

# il Diabete

Vol. 33, N. 2, luglio 2021



## Diabete e NAFLD: un'associazione bidirezionale

### - RASSEGNE

Epidemiologia e storia naturale della NAFLD, una malattia sistemica

Ruolo dei farmaci antidiabete nel trattamento della NAFLD

Ruolo dei farmaci non antidiabete nel trattamento della NAFLD

### - EDITORIALI

La gestione della pandemia di NAFLD: il ruolo del diabetologo

### - AGGIORNAMENTO DALLA LETTERATURA

Caratterizzazione di un nuovo modello sperimentale per lo studio della NAFLD

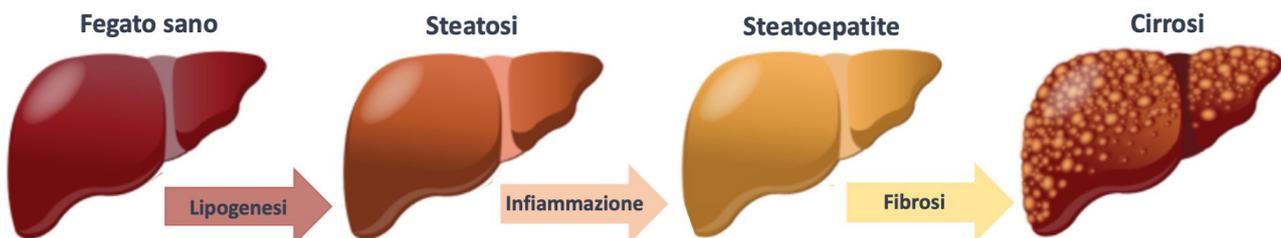
### - JOURNAL CLUB

- MEDICINA TRASLAZIONALE: APPLICAZIONI CLINICHE DELLA RICERCA DI BASE

Biomarcatori clinici e molecolari per la diagnosi e la stadiazione della NAFLD

### - AGGIORNAMENTO CLINICO

Steatosi epatica non alcolica: non sempre una condizione benigna



# il Diabete

---

Organo ufficiale della  
Società Italiana di Diabetologia

## *Direttore Scientifico*

Sebastiano Squatrito (Catania)

## *Co-direttori*

Gloria Formoso (Chieti)  
Lucia Frittitta (Catania)  
Simona Frontoni (Roma)  
Marta Letizia Hribal (Catanzaro)  
Lorella Marselli (Pisa)  
Giuseppe Defeudis (YoSID)

## *Comitato di Redazione*

Benedetta Bonora (Padova)  
Fabio Broglio (Torino)  
Stefano Ciardullo (Milano)  
Francesca Cinti (Roma-Cattolica)  
Giuseppe Daniele (Pisa)  
Angela Dardano (Pisa)  
Ilaria Dicembrini (Firenze)  
Antonio Di Pino (Catania)  
Francesca Fiory (Napoli)  
Luigi Laviola (Bari)  
Anna Leonardini (Bari)  
Roberta Lupoli (Napoli-Federico II)  
Ernesto Maddaloni (Roma-Sapienza)  
Daria Maggi (Roma-Campus)  
Alessandro Mantovani (Verona)  
Matteo Monami (Firenze)  
Mario Luca Morieri (Padova)  
Antonio Nicolucci (Pescara)  
Emanuela Orsi (Milano)  
Pia Clara Pafundi (Napoli-Vanvitelli)  
Lorenzo Piemonti (Milano)  
Francesca Porcellati (Perugia)  
Ivana Rabbone (Torino)  
Elena Succurro (Catanzaro)  
Dario Tuccinardi (Roma-Campus)

## *Responsabili di Redazione*

Andrea Tumminia (Catania)  
Agostino Milluzzo (Catania)  
Rosario Le Moli (Catania)

## **CONSIGLIO DIRETTIVO SID**

### *Presidente*

Agostino Consoli (Chieti)

### *Presidente Eletto*

Angelo Avogaro (Padova)

### *Tesoriere*

Marta Letizia Hribal (Catanzaro)

### *Segretario*

Gloria Formoso (Chieti-Pescara)

### *Consiglieri*

Fabio Broglio (Torino)  
Massimo Federici (Roma)  
Luigi Laviola (Bari)  
Giuseppe Lepore (Bergamo)  
Raffaele Napoli (Napoli)  
Massimiliano Petrelli (Ancona)  
Lorenzo Piemonti (Milano)  
Salvatore Piro (Catania)  
Sabrina Prudente (Roma)  
Anna Solini (Pisa)  
Giovanni Targher (Verona)

## **UFFICIO DI PRESIDENZA SID 2018-2020**

Agostino Consoli (Chieti)  
Francesco Purrello (Catania)  
Giorgio Sesti (Catanzaro)

Con questo secondo numero della rivista comincia una nuova strutturazione che prevede, nell'arco dell'anno, la realizzazione di alcuni numeri monotematici. Questo numero sarà dedicato ai rapporti tra diabete e NAFLD, la forma più diffusa di malattia epatica cronica nel mondo, parallela all'epidemia di obesità e al diabete mellito di tipo 2. La NAFLD ha una associazione bidirezionale con alcuni disordini metabolici, di cui rappresenta sia una causa che l'effetto. Per questo motivo rappresenta una malattia multisistemica, ed il suo peso clinico e sociale non si limita solo alla morbilità e mortalità collegate al fegato, ma aumenta anche il rischio di sviluppare il diabete di tipo 2 e le malattie cardiovascolari. Per questi motivi è necessario uno screening diffuso e un riconoscimento precoce della patologia nei pazienti diabetici, al fine di attuare un trattamento adeguato per ridurne l'evoluzione e prevenire le complicanze ad essa collegate.

## Sommario

### – RASSEGNE

101 **Epidemiologia e storia naturale della NAFLD, una malattia sistemica**

*Salvatore Petta, Grazia Pennisi*

114 **Ruolo dei farmaci antidiabete nel trattamento della NAFLD**

*Alessandro Mantovani*

130 **Ruolo dei farmaci non antidiabete nel trattamento della NAFLD**

*Maurizio Russello, Maria Luisa Arpi*

### – EDITORIALI A CURA DI SIMONA FRONTONI

143 **La gestione della pandemia di NAFLD: il ruolo del diabetologo**

*Ilaria Barchetta, Flavia Agata Cimini, Laura Bertocchini, Maria Gisella Cavallo*

### – AGGIORNAMENTO DALLA LETTERATURA A CURA DI MARIA LETIZIA HRIBAL

153 **Caratterizzazione di un nuovo modello sperimentale per lo studio della NAFLD**

155 **– JOURNAL CLUB** A CURA DI MARIA LETIZIA HRIBAL

### – MEDICINA TRASLAZIONALE: APPLICAZIONI CLINICHE DELLA RICERCA DI BASE A CURA DI LORELLA MARSELLI

156 **Biomarcatori clinici e molecolari per la diagnosi e la stadiazione della NAFLD**

*Alessandra Scamporrino, Stefania Di Mauro, Agnese Filippello, Francesco Purrello, Salvatore Piro*

### – AGGIORNAMENTO CLINICO A CURA DI GIUSEPPE DEFEUDIS

173 **Steatosi epatica non alcolica: non sempre una condizione benigna**

*Stefano Ciardullo, Gianluca Perseghin*

PLATINUM CIRCLE



GOLDEN CIRCLE



SILVER CIRCLE



# il Diabete

Vol. 33, N. 2, luglio 2021

Con questo secondo numero della rivista cambiano il Direttore Scientifico, i Co-direttori, i componenti del Comitato di Redazione ed i Responsabili di Redazione.

In qualità di Direttore Scientifico desidero esprimere prima di tutto un ringraziamento sincero a nome mio e di tutta la Società al mio predecessore Prof. Cavallo Perin e a tutto il gruppo che ha collaborato con lui per la gestione della rivista negli ultimi due anni, con impegno e dedizione costante.

Desidero anche ringraziare tutti i colleghi che hanno accettato di entrare a far parte della squadra che nei prossimi anni si occuperà di portare avanti la rivista della nostra Società. Per alcuni si tratta di una conferma, mentre per molti altri è la prima esperienza.

Per me è un grande onore assumere la direzione scientifica e, in qualche modo, questo incarico rappresenta un "ritorno al passato" dato che Il Diabete è nato a Catania nel 1990 sotto la direzione del Prof. Riccardo Vigneri e, per tanti anni, ci siamo occupati della sua gestione. In quell'epoca la rivista rappresentava un modello nuovo di aggiornamento e formazione rivolto a tutti i colleghi diabetologi, con finalità prevalentemente di tipo clinico. La rivista in tutti questi anni ha mantenuto uno standard qualitativo molto elevato grazie al contributo di tutti i Comitati di Redazione che si sono susseguiti nel tempo, e di tutti i colleghi che hanno contribuito alla preparazione del materiale di aggiornamento. La sua funzione è stata ancora più utile in questi ultimi due anni poiché, date le restrizioni legate alla pandemia da Covid-19, sono venute meno tutte le occasioni di incontri e formazione in presenza.

Oggi certamente Il Diabete rappresenta un punto di riferimento in ambito diabetologico sia per gli specialisti di Diabetologia sia per altri colleghi (Cardiologi, Nefrologi, Internisti). Va da sé che questo standard qualitativo raggiunto ci obbliga ad impegnarci tutti per mantenerlo e rafforzarlo.

Il Direttore Scientifico  
Sebastiano Squatrito

## Direzione Scientifica

Sebastiano Squatrito, Catania

## Direttore Responsabile

Stefano Melloni

Associato all'Unione Stampa Periodica Italiana



Copyright © 2021 SID  
Società Italiana di Diabetologia  
ISBN Online 978-88-6923-820-8  
ISSN Online 1720-8335

Nessuna parte può essere duplicata o riprodotta senza l'autorizzazione scritta dell'Editore.



Bononia University Press

## Bononia University Press

Via Ugo Foscolo 7, 40123 Bologna  
tel. (+39) 051 232 882; fax (+39) 051 221 019  
e-mail: info@buponline.com  
www.buponline.com

Periodico riconosciuto "di elevato valore culturale" dal Ministero per i Beni e le Attività Culturali

Autorizzazione Tribunale di Milano  
n. 706 del 2/11/1988

Progetto grafico: Alessio Bonizzato

## Avvertenza ai lettori

L'Editore declina ogni responsabilità derivante da errori od omissioni in merito a dosaggio e impiego di prodotti eventualmente citati negli articoli, e invita il lettore a controllarne personalmente l'esattezza, facendo riferimento alla bibliografia relativa.

# Epidemiologia e storia naturale della NAFLD, una malattia sistemica

Salvatore Petta, Grazia Pennisi

Sezione di Gastroenterologia e Epatologia, PROMISE, Università di Palermo

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2102a>

## INTRODUZIONE

La steatosi epatica non alcolica, ovvero *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease* (NAFLD), è una condizione frequentemente associata alla presenza di patologie metaboliche quali obesità e diabete, e nel cui contesto è possibile discriminare un quadro di semplice steatosi da uno di steatoepatite non alcolica (NASH), quest'ultima caratterizzata da un rischio più elevato di progressione della malattia di fegato verso la cirrosi epatica e le sue complicanze (1) (Fig. 1). In Italia la prevalenza stimata di NAFLD in popolazione generale è di circa il 25%, con tassi superiori al 50% in popolazioni a rischio quali soggetti obesi e/o diabetici, e con una prevalenza stimata di danno epatico significativo di circa il 2%, ma intorno al 13% in popolazione diabetica (2-4). Il rilevante impatto epidemiologico della NAFLD si traduce anche in un estremamente rilevante impatto clinico dovuto all'osservato e crescente incremento sia di complicanze correlate alla malattia di fegato che extraepatiche, con studi di coorte che hanno identificato nella severità della malattia di fegato ed in modo particolare della fibrosi epatica il fattore che più condiziona la prognosi ed il rischio di complicanze di tali pazienti (5).

## DEFINIZIONE ED EPIDEMIOLOGIA DELLA NAFLD

La NAFLD è una condizione caratterizzata e definita dall'accumulo di lipidi all'interno degli epatociti in una

quantità che interessi almeno il 5% del fegato (1). La definizione di NAFLD è tuttavia una definizione "negativa" perché per poterne porre diagnosi è necessario escludere altre cause di malattia cronica di fegato quali infezioni da virus dell'epatite B e C, ed escludere anche un consumo significativo ed a rischio di alcolici stimato come superiore a 2 unità alcoliche/die o 14/settimana nelle donne e 3/die o 21/settimana negli uomini.

L'incremento del dibattito sulla NAFLD e di dati della letteratura scientifica in merito a tale condizione è giustificato dal suo più che rilevante *burden* epidemiologico. Una

### FAD ECM "il Diabete"

Questa rassegna fa parte di un percorso di **formazione a distanza** accreditato a livello nazionale e disponibile gratuitamente nell'aula virtuale della SID ([www.fad.siditalia.it](http://www.fad.siditalia.it)).

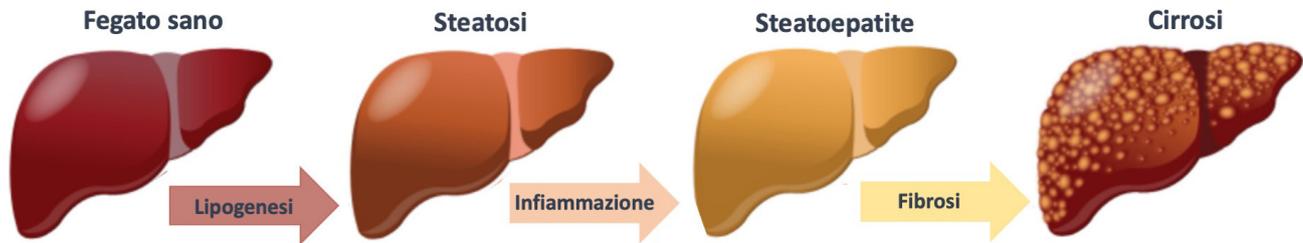
Per partecipare al corso occorre:

1. Leggere la rassegna (disponibile on-line)
2. Registrarsi all'aula e iscriversi al corso "il Diabete"
3. Rispondere on-line al quiz di verifica e compilare il questionario di valutazione dell'evento FAD.

Una volta eseguito con successo il test di valutazione e compilato il questionario di valutazione dell'evento, sarà cura della Segreteria ECM della SID far pervenire l'attestato ECM del corso ai diretti interessati nei tempi e nelle modalità stabiliti dalla regolamentazione vigente.

**Per ulteriori informazioni: [www.fad.siditalia.it](http://www.fad.siditalia.it)**

**Figura 1** ♦ **Evoluzione della NAFLD. L'anomalo accumulo di grasso su fegato sano determina la comparsa di steatosi epatica. I processi di infiammatori innescati dall'alterata lipogenesi determinano la comparsa di steatoepatite e fibrosi epatica, con progressiva evoluzione verso la cirrosi**



recente meta-analisi che ha considerato gli studi sulla prevalenza della NAFLD in popolazione generale fino al 2016 ha stimato una prevalenza media di steatosi epatica non alcolica del 24,1%, con picchi intorno al 30% in Sud America e nei paesi del medio oriente (6). In accordo con questi dati, una più recente meta-analisi presentata nel 2020 al meeting europeo delle malattie del fegato e che considerava solo studi su popolazione generale europea ha riportato un tasso di prevalenza del 27,6%, quindi in lieve aumento rispetto a quanto osservato nella precedente meta-analisi (7). I dati di prevalenza in Italia si allineano perfettamente con quanto osservato nel resto del mondo. Lo studio Dionysos è stato condotto nel 2002-2003 nella cittadina di Campogalliano in provincia di Modena, su un campione di 3.345 soggetti su 5.780 di età compresa fra 18 e 75 anni e che hanno accettato di partecipare allo studio (8). Tale studio ha documentato come la prevalenza di NAFLD, valutata mediante esame ultrasonografico, in soggetti con sospetta malattia di fegato - definita sulla base di incremento dei valori di ALT e/o GGT, e/o positività per HBsAg e/o ANTI-HCV - era del 25% ovvero simile al 20% riscontrato in un gruppo di soggetti della stessa corte, paragonabili per sesso ed età, ma senza sospetta malattia di fegato (8). A distanza di quasi 20 anni un altro studio condotto in Italia ha documentato un tasso elevato ed un incremento della prevalenza della NAFLD. Infatti lo studio ABCD, condotto in un grande ipermercato di Palermo, su una popolazione di 890 individui ha riportato una prevalenza di NAFLD del 27% diagnosticata mediante l'utilizzo della *Controlled Attenuation Parameter (CAP)* ovvero di un parametro ottenuto mediante lo strumento non invasivo FibroScan (2). I dati finora riportati suggeriscono quindi come un sog-

getto su 4 o un soggetto su 5 in popolazione generale presenti un quadro di steatosi epatica non alcolica. Tale dato tuttavia rappresenta una media di prevalenze differenti in gruppi a diverso rischio di NAFLD, e pertanto appare estremamente importante individuare le categorie di soggetti a più elevato rischio. Numerosi studi osservazionali documentano infatti come la prevalenza di NAFLD sia particolarmente elevata in presenza di comorbidità metaboliche. Lo studio ABCD prima citato mostra come la prevalenza di NAFLD aumenta progressivamente dal 2,6% in popolazione normopeso, al 24,6% in soggetti sovrappeso, superando ben il 50% (54%) nei soggetti obesi (2). In analogia con questi dati, un altro studio italiano condotto nel 2005 su una popolazione di 187 soggetti obesi non diabetici, di cui ben 145 con BMI > 40 kg/m<sup>2</sup>, mostrava come soltanto 4 pazienti non presentavano una diagnosi ecografica di steatosi epatica (9). Dati altrettanto allarmanti sono stati riportati in coorti di pazienti affetti da diabete di tipo 2. Una recente meta-analisi che ha incluso un totale di 49.419 pazienti con diagnosi di diabete mellito di tipo 2 ha ben documentato una prevalenza media di NAFLD del 55,8%, in linea quindi con quanto osservato in popolazione obesa (10). Questi dati sono stati confermati anche su popolazione italiana, in cui la prevalenza osservata di NAFLD - diagnosticata mediante lo score *fatty liver index* - in una popolazione di 38.880 pazienti diabetici provenienti da 160 differenti centri clinici era del 59,6%; tale studio documentava inoltre come ben il 73,6% di questi pazienti con steatosi presentava valori di transaminasi entro i limiti della norma (3). Il significativo impatto delle comorbidità metaboliche sulla prevalenza di steatosi epatica veniva confermato anche in un altro studio italiano che riportava in una coorte di 203 pazienti non

diabetici ma con sindrome metabolica una prevalenza di steatosi epatica ecografica del 78,8% (11).

Lo scenario appena descritto rende conto quindi a livello mondiale ed anche in Italia di un significativo ed allarmante impatto epidemiologico della steatosi epatica non alcolica. Le previsioni per il futuro non sono tuttavia incoraggianti; un recente modello che simula l'andamento nel tempo della steatosi epatica e delle sue complicanze a livello globale ed in singoli stati inclusa l'Italia, facendo degli assunti che ovviamente possono limitare la forza del modello stesso, stima come dal 2016 al 2030 si osserverà un ulteriore incremento di circa il 10% nella prevalenza della NAFLD (12). Tale dato allarmante può trovare spiegazione nell'andamento nel tempo dei due più importanti fattori di rischio per steatosi epatica quali l'obesità ed il diabete. È infatti ben noto da dati dell'Organizzazione Mondiale della Sanità che in Europa ed in nord America nel 2016 il tasso di obesità è rispettivamente del 23,3% e 28,3% e come tali tassi dal 1975 siano aumentati di circa 2-2,5 volte (13). In analogia all'obesità, i dati dell'IDF Atlas riportano una prevalenza di diabete nel 2019 in Europa ed in nord America del rispettivamente 6,3% e 11,3%, destinati ad aumentare nel 2040 al rispettivamente 7,8% e 13% (14). Tali dati rendono quindi conto di come l'epidemia di NAFLD progredisca in parallelo con la pandemia di diabete ed obesità.

Lo stretto rapporto fra NAFLD e comorbidità metaboliche ha quindi portato avanti un movimento scientifico-culturale che, per quanto non ancora del tutto recepito, suggerisce di cambiare la definizione "negativa" di NAFLD in una definizione positiva ovvero *Metabolic-Associated Fatty Liver Disease* (MAFLD) la cui diagnosi prevede la presenza di steatosi epatica associata a sovrappeso/obesità e/o diabete, ed in pazienti non diabetici e normopeso associata alla presenza di almeno altre due alterazioni metaboliche, il tutto indipendentemente dalla coesistenza di altre cause di danno epatico (15). Tale nuova definizione cambia quindi il paradigma: non più NAFLD come diagnosi di esclusione, bensì malattia metabolica del fegato come unica o coesistente causa di danno epatico.

## STORIA NATURALE DELLA NAFLD

Il rilevante impatto epidemiologico della NAFLD solleva l'ovvia questione se l'accumulo di grasso nel fegato esponga ad un più elevato rischio di complicanze sia epatiche

che extra-epatiche, interferendo quindi negativamente con la prognosi di tali soggetti.

## NAFLD e complicanze epatiche

Riguardo il rischio di complicanze epatiche nei soggetti con NAFLD, dati del *Global Burden of Disease* aggiornati al 2017 riportano come a livello mondiale dal 2012 al 2017 è stato osservato un incremento del 21% dei casi incidenti di tumore epatico e del 7,18% dei casi di cirrosi; tale quadro si confermava anche nella macroarea dell'Europa occidentale con un incremento stimato di incidenza di cancro epatico del 8,7% e di cirrosi epatica del 1,2% (16). Tali evidenze tuttavia considerano insieme le varie cause di malattie croniche di fegato e quindi quesito interrogativo chiave è se la NAFLD può spiegare questi dati. Per rispondere in modo corretto ed esaustivo a tale domanda è necessario valutare l'impatto della NAFLD sul rischio di sviluppare fibrosi epatica avanzata - maggiore fattore di rischio per complicanze epatiche -, sul rischio di insorgenza di epatocarcinoma e scompenso epatico, e quindi sul rischio di morire per cause correlate alla malattia di fegato.

In merito al rapporto fra NAFLD e probabilità di sviluppare una malattia cronica di fegato con fibrosi epatica severa, numerosi studi di popolazione mostrano come a fronte di una prevalenza media di NAFLD in popolazione generale di circa il 25%, il tasso di prevalenza di fibrosi epatica riportato in letteratura nel medesimo contesto clinico varia dallo 0,9% a circa il 26% (17). Tuttavia, soffermandoci su quegli studi che si sono focalizzati sulla valutazione non invasiva della presenza di fibrosi epatica severa si stima che in popolazione generale l'1%-2% presenti un quadro di fibrosi epatica severa secondaria a NAFLD (17). In accordo con questi dati lo studio ABCD2 su popolazione generale italiana riporta come il 2% dei soggetti valutati presentava un quadro di sospetta fibrosi epatica severa secondaria a NAFLD, valutata mediante FibroScan (2). Tali dati nel loro insieme suggeriscono quindi come in numero assoluto esiste un vasto bacino di pazienti con malattia cronica di fegato secondaria a NAFLD ed a rischio di sviluppare complicanze epatiche. Tale scenario appare ancora più allarmante quando consideriamo popolazioni ad elevato rischio metabolico quali i soggetti con diabete di tipo 2. Uno studio condotto in US documentava infatti come in tale categoria di pazienti la prevalenza di fibrosi epatica avanzata valutata mediante

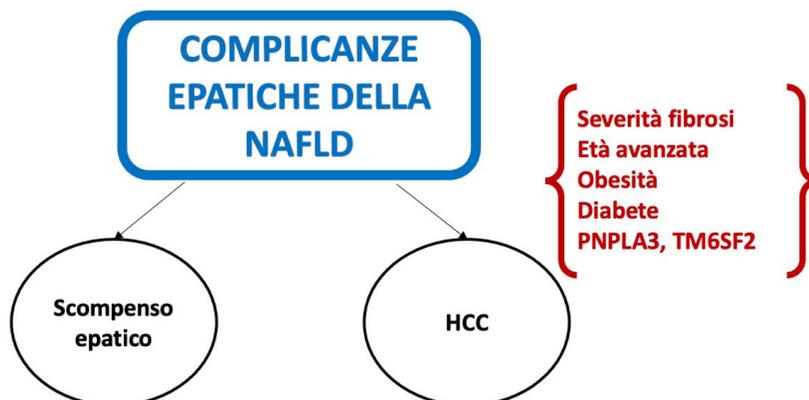
elastoRM incrementi progressivamente dal 3% in soggetti con meno di 58 anni, al 5,7% in soggetti fra 58 e 65 anni, fino al 13,3% in quelli con più di 65 anni (18). In analogia con questi dati uno studio italiano su 1527 pazienti diabetici e con steatosi epatica diagnosticata mediante lo score *fatty liver index* riportava un tasso di fibrosi epatica avanzata del 13,1%, valutata mediante lo score non invasivo FIB-4 (3). Tali dati suggeriscono quindi come, specie in gruppi a più elevato rischio quali le popolazioni con comorbidità metaboliche, vadano messi in opera programmi di screening basati su metodiche non invasive, poco costose e disponibili che consentano un agile *referral* all'epatologo del paziente con NAFLD e sospetto danno epatico (19).

L'elevato numero di soggetti con NAFLD e di conseguenza con fibrosi epatica avanzata secondaria a NAFLD può agevolmente spiegare l'aumento osservato negli ultimi anni di complicanze epatiche in tale categoria di soggetti. Dati raccolti dal registro US della *HealthCore* fra il 2006 ed il 2014 su 1.853 pazienti con cirrosi epatica ed epatocarcinoma, di cui il 10,1% con NAFLD, hanno documentato come la NAFLD rappresentava in proporzione la causa più emergente di epatocarcinoma, rendendo conto nel 2006 circa il 5% dei casi e nel 2014 di ben quasi il 20% (20). In analogia con quanto appena riportato, dati US tratti del *Scientific Registry of Transplant Recipients* su 168.441 pazienti in lista d'attesa per trapianto di fegato, e di cui il 16,5% per epatocarcinoma, confermavano come fra i pazienti in lista con epatocarcinoma la proporzione di quelli con NAFLD fosse la più emergente passando da meno del 5% nel 2002 a più del 20% nel 2018 (21). Lo scenario si presenta abbastanza simile in Italia ed in Europa. La coorte italiana ITALICA di 5.192 pazienti con epatocarcinoma rivela come la proporzione di epatocarcinomi su malattia cronica di fegato secondaria a NAFLD dal 2000 al 2014 era incrementata dal 1,1% al 12,6 (22). Inoltre dati dell'*European Liver Transplant Registry* su 60.527 pazienti sottoposti a trapianto epatico, cui il 28,3% per epatocarcinoma, riportavano come in quest'ultimo gruppo il tasso di trapianti per epatocarcinoma secondario a NAFLD fosse aumentato di circa 3 volte ovvero dallo 0,3% del 2007 al 1,1% del 2017 (23). Analogamente a quanto osservato per l'epatocarcinoma, i pazienti con NAFLD hanno anche un rischio più elevato di sviluppare scompenso epatico ed *end-stage liver disease*. Uno studio US su 9.261 pazienti con nuova diagnosi di cirrosi epatica ha documentato come in tre differenti periodi, ovvero 2004-2006, 2007-2011 e 2012-2014, il tasso di

incidenza di scompenso epatico per 100 persone per anno in pazienti con cirrosi secondaria a NAFLD era raddoppiato da 7,5 a 15 casi; appare inoltre interessante sottolineare come tale *trend* veniva osservato per tutte le manifestazioni di scompenso epatico ovvero incidenza di ascite (da 5,6 a 11,7), di encefalopatia porto-sistemica (da 3,6 a 5,4) e di sanguinamento da rottura di varici esofagee o gastriche (da 1.6 a 2.3) (24). L'impatto clinico rilevante di tali evidenze trova conferma nello studio prima citato che analizza dati del *Scientific Registry of Transplant Recipients* su 168.441 pazienti in lista d'attesa per trapianto di fegato che mostrava come fra i pazienti in lista con *end-stage liver disease* la proporzione di quelli con NAFLD fosse la più emergente passando da circa il 5% nel 2002 a quasi il 30% nel 2018 (21). Risultati simili erano anche osservati nell'*European Liver Transplant Registry* su 60.527 pazienti sottoposti a trapianto epatico, ed in cui ben si documentava come il tasso di trapianti per *end-stage liver disease* secondario a NAFLD fosse aumentato dal 1,2% del 2007 al 3,1% del 2017 (23).

L'incremento dell'incidenza di epatocarcinoma e scompenso epatico in pazienti con NAFLD giustifica infine quanto osservato in US dal *National Vital Statistics System*, ovvero un aumento costante, e più elevato rispetto ad altre eziologie, del tasso di mortalità standardizzato per età per epatocarcinoma e cirrosi in pazienti con NAFLD dal 2009 al 2018 (25).

I dati finora riportati dimostrano in modo inequivocabile come i soggetti con NAFLD abbiano un rischio clinicamente rilevante di sviluppare complicanze correlate alla malattia di fegato (Fig. 2). Tuttavia differenti fattori consentono di stratificare il rischio di tali eventi nella popolazione con NAFLD. L'età avanzata e la presenza di comorbidità metaboliche ed in modo particolare di obesità e diabete sono state associate sia in studi trasversali che longitudinali ad un più elevato rischio di epatocarcinoma e di scompenso epatico (26). Insieme a tali fattori di rischio "tradizionali" evidenze preliminari suggeriscono come varianti comuni di geni implicati nella regolazione dell'omeostasi metabolica e già dimostrati essere associati alla presenza ed alla severità della NAFLD, quali PNPLA3, TM6SF2, HSD17B13, ecc., conferiscano un rischio più elevato di sviluppare eventi epatici e, considerati insieme in *polygenic risk score*, possano essere di aiuto nella stratificazione del rischio (26-27). Tuttavia appare importante sottolineare come la variabile più im-

**Figura 1** ◆ Complicanze epatiche della NAFLD: scompenso epatico e HCC. HCC: epatocarcinoma

portante in grado di discriminare il rischio di insorgenza di eventi epatici in soggetti con NAFLD sia rappresentata dalla severità del danno epatico. A tale proposito bisogna ricordare come nel contesto dei pazienti con NAFLD il 20% circa presenta un quadro di steatoepatite non alcolica (NASH), che a differenza della semplice steatosi si caratterizza per la presenza a livello epatico non solo di gocce lipidiche ma anche di infiammazione e danno epatocellulare (1). Tale distinzione è clinicamente rilevante perché, come dimostrato in una recente meta-analisi, i pazienti con NASH rispetto a quelli con semplice steatosi hanno un tasso di progressione della fibrosi di circa 2 volte superiore, il che giustifica il loro rischio più elevato di sviluppare la cirrosi epatica e le sue complicanze (28). Come conseguenza di quanto appena riportato, se quindi la NASH può essere considerata il “motore” della progressione della fibrosi epatica, quest’ultima può essere riconosciuta come il *driver* finale che modula il rischio di incidenza di complicanze epatiche. Studi di storia naturale a lungo termine di pazienti con diagnosi istologica di NAFLD hanno ben mostrato come il rischio di sviluppare eventi correlate alla malattia di fegato è estremamente più elevato in pazienti con fibrosi epatica avanzata e cirrosi epatica rispetto a quelli con assente, minima o moderata fibrosi epatica (29-30). In linea con questi dati, una recente meta-analisi che ha cumulato gli studi di coorte disponibili su popolazione con diagnosi istologica di NAFLD ha riportato come il rischio di sviluppare eventi epatici sia minimo in pazienti con NAFLD e fibrosi epatica assente o minima, e 2,6; 5,2 e ben 12,7 superiore ri-

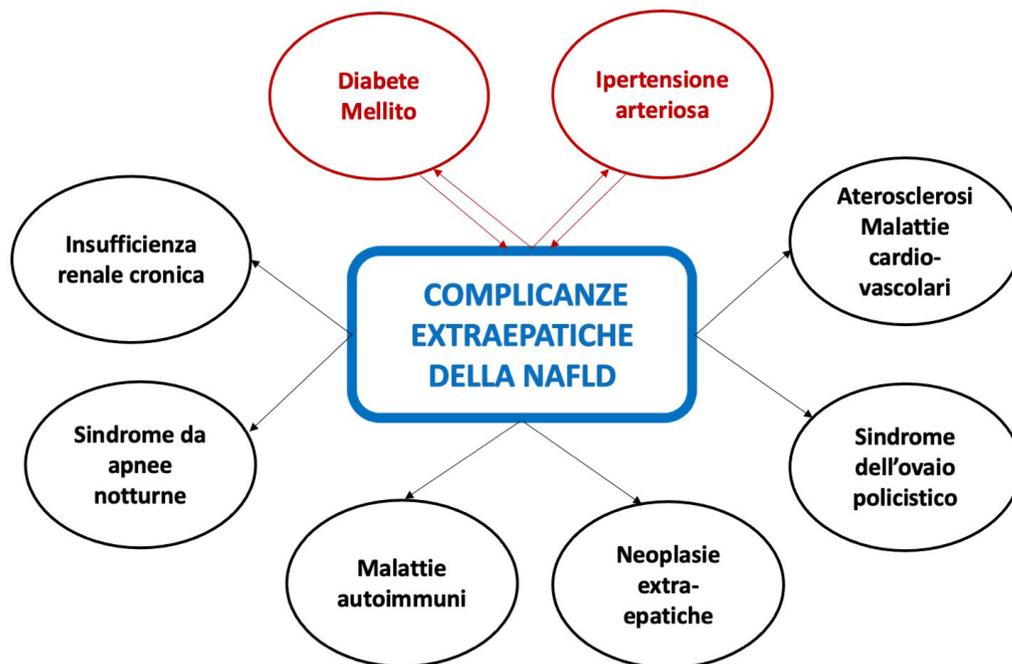
spettivamente nei pazienti con fibrosi epatica F2, F3 ed F4 rispetto a quelli senza fibrosi (5). Tali dati quindi identificano nella fibrosi epatica avanzata/cirrosi epatica il gruppo di pazienti con NAFLD a rischio clinicamente rilevante di sviluppare eventi epatici e quindi da sottoporre a programmi di screening in ambito specialistico. A tale assunto fa parzialmente eccezione il rischio di sviluppare epatocarcinoma che, seppur molto basso, esiste anche in pazienti con NAFLD senza fibrosi epatica avanzata (31). A tale proposito ulteriori studi sono necessari per identificare sottogruppi a rischio in base a caratteristiche metaboliche e genetiche e meritevoli di strategie di screening.

#### NAFLD e complicanze extraepatiche

La NAFLD si caratterizza per una peculiarità clinicamente estremamente rilevante ovvero predisporre non soltanto alla comparsa di eventi correlati alla malattia di fegato, ma anche di eventi extra-epatici.

Studi pionieristici di storia naturale con lungo follow-up di pazienti con diagnosi istologica di NAFLD hanno documentato come sebbene in termini di rischio relativo la prima causa di mortalità sia rappresentata da eventi correlati alla malattia di fegato, in termini di rischio assoluto le prime due cause di decesso, più elevate rispetto a popolazione di controllo senza steatosi, sono rappresentate da eventi cardiovascolari e neoplasia extraepatiche seguite da eventi epatici (29-30).

Negli ultimi anni numerosi studi hanno riportato un’associazione fra NAFLD e numerose patologie extraepatiche (Fig. 3). I dati più solidi mostrano che i pazienti con NAFLD hanno una prevalenza maggiore ed un rischio

**Figura 3** ◆ **Complicanze epatiche della NAFLD: scompenso epatico e HCC. HCC: epatocarcinoma**

più elevato di sviluppare diabete, ipertensione, danno renale, malattie cardiovascolari e neoplasia extraepatiche rispetto a popolazioni senza steatosi epatica. Vi sono tuttavia anche evidenze che la NAFLD sia più frequente in soggetti con altre patologie quali sindrome da apnea notturna (32) e sindrome dell'ovaio policistico (33), e malattie immuno-mediate come la psoriasi (34) e le malattie infiammatorie croniche intestinali (35).

Riguardo l'associazione fra NAFLD e diabete una recente meta-analisi su coorti di soggetti senza diabete al momento dell'arruolamento e stratificati per presenza/assenza di steatosi epatica, mostra come i pazienti con fegato grasso hanno nel tempo un rischio di circa 2 volte superiore di sviluppare diabete; il dato veniva confermato sia in studi con un follow-up superiore che inferiore a 5 anni (36). Insulino-resistenza secondaria all'accumulo di grassi negli epatociti ed infiammazione sistemica correlata al danno epatico sono i *trigger* considerati come elementi patogenetici in grado di spiegare tale l'associazione fra NAFLD ed aumentato rischio di diabete.

La NAFLD è stata anche associata alla presenza ed allo sviluppo di danno renale. In uno studio italiano su una popolazione di più di 2.000 soggetti la NAFLD è stato osservato essere indipendentemente associata ad una prevalenza più elevata di danno renale cronico (37). In

linea con questo dato sempre il gruppo di Verona ha riportato come i soggetti con fegato grasso, anche dopo correzione per numerosi fattori associati a malattia renale, avevano un rischio di 1,5 volte superiore di sviluppare insufficienza renale cronica (38). Tali dati sono stati ampiamente confermati in una meta-analisi che ha incluso dieci studi longitudinali in cui i pazienti erano stratificati in base alla presenza/assenza di steatosi epatica diagnosticata sulla base di incremento dei valori di transaminasi o del fatty liver index oppure mediante ecografia, ed in cui i pazienti con fegato grasso avevano un rischio di circa 1,45 volte superiore di sviluppare danno renale cronico (39).

Numerose evidenze suggeriscono un forte legame fra NAFLD ed aumentato rischio cardiovascolare. Lo studio ABCD mostra come i soggetti con steatosi epatica, rispetto a quelli senza e dopo correzione per obesità, presentino valori più elevati di ASCVD score (atherosclerotic cardiovascular disease, ASCVD), espressione di un rischio più elevato a 10 anni di eventi di malattia cardiovascolare aterosclerotica (40). Altri dati ottenuti da studi trasversali riportano come la steatosi epatica rappresenti un fattore di rischio indipendente sia per un aumentato spessore medio-intimale carotideo (41) che per la presenza di segni

ecocardiografici di disfunzione cardiaca diastolica (42). In linea con questi dati lo studio di Valpolicella condotto su una coorte di più di 2.000 pazienti con diabete di tipo 2 ha documentato come la presenza di steatosi epatica, dopo correzione per i tradizionali fattori di rischio cardiometabolici, sia associata ad una più elevata prevalenza di malattia vascolare coronarica, cerebrale e periferica (43). Dati ancora più solidi in merito all'associazione fra NAFLD e rischio cardiovascolare derivano da lavori su coorti longitudinali. Uno studio francese su 1.872 individui con due valutazioni ecografiche relative alla presenza di placche carotidee a distanza di almeno due anni ha ben documentato come la presenza di fegato grasso al momento della valutazione basale sia un fattore di rischio indipendente per la comparsa di placche aterosclerotiche carotidee (44). Una recente meta-analisi ha anche mostrato come i pazienti con NAFLD abbiano un rischio di circa 1,3 volte superiore di sviluppare fibrillazione atriale rispetto alla popolazione senza fegato grasso (45). Altro dato molto interessante deriva sempre dallo studio prima citato di Valpolicella dove in un contesto ad alto rischio cardiovascolare quale la popolazione diabetica, la NAFLD, dopo correzione per i classici fattori di rischio cardiometabolici emergeva quale fattore di rischio indipendente per l'incidenza di eventi cardio-cerebrovascolari (46). In accordo con quanto finora riportato una meta-analisi pubblicata nel 2016 ha mostrato come i pazienti con NAFLD rispetto alla controparte senza steatosi hanno un rischio di circa 1,6 volte superiore di sviluppare eventi cardiovascolari, riportando ulteriormente come tale rischio sia più elevato per eventi non fatali (47).

La NAFLD è stata anche associata allo sviluppo di neoplasie extraepatiche. Uno studio di coorte longitudinale asiatico su 25.947 soggetti seguiti per un periodo mediano di 7,5 anni ha riportato un tasso superiore di incidenza di neoplasie in pazienti con rispetto a quelli senza steatosi (782,9 vs 592,8 per 100.000 persone-anno) (48). Appare importante sottolineare che i pazienti con NAFLD avevano un più elevato tasso di incidenza non solo, come atteso, per epatocarcinoma, ma anche un rischio di circa 2 volte superiore di tumore della mammella nelle donne e del colon-retto negli uomini (48). Tale ultimo dato è suffragato da una meta-analisi che riporta un rischio di 1,4 volte superiore di sviluppare adenomi/tumori del colon-retto in pazienti con NAFLD rispetto a quelli senza (49). Ulteriori evidenze in merito al nesso fra NAFLD e neoplasia extra-

epatiche sono emerse da un recente studio svedese su una coorte di 8.892 pazienti con diagnosi istologica di NAFLD confrontata con 39.907 soggetti senza steatosi (50). Tale studio, oltre a confermare una attesa più elevata incidenza di epatocarcinoma, ha anche riportato una associazione indipendente fra NAFLD e modesto ma significativo incremento di incidenza di neoplasia pancreatiche, tumori della vescica/rene e melanoma (50). Infine una recente meta-analisi che ha incluso 10 studi di coorte per un totale di 182.202 individui di cui circa un quarto con NAFLD, ha riportato come la presenza di steatosi epatica sia associata in modo significativo con un rischio da 1,5 a 2 volte superiore di incidenza di neoplasia gastrointestinali (esofago, stomaco, pancreas e colon-retto), e di circa 1,2-1,5 superiore di sviluppo di tumori a carico di polmone, mammella, ginecologici o del sistema urinario (51). In accordo con quanto finora riportato, dati US raccolti dal *National Vital Statistics System*, riportano come dal 2007 al 2017 in pazienti con NAFLD sia stato osservato un progressivo e significativo incremento del tasso annuale standardizzato per età di mortalità correlate al diabete, a malattie cardiovascolari ed a neoplasia extraepatiche (52).

I dati finora riportati suggeriscono come esista una associazione indipendente fra NAFLD e patologie extraepatiche, tuttavia, in considerazione dell'elevata prevalenza della NAFLD e dell'elevata probabilità che questa possa coesistere con altre patologie, servono elementi per provare un nesso di causa-effetto. A tale proposito, focalizzandosi ad esempio sul rapporto fra NAFLD ed eventi cardio-cerebrovascolari, un primo aspetto banale ma fondamentale su cui basarsi è il nesso fra NAFLD e fattori di rischio cardiovascolari quali ad esempio diabete ed ipertensione che è ben noto hanno una elevata prevalenza in popolazione con steatosi epatica. Uno studio su 1051 soggetti della coorte del *Framingham Heart Study* e seguiti per un periodo mediano di circa 6 anni ha documentato come vi sia un rapporto bidirezionale fra NAFLD e comorbidità metaboliche/fattori di rischio cardiovascolari (53). Tale studio ha infatti documentato come la presenza al basale di NAFLD prediceva in modo indipendente l'incidenza di diabete di tipo 2 e di ipertensione arteriosa che, a loro volta, insieme all'ipertrigliceridemia, nei soggetti senza steatosi al basale aumentavano il rischio nel tempo di svilupparla (53). Un altro aspetto importante su cui soffermarsi è il ruolo potenziale della severità della NA-

FLD sul rischio di incidenza di complicanze extraepatiche. Uno studio di coorte coreano su una popolazione di quasi 40.000 individui seguito nel tempo ha dimostrato come il rischio di sviluppare diabete aumenta progressivamente da soggetti senza steatosi a quelli con steatosi epatica ed a basso rischio di fibrosi valutata in modo non invasivo con il *NAFLD Fibrosis Score* (NFS), documentando quindi il rischio più elevato in soggetti con fegato grasso ed a rischio intermedio-alto di fibrosi epatica severa (54). Tali dati sono stati quindi confermati recentemente da uno studio spagnolo su 178 pazienti con diagnosi istologica di NAFLD in cui il rischio di sviluppare sia diabete di tipo 2 che ipertensione arteriosa durante il follow-up era significativamente più elevato nei pazienti con fibrosi epatica F2-F4 rispetto a quelli con stadi più lievi di fibrosi (3,5% a 5 anni vs 14,3% per il diabete; 4,2% a 5 anni vs 17,2% per l'ipertensione arteriosa) (55). Translando quanto appena riportato sul diabete e sull'ipertensione al danno cardiovascolare in letteratura sono presenti numerose evidenze. Uno studio pionieristico italiano su una coorte di pazienti con diagnosi istologica di NAFLD ben documentava come lo spessore medio-intimale carotideo aumentava in modo significativo e progressivo in funzione della severità dello stadio di fibrosi epatica (56). In analogia con questi dati, il nostro gruppo ha riportato come la severità della fibrosi epatica valutata mediante biopsia sia associata, dopo correzione per i tradizionali fattori di rischio cardiovascolari, con alterazioni a carico di indici di disfunzione cardiaca sia sistolica che diastolica (57). Quindi sempre il nostro gruppo ha messo in evidenza come, rispetto ad una popolazione di controllo senza fegato grasso, i soggetti con NAFLD e fibrosi epatica, non l'intera popolazione NAFLD, avessero una prevalenza più elevata di alterazioni vascolari della sostanza bianca cerebrale (58). Evidenze ancora più forti che suggeriscono un legame fra severità della fibrosi epatica e complicanze extraepatiche derivano da studi longitudinali. Uno studio condotto su 4731 adulti senza storia di malattia cardiovascolare e sottoposti a TC seriate per valutare l'eventuale progressione del *Coronary Artery Calcium* (CAC) score ha mostrato come dopo correzione per fattori di rischio cardiovascolari il rischio di progressione del CAC aumentava progressivamente da soggetti senza evidenza ecografica di steatosi a quelli con steatosi ma a basso rischio di fibrosi epatica valutata con il NFS, ed era più elevato in individui con steatosi epatica ed a rischio intermedio-elevato di

fibrosi avanzata (59). Tali dati trovano ulteriore conferma in una meta-analisi che documenta come la presenza di "NAFLD severa" si associ ad un rischio di circa 2,5 volte più elevato di sviluppare eventi cardiovascolari fatale e non fatali (47).

A supporto del più elevato rischio di sviluppare eventi extra-epatici in funzione della severità del danno epatico in NAFLD una meta-analisi ha ben documentato come il rischio mortalità per tutte le cause, incluse quindi quelle non correlate alla malattia di fegato, è di circa rispettivamente 1,5; 2,1 e 3,4 volte più alto in pazienti con fibrosi epatica F2, F3 ed F4 rispetto a quelli senza fibrosi (5).

Quanto finora esposto in merito al rapporto fra la severità del danno epatico in NAFLD ed il rischio di sviluppare eventi extraepatici suggerisce come la severità della malattia di fegato possa determinare uno stato proinfiammatorio, profibrogenico e proaterogenico sistemico che possa contribuire in modo indipendente allo sviluppo di complicanze extraepatiche. A tale proposito numerosi studi hanno infatti documentato una correlazione fra severità del danno epatico in NAFLD ed incremento dei livelli circolanti di citochine proinfiammatorie (60-61).

Un altro fattore potenzialmente in grado di modulare il rischio di eventi extraepatici in pazienti con NAFLD è rappresentato dal *background* genetico. A tale proposito, come prima citato, uno dei geni una cui comune variante è stata implicata nel modulare il rischio di NAFLD è il gene *TM6SF2* che codifica per una proteina implicata nell'*export* dei lipidi, sotto forma di VLDL, dal fegato. La variante comune rs58542926 è associata ad un ridotto export dei lipidi dal fegato: tale condizione da una parte determina un accumulo epatico di trigliceridi e quindi steatosi epatica, dall'altro però determina una riduzione circolante dei livelli di colesterolo LDL nel sangue con conseguente ridotto rischio di aterosclerosi carotidea e di eventi cardiovascolari (62).

In conclusione, quanto finora riportato suggerisce come i pazienti con NAFLD siano esposti non solo ad un aumentato rischio di eventi correlati alla malattia di fegato ma anche ad un più elevato rischio di complicanze extraepatiche, e come tale rischio sembra essere modulato da più fattori fra cui i più rilevanti sono la capacità della NAFLD di interferire con fattori di rischio cardiometabolici, l'effetto proinfiammatorio e profibrogenico sistemico alimentato dalla severità del danno epatico, e la presenza di comuni polimorfismi in geni implicati nella regolazione

dell'omeostasi metabolica e che possono anche influire sul rischio di danno epatico e sistemico.

È inoltre importante considerare che il ruolo di NAFLD come malattia multiorgano appare ancora più rilevante se consideriamo che numerosi farmaci ad oggi nelle fasi 2 e 3 di sperimentazione per il trattamento della NASH sono in grado di modulare anche noti fattori di rischio metabolici quali peso corporeo, assetto glicemico e lipidi, il che rende mandatoria una valutazione di tali farmaci non solo sul danno epatico ma anche sul rischio di complicanze extraepatiche.

### NAFLD e qualità di vita

Un altro aspetto importante di cui tenere conto nel valutare l'impatto clinico di una malattia in generale e della NAFLD nello specifico riguarda l'effetto della malattia stessa sulla qualità di vita - *patient reported outcomes* - misurata mediante questionari standardizzati.

Uno studio trasversale condotto in 5 paesi europei su 184 pazienti con NAFLD, 386 pazienti diabetici e 736 individui come controllo selezionati da popolazione generale, ed a cui era stato somministrato un questionario standardizzato, ha dimostrato come i pazienti con NAFLD rispetto a quelli diabetici presentano un peggioramento significativo nella qualità di vita, e rispetto alla popolazione di controllo un deterioramento sia nelle componenti dello score che valutano una compromissione mentale che in quelle che studiano le funzioni fisiche (63). In modo particolare i pazienti con NAFLD riportavano più frequentemente ansia, depressione e difficoltà del sonno, il che in ultima analisi aveva anche un rilevante impatto sull'attività lavorativa in termini di un più elevato tasso di assenteismo e di perdita di attività produttiva e di lavoro (63). L'impatto negativo della NAFLD sulla qualità di vita è stato ulteriormente confermato in una popolazione di 1.667 pazienti con NASH e fibrosi epatica F3-F4 arruolati nello studio clinico Stellar (64). In tale lavoro gli autori confermano gli score dei *patient reported outcomes* indicavano una compromissione della qualità di vita nei pazienti con NASH rispetto alla popolazione di controllo, ma lo studio documentava inoltre come il peggioramento era proporzionale alla severità della fibrosi epatica, ovvero vi era una maggiore compromissione nei pazienti con fibrosi epatica F3 rispetto a quelli con fibrosi F4 (64).

Nel loro insieme quindi i dati appena riportati mostrano come la NAFLD possa essere considerata una malat-

tia sintomatica che, in modo crescente in funzione della severità del danno epatico, interferisce con la qualità di vita sia nelle sue sfere mentali che fisiche.

### CONCLUSIONI

I dati finora riportati, nel complesso dimostrano chiaramente come la NAFLD rappresenti un problema emergente dal punto di vista epidemiologico, clinico e di impatto sulla qualità di vita e che ha come conseguenza un emergente incremento dei costi del sistema sanitario sia a livello globale che nazionale. La dimensione del problema è inoltre ancora più rilevante se consideriamo che abbiamo a che fare con una condizione in costante e continua crescita, fortemente correlata alla pandemia di "diabesità", e che deve essere considerata come una malattia multiorgano in grado di incrementare non soltanto il rischio di complicanze epatiche ma anche di quelle non correlate alla malattia di fegato ed in modo particolare cardiovascolari e neoplastiche.

Tuttavia, a fronte di un tale *burden*, problema estremamente rilevante che ostacola un corretto approccio alla malattia è la scarsa consapevolezza della stessa e dei suoi rischi non solo fra i pazienti ma anche fra il personale sanitario, le istituzioni ed i decisori. A tale proposito, una *survey* recentemente condotta dall'EASL (*European Association for the Study of the Liver*) in 29 differenti paesi ha mostrato come soltanto in una minoranza di essi sono stati attivati studi epidemiologici ufficiali, programmi strutturati di informazione, di formazione e di modifiche dello stile di vita, nonché algoritmi standardizzati che consentano lo screening in *setting* ad elevato rischio e mirato ad individuare fra i tanti soggetti con NAFLD quelli con danno epatico meritevoli di *referral* allo specialista epatologo (65). Appare quindi necessario uno sforzo comune mirato a una corretta informazione sulla NAFLD ed a una sua corretta gestione clinica multidisciplinare.

### BIBLIOGRAFIA

1. European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO) EASL-EASD-EASO. Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 64(6): 1388-1402, 2016.
2. Petta S, Di Marco V, Pipitone RM, Grimaudo S, Buscemi C, Craxì A, Buscemi S. Prevalence and severity of nonal-

- coholic fatty liver disease by transient elastography: Genetic and metabolic risk factors in a general population. *Liver Int* 38(11): 2060-2068, 2018.
3. Forlani G, Giorda C, Manti R, Mazzella N, De Cosmo S, Rossi MC, Nicolucci A, Di Bartolo P, Ceriello A, Guida P. AMD-Annals Study Group. The Burden of NAFLD and Its Characteristics in a Nationwide Population with Type 2 Diabetes. *J Diabetes Res* 2016: 2931985, 2016.
  4. Giorda CB, Forlani G, Manti R, Mazzotti A, De Cosmo S, Rossi MC, Nicolucci A, Di Bartolo P, Ceriello A, Guida P, Tartaglino B, Russo G. AMD-Annals Study Group. Trend over time in hepatic fibrosis score in a cohort of type 2 diabetes patients. *Diabetes Res Clin Pract* 135: 65-72, 2018.
  5. Taylor RS, Taylor RJ, Bayliss S, Hagström H, Nasr P, Schattenberg JM, Ishigami M, Toyoda H, Wai-Sun Wong V, Peleg N, Shlomai A, Sebastiani G, Seko Y, Bhala N, Younossi ZM, Anstee QM, McPherson S, Newsome PN. Association Between Fibrosis Stage and Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* 158(6): 1611-1625.e12, 2020.
  6. 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* 64(1): 73-84, 2016.
  7. Petta S, Hagström H, Geier A, Ratziu V, Caballeria L, Expósito C, Hernández R, Blokzijl H, de Knegt RJ, Ferrinho D, Ntalla I, Smith A, Ramroth H, Newsome PN. Europe's largest meta-analysis on the prevalence of non-alcoholic fatty liver disease, non-alcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis (F3-F4). *Digital ILC 2021, THU-053*, 2020.
  8. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 42(1): 44-52, 2005.
  9. Colicchio P, Tarantino G, del Genio F, Sorrentino P, Saldamacchia G, Finelli C, Conca P, Contaldo F, Pasanisi F. Non-alcoholic fatty liver disease in young adult severely obese non-diabetic patients in South Italy. *Ann Nutr Metab* 49(5): 289-295, 2005.
  10. Younossi ZM, Golabi P, de Avila L, Paik JM, Srishord M, Fukui N, Qiu Y, Burns L, Afendy A, Nader F. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 71(4): 793-801, 2019.
  11. Soresi M, Noto D, Cefalù AB, Martini S, Vigna GB, Fonda M, Manzato E, Cattin L, Fellin R, Averna MR, Notarbartolo A. Metabolic Syndrome Study Group. Nonalcoholic fatty liver and metabolic syndrome in Italy: results from a multicentric study of the Italian Arteriosclerosis society. *Acta Diabetol* 50(2): 241-249, 2013.
  12. Estes C, Anstee QM, Arias-Loste MT, Bantel H, Bellentani S, Caballeria J, Colombo M, Craxi A, Crespo J, Day CP, Eguchi Y, Geier A, Kondili LA, Kroy DC, Lazarus JV, Loomba R, Manns MP, Marchesini G, Nakajima A, Negro F, Petta S, Ratziu V, Romero-Gomez M, Sanyal A, Schattenberg JM, Tacke F, Tanaka J, Trautwein C, Wei L, Zeuzem S, Razavi H. Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016-2030. *J Hepatol* 69(4): 896-904, 2018.
  13. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
  14. <https://www.diabetesatlas.org/en/>.
  15. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero-Gomez M, Zelber-Sagi S, Wai-Sun Wong V, Dufour JF, Schattenberg JM, Kawaguchi T, Arrese M, Valenti L, Shiha G, Tiribelli C, Yki-Järvinen H, Fan JG, Grønbaek H, Yilmaz Y, Cortez-Pinto H, Oliveira CP, Bedossa P, Adams LA, Zheng MH, Fouad Y, Chan WK, Mendez-Sanchez N, Ahn SH, Castera L, Bugianesi E, Ratziu V, George J. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol* 73(1): 202-209, 2020.
  16. Paik JM, Golabi P, Younossi Y, Mishra A, Younossi ZM. Changes in the Global Burden of Chronic Liver Diseases From 2012 to 2017: The Growing Impact of NAFLD. *Hepatology* 72(5): 1605-1616, 2020.
  17. Harris R, Harman DJ, Card TR, Aithal GP, Guha IN. Prevalence of clinically significant liver disease within the general population, as defined by non-invasive markers of liver fibrosis: a systematic review. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2(4): 288-297, 2017.
  18. Doycheva I, Cui J, Nguyen P, Costa EA, Hooker J, Hofflich H, Bettencourt R, Brouha S, Sirlin CB, Loomba R. Non-invasive screening of diabetics in primary care for NAFLD and advanced fibrosis by MRI and MRE. *Aliment Pharmacol Ther* 43(1): 83-95, 2016.
  19. Castera L, Friedrich-Rust M, Loomba R. Noninvasive Assessment of Liver Disease in Patients With Nonalcoholic

- Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 156(5): 1264-1281.e4, 2019.
20. Goldberg D, Ditah IC, Saeian K, Lalehzari M, Aronsohn A, Gorospe EC, Charlton M. Changes in the Prevalence of Hepatitis C Virus Infection, Nonalcoholic Steatohepatitis, and Alcoholic Liver Disease Among Patients With Cirrhosis or Liver Failure on the Waitlist for Liver Transplantation. *Gastroenterology* 152(5): 1090-1099.e1, 2017.
  21. Younossi ZM, Stepanova M, Ong J, Trimble G, AlQahtani S, Younossi I, Ahmed A, Racila A, Henry L. Nonalcoholic Steatohepatitis Is the Most Rapidly Increasing Indication for Liver Transplantation in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol* 19(3): 580-589.e5, 2021.
  22. Bucci L, Garuti F, Lenzi B, Pecorelli A, Farinati F, Giannini EG, Granito A, Ciccarese F, Rapaccini GL, Di Marco M, Caturelli E, Zoli M, Borzio F, Sacco R, Cammà C, Virdone R, Marra F, Felder M, Morisco F, Benvegnù L, Gasbarrini A, Svegliati-Baroni G, Foschi FG, Missale G, Masotto A, Nardone G, Colecchia A, Bernardi M, Trevisani F. Italian Liver Cancer (ITA.LI.CA) group. The evolutionary scenario of hepatocellular carcinoma in Italy: an update. *Liver Int* 37(2): 259-270, 2017.
  23. Belli LS, Perricone G, Adam R, Cortesi PA, Strazzabosco M, Facchetti R, Karam V, Salizzoni M, Andujar RL, Fondavila C, De Simone P, Morelli C, Fabregat-Prous J, Samuel D, Agarwala K, Moreno Gonzales E, Charco R, Zieniewicz K, De Carlis L, Duvoux C. All the contributing centers (www.eltr.org) and the European Liver and Intestine Transplant Association (ELITA). Impact of DAAs on liver transplantation: Major effects on the evolution of indications and results. An ELITA study based on the ELTR registry. *J Hepatol* 69(4): 810-817, 2018.
  24. Orman ES, Roberts A, Ghabril M, Nephew L, Desai AP, Patidar K, Chalasani N. Trends in Characteristics, Mortality, and Other Outcomes of Patients With Newly Diagnosed Cirrhosis. *JAMA Netw Open* 2(6): e196412, 2019.
  25. Kim D, Konyon P, Cholankeril G, Wong RJ, Younossi ZM, Ahmed A. Hepatocellular Carcinoma Research Committee for Chronic Liver Disease Foundation. Decline in Annual Mortality of Hepatitis C Virus-Related Hepatocellular Carcinoma in the United States, From 2009 to 2018. *Gastroenterology* 159(4): 1558-1560.e2, 2020.
  26. Grimaudo S, Pipitone RM, Pennisi G, Celsa C, Cammà C, Di Marco V, Barcellona MR, Boemi R, Enea M, Giannetti A, Spatola F, Marchesini G, Craxì A, Petta S. Association Between PNPLA3 rs738409 C>G Variant and Liver-Related Outcomes in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 18(4): 935-944.e3, 2020.
  27. Bianco C, Jamialahmadi O, Pelusi S, Baselli G, Don-giovanni P, Zanoni I, Santoro L, Maier S, Liguori A, Meroni M, Borroni V, D'Ambrosio R, Spagnuolo R, Alisi A, Federico A, Bugianesi E, Petta S, Miele L, Vespasiani-Gentilucci U, Anstee QM, Stickel F, Hampe J, Fischer J, Berg T, Fracanzani AL, Soardo G, Reeves H, Prati D, Romeo S, Valenti L. Non-invasive stratification of hepatocellular carcinoma risk in non-alcoholic fatty liver using polygenic risk scores. *J Hepatol* 74(4): 775-782, 2021.
  28. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 13(4): 643-54.e1-9; quiz e39-40, 2015.
  29. Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, Adams LA, Bjornsson ES, Charatcharoenwitthaya P, Mills PR, Keach JC, Lafferty HD, Stahler A, Haflidadottir S, Bendtsen F. Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 149(2): 389-97.e10, 2015.
  30. Ekstedt M, Hagström H, Nasr P, Fredrikson M, Stål P, Kechagias S, Hultcrantz R. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology* 61(5): 1547-1554, 2015.
  31. Piscaglia F, Svegliati-Baroni G, Barchetti A, Pecorelli A, Marinelli S, Tiribelli C, Bellentani S. HCC-NAFLD Italian Study Group. Clinical patterns of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver disease: A multicenter prospective study. *Hepatology* 63(3): 827-838, 2016.
  32. Petta S, Marrone O, Torres D, Buttacavoli M, Cammà C, Di Marco V, Licata A, Lo Bue A, Parrinello G, Pinto A, Salvaggio A, Tuttolomondo A, Craxì A, Bonsignore MR. Obstructive Sleep Apnea Is Associated with Liver Damage and Atherosclerosis in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS One* 10(12): e0142210, 2015.
  33. Wu J, Yao XY, Shi RX, Liu SF, Wang XY. A potential link between polycystic ovary syndrome and non-alcoholic fatty liver disease: an update meta-analysis. *Reprod Health* 15(1): 77, 2018.
  34. Phan K, Onggo J, Charlton O, Smith SD. Relationship between psoriasis and non-alcoholic fatty liver disease -

- Updated systematic review and adjusted meta-analysis. *Australas J Dermatol* 60(4): e352-e355, 2019.
35. Zou ZY, Shen B, Fan JG. Systematic Review With Meta-analysis: Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 25(11): 1764-1772, 2019.
  36. Mantovani A, Byrne CD, Bonora E, Targher G. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Risk of Incident Type 2 Diabetes: A Meta-analysis. *Diabetes Care* 41(2): 372-382, 2018.
  37. Targher G, Bertolini L, Rodella S, Zoppini G, Lippi G, Day C, Muggeo M. Non-alcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased prevalence of chronic kidney disease and proliferative/laser-treated retinopathy in type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 51(3): 444-450, 2008.
  38. Targher G, Chonchol M, Bertolini L, Rodella S, Zenari L, Lippi G, Franchini M, Zoppini G, Muggeo M. Increased risk of CKD among type 2 diabetics with nonalcoholic fatty liver disease. *J Am Soc Nephrol* 19(8): 1564-1570, 2008.
  39. Mantovani A, Petracca G, Beatrice G, Csermely A, Lonardo A, Schattenberg JM, Tilg H, Byrne CD, Targher G. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident chronic kidney disease: an updated meta-analysis. *Gut* gutjnl-2020-323082, 2020.
  40. Pennisi G, Di Marco V, Buscemi C, Mazzola G, Randazzo C, Spatola F, Craxì A, Buscemi S, Petta S. Interplay between non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk in an asymptomatic general population. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, in press.
  41. Fracanzani AL, Burdick L, Raselli S, Pedotti P, Grigore L, Santorelli G, Valenti L, Maraschi A, Catapano A, Fargion S. Carotid artery intima-media thickness in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Med* 121(1): 72-78, 2008.
  42. Bonapace S, Perseghin G, Molon G, Canali G, Bertolini L, Zoppini G, Barbieri E, Targher G. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with left ventricular diastolic dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 35(2): 389-395, 2012.
  43. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Tessari R, Zenari L, Day C, Arcaro G. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 30(5): 1212-1218, 2007.
  44. Pais R, Giral P, Khan JF, Rosenbaum D, Housset C, Poynard T, Ratziu V LIDO Study Group. Fatty liver is an independent predictor of early carotid atherosclerosis. *J Hepatol* 65(1): 95-102, 2016.
  45. Mantovani A, Dauriz M, Sandri D, Bonapace S, Zoppini G, Tilg H, Byrne CD, Targher G. Association between non-alcoholic fatty liver disease and risk of atrial fibrillation in adult individuals: An updated meta-analysis. *Liver Int* 39(4): 758-769, 2019.
  46. Targher G, Bertolini L, Rodella S, Tessari R, Zenari L, Lippi G, Arcaro G. Nonalcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased incidence of cardiovascular events in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 30(8): 2119-2121, 2007.
  47. Targher G, Byrne CD, Lonardo A, Zoppini G, Barbui C. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: A meta-analysis. *J Hepatol* 65(3): 589-600, 2016.
  48. Kim GA, Lee HC, Choe J, Kim MJ, Lee MJ, Chang HS, Bae IY, Kim HK, An J, Shim JH, Kim KM, Lim YS. Association between non-alcoholic fatty liver disease and cancer incidence rate. *J Hepatol* S0168-8278(17)32294-8, 2017.
  49. Mantovani A, Dauriz M, Byrne CD, Lonardo A, Zoppini G, Bonora E, Targher G. Association between nonalcoholic fatty liver disease and colorectal tumours in asymptomatic adults undergoing screening colonoscopy: a systematic review and meta-analysis. *Metabolism* 87: 1-12, 2018.
  50. Simon TG, Roelstraete B, Sharma R, Khalili H, Hagström H, Ludvigsson JF. Cancer Risk in Patients With Biopsy-Confirmed Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Population-Based Cohort Study. *Hepatology*. doi: 10.1002/hep.31845, 2021.
  51. Mantovani A, Petracca G, Beatrice G, Csermely A, Tilg H, Byrne CD, Targher G. Non-alcoholic fatty liver disease and increased risk of incident extrahepatic cancers: a meta-analysis of observational cohort studies *Gut*. gutjnl-2021-324191, 2021.
  52. Kim D, Li AA, Perumpail BJ, Gadiparthi C, Kim W, Cholanckeril G, Glenn JS, Harrison SA, Younossi ZM, Ahmed A. Changing Trends in Etiology-Based and Ethnicity-Based Annual Mortality Rates of Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma in the United States. *Hepatology* 69(3): 1064-1074, 2019.
  53. Ma J, Hwang SJ, Pedley A, Massaro JM, Hoffmann U, Chung RT, Benjamin EJ, Levy D, Fox CS, Long MT. Bi-di-

- rectional analysis between fatty liver and cardiovascular disease risk factors. *J Hepatol* 66(2): 390-397, 2017.
54. Chang Y, Jung HS, Yun KE, Cho J, Cho YK, Ryu S. Cohort study of non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD fibrosis score, and the risk of incident diabetes in a Korean population. *Am J Gastroenterol* 108(12): 1861-1868, 2013.
  55. Ampuero J, Aller R, Gallego-Durán R, Crespo J, Calleja JL, García-Monzón C, Gómez-Camarero J, Caballería J, Lo Iacono O, Ibañez L, García-Samaniego J, Albillos A, Francés R, Fernández-Rodríguez C, Diago M, Soriano G, Andrade RJ, Latorre R, Jorquera F, Morillas RM, Escudero D, Estévez P, Guerra MH, Agustín S, Banales JM, Aspichueta P, Benlloch S, Rosales JM, Salmerón J, Turnes J, Romero Gómez M. HEPAmet Registry. Significant fibrosis predicts new-onset diabetes mellitus and arterial hypertension in patients with NASH. *J Hepatol* 73(1): 17-25, 2020.
  56. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Zoppini G, Zenari L, Cigolini M, Falezza G, Arcaro G. Relations between carotid artery wall thickness and liver histology in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Care* 29(6): 1325-1330, 2006.
  57. Petta S, Argano C, Colomba D, Cammà C, Di Marco V, Cabibi D, Tuttolomondo A, Marchesini G, Pinto A, Licata G, Craxi A. Epicardial fat, cardiac geometry and cardiac function in patients with non-alcoholic fatty liver disease: association with the severity of liver disease. *J Hepatol* 62(4): 928-933, 2015.
  58. Petta S, Tuttolomondo A, Gagliardo C, Zafonte R, Brancatelli G, Cabibi D, Cammà C, Di Marco V, Galvano L, La Tona G, Licata A, Magliozzo F, Maida C, Marchesini G, Merlino G, Midiri M, Parrinello G, Torres D, Pinto A, Craxi A. The Presence of White Matter Lesions Is Associated With the Fibrosis Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Medicine (Baltimore)* 95(16): e3446, 2016.
  59. Sinn DH, Kang D, Chang Y, Ryu S, Gu S, Kim H, Seong D, Cho SJ, Yi BK, Park HD, Paik SW, Song YB, Lazo M, Lima JA, Guallar E, Cho J, Gwak GY. Non-alcoholic fatty liver disease and progression of coronary artery calcium score: a retrospective cohort study. *Gut* 66(2): 323-329, 2017.
  60. Targher G, Day CP, Bonora E. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 363(14): 1341-1350, 2010.
  61. Tripodi A, Fracanzani AL, Primignani M, Chantarangkul V, Clerici M, Mannucci PM, Peyvandi F, Bertelli C, Valenti L, Fargion S. Procoagulant imbalance in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 61(1): 148-154, 2014.
  62. Dongiovanni P, Petta S, Maglio C, Fracanzani AL, Pipitone R, Mozzi E, Motta BM, Kaminska D, Rametta R, Grimaudo S, Pelusi S, Montalcini T, Alisi A, Maggioni M, Kärjä V, Borén J, Käkälä P, Di Marco V, Xing C, Nobili V, Dallapiccola B, Craxi A, Pihlajamäki J, Fargion S, Sjöström L, Carlsson LM, Romeo S, Valenti L. Transmembrane 6 superfamily member 2 gene variant disentangles nonalcoholic steatohepatitis from cardiovascular disease. *Hepatology* 61(2): 506-514, 2015.
  63. Balp MM, Krieger N, Przybysz R, Way N, Cai J, Zappe D, McKenna SJ, Wall G, Janssens N, Tapper E. The burden of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) among patients from Europe: A real-world patient-reported outcomes study. *JHEP Rep* 1(3): 154-161, 2019.
  64. Younossi ZM, Stepanova M, Anstee QM, Lawitz EJ, Wai-Sun Wong V, Romero-Gomez M, Kersey K, Li G, Subramanian GM, Myers RP, Djedjios CS, Okanoue T, Trauner M, Goodman Z, Harrison SA. Reduced Patient-Reported Outcome Scores Associate With Level of Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 17(12): 2552-2560.e10, 2019.
  65. Lazarus JV, Ekstedt M, Marchesini G, Mullen J, Novak K, Pericàs JM, Roel E, Romero-Gómez M, Ratziu V, Tacke F, Cortez-Pinto H, Anstee QM. EASL International Liver Foundation NAFLD Policy Review Collaborators. A cross-sectional study of the public health response to non-alcoholic fatty liver disease in Europe. *J Hepatol* 72(1): 14-24, 2020.

# Ruolo dei farmaci antidiabete nel trattamento della NAFLD

Alessandro Mantovani

Sezione di Endocrinologia, Diabetologia e Malattie del Metabolismo,  
Dipartimento di Medicina, Università ed Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2102b>

## INTRODUZIONE

La steatosi epatica non alcolica, nota con l'acronimo inglese NAFLD (*Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*), è attualmente l'epatopatia cronica di più frequente riscontro nella pratica clinica in molti paesi occidentali, dal momento che colpisce più del 30% degli adulti nella popolazione generale (1), circa il 70% dei pazienti affetti da diabete di tipo 2 (T2DM) (2), quasi il 40% dei pazienti con diabete di tipo 1 (T1DM) (3) e praticamente tutti i soggetti obesi (4). Dal punto di vista istopatologico, la NAFLD comprende uno spettro di condizioni che vanno dalla steatosi semplice (NAFL, *Nonalcoholic Fatty Liver*), alla steatoepatite non alcolica (NASH, *Nonalcoholic Steatohepatitis*), alla fibrosi epatica avanzata e, infine, alla cirrosi (5-6). La NAFLD si associa frequentemente a sovrappeso/obesità, diabete mellito (soprattutto T2DM) ed aumentata resistenza all'insulina (7-8); condizioni che svolgono un ruolo chiave nella sua eziopatogenesi, così come nello sviluppo delle sue complicanze epatiche ed extra-epatiche (7-12). Sulla base di ciò, nel 2020, numerosi esperti ed alcune società scientifiche (13-15), anche se non tutte (16-17), hanno proposto un cambiamento della nomenclatura e della definizione della steatosi epatica, suggerendo di passare dal termine NAFLD a quello MAFLD (*Metabolic Associated Fatty Liver Disease*). Nello specifico la diagnosi di MAFLD può essere fatta dal riscontro di steatosi epatica ed almeno uno dei seguenti criteri: (a) sovrappeso o obesità, (b) T2DM e (c) disfunzione

metabolica (almeno 2 dei seguenti fattori: circonferenza vita aumentata, ipertrigliceridemia, bassi livelli sierici di colesterolo HDL, ipertensione arteriosa, alterata glicemia a digiuno, insulino-resistenza, infiammazione cronica) (13). In questa rassegna, tuttavia, dal momento che è ancora in corso la discussione su quale termine utilizzare, si è ritenuto opportuno mantenere l'uso del termine NAFLD.

Nonostante una maggiore comprensione dei principali meccanismi fisiopatologici implicati nello sviluppo e nella progressione della NAFLD e delle sue complicanze,

## FAD ECM "il Diabete"

Questa rassegna fa parte di un percorso di **formazione a distanza** accreditato a livello nazionale e disponibile gratuitamente nell'aula virtuale della SID ([www.fad.siditalia.it](http://www.fad.siditalia.it)).

Per partecipare al corso occorre:

1. Leggere la rassegna (disponibile on-line)
2. Registrarsi all'aula e iscriversi al corso "il Diabete"
3. Rispondere on-line al quiz di verifica e compilare il questionario di valutazione dell'evento FAD.

Una volta eseguito con successo il test di valutazione e compilato il questionario di valutazione dell'evento, sarà cura della Segreteria ECM della SID far pervenire l'attestato ECM del corso ai diretti interessati nei tempi e nelle modalità stabiliti dalla regolamentazione vigente.

Per ulteriori informazioni: [www.fad.siditalia.it](http://www.fad.siditalia.it)

attualmente non esistono trattamenti farmacologici specifici per questa malattia epatica (18). La gestione della NAFLD si basa, pertanto, sui seguenti obiettivi: (i) perdita di peso attraverso la dieta (ipocalorica) e l'esercizio fisico, (ii) controllo dei principali fattori di rischio cardio-metabolici, e (iii) prevenzione delle complicanze epatiche ed extraepatiche (18-20). Ipoteticamente, la terapia ottimale per la NAFLD dovrebbe essere in grado di ridurre l'infiammazione di grasso epatico, la necro-infiammazione e la fibrosi, con l'obiettivo di prevenire le complicanze epatiche (18-20). Inoltre, un'ipotetica terapia dovrebbe anche essere in grado di migliorare il *background* metabolico, al fine di prevenire il T2DM, le malattie cardiovascolari ed i tumori extra-epatici (18-20). È ragionevole pensare che un singolo agente (o un unico approccio) non sia in grado di raggiungere tutti questi obiettivi. Pertanto, oggi, vengono studiati diversi approcci terapeutici combinati, inclusi gli ipoglicemizzanti (18).

Scopo di questa rassegna è quello di discutere le attuali evidenze sul ruolo degli ipoglicemizzanti (orali e non) nel trattamento della NAFLD e delle sue forme avanzate nei pazienti con e senza T2DM. La tabella 1 riassume schematicamente tali evidenze.

## DIETA ED ESERCIZIO FISICO

Prima di addentrarci nel ruolo specifico dei farmaci ipoglicemizzanti nel trattamento della NAFLD/NASH, vale la pena spendere due parole sul ruolo della dieta e dell'esercizio fisico, dal momento che una grande mole di dati supporta il ruolo delle modifiche dello stile di vita come approccio iniziale per la gestione ed il trattamento della NAFLD (5-6, 19-21). A questo proposito, è importante ricordare il fatto che è stato ampiamente dimostrato come la perdita di peso è in grado di far regredire la NAFLD/NASH, oltre che a ridurre il rischio cardiovascolare e quello di sviluppare T2DM (22). Nello specifico, una riduzione del peso superiore o uguale al 10% può contribuire a far regredire la NASH e la fibrosi epatica (22). Una perdita di peso compresa tra il 5% ed il 10%, invece, ha effetti positivi sui vari componenti del NAFLD *Activity Score* (NAS) (uno score istologico che rappresenta la somma degli scores per la fibrosi, l'infiammazione lobulare ed il ballooning [presenza di epatociti rigonfi caratterizzati da un citoplasma chiaro e rarefatto e da un nucleo ipercromatico]) (22). Per tale ragione, le linee guida europee delle società scientifiche

EASL-EASD-EASO (*European Association for the Study of the Liver-European Association for the Study of Diabetes-European Association for the Study of Obesity*) e quelle americane dell'AASLD (*American Association for the Study of Liver Diseases*) raccomandano, come obiettivo principale, una perdita di peso compresa tra il 5% ed il 10% in tutti i pazienti con NAFLD, che sono anche obesi o in sovrappeso (5-6). Raccomandazioni del tutto simili vengono fornite anche dalle linee guida inglesi NICE (*National Institute for Health and Care Excellence*) (21) (Tab. 2). L'effetto della perdita di peso sui vari componenti istologici della NAFLD sembra essere in relazione all'entità della riduzione del peso più che al modo in cui esso viene raggiunto (22).

Tutti i pazienti con NAFLD, indipendentemente dalla presenza di T2DM, dovrebbero evitare il consumo di alcol (anche moderato) e, quando possibile, l'uso di farmaci epatotossici (5-6, 21). Andrebbe evitato anche il fumo di sigaretta (5-6, 21) ed il consumo di bevande e/o cibi contenenti grandi quantità di fruttosio (5-6, 21).

Negli ultimi due decenni, nei pazienti con NAFLD, sono state studiate diverse tipologie di diete ipocaloriche (22-23). Studi osservazionali, così come alcuni piccoli RCTs, hanno documentato che la dieta mediterranea ha importanti effetti positivi nei pazienti con NAFLD, dal momento che è in grado, da sola, di ridurre il contenuto di grasso epatico e migliorare il profilo metabolico (23-25). Per tale ragione, attualmente, la dieta mediterranea è il modello dietetico maggiormente raccomandato nei pazienti con NAFLD da parte delle principali linee guida internazionali (5). In sintesi, la dieta mediterranea è caratterizzata da un elevato apporto di verdure, legumi, cereali integrali, olio d'oliva (come fonte principale di grassi aggiunti), pesce, frutti di mare, noci e frutta, oltre che ad un basso apporto di carne rossa e dolci (26). Rispetto alle diete a basso contenuto di grassi, che normalmente contengono fino al 30% di grassi, nella dieta mediterranea il 40% delle calorie proviene dai grassi, in particolare i grassi monoinsaturi e polinsaturi (26). Inoltre, è stato chiaramente documentato che la dieta mediterranea è in grado di ridurre anche il rischio di malattie cardiovascolari (27) e quello di sviluppare T2DM (28); due condizioni comunemente osservate nei pazienti con NAFLD (8). Per contro, il consumo di bevande zuccherate, fruttosio, carne rossa e acidi grassi saturi ha effetti deleteri per lo sviluppo e la progressione della NAFLD (23). In un piccolo RCT, che ha arruolato 12 pazienti non diabetici con NAFLD, diagnosticata median-

**Tabella 1** ♦ **Caratteristiche dei farmaci ipoglicemizzanti che sono stati studiati per il trattamento della NAFLD**

FARMACI IPO-GLICEMIZZANTI	MECCANISMI D'AZIONE	STUDI PRINCIPALI	ENDPOINT PRIMARIO	PRINCIPALI EFFETTI COLLATERALI	COMMENTO
Metformina	- Attivazione della AMPK e delle pathways correlate - Modulazione del bilancio energetico cellulare - Modulazione dello stato <i>redox</i> delle cellule - Gluconeogenesi	- TONIC trial	- Minimi effetti positivi sulla steatosi epatica e sull'infiammazione - Nessun effetto sulla fibrosi epatica e sulla risoluzione della NASH	Acidosi lattica, diarrea, nausea, vomito, flatulenza, carenza di vitamina B12 (uso a lungo termine)	- Non raccomandato per il trattamento della NAFLD dalla maggior parte delle linee guida - Potenziale effetto protettivo sul rischio di cirrosi ed epatocarcinoma
Pioglitazone	- Agonista del PPAR-gamma	- PIVENS trial	- Miglioramento del NAFLD <i>activity score</i> senza peggioramento della fibrosi - Miglioramento della fibrosi epatica	Aumento di peso (solitamente 2-4% del peso corporeo), ritenzione di liquidi, fratture ossee (soprattutto nelle donne), cancro della vescica (dati non consistenti)	- Le principali linee guida internazionali raccomandano l'uso del pioglitazone nei pazienti con NASH (documentata alla biopsia) con o senza T2DM - Questo agente non è ancora stato approvato dalla maggior parte delle agenzie del farmaco per il trattamento al di fuori del T2DM - L'uso <i>off-label</i> richiede quindi il consenso del paziente - Benefici cardiovascolari nei pazienti con T2DM o prediabete
Agonisti del recettore del GLP-1 (soprattutto liraglutide e semaglutide)	- Agonisti del recettore del GLP-1	- LEAN trial - LEAD study - LEAD-2 study - Meta-analisi	- Risoluzione della NASH - Miglioramento della steatosi epatica e del ballooning - Nessun effetto sulla fibrosi epatica	Perdita di appetito, nausea, costipazione, diarrea	- Dati ancora poco consistenti per considerare questi farmaci nei pazienti con NASH - Benefici cardio-renali rilevanti nei pazienti con T2DM
Inibitori SGLT-2 (dapagliflozin, empagliflozin, canagliflozin, ipragliflozin)	- Inibizione di SGLT-2 che è altamente espresso sulle cellule epiteliali renali localizzate nel segmento S1 del tubulo contorto prossimale	- Meta-analisi	- Riduzione dei livelli delle transaminasi - Miglioramento del contenuto di grasso epatico	Infezioni genito-urinarie, chetoacidosi, ipotensione	- Dati ancora poco consistenti per considerare questi farmaci nei pazienti con NASH - Non sono disponibili studi con endpoint istologici - Benefici cardio-renali rilevanti nei pazienti con e senza T2DM

*Abbreviazioni:* AMPK, activated protein kinase; GLP-1, glucagon-like peptide 1; LEAD, Liraglutide effect and action in diabetes; LEAN, Liraglutide Efficacy and Action in NASH; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; PIVENS, Pioglitazone vs vitamin E vs placebo for the treatment of non-diabetic patients with non-alcoholic steatohepatitis; SGLT-2, cotrasportatore 2 di sodio-glucosio; T2DM, diabete di tipo 2; TONIC, Treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children.

*Nota:* considerati i dati poco promettenti degli inibitori del DPP-IV nel trattamento della NAFLD, questa classe di farmaci ipoglicemizzanti non è stata inclusa nella tabella, mentre è stata discussa nel testo

te biopsia epatica, randomizzati alla dieta mediterranea o ad una dieta a basso contenuto di grassi e carboidrati, Ryan et al. hanno dimostrato che, dopo un follow-up di 6 settimane, la dieta mediterranea era in grado di determinare una maggiore riduzione del contenuto di grasso epatico (-39% vs -7%, misurato attraverso la spettroscopia in risonanza magnetica,  $p < 0,05$ ) (29). Risultati simili sono stati riportati anche nei pazienti con T2DM (30). In un piccolo trial randomizzato, ad esempio, che ha incluso 45 pazienti con T2DM randomizzati ad una dieta ad alto contenuto di carboidrati/fibre o ad una dieta ad alto contenuto di acidi grassi monoinsaturi, per un totale di otto settimane, Bozzetto et al. hanno dimostrato che il contenuto di grasso epatico, misurato attraverso la spettroscopia in risonanza magnetica, diminuiva significativamente nei soggetti trattati con la dieta ad alto contenuto di acidi grassi monoinsaturi, rispetto a quelli trattati con la dieta ad alto contenuto di carboidrati/fibre (-29% vs -4%,  $p < 0,05$ , rispettivamente) (30). Recentemente, in un altro trial che ha incluso 51 pazienti obesi con NAFLD, che sono stati randomizzati alla dieta mediterranea isocalorica *ad libitum* o ad una dieta a basso contenuto di grassi, Properzi et al. hanno documentato che la steatosi epatica (valutata mediante la spettroscopia in risonanza magnetica) migliorava in entrambi i gruppi, senza differenze significative in termini di riduzione della percentuale media del contenuto di grasso epatico (31). I potenziali meccanismi molecolari che stanno alla base degli effetti favorevoli della dieta mediterranea sulla NAFLD/NASH includono la presenza di polifenoli, carotenoidi, acido oleico, acidi grassi polinsaturi e fibre (25). Benché ci siano molti dati a sostegno degli effetti positivi della dieta mediterranea nel trattamento della NAFLD, un problema potrebbe essere quello dell'aderenza da parte del paziente (32). A tale proposito, è importante notare il fatto che la dieta mediterranea non è la dieta tipica di ogni paese o popolazione (25). Alcuni autori hanno, quindi, proposto un atteggiamento "wise choices" attraverso cui il singolo paziente compie la migliore scelta dietetica possibile, cercando di mantenere almeno alcuni dei principi nutrizionali che caratterizzano la dieta mediterranea (25). Dato che ogni componente della dieta mediterranea ha un effetto positivo sulla NAFLD, questo atteggiamento potrebbe essere un compromesso accettabile nella comune pratica clinica (25). Diversi tipi di esercizio fisico (ad esempio, esercizio fisico aerobico, esercizio contro resistenza, esercizio intermit-

tente ad alta intensità) sembrano avere effetti del tutto simili sul contenuto di grasso epatico (33-34). Tuttavia, è interessante notare il fatto che nello studio di Oh et al. l'esercizio intermittente ad alta intensità era in grado di migliorare anche la funzione delle cellule di Kupffer (35), che sono implicate nei processi di fibrogenesi.

Recentemente, in un RCTs che ha incluso 220 pazienti obesi con NAFLD, randomizzati all'esercizio fisico intenso, all'esercizio fisico moderato o a nessun esercizio (controlli), Zhang et al. hanno documentato che, dopo 12 mesi di follow-up, il contenuto di grasso epatico (valutato mediante la spettroscopia in risonanza magnetica) era significativamente ridotto nei 2 gruppi di pazienti randomizzati all'esercizio fisico, rispetto ai controlli (36). Tuttavia, se i pazienti smettevano di essere fisicamente attivi, i benefici ottenuti venivano persi (22).

Il *background* genetico (ad esempio, il polimorfismo rs738409 del gene *PNPLA3* [patatin like phospholipase domain containing 3], che è la variante genetica maggiormente associata alla NAFLD ed alle sue complicanze epatiche) potrebbe influenzare la risposta all'attività fisica nei pazienti con NAFLD. Alcuni studi suggeriscono, ad esempio, che i pazienti con NAFLD e genotipo G/G del polimorfismo rs738409 del gene *PNPLA3* potrebbero rispondere meglio all'esercizio fisico, rispetto a quelli con genotipo C/C o C/G (22, 37). Inoltre, la percentuale di soggetti che va incontro ad una risoluzione della NASH e/o alla regressione della fibrosi dopo l'esercizio fisico potrebbe essere modesta in alcune categorie di pazienti, come quelli con più di 65 anni, i diabetici o quelli che hanno un *NAFLD activity score* >5 (22).

I meccanismi fisiopatologici che stanno alla base della regressione della NAFLD a seguito dell'esercizio fisico potrebbