tra il rapporto oxLDL/HDL e NASH, ballooning e fibrosi⁹⁶.

Infine, i pazienti “lean” con NAFLD hanno mostrato una maggiore concentrazione di acidi grassi (FFA) rispetto ai controlli sani e un flusso portale di FFA superiore, che potrebbe indurre accumulo di grasso intraepatico^{97,98}.

Genetica nei pazienti “lean” con NAFLD

La NAFLD è classicamente legata all'obesità. La presenza di una minoranza di soggetti “lean” potrebbe implicare una predisposizione genetica allo sviluppo di questa condizione patologica. Tuttavia, la ricerca sulle cause genetiche che contribuiscono all'incidenza della NAFLD nei pazienti “lean” è ancora agli inizi.

Come riportato da analisi sul genoma, eseguite inizialmente nell'ambito del Dallas Heart Study e ampiamente confermate in letteratura, una specifica variante del “patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3), ovvero rs738409[G], codificante per la mutazione I148M, è associata ad un aumento sia del grasso che dell'infiammazione epatica⁹⁹.

Confrontando soggetti obesi e non obesi con NAFLD, è stata riscontrata una più alta prevalenza dell'allele PNPLA3[G] tra i soggetti non obesi (78,4% vs 59,8%), indipendentemente associata con la NAFLD anche nell'analisi multivariata⁸².

Questa osservazione è stata confermata in uno studio in cui sono stati reclutati pazienti “lean” giapponesi con NAFLD (BMI <23). Sebbene nella popolazione in studio non ci fossero portatori omozigoti GG, nei soggetti “lean” l'allele G era un fattore predittivo di NAFLD in tutte le fasi dell'analisi multivariata, mentre non ha mantenuto la sua significatività nella popolazione obesa¹⁰⁰.

In un altro studio giapponese, in cui sono stati reclutati 540 pazienti con NAFLD sottoposti a biopsia (134 non obesi), è stata riscontrata una più alta prevalenza del genotipo omozigote GG della variante rs738409 nei pazienti non obesi rispetto agli individui obesi con steatosi epatica. Inoltre, il polimorfismo GG è risultato essere un fattore predittivo indipendente per lo sviluppo della NAFLD, insieme al diabete, esclusivamente nella coorte di pazienti non obesi¹⁰¹.

La proteina di trasferimento dell'estere del colesterolo (CETP) è coinvolta nello scambio di trigliceridi tra le lipoproteine⁴⁰. Due polimorfismi a singolo nucleotide (rs12447924 e rs12597002) sono stati associati con la NAFLD in soggetti caucasici adolescenti di sesso femminile e BMI <25. In particolare, questa associazione è risultata essere influenzata dall'adiposità, per cui il rischio è espresso maggiormente in corrispondenza di minori valori di spessore cutaneo, cosicché il rischio di sviluppare la NAFLD nelle pazienti "lean" omozigoti, eterozigoti e wild-type è stato oltre il 30%, 10-15% e 3.5% rispettivamente¹⁰².

Infine, uno studio recente e molto interessante su modelli animali ha ipotizzato che una mancanza della fosfatidiletanolamina N-metiltransferasi (PEMT) potrebbe svolgere un ruolo chiave nello sviluppo della steatoepatite non alcolica in individui "lean"¹⁰³. La PEMT è un enzima coinvolto nella sintesi della fosfatidilcolina nelle cellule epatiche. I topi PEMT ^{-/-}, sottoposti ad una dieta ad alto contenuto di grassi e saccarosio, non hanno sviluppato obesità o insulino-resistenza rispetto a topi PEMT ^{+/+} ed hanno presentato livelli normali di colesterolo e trigliceridi.

Inoltre, è stato dimostrato che topi PEMT ^{-/-} hanno sviluppato steato-epatite e dopo 90 settimane tutti i topi PEMT ^{-/-} hanno sviluppato tumori epatici. La quantificazione

dell'espressione di mRNA-PEMT nelle biopsie epatiche ha permesso di identificare un'espressione inferiore di PEMT in pazienti con steatoepatite. È stata inoltre riportata una correlazione significativa con bassi valori di BMI, che potrebbe suggerire il deficit di PEMT come agente eziologico della NASH¹⁰³.

Microbioma intestinale e Metabolomica in pazienti “lean” NAFLD

Studi recenti hanno evidenziato la connessione tra alterazioni del microbioma intestinale e l'incidenza e la progressione della steatosi epatica non alcolica. In effetti, la NAFLD è associata a un tasso più basso di *Bacteroidetes* e ad un più alto tasso di *Prevotella* e *Porphyromonas*, nonché a un numero più elevato di batteri produttori di etanolo¹⁰⁴.

Duarte et al. hanno descritto una differenza significativa nell'abbondanza di *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* in pazienti con steato-epatite non alcolica rispetto ai controlli¹⁰⁵. I pazienti “lean” con NASH hanno mostrato la stessa differenza quando paragonati a controlli sani sia “lean” che obesi. D'altra parte, i pazienti “lean” con NASH presentano meno abbondanza di *Ruminococcus* e una carenza di Lattobacilli rispetto ai pazienti obesi o in sovrappeso sempre con NASH¹⁰⁵.

Le liso-fosfatidilcoline (liso-PC) sono fosfolipidi con effetti antinfiammatori e sensibilizzanti dell'insulina e livelli più bassi di liso-PC sono stati osservati nei pazienti obesi¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Analisi metabolomiche hanno mostrato livelli inferiori di liso-PC nei pazienti con NAFLD sia “lean” che obesi rispetto ai controlli sani¹⁰⁹. D'altra parte, i

pazienti “lean” hanno evidenziato una più alta concentrazione di lisina rispetto ai pazienti obesi¹⁰⁹. Essendo correlata all'accumulo di grasso viscerale¹¹⁰, la lisina può rappresentare un segno dell'ambiente metabolico disfunzionale negli individui “lean” con steatosi epatica non alcolica.

Caratteristiche Cliniche E Istopatologiche

Le caratteristiche cliniche dei pazienti “lean” affetti da NAFLD non sono descritte in modo univoco in letteratura. Se da un lato molti studi si sono concentrati sulla descrizione dei pazienti “lean” e sul loro confronto con i controlli sani, pochi hanno dato una visione più dettagliata delle caratteristiche cliniche e istopatologiche di questo gruppo di pazienti nei diversi stadi istologici della malattia.

In questo contesto, e considerando gli studi condotti nei paesi occidentali, Younossi et al. hanno riportato che i pazienti “lean” con NAFLD (BMI <25) nella popolazione di NHANES III erano più giovani, prevalentemente di sesso femminile e con minore prevalenza di insulino-resistenza o dislipidemia. Tra gli individui che soddisfacevano la definizione clinica di NASH, adattata per quella specifica coorte (ovvero pazienti con NAFLD ed elevate aminotransferasi, in presenza di diabete o insulino-resistenza), la prevalenza di soggetti “lean” era pari a 1,38%⁷¹.

Rispetto ai pazienti obesi con NAFLD, Fieldman et al. hanno riportato che i pazienti “lean” di origine caucasica hanno una maggiore concentrazione di lipoproteine ad alta densità (HDL), e livelli inferiori di trigliceridi e di glucosio a digiuno, oltre a una minore concentrazione delle citochine pro-infiammatorie IL6 e TNF- α . I pazienti

“lean” con NAFLD hanno mostrato anche un livello inferiore di adiponectina rispetto ai controlli sani, con concentrazioni simili alla popolazione obesa. Al contrario, essi hanno livelli di leptina simili ai controlli sani e significativamente inferiori rispetto ai pazienti obesi con NAFLD¹⁰⁹.

Un recente studio retrospettivo italiano ha analizzato i dati di 669 pazienti NAFLD caucasici sottoposti a biopsia. I soggetti “lean” con NAFLD (BMI <25) hanno riportato un tasso più basso di sindrome metabolica e diabete rispetto ai soggetti in sovrappeso o obesi e presentavano un'incidenza più bassa di diagnosi istologica di NASH e fibrosi F2 o superiore. Inoltre, i pazienti “lean” mostravano un danno cardiovascolare inferiore, espresso come un minore spessore dell'intima media carotidea ed una bassa prevalenza di placche¹¹¹.

Nelle coorti asiatiche, le condizioni della sindrome metabolica (circonferenza vita, glicemia a digiuno, ipertensione arteriosa e dislipidemia) sono state associate allo sviluppo della steatosi epatica non alcolica nei pazienti non obesi rispetto ai controlli⁷⁸. Sebbene questa associazione fosse ampiamente diffusa nell'intero spettro del BMI, i pazienti “lean” con NAFLD hanno riportato le correlazioni più forti⁷⁹.

I pazienti cinesi e non obesi con NAFLD mostrano, rispetto alla popolazione generale, una percentuale simile di contenuto di trigliceridi intraepatici, misurata mediante Proton-Magnetic Resonance Spectroscopy, ma un contenuto di grasso significativamente inferiore rispetto ai pazienti obesi con NAFLD⁸². Effettuando un confronto tra pazienti NAFLD asiatici “lean” (BMI <23) e in sovrappeso (BMI > 23 e <25), Leung et al. non hanno trovato differenze cliniche o istopatologiche tra i due gruppi. Nello stesso studio, la proporzione di biopsie che hanno individuato una

diagnosi di NASH è risultata simile tra soggetti obesi e non obesi, mentre i pazienti obesi hanno riportato un grado significativamente più alto di steatosi e un maggiore stadio di fibrosi⁷². D'altra parte, nei soggetti non obesi con steatosi epatica non alcolica, i livelli di trigliceridi si sono rilevati un fattore predittivo indipendente di severità di malattia e sono stati associati ad un grado superiore di steatosi ed alla degenerazione degli epatociti.

Honda et al., nello studio di una coorte giapponese di pazienti con una diagnosi di NAFLD riscontrata tramite biopsia, hanno trovato che l'infiammazione lobulare e la degenerazione degli epatociti sono strettamente associati al polimorfismo GG-PNPLA3, che è presente maggiormente nella coorte non obesa, mentre non è associato a gravità istologica nei pazienti NAFLD obesi¹⁰¹.

Nella revisione sistematica di Sookoian et al.⁹⁵, in cui vengono considerati 15 studi che descrivono sia la popolazione asiatica che quella caucasica (sebbene si utilizzi nei criteri di inclusione una definizione di soggetto "lean" come BMI <25, per cui il cut-off del BMI avrebbe dovuto essere adattato), i pazienti "lean" e obesi con NAFLD presentano un profilo metabolico simile. In particolare, rispetto ai controlli sani, entrambi hanno una prevalenza significativamente più alta di sindrome metabolica e una maggiore probabilità di avere insulino-resistenza⁹⁵. In una successiva meta-analisi di otto studi che analizzano la gravità istologica nei pazienti "lean", Sookoian et al. riportano una malattia istologica meno severa rispetto ai pazienti in sovrappeso/obesi¹¹².

In conclusione, a seconda delle coorti, i pazienti “lean” possono presentare caratteristiche istologiche più lievi rispetto ai pazienti obesi con NAFLD o possono mostrare le stesse caratteristiche senza differenze significative.

Anche se i pazienti obesi e in sovrappeso con steatosi epatica non alcolica evidenziano condizioni metaboliche peggiori, i pazienti “lean” mostrano comunque un più alto tasso di disfunzioni metaboliche rispetto ai controlli sani, specialmente legati al metabolismo lipidico.

Prognosi A Lungo Termine Dei Pazienti “Lean”

Ad oggi, studi longitudinali che prendano in considerazione esiti a lungo termine, mortalità ed eventi correlati alla malattia in pazienti “lean” NAFLD risultano scarsi.

Data l'eterogeneità della patologia, l'ampia variazione genetica e l'importante peso dell'etnia, si dovrebbero progettare studi che mirino ad analizzare la prognosi a lungo termine dei pazienti “lean” tenendo conto delle suddette variabili. Inoltre, poiché le caratteristiche istopatologiche sono cruciali per la diagnosi e la definizione della steatosi epatica non alcolica, le coorti reclutate dovrebbero includere pazienti con NAFLD diagnosticata biotticamente.

Un esempio eccezionale è lo studio di Dela Cruz et al.¹¹³, dove sono stati reclutati 1090 pazienti di diverse etnie e con diagnosi istologica di NAFLD. Un totale di 125 (11,5%) pazienti sono stati classificati come “lean” (BMI <25 per non asiatici e <23 per asiatici). I pazienti “lean” erano più comunemente uomini di origine non caucasica e, come previsto, mostravano meno caratteristiche della sindrome metabolica.

Istologicamente, i pazienti “lean” presentavano fibrosi meno severa anche se mostravano un grado superiore di infiammazione lobulare. È interessante notare che, dopo un periodo di follow-up di $133 \pm 81,3$ mesi, la sopravvivenza cumulativa nei pazienti “lean” era inferiore rispetto ai non “lean”, a sostegno di una mortalità complessiva più elevata.

Nella popolazione asiatica, è stata dimostrata una curva di mortalità ad “U”, con picchi ad entrambe le estremità dei valori di BMI¹¹⁴. Considerando i fattori ambientali che potrebbero aver influenzato questa ipotesi, come ad es. basso BMI a causa della malnutrizione in paesi asiatici in via di sviluppo, questa ipotesi difficilmente può essere generalizzata per spiegare una sopravvivenza generale più breve nei pazienti “lean” non-caucasici affetti da NAFLD.

Infatti, nella coorte di Hong Kong di Leung et al., dove 307 pazienti con diagnosi istologica di NAFLD (23,5% non-obesi, BMI <25) sono stati seguiti per un periodo mediano di 49 mesi, il tasso di eventi clinici a lungo termine è stato significativamente più basso nel gruppo non obeso ed i sei decessi ed i due carcinomi epatocellulari che si sono registrati appartenevano tutti alla popolazione obesa⁷².

LO STUDIO (prima parte)

SCOPO DEL LAVORO

Come descritto nella sezione precedente, i pazienti “lean” con steatosi epatica non alcolica costituiscono una sottopopolazione di individui rappresentati soprattutto nella popolazione asiatica. Gli studi che hanno coinvolto coorti di pazienti caucasici sono in quantità minore e con limitato numero di soggetti, se si esclude la coorte NHANES III analizzata da Younossi et al. e le cui caratteristiche sono state riportate nel capitolo precedente. Tuttavia, sia per la popolazione asiatica che per quella caucasica, gli studi condotti finora sono prevalentemente di tipo trasversale e con follow-up limitato. Inoltre, la maggioranza di quest’ultimi ha reclutato pazienti con diagnosi clinico-radiologica di NAFLD, mentre pochi sono quelli che hanno arruolato pazienti con diagnosi istologica di steato-epatite.

Gli obiettivi di questo studio consistono pertanto nel confrontare la sottopopolazione di pazienti caucasici “lean” con steato-epatite non alcolica con pazienti sovrappeso ed obesi per quanto riguarda:

caratteristiche cliniche ed espressione istopatologica della malattia;

differenza di prevalenza della mutazione genetica C>G del gene PNPLA3

follow-up longitudinale con analisi della frequenza e prevalenza di eventi avversi legati alla malattia epatica e/o al quadro cardiovascolare, polmonare, autoimmune e neoplastico;

analisi di sopravvivenza dei pazienti “lean” in confronto alla popolazione con steatosi epatica non alcolica e BMI > 25

MATERIALI E METODI

Lo studio consiste di una prima valutazione trasversale, in cui si analizzano le caratteristiche cliniche ed istopatologiche dei pazienti “lean”, e di una parte longitudinale in cui si indaga la prognosi a lungo termine e la sopravvivenza dei suddetti pazienti.

Sono stati reclutati pazienti di etnia caucasica afferenti a sei diversi centri di ricerca epatologica, collocati in Italia (Torino, Milano, Roma, Palermo), Regno Unito (Newcastle) ed Australia (Sydney), con dati di follow-up disponibili e sottoposti a biopsia epatica per sospetto clinico di NASH a partire dal 1990. L’indicazione alla biopsia è stata data per almeno un episodio di alterazione degli enzimi epatici, senza individuazione di agente eziologico, associato ad evidenza ecografica di steatosi. La biopsia è stata eseguita da epatologi o radiologi esperti presso i centri di riferimento, secondo le linee guida internazionali.

Criteri di inclusione sono stati la diagnosi di NAFLD confermata dalla biopsia epatica ed un’età ≥ 18 anni. Sono stati, invece, criteri di esclusione le malattie epatiche di altra eziologia (epatopatia alcolica o da farmaci, epatite autoimmune, virale, colestatica o metabolico-genetica), escluse utilizzando criteri clinici, laboratoristici, radiografici e/o istologici specifici.

Il giorno della biopsia epatica sono stati raccolti dati antropometrici (età, sesso, BMI, circonferenza vita), biochimici (Hb, piastrine, AST, ALT, GGT, ALP, glucosio, insulina, creatinina, albumina, bilirubina, emoglobina glicata, colesterolo, trigliceridi, HDL, LDL) ed è stata raccolta e registrata in cartella clinica l'anamnesi patologica prossima e remota. È stato inoltre indagato il consumo alcolico, per cui sono stati inclusi solo pazienti con un consumo alcolico settimanale non superiore a 210g per gli uomini e 140g per le donne.

BMI (Body Mass Index)

Il BMI (peso corporeo in chilogrammi diviso per l'altezza in metri quadrati [kg/m^2]) è stato calcolato in ogni paziente al momento della biopsia epatica. I pazienti sono stati classificati con BMI normale ($<25 \text{ kg}/\text{m}^2$), sovrappeso (BMI tra 25 e $29,9 \text{ kg}/\text{m}^2$) ed obesi (BMI $\geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$). La definizione di "Lean NAFLD" è stata data da un BMI $< 25 \text{ kg}/\text{m}^2$.

Sono stati inoltre valutati i cinque componenti della sindrome metabolica, ovvero 1) iperglicemia (glucosio a digiuno $\geq 100 \text{ mg}/\text{dl}$ o $\geq 5,6 \text{ mmol}/\text{l}$) o diabete mellito di tipo 2 precedentemente diagnosticato (glicemia a digiuno $\geq 126 \text{ mg}/\text{dL}$ o $\geq 7 \text{ mmol}/\text{l}$ o trattamento con farmaci antidiabetici), 2) ipertrigliceridemia (trigliceridi a digiuno $\geq 150 \text{ mg}/\text{dl}$ o $\geq 1,69 \text{ mmol}/\text{l}$), 3) ipertensione arteriosa (pressione sistolica ≥ 130 e/o pressione diastolica $\geq 85 \text{ mmHg}$), 4) basso colesterolo HDL ($<40 \text{ mg}/\text{dl}$ o $< 1.03 \text{ mmol}/\text{l}$ negli uomini, $< 50 \text{ mg}/\text{dl}$ o $< 1,29 \text{ mmol}/\text{l}$ nelle donne), e 5) obesità centrale (circonferenza della vita $\geq 88 \text{ cm}$ nelle donne e $\geq 102 \text{ cm}$ negli uomini).

Istologia epatica

Le biopsie epatiche sono state valutate da esperti anatomo-patologi con esperienza epatologica, utilizzando il sistema di classificazione NASH Clinical Research Network ed il successivo SAF score. Le caratteristiche istologiche analizzate includono il grado di steatosi (0-3), l'infiammazione lobulare (0-2), il grado di ballooning (0-2) e lo stadio di fibrosi (0-4). Sebbene non esista un consenso su quale debba essere la migliore dimensione del frustolo bioptico nella NAFLD, sono state incluse nell'analisi solo biopsie con lunghezza superiore ai 15 mm. Pertanto, tutte le biopsie sono state di qualità e dimensioni appropriate, con un adeguato numero di tratti portalici. Per la diagnosi di NAFLD è stata richiesta una soglia di steatosi negli epatociti pari al 5%. Per la diagnosi di NASH, oltre alla steatosi, è stata richiesta la contemporanea presenza di infiammazione lobulare e ballooning.

Follow up

I pazienti sono stati seguiti con follow-up regolare, ad intervalli di 3-12 mesi, successivamente alla diagnosi di NAFLD. La cartella clinica è stata aggiornata con la registrazione di eventuali eventi clinici ad ogni visita ed i pazienti sono stati sottoposti ad esame obiettivo ed esami di laboratorio inerenti la malattia epatica. È stato inoltre eseguito regolare controllo ecografico addominale. Nell'analisi a lungo termine, è stato

stabilito che una quota maggiore del 90% dei pazienti dovesse avere un periodo di follow up di almeno 5 anni successivi alla biopsia epatica.

Analisi Statistiche

I pazienti sono stati raggruppati in “lean” NAFLD ($BMI < 25 \text{ kg/m}^2$) e non-“lean” NAFLD ($BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$). I dati sono stati presentati come medie (e deviazione standard), mediane o numeri (e percentuali) di pazienti con una determinata condizione. I parametri basali sono state confrontati tra “lean” e non-“lean” usando test standard parametrici e non parametrici (in base all’appropriatezza) per variabili continue o il test del chi quadrato per le variabili categoriche. E’ stata analizzata inoltre la frequenza di eventi epatici, cardiovascolari, polmonari e neoplastici tra il gruppo “lean” e non-“lean”.

È stata altresì eseguita un’analisi di sopravvivenza valutando la mortalità complessiva (morte per qualsiasi causa) nei due gruppi mediante l’analisi di Kaplan-Meier e confrontata con il test di log-rank.

La regressione logistica binaria univariata e multivariata, così come la regressione di Cox, aggiustate per i più comuni confondenti, sono state eseguite per indagare il valore predittivo di alcune condizioni clinico-patologiche basali e la loro influenza sullo sviluppo di eventi clinici durante il follow-up.

Le analisi sono state eseguite utilizzando il software IBM SPSS Statistics versione 24.0 (IBM Corporation, Armonk, NY). Lo studio è stato approvato da appropriati

organismi regolatori in tutti i centri partecipanti e tutti i pazienti hanno dato il proprio consenso informato scritto per la partecipazione alla ricerca in ambito medico

RISULTATI

Sono stati identificati complessivamente 1204 pazienti, di cui 18 sono stati esclusi in quanto non erano disponibili dati circa il BMI. Sono stati perciò inclusi 1186 pazienti, la cui suddivisione nei diversi centri è esposta in tabella 1:

Tabella 1. Suddivisione dei pazienti in base ai centri di riferimento

Torino – Italia	311 pazienti
Milano – Italia	140 pazienti
Roma – Italia	198 pazienti
Palermo – Italia	200 pazienti
Newcastle – Regno Unito	278 pazienti
Sydney – Australia	59 pazienti

Analisi Trasversale

In tabella 2 sono riportate le caratteristiche basali dell'intera coorte, mentre la tabella 3 illustra analogie e differenze tra pazienti “lean” e non “lean”.

Tabella 2. Caratteristiche basali dell'intera popolazione

	Min	Max	Media	SD
Età alla biopsia (anni)	12	79	47,8	12,6
BMI (kg/m²)	17,8	58,8	30,0	5,7
Circonferenza vita (cm)	65	156	101,3	12,6
PA Sistolica (mmHg)	85	205	129,4	15,2
PA Diastolica (mmHg)	52	130	80,9	8,9
ALT (IU/l)	7	376	72,1	47,3
AST (IU/l)	10	297	46,1	30,9
Hb g/dl	9,8	18,7	14,6	1,5
Plts (10³/mm³)	56	435	225,2	63,7
Alb (g/dl)	15	76	45,4	4,0
Bil (µmol/L)	1,7	56	13,2	7,6
ALP (IU/l)	4	616	100,3	58,9
gGT (IU/l)	10	2313	106,3	149,9
Creatinina (mg/dL)	0,3	2,1	0,9	0,2
Ferritina (ng/mL)	1	11252	280,7	457,6
HbA1c (mmol/L)	14	141	48,7	17,4
Glucosio (mmol/L)	2,5	21,3	5,8	2,1
Insulina (mIU/L)	1,1	280	19,0	20,3
Colesterolo (mmol/l)	1,5	16,9	5,2	1,3
HDL (mmol/L)	0,5	10	1,3	0,5
LDL (mmol/L)	0,5	7,4	3,4	1,1
TG (mmol/L)	0,2	37,5	1,8	1,9
BMI < 25 (lean)	218 (18,4%)			
Diabete prevalenza (n)	359 (30%)			
Ipertensione (n)	496 (41,5%)			
Dislipidemia (n)	547 (55,2%)			

PNPLA3 C>G* 401 (72,5%)

*Dati disponibili per 651 pz

Tabella 3. Caratteristiche basali suddivise tra pazienti “lean” e non “lean”

		Mean	SD	p-value
Age (years) at biopsy	Non-Lean	48,2	12,6	<0,0001
	Lean	44,7	12,0	
BMI (kg/m ²)	Non-Lean	31,5	5,2	<0,0001
	Lean	23,3	1,5	
Waist circumference (cm)	Non-Lean	104,5	11,4	<0,0001
	Lean	88,3	7,4	
Systolic BP (mmHg)*	Non-Lean	130,8	15,1	<0,0001
	Lean	124,8	14,2	
Diastolic BP (mmHg)*	Non-Lean	81,2	8,7	0,028
	Lean	79,6	9,2	
ALT (IU/l)	Non-Lean	73,6	48,0	0,043
	Lean	66,3	44,7	
AST (IU/l)	Non-Lean	47,0	31,4	0,025
	Lean	41,7	28,1	
Hb g/dl	Non-Lean	14,6	1,5	0,798
	Lean	14,6	1,4	
Plts (10 ³ /mm ³)	Non-Lean	223,7	64,7	0,05
	Lean	233,6	57,8	
Alb (g/dl)	Non-Lean	45,4	3,9	0,541
	Lean	45,6	3,9	
Bil (μmol/L)	Non-Lean	12,9	7,3	0,002
	Lean	14,8	8,6	
ALP (IU/l)	Non-Lean	99,5	59,3	0,409
	Lean	103,4	58,2	
gGT (IU/l)	Non-Lean	108,8	159,7	0,107
	Lean	90,6	87,0	
Creatinine (mg/dL)	Non-Lean	0,9	0,2	0,524
	Lean	0,9	0,2	
Ferritin (ng/ml)	Non-Lean	282,8	490,0	0,876
	Lean	277,0	311,9	
HbA1c (mmol/L)	Non-Lean	50,1	17,5	<0,0001
	Lean	37,6	10,3	
Glucose (mmol/L)	Non-Lean	6,0	2,3	<0,0001
	Lean	5,1	0,8	
Insulin (mIU/L)	Non-Lean	20,9	22,2	<0,0001
	Lean	11,9	7,1	

Cholesterol (mmol/L)	Non-Lean	5,2	1,3	0,835
	Lean	5,2	1,1	
HDL (mmol/L)	Non-Lean	1,3	0,6	0,116
	Lean	1,3	0,5	
LDL (mmol/L)	Non-Lean	3,3	1,2	0,095
	Lean	3,5	1,0	
TG (mmol/L)	Non-Lean	1,9	2,1	0,003
	Lean	1,5	0,9	
Italian Centre (n)	Lean non-ITA	13 (6%)		<0,0001
	Lean-ITA	205 (94%)		
Gender (Male)	Non-Lean	641 (66,2%)		0,01
	Lean	164 (75,2%)		
ANA positivity (n)	Non-Lean	131 (16,4%)		0,54
	Lean	30 (18,4%)		
Diabetes (n)	Non-Lean	331 (34,3%)		<0,0001
	Lean	19 (8,8%)		
Hypertension (n)	Non-Lean	435 (45,3%)		<0,0001
	Lean	56 (25,8%)		
Dyslipidemia (n)	Non-Lean	461 (58,7%)		<0,0001
	Lean	84 (44,2%)		
PNPLA3 C>G** (n) (carriers)	Non-Lean	326 (71,8%)		0,429
	Lean	72 (75,8%)		
*Data available for 710 pts				
**Data available for 651 pts				

Confrontati con i pazienti obesi, i pazienti “lean” sono più giovani, prevalentemente di sesso maschile e con una significativa appartenenza ad uno dei centri italiani (94%, N=205).

A livello laboratoristico, i pazienti “lean” mostrano valori inferiori di ALT (P=0,043), AST (p=0,025), trigliceridi (p=0,003), emoglobina glicata, glicemia (entrambi p<0,001), mentre presentano valori superiori di insulinemia (p<0,001) e di bilirubina,

anche se quest'ultima si mantiene nei range di normalità ed è probabilmente influenzata dalla componente indiretta.

Prendendo in considerazione la sindrome metabolica, i pazienti non “lean” mostrano una significativa maggiore prevalenza di tutte le componenti (fig.5). Infatti, al momento della biopsia, essi sono maggiormente diabetici ($p<0,001$), ipertesi ($p<0,001$), dislipidemicici ($p<0,001$) e con un maggiore diametro di circonferenza vita ($p<0,001$) in aggiunta all'ovvio e significativo BMI più elevato ($p<0,001$).

Non sono state invece riscontrate differenze nel polimorfismo C>G del gene PNPLA3, sebbene questa analisi abbia coinvolto solo 615 pazienti.

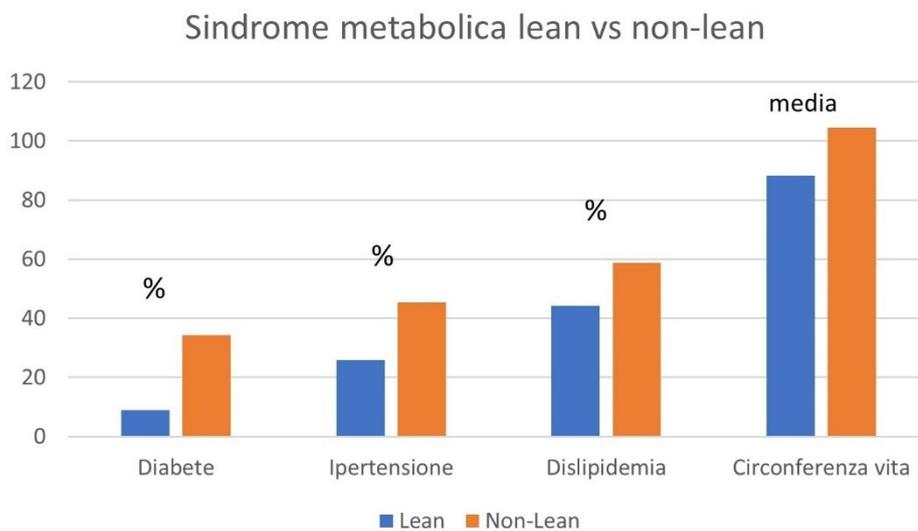


Figura 5. Prevalenza della Sindrome Metabolica nei pazienti “lean” e non “lean”.

La Tabella 4 illustra le differenze istopatologiche tra i pazienti “lean” NAFLD e non “lean”. I pazienti “lean” mostrano una significativa minore prevalenza di steatosi, infiammazione lobulare e degenerazione epatocellulare ($p < 0,001$). D’altra parte, i pazienti “lean” differiscono significativamente dai non “lean” per la tipologia di steatosi in quanto, se per quest’ultimi prevale una steatosi di tipo macrovescicolare, nei pazienti “lean” vi è una significativa maggiore prevalenza di steatosi mista. Utilizzando come criterio diagnostico per la diagnosi di steatoepatite la contemporanea presenza di steatosi, infiammazione lobulare e “ballooning”, la prevalenza nella popolazione “lean” è del 45% (N=97), mentre è del 65% nella popolazione non “lean” (N=625). Sebbene la popolazione non “lean” presenti una maggiore prevalenza di fibrosi avanzata ($p < 0,001$), il 12% dei pazienti “lean” (N=25) presenta fibrosi F3-F4.

Tabella 4. Caratteristiche istopatologiche della popolazione “lean” e non “lean”

	BMI < 25	BMI ≥ 25	
Caratteristiche Istopatologiche			
Steatosi < 5%*	11 (5%)	14 (1,5%)	<0,0001
Steatosi 5-33%	124 (57%)	335 (35%)	
Steatosi 33-66%	61 (28%)	385 (40%)	
Steatosi > 66%	22 (10%)	218 (23%)	
Steatosi Macrovescicolare	32 (39%)	202 (68%)	<0,0001
Steatosi Mista	47 (57%)	65 (22%)	
Steatosi Microvescicolare	3 (4%)	29 (10%)	

Ballooning_0	106 (49%)	269 (28%)	<0,0001
Ballooning_1	72 (33%)	433 (46%)	
Ballooning_2	38 (18%)	247 (26%)	
Infiammazione lobulare_0	57 (26%)	118 (12%)	<0,0001
Infiammazione lobulare_1	126 (58%)	553 (58%)	
Infiammazione lobulare_2	35 (16%)	280 (30%)	
NASH (SAF ≥ 2)	97 (45%)	625 (65%)	<0,0001
F0	89 (41%)	185 (19%)	<0,0001
F1	70 (32%)	251 (26%)	
F2	34 (16%)	258 (27%)	
F3	13 (6%)	166 (17%)	
F4	12 (6%)	101 (11%)	

*F4 patients

Analisi longitudinale

Dei 1186 pazienti della coorte, 61 sono stati considerati persi al follow up, senza poter quantificare il periodo esatto in cui sono stati seguiti clinicamente. Per i rimanenti 1125 pazienti, il periodo medio di follow up è stato di 105 mesi (SD ± 50).

Dei suddetti pazienti, i seguenti eventi clinici sono stati registrati e presi in considerazione per l'analisi (tra parentesi la tipologia di eventi registrati nella coorte):

eventi cardiovascolari (cardiopatía ischemica, infarto del miocardio, stroke ischemico/emorragico, vasculopatia, aritmie cardiache, valvulopatie, scompenso cardiaco);

eventi polmonari (embolia polmonare, BPCO, OSAS, fibrosi polmonare, interstiziopatie);

neoplasie non-HCC (neoplasie di: colon, mammella, vescica, stomaco, ovaio, tiroide, prostata, linfo-ematopoietici, rene, polmone, pancreas, utero, laringe, ipofisi, mieloma, melanoma, meningioma, seminoma, tessuti molli);

eventi epatici (scompenso ascitico, varici esofagee, emorragie digestive, peritonite batterica spontanea, encefalopatia porto-sistemica, trombosi cavale, nodularità epatiche non-HCC);

epatocarcinoma.

Complessivamente, i pazienti non “lean” hanno registrato un significativo maggior numero di eventi cardiovascolari, polmonari, ed epatologici, compresa l’incidenza di epatocarcinoma (tabella 5). Non ci sono state invece differenze nell’incidenza di malattie neoplastiche non-HCC ($p=0,542$).

Tabella 5. Frequenza di eventi clinici nella popolazione “lean” e non “lean”.

	Lean	Non-Lean	p-value
Eventi epatici	10 (5%)	91 (9,8%)	0,024
Carcinoma Epatocellulare	1 (0,5%)	30 (3,2%)	0,029
Eventi cardiovascolari	14 (7%)	123 (13%)	0,01
Eventi polmonari	5 (2,5%)	72 (7,8%)	0,006

Altri tumori (non-HCC)	17 (8,3%)	89 (9,7%)	0,542
-------------------------------	-----------	-----------	-------

Ciononostante, una parte dei pazienti “lean” ha mostrato progressione della malattia epatica. Infatti, se da un lato 25 pazienti “lean” (12%) hanno evidenziato una malattia avanzata già alla biopsia epatica, 10 pazienti (5%) hanno registrato segni e sintomi della cirrosi scompensata ed un paziente è progredito verso l’epatocarcinoma. Gli eventi cardiovascolari e neoplastici rimangono comunque gli eventi di maggior frequenza anche nei pazienti con BMI < 25 (Fig.6).

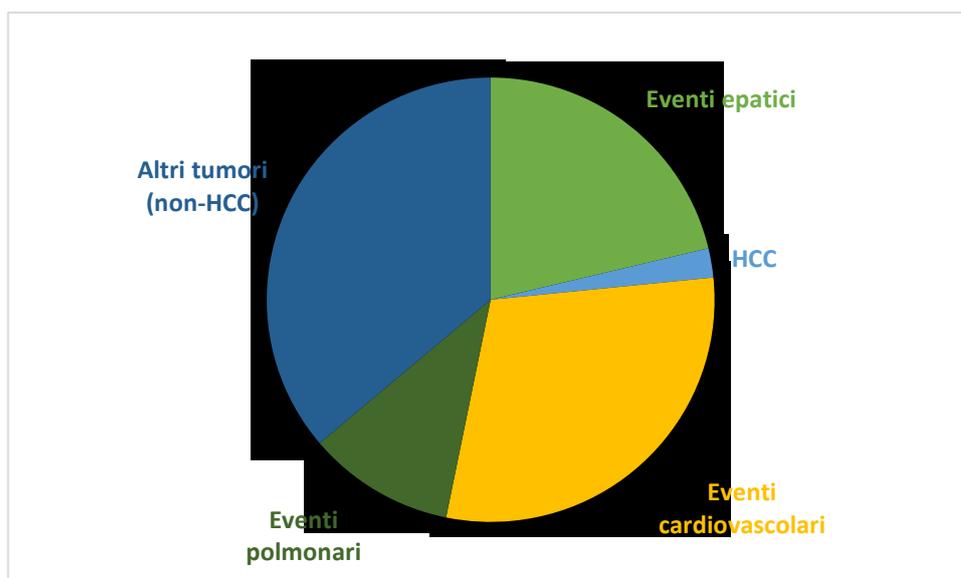


Figura 6. Eventi clinici nella popolazione “lean” NAFLD

Per quanto riguarda l’analisi di sopravvivenza, la coorte ha registrato 62 decessi durante l’intero periodo di follow up, di cui 4 nella popolazione “lean” e 58 in quella non “lean”.

Nonostante questa discrepanza numerica, l’analisi di sopravvivenza con il metodo Kaplan-Meier, il quale fornisce una probabilità cumulativa dato dalla sommatoria di

ciascun periodo di follow up analizzato, così come il confronto delle due curve di sopravvivenza (lean vs non lean) con il log-rank test, non fornisce una differenza statisticamente significativa tra la sopravvivenza nei due gruppi di pazienti (fig.7). Questo nonostante la forte inclinazione della curva dei pazienti non-lean nella parte finale del periodo di follow up, che però è bilanciata da una sostanziale sovrapposizione delle due curve nella parte iniziale dell'osservazione.

All'analisi multivariata, il maggior fattore predittivo di malattia epatica avanzata nei pazienti "lean" è stata la presenza di diabete mellito di tipo 2 alla biopsia epatica. Sebbene questo fattore sia predittivo di evoluzione della NAFLD anche nei pazienti non "lean", l'aumento di rischio conferito dalla presenza di diabete è significativamente maggiore nei pazienti "lean" (OR-lean vs OR-non-lean 5.8 vs 3.4 rispettivamente).

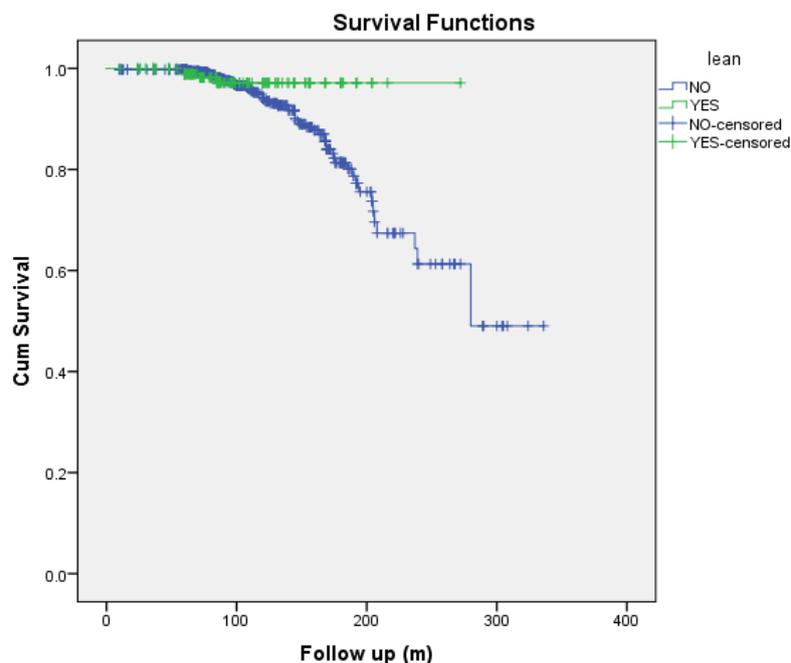


Figura 7. Curve di sopravvivenza dei pazienti "lean" e non "lean".

LO STUDIO (Seconda Parte)

L'obiettivo di questa seconda parte dello studio è stata quella di ricercare delle associazioni genetiche caratterizzanti i pazienti magri con NAFLD.

Le basi per tale ricerca consistono innanzi tutto nel fatto che la NAFLD in questa categoria di pazienti sembra essere correlata ad un particolare tipo di popolazione, ovvero quella mediterranea, mentre i pazienti magri del Nord Europa (popolazione inglese nel nostro caso) sembrano essere immuni.

Questa osservazione è inoltre rafforzata dal fatto che la popolazione di pazienti magri con NAFLD ha avuto una distribuzione coerente (vedi prima parte dello studio) in tutti i centri italiani analizzati, con percentuali di prevalenza che si aggirano tra il 15% ed il 20% della popolazione analizzata.

L'analisi genetica è stata possibile usufruendo dei dati generati dallo studio di Genome Wide Association Study (GWAS) che ha coinvolto centri italiani ed europei, con raccolta di DNA di pazienti reclutati dal 2012 al 2017 (vedi materiali e metodi) presso la Biobanca di Newcastle Upon Tyne (Regno Unito).

MATERIALI E METODI

LA COORTE GWAS: I CASI NAFLD

Per lo studio GWAS, i pazienti sono stati reclutati in numerosi centri specialistici europei. In particolare, questi sono stati i centri coinvolti:

- Freeman Hospital, Newcastle upon Tyne Hospitals NHS Trust, Newcastle upon Tyne, Regno Unito;
- Addenbrooke's Hospital, Cambridge, Regno Unito;
- Ospedali dell'Università di Nottingham NHS Trust, Nottingham, Regno Unito;
- Inselspital Hospital, Berna, Svizzera;
- Antwerp University Hospital, Belgio;
- Ospedale Pitié-Salpêtrière, Parigi, Francia;
- Ospedale universitario, Linköping, Svezia
- Ospedale della contea di Oskarshamn, Svezia;
- University Medical Center, Mainz, Germania;
- Ospedale Città della Salute e della Scienza di Torino, Torino, Italia;
- Sezione di Gastroenterologia ed Epatologia, Università di Palermo, Italia.

Ulteriori casi di replica sono stati reclutati presso la Fondazione IRCCS Ca 'Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano, Italia.

Lo studio ha ottenuto tutte le necessarie approvazioni etiche dai competenti organi nazionali/istituzionali e tutti i partecipanti hanno fornito il consenso informato. Tutti i casi "NAFLD" sono pazienti con NAFLD istologicamente caratterizzata, derivati da

una popolazione di pazienti originariamente identificata come avente steatosi ecografica o alterazioni degli enzimi epatici (ALT e/o GGT) o identificata come avente evidenza di NAFLD quando sottoposti a chirurgia bariatrica. Sono state escluse altre diagnosi di malattia epatica, tra cui l'assunzione eccessiva di alcol (assunzione di alcol <20 g/die per le donne; <30 g/die per gli uomini), epatite virale cronica (epatite B ed epatite C), malattie epatiche autoimmuni, emocromatosi ereditaria, deficit di α 1-antitripsina, malattia di Wilson e il danno epatico da farmaci. I dati clinici e di laboratorio sono stati raccolti al momento della diagnosi, inclusi i dati antropometrici e le eventuali comorbidità, come la presenza di diabete mellito di tipo 2, così come l'evidenza di cirrosi sottostante.

LA COORTE GWAS: I CONTROLLI

Per quanto riguarda i controlli, sono stati usati dati disponibili della popolazione generale. In particolare, sono stati selezionati controlli di ascendenza europea (n = 17781) da più fonti disponibili:

Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC), n=5159)

coorte Hypergenes (<http://www.hypergenes.eu/dissemination.html#pub>), n=1520

KORA (<https://epi.helmholtz-muenchen.de/>), n=1835

Understanding Societies (<https://www.understandingsociety.ac.uk/>), n=9267

Per replicare le associazioni rilevate nel GWAS, è stata impiegata una coorte di controllo italiana (n=945) costituita da una serie di controlli italiani descritti in precedenza¹¹⁵, insieme ad alcuni controlli italiani recentemente reclutati, avendo cura di rimuovere ogni overlap di casi con la coorte Hypergenes.

GENOTIPIZZAZIONE

Preparazione del DNA

Il DNA è stato estratto da campioni di sangue raccolto con anticoagulante EDTA, come descritto in precedenza in letteratura¹¹⁶

Genome-wide Analysis, imputazione e replicazione

In sintesi, la genotipizzazione dei casi è stata effettuata in due fasi, impiegando il chip Illumina OmniExpress BeadChip dell'Edinburgh Clinical Research Centre per la prima fase ed Illumina HumanCoreExome BeadChip - Aros, Danimarca, per la seconda fase, resasi necessaria per l'individuazione di ulteriori "single nucleotide polymorphisms" (SNPs). L'imputazione degli SNPs nei "casi" è stata ottenuta mediante il Michigan Imputation Server (<https://imputationserver.sph.umich.edu/start.html#!pages/home>). Ogni coorte è stata caricata sul Michigan Imputation Server e assegnata al pannello di riferimento dell'Haplotype Reference Consortium (HRC 1.1r 2016).

I principali SNP imputati sono stati ulteriormente “replicati” in una aggiuntiva coorte italiana (n = 559) mediante saggi TaqMan® predefiniti o personalizzati (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), in conformità con le raccomandazioni del produttore.

ANALISI SUI PAZIENTI “LEAN”

Sfruttando la mole di dati analizzata per lo studio GWAS, si è proceduto ad effettuare una sub-analisi, con l'intenzione di individuare SNP significativi e caratterizzanti i pazienti magri con NAFLD. A tale scopo la popolazione di pazienti con NAFLD e BMI < 25 kg/m² è stata comparata con le seguenti popolazioni:

- Pazienti con NAFLD e BMI ≥ 25 kg/m²
- Controlli sani: coorte Hypergenes:
(<http://www.hypergenes.eu/dissemination.html#pub>)
- Analisi stratificata per nazionalità di provenienza dei pazienti

La coorte di replicazione è stata rappresentata da una coorte di pazienti italiani con NAFLD della Fondazione IRCCS Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico di Milano e controlli sani senza steatosi né alterazioni metaboliche dello stesso istituto.

RISULTATI

Ai fini di questa tesi, verranno presentati i risultati inerenti la sub-analisi GWAS che ha coinvolto i pazienti NAFLD e BMI < 25 kg/m².

DISCOVERY COHORT

Nell'analisi effettuata nella coorte GWAS principale sopra descritta, i pazienti lean con NAFLD non hanno mostrato sostanziale differenza, in termini di alterazioni genetiche, con la popolazione NAFLD sovrappeso o obesa.

Tuttavia, quando è l'analisi è stata stratificata per nazionalità di provenienza, la popolazione dei pazienti italiani magri con NAFLD ha messo in evidenza una significativa maggiore frequenza allelica di alcuni polimorfismi (indicati in tabella 6), rispetto ai controlli sani della popolazione Hypergenes (figure 8, 9 e 10):

Tabella 6. Frequenza degli SNP nella popolazione lean NAFLD italiani vs controlli

SNP	Chr	Position	A1	A2	Pvalue_sex+ SNP+PCs	OR	CI	MAF_ cases	MAF_ controls	N cases	N controls
rs1407428	1	185755609	T	G	6.42E-08	18.92	6.52-54.93	0.037	0.002	108	2578
rs12061058	1	185891053	T	C	1.31E-07	18.01	6.16-52.96	0.037	0.003	108	2584
rs4750211	10	12435379	A	G	1.99E-07	2.942	1.96-4.42	0.482	0.261	108	2584
rs17106436	14	78300329	T	G	5.99E-09	7.829	3.92-15.66	0.102	0.017	108	2582
rs12100847	14	78309743	T	G	7.80E-11	9.813	4.96-19.53	0.111	0.016	108	2584
rs17106552	14	78358558	T	C	6.98E-08	4.622	2.65-8.06	0.157	0.04	108	2584

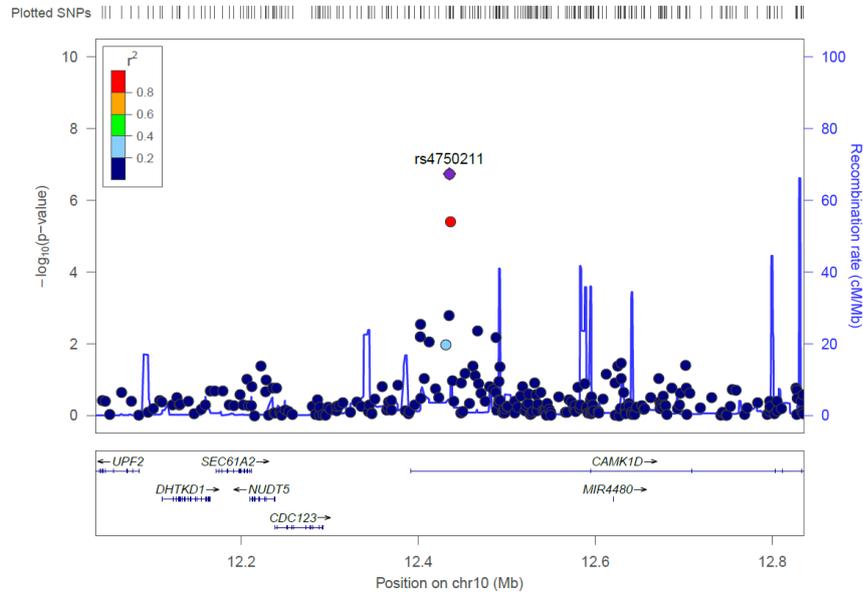


Figura 8. Plot di associazione dello SNP rs4750211 nella popolazione italiana magra con NAFLD

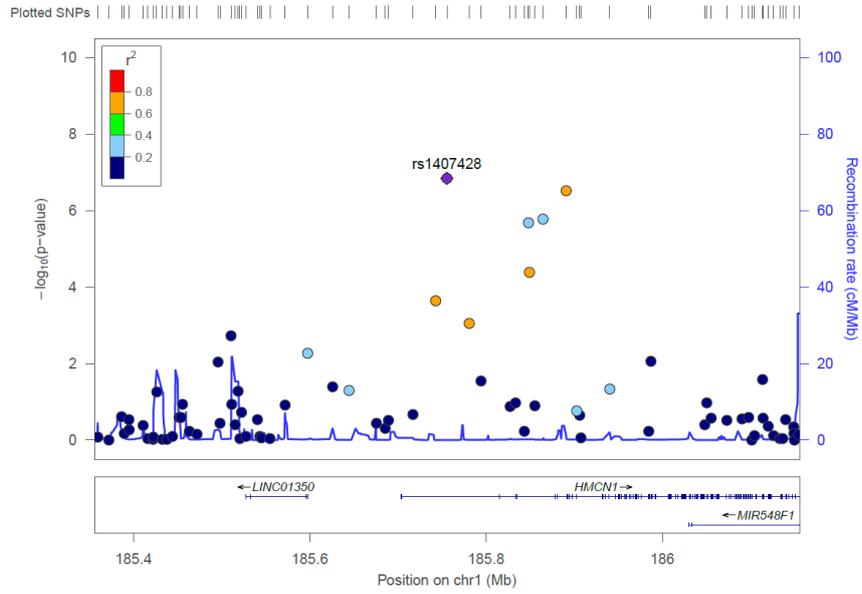


Figura 9. Plot di associazione dello SNP rs1407428 nella popolazione italiana magra con NAFLD

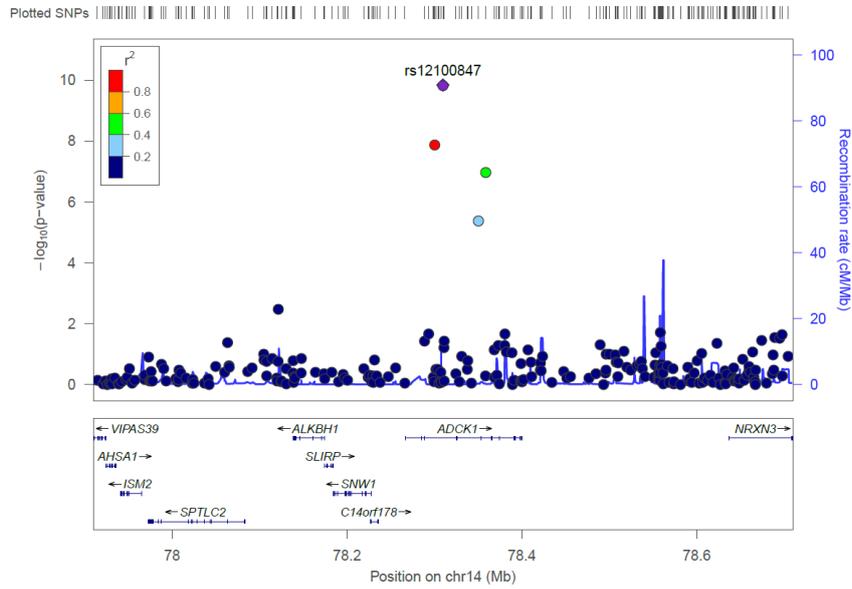


Figura 10. Plot di associazione dello SNP rs12100847 nella popolazione italiana magra con NAFLD

REPLICATION COHORT

Per confermare le associazioni trovate nella “discovery cohort”, la frequenza degli stessi SNPs sopra individuati è stata ricercata in una coorte di replicazione, presso la Fondazione IRCCS Ca’ Granda, Ospedale Maggiore Policlinico di Milano.

Ad oggi, i dati disponibili riguardano lo SNP rs4750211 legato al gene CAMK1D, mentre le analisi sui restanti SNPs sono tuttora in corso.

Come rappresentato nelle figure 11 e 12, l’indagine nella coorte di replicazione è stata in grado di replicare l’associazione individuata nella discovery cohort. In particolare, è stata evidenziata un’associazione significativa con il genotipo CC della variante rs4750211, che è risultata essere significativamente più presente nei controlli sani normopeso senza NAFLD rispetto ai pazienti normopeso con NAFLD.

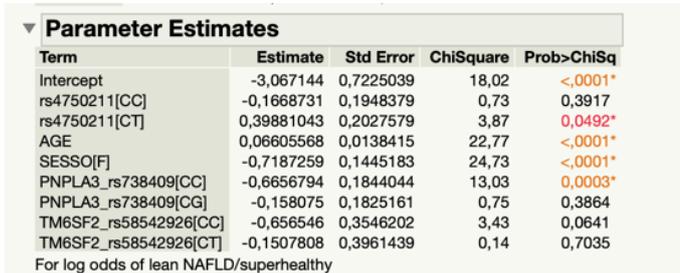
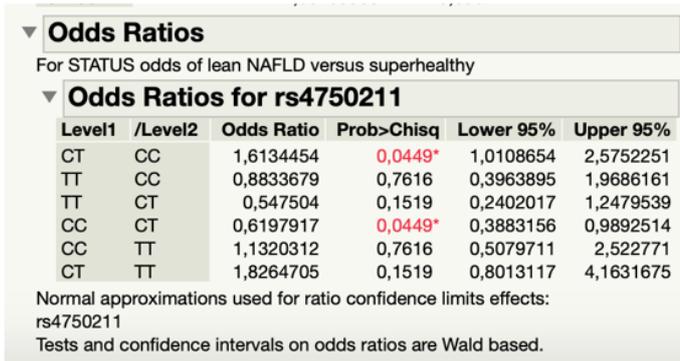
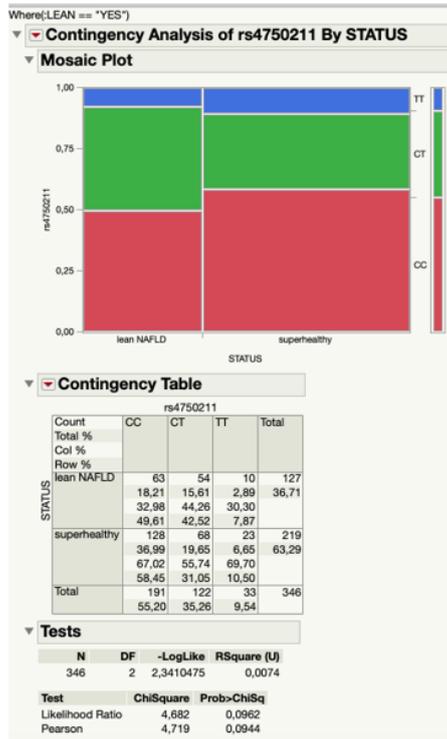


Figura 11. Analisi di associazione dello SNP rs4750211 nella coorte di replicazione (1)

Results					
	CC	CT	TT		Row Totals
cases	63 (70.73) [0.85]	54 (43.41) [2.59]	10 (12.86) [0.64]		127
controls	113 (105.27) [0.57]	54 (64.59) [1.74]	22 (19.14) [0.43]		189
Column Totals	176	108	32		316 (Grand Total)

The chi-square statistic is 6.8018. The p -value is .033343. The result is significant at $p < .05$.

Figura 12. Analisi di associazione dello SNP rs4750211 nella coorte di replicazione (2)

Rimane ancora da stabilire l'associazione di questa maggiore frequenza allelica dello SNP rs4750211 con parametri clinici e metabolici sia nei pazienti magri con NAFLD che nei controlli sani.

A questo proposito, studi funzionali in vitro sono stati programmati presso l'Università di Milano e di Newcastle così come sono in programma studi funzionali con traccianti in pazienti con NAFLD presso l'Università di Torino.

DISCUSSIONE

Il maggior risultato di questo studio è l'individuazione di una popolazione di pazienti con diagnosi istologica di steatosi epatica non alcolica, non obesi, con BMI < 25, in cui la NAFLD può progredire verso la fibrosi avanzata o cirrosi. Inoltre, in questi stessi pazienti la malattia epatica può evolvere verso la cirrosi scompensata e l'insorgenza del carcinoma epato-cellulare, percorrendo quindi tutti gli step della storia naturale della malattia. Un altro dato di maggiore interesse è che questa popolazione di pazienti "lean" presenta la malattia ad un'età inferiore, è prevalentemente di sesso maschile ed ha una forte localizzazione geografica, essendo per il 94% di origine italiana nella coorte del nostro studio. Dati che assumono ancor più rilevanza se si considera che i pazienti "lean" presentano una malattia meno severa dal punto di vista istologico ed una minore prevalenza delle componenti della sindrome metabolica.

A questo proposito, il dato più interessante è la netta differenza nella prevalenza di diabete mellito di tipo 2 tra le due popolazioni, essendone colpito solo l'8,8% dei pazienti "lean" contro il 34,3% dei pazienti non-"lean". Ciononostante, il diabete rappresenta l'unico fattore predittivo di fibrosi avanzata nella popolazione "lean", con valori di rischio maggiori rispetto alla popolazione con BMI > 25. Questo dato fa presupporre una differenza "metabolica" qualitativa più che quantitativa tra le due coorti. Infatti, se da un lato la popolazione non-lean presenta una più alta prevalenza della sindrome metabolica, il minor numero di pazienti "lean" colpiti potrebbe presentare una forma di malattia più aggressiva, probabile segno di meccanismi patofisiologici diversi che ne aggravano il decorso o maggiore quota di meccanismi

che sottendono ad alterazione del metabolismo lipidico vs. insulino resistenza sistemica associata ad obesità

Altro elemento a sostegno di una più aggressiva malattia metabolica nei pazienti lean risiede nel fatto che, nonostante questi pazienti presentino un significativo minor numero di fattori di rischio cardiovascolare, 14 soggetti (7%) hanno sviluppato un evento cardiaco nel corso del follow up, tra cui infarto del miocardio e stroke. A dimostrazione che la NAFLD in questi pazienti non è una malattia isolata ma è la localizzazione epatica di una disfunzione metabolica più diffusa e sistemica che potrebbe rappresentare un maggior rischio per questi pazienti rispetto alla popolazione generale.

Sicuramente, sia la suddetta disfunzione metabolica che la forte localizzazione geografica di questo tipo di pazienti, quasi tutti in Italia, rappresenta un importante quesito circa una particolare e nuova probabile predisposizione genetica di questi individui a sviluppare la NAFLD. Seppur eseguita su metà della coorte in oggetto, l'analisi del polimorfismo C>G del gene PNPLA3 non ha evidenziato differenze significative tra i due gruppi di pazienti.

A tale scopo, la seconda fase dello studio ha assunto un'importanza cruciale, in quanto si è posta l'obiettivo, appunto, di andare ad individuare quali potessero essere le varianti genetiche alla base di queste differenze. Di notevole interesse è che le analisi di GWAS hanno confermato la prima parte clinica dello studio, ovvero la localizzazione geografica mediterranea di questo particolare fenotipo di NAFLD.

L'individuazione degli SNPs presentati in questa tesi, e la replicazione di almeno uno di essi, conferma non solo la peculiarità di questa tipologia di pazienti, ma anche il

peso del background genetico nei pazienti con NAFLD. Il completamento dell'analisi genetica darà origine ad un fenotipo di pazienti con caratteristiche cliniche, antropomorfe, territoriali e genetiche "uniche", identificanti una sottopopolazione di pazienti con NAFLD.

Infatti, un altro punto fondamentale emerso dal nostro studio è che la steatosi epatica non alcolica può insorgere anche senza obesità e/o sindrome metabolica. Questo è sicuramente un messaggio dal valore clinico rilevante, in quanto deve indirizzare e fare emergere un dubbio diagnostico di NAFLD anche in quei pazienti magri che si presentano all'osservazione clinica con alterazione degli enzimi epatici e steatosi ecografica. Ed è anche probabile, alla luce dei dati di questo studio, che questi pazienti necessitino di un monitoraggio più stretto e multidisciplinare.

Questo è uno studio che ha come punto di forza il fatto di essere il primo a compiere un'analisi a lungo termine di pazienti con NAFLD, BMI nella norma ed etnia caucasica. Inoltre, ha il vantaggio di essere multicentrico, internazionale e di coinvolgere un ampio numero di pazienti, i quali presentano tutti una diagnosi istologica di steatosi epatica non alcolica. Sicuramente la possibilità di avere accesso a dati genetici di GWAS comprendenti pazienti magri con NAFLD è un altro importante punto di forza di questo studio. Alcuni dei limiti, come per molti studi di tipo multicentrico, consistono nel fatto di non avere protocolli di trattamento e/o protocolli dietetici per la NAFLD univoci per tutti i centri tali che tutti i pazienti siano stati sottoposti alle stesse condizioni. Inoltre, sebbene la maggior parte degli anatomici dei diversi centri di questo studio abbiano collaborato a studi precedenti, in cui si sono osservati alti livelli di concordanza, dato il lungo periodo di follow up non tutte le biopsie sono state analizzate da quegli stessi anatomici e sicuramente

una lettura centralizzata avrebbe reso il lavoro più preciso. Inoltre, una consistente rappresentanza etnica diversa da quella caucasica potrebbe fornire ulteriori dati sulla rilevanza dell'etnia nello sviluppo della NAFLD nei soggetti magri.

In conclusione, nel nostro studio abbiamo dimostrato l'esistenza di una popolazione di pazienti non obesi e con BMI < 25 che sviluppa steatosi epatica non-alcolica. Questi pazienti sono prevalentemente giovani, maschi, italiani, con meno componenti della sindrome metabolica e con malattia istologica meno severa. Inoltre, questi pazienti hanno un background genetico peculiare, quando paragonati con controlli sani dello stesso BMI. In questi pazienti, la NAFLD può progredire verso la fibrosi avanzata, la cirrosi scompensata e l'epatocarcinoma avendo nel diabete il fattore indipendente predittivo principale. Infine, sebbene presentino fattori di rischio significativamente minori, questi pazienti possono andare incontro ad eventi cardiovascolari quali stroke ed infarto del miocardio.

REFERENZE

1. 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;53(2):372-384.
2. Hassan K, Bhalla V, El Regal ME, HH AK. Nonalcoholic fatty liver disease: a comprehensive review of a growing epidemic. *World J Gastroenterol.* 2014;20(34):12082-12101.
3. Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Manesis EK, Kafiri G, Tiniakos DG, Archimandritis AJ. Metabolic syndrome is associated with severe fibrosis in chronic viral hepatitis and non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008;27(1):80-89.
4. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology.* 2016;64(1):73-84.
5. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017.
6. Anstee QM, Targher G, Day CP. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10(6):330-344.
7. Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, et al. Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* 2015;149(2):389-397 e310.
8. Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL, Kechagias S. Low clinical relevance of the nonalcoholic fatty liver disease activity score (NAS) in predicting fibrosis progression. *Scand J Gastroenterol.* 2012;47(1):108-115.
9. Buzzetti E, Lombardi R, De Luca L, Tsochatzis EA. Noninvasive Assessment of Fibrosis in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Endocrinol.* 2015;2015:343828.
10. Peverill W, Powell LW, Skoien R. Evolving concepts in the pathogenesis of NASH: beyond steatosis and inflammation. *Int J Mol Sci.* 2014;15(5):8591-8638.
11. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism.* 2016;65(8):1038-1048.
12. Jacome-Sosa MM, Parks EJ. Fatty acid sources and their fluxes as they contribute to plasma triglyceride concentrations and fatty liver in humans. *Curr Opin Lipidol.* 2014;25(3):213-220.
13. Musso G, Gambino R, Cassader M. Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Prog Lipid Res.* 2013;52(1):175-191.
14. Ferramosca A, Zara V. Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. *World J Gastroenterol.* 2014;20(7):1746-1755.
15. Koliwad SK, Streeper RS, Monetti M, et al. DGAT1-dependent triacylglycerol storage by macrophages protects mice from diet-induced insulin resistance and inflammation. *J Clin Invest.* 2010;120(3):756-767.
16. Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology.* 2010;52(2):774-788.

17. Lambert JE, Ramos-Roman MA, Browning JD, Parks EJ. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2014;146(3):726-735.
18. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1793-1801.
19. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev*. 2002;23(2):201-229.
20. Pagano G, Pacini G, Musso G, et al. Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology*. 2002;35(2):367-372.
21. Sabio G, Das M, Mora A, et al. A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science*. 2008;322(5907):1539-1543.
22. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(2):85-96.
23. Pessayre D, Fromenty B. NASH: a mitochondrial disease. *J Hepatol*. 2005;42(6):928-940.
24. Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion*. 2006;6(1):1-28.
25. Cusi K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology*. 2012;142(4):711-725 e716.
26. Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(39):14205-14218.
27. Cusi K. Nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2009;16(2):141-149.
28. Tomita K, Tamiya G, Ando S, et al. Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Gut*. 2006;55(3):415-424.
29. Crespo J, Cayon A, Fernandez-Gil P, et al. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology*. 2001;34(6):1158-1163.
30. Pikarsky E, Porat RM, Stein I, et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*. 2004;431(7007):461-466.
31. Tsochatzis EA, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ. Adipokines in nonalcoholic steatohepatitis: from pathogenesis to implications in diagnosis and therapy. *Mediators Inflamm*. 2009;2009:831670.
32. Makino T, Noguchi Y, Yoshikawa T, Doi C, Nomura K. Circulating interleukin 6 concentrations and insulin resistance in patients with cancer. *Br J Surg*. 1998;85(12):1658-1662.
33. Fernandez-Real JM, Vayreda M, Richart C, et al. Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(3):1154-1159.
34. Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Hadziyannis E, et al. Serum adipokine levels in chronic liver diseases: association of resistin levels with fibrosis severity. *Scand J Gastroenterol*. 2008;43(9):1128-1136.

35. Ikejima K, Honda H, Yoshikawa M, et al. Leptin augments inflammatory and profibrogenic responses in the murine liver induced by hepatotoxic chemicals. *Hepatology*. 2001;34(2):288-297.
36. Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ. The evolving role of leptin and adiponectin in chronic liver diseases. *Am J Gastroenterol*. 2006;101(11):2629-2640.
37. Tilg H, Hotamisligil GS. Nonalcoholic fatty liver disease: Cytokine-adipokine interplay and regulation of insulin resistance. *Gastroenterology*. 2006;131(3):934-945.
38. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(10):772-783.
39. Kamada Y, Tamura S, Kiso S, et al. Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. *Gastroenterology*. 2003;125(6):1796-1807.
40. Adachi M, Brenner DA. High molecular weight adiponectin inhibits proliferation of hepatic stellate cells via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Hepatology*. 2008;47(2):677-685.
41. Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest*. 2003;112(1):91-100.
42. Anstee QM, Daly AK, Day CP. Genetics of Alcoholic Liver Disease. *Semin Liver Dis*. 2015;35(4):361-374.
43. Anstee QM, Day CP. The genetics of NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(11):645-655.
44. Schultz JR, Tu H, Luk A, et al. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev*. 2000;14(22):2831-2838.
45. Kozlitina J, Smagris E, Stender S, et al. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*. 2014;46(4):352-356.
46. Liu YL, Reeves HL, Burt AD, et al. TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nat Commun*. 2014;5:4309.
47. Dongiovanni P, Petta S, Maglio C, et al. Transmembrane 6 superfamily member 2 gene variant disentangles nonalcoholic steatohepatitis from cardiovascular disease. *Hepatology*. 2015;61(2):506-514.
48. Zeybel M, Mann DA, Mann J. Epigenetic modifications as new targets for liver disease therapies. *J Hepatol*. 2013;59(6):1349-1353.
49. Podrini C, Borghesan M, Greco A, Paziienza V, Mazzoccoli G, Vinciguerra M. Redox homeostasis and epigenetics in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Curr Pharm Des*. 2013;19(15):2737-2746.
50. Pogribny IP, Tryndyak VP, Bagnyukova TV, et al. Hepatic epigenetic phenotype predetermines individual susceptibility to hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methyl-deficient diet. *J Hepatol*. 2009;51(1):176-186.
51. Bergheim I, Weber S, Vos M, et al. Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: role of endotoxin. *J Hepatol*. 2008;48(6):983-992.
52. Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S, Haub S, Bischoff SC, Bergheim I. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology*. 2009;50(4):1094-1104.
53. Abdelmalek MF, Suzuki A, Guy C, et al. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010;51(6):1961-1971.

54. Ma J, Fox CS, Jacques PF, et al. Sugar-sweetened beverage, diet soda, and fatty liver disease in the Framingham Heart Study cohorts. *J Hepatol.* 2015;63(2):462-469.
55. Molloy JW, Calcagno CJ, Williams CD, Jones FJ, Torres DM, Harrison SA. Association of coffee and caffeine consumption with fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, and degree of hepatic fibrosis. *Hepatology.* 2012;55(2):429-436.
56. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 2011;473(7346):174-180.
57. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 2006;444(7122):1027-1031.
58. Miele L, Valenza V, La Torre G, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2009;49(6):1877-1887.
59. Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, McCarthy PJ, Grose RH, Cummins AG. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut.* 2001;48(2):206-211.
60. Spencer MD, Hamp TJ, Reid RW, Fischer LM, Zeisel SH, Fodor AA. Association between composition of the human gastrointestinal microbiome and development of fatty liver with choline deficiency. *Gastroenterology.* 2011;140(3):976-986.
61. Tremaroli V, Backhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature.* 2012;489(7415):242-249.
62. Cope K, Risby T, Diehl AM. Increased gastrointestinal ethanol production in obese mice: implications for fatty liver disease pathogenesis. *Gastroenterology.* 2000;119(5):1340-1347.
63. European Association for the Study of the L, European Association for the Study of D, 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(6):1388-1402.
64. Marengo A, Jouness RI, Bugianesi E. Progression and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Adults. *Clin Liver Dis.* 2016;20(2):313-324.
65. Bugianesi E, Leone N, Vanni E, et al. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2002;123(1):134-140.
66. Ertle J, Dechene A, Sowa JP, et al. Non-alcoholic fatty liver disease progresses to hepatocellular carcinoma in the absence of apparent cirrhosis. *Int J Cancer.* 2011;128(10):2436-2443.
67. Michelotti GA, Machado MV, Diehl AM. NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10(11):656-665.
68. Zoller H, Tilg H. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma. *Metabolism.* 2016;65(8):1151-1160.
69. Ruderman NB, Schneider SH, Berchtold P. The "metabolically-obese," normal-weight individual. *Am J Clin Nutr.* 1981;34(8):1617-1621.
70. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes.* 2001;50(8):1844-1850.
71. Younossi ZM, Stepanova M, Negro F, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in lean individuals in the United States. *Medicine (Baltimore).* 2012;91(6):319-327.
72. Leung JC, Loong TC, Wei JL, et al. Histological severity and clinical outcomes of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese patients. *Hepatology.* 2017;65(1):54-64.

73. Consultation WHOE. Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. *Lancet*. 2004;363(9403):157-163.
74. Younes R, Rosso C, Petta S, et al. Usefulness of the index of NASH - ION for the diagnosis of steatohepatitis in patients with Non-Alcoholic Fatty Liver: an external validation study. *Liver Int*. 2017.
75. Bohte AE, van Werven JR, Bipat S, Stoker J. The diagnostic accuracy of US, CT, MRI and 1H-MRS for the evaluation of hepatic steatosis compared with liver biopsy: a meta-analysis. *Eur Radiol*. 2011;21(1):87-97.
76. Chen CH, Huang MH, Yang JC, et al. Prevalence and risk factors of nonalcoholic fatty liver disease in an adult population of taiwan: metabolic significance of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese adults. *J Clin Gastroenterol*. 2006;40(8):745-752.
77. Das K, Das K, Mukherjee PS, et al. Nonobese population in a developing country has a high prevalence of nonalcoholic fatty liver and significant liver disease. *Hepatology*. 2010;51(5):1593-1602.
78. Xu C, Yu C, Ma H, Xu L, Miao M, Li Y. Prevalence and risk factors for the development of nonalcoholic fatty liver disease in a nonobese Chinese population: the Zhejiang Zhenhai Study. *Am J Gastroenterol*. 2013;108(8):1299-1304.
79. Feng RN, Du SS, Wang C, et al. Lean-non-alcoholic fatty liver disease increases risk for metabolic disorders in a normal weight Chinese population. *World J Gastroenterol*. 2014;20(47):17932-17940.
80. Kwon YM, Oh SW, Hwang SS, Lee C, Kwon H, Chung GE. Association of nonalcoholic fatty liver disease with components of metabolic syndrome according to body mass index in Korean adults. *Am J Gastroenterol*. 2012;107(12):1852-1858.
81. Kim NH, Kim JH, Kim YJ, et al. Clinical and metabolic factors associated with development and regression of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese subjects. *Liver Int*. 2014;34(4):604-611.
82. Wei JL, Leung JC, Loong TC, et al. Prevalence and Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Non-Obese Patients: A Population Study Using Proton-Magnetic Resonance Spectroscopy. *Am J Gastroenterol*. 2015;110(9):1306-1314; quiz 1315.
83. Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, et al. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. *Ann Intern Med*. 2000;132(2):112-117.
84. Kim LJ, Nalls MA, Eiriksdottir G, et al. Associations of visceral and liver fat with the metabolic syndrome across the spectrum of obesity: the AGES-Reykjavik study. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;19(6):1265-1271.
85. van der Poorten D, Milner KL, Hui J, et al. Visceral fat: a key mediator of steatohepatitis in metabolic liver disease. *Hepatology*. 2008;48(2):449-457.
86. Jorge ASB, Andrade JMO, Paraiso AF, et al. Body mass index and the visceral adipose tissue expression of IL-6 and TNF-alpha are associated with the morphological severity of non-alcoholic fatty liver disease in individuals with class III obesity. *Obes Res Clin Pract*. 2018;12(1S1):1-8.
87. Angulo P. NAFLD, obesity, and bariatric surgery. *Gastroenterology*. 2006;130(6):1848-1852.
88. Kazankov K, Barrera F, Moller HJ, et al. The macrophage activation marker sCD163 is associated with morphological disease stages in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2016;36(10):1549-1557.
89. Lallukka S, Sevastianova K, Perttila J, et al. Adipose tissue is inflamed in NAFLD due to obesity but not in NAFLD due to genetic variation in PNPLA3. *Diabetologia*. 2013;56(4):886-892.

90. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008;453(7196):783-787.
91. Kohli S, Sniderman AD, Tchernof A, Lear SA. Ethnic-specific differences in abdominal subcutaneous adipose tissue compartments. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18(11):2177-2183.
92. Markman B, Barton FE, Jr. Anatomy of the subcutaneous tissue of the trunk and lower extremity. *Plast Reconstr Surg*. 1987;80(2):248-254.
93. 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(6):1244-1249.
94. Amato MC, Giordano C, Galia M, et al. Visceral Adiposity Index: a reliable indicator of visceral fat function associated with cardiometabolic risk. *Diabetes Care*. 2010;33(4):920-922.
95. Sookoian S, Pirola CJ. Systematic review with meta-analysis: risk factors for non-alcoholic fatty liver disease suggest a shared altered metabolic and cardiovascular profile between lean and obese patients. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017;46(2):85-95.
96. Ampuero J, Ranchal I, Gallego-Duran R, et al. Oxidized low-density lipoprotein antibodies/high-density lipoprotein cholesterol ratio is linked to advanced non-alcoholic fatty liver disease lean patients. *J Gastroenterol Hepatol*. 2016;31(9):1611-1618.
97. Feng R, Luo C, Li C, et al. Free fatty acids profile among lean, overweight and obese non-alcoholic fatty liver disease patients: a case - control study. *Lipids Health Dis*. 2017;16(1):165.
98. Wattacheril J, Sanyal AJ. Lean NAFLD: An Underrecognized Outlier. *Curr Hepatol Rep*. 2016;15(2):134-139.
99. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*. 2008;40(12):1461-1465.
100. Nishioji K, Mochizuki N, Kobayashi M, et al. The Impact of PNPLA3 rs738409 Genetic Polymorphism and Weight Gain ≥ 10 kg after Age 20 on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Non-Obese Japanese Individuals. *PLoS One*. 2015;10(10):e0140427.
101. Honda Y, Yoneda M, Kessoku T, et al. Characteristics of non-obese non-alcoholic fatty liver disease: Effect of genetic and environmental factors. *Hepatol Res*. 2016;46(10):1011-1018.
102. Adams LA, Marsh JA, Ayonrinde OT, et al. Cholesteryl ester transfer protein gene polymorphisms increase the risk of fatty liver in females independent of adiposity. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012;27(9):1520-1527.
103. Nakatsuka A, Matsuyama M, Yamaguchi S, et al. Insufficiency of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase is risk for lean non-alcoholic steatohepatitis. *Sci Rep*. 2016;6:21721.
104. Zhu L, Baker SS, Gill C, et al. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology*. 2013;57(2):601-609.
105. Duarte SMB, Stefano JT, Miele L, et al. Gut microbiome composition in lean patients with NASH is associated with liver damage independent of caloric intake: A prospective pilot study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2018;28(4):369-384.
106. Hung ND, Kim MR, Sok DE. 2-Polyunsaturated acyl lysophosphatidylethanolamine attenuates inflammatory response in zymosan A-induced peritonitis in mice. *Lipids*. 2011;46(10):893-906.

107. Soga T, Ohishi T, Matsui T, et al. Lysophosphatidylcholine enhances glucose-dependent insulin secretion via an orphan G-protein-coupled receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;326(4):744-751.
108. Heimerl S, Fischer M, Baessler A, et al. Alterations of plasma lysophosphatidylcholine species in obesity and weight loss. *PLoS One*. 2014;9(10):e111348.
109. Feldman A, Eder SK, Felder TK, et al. Clinical and Metabolic Characterization of Lean Caucasian Subjects With Non-alcoholic Fatty Liver. *Am J Gastroenterol*. 2017;112(1):102-110.
110. Yamakado M, Tanaka T, Nagao K, et al. Plasma amino acid profile is associated with visceral fat accumulation in obese Japanese subjects. *Clin Obes*. 2012;2(1-2):29-40.
111. Fracanzani AL, Petta S, Lombardi R, et al. Liver and Cardiovascular Damage in Patients With Lean Nonalcoholic Fatty Liver Disease, and Association With Visceral Obesity. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2017;15(10):1604-1611 e1601.
112. Sookoian S, Pirola CJ. Systematic review with meta-analysis: the significance of histological disease severity in lean patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018;47(1):16-25.
113. Cruz ACD, Bugianesi E, George J, et al. 379 Characteristics and Long-Term Prognosis of Lean Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2014;146(5):S-909.
114. Zheng W, McLerran DF, Rolland B, et al. Association between body-mass index and risk of death in more than 1 million Asians. *N Engl J Med*. 2011;364(8):719-729.
115. Cordell HJ, Han Y, Mells GF, et al. International genome-wide meta-analysis identifies new primary biliary cirrhosis risk loci and targetable pathogenic pathways. *Nat Commun*. 2015;6:8019.
116. Daly AK, King BP, Leathart JB. Genotyping for cytochrome P450 polymorphisms. *Methods Mol Biol*. 2006;320:193-207.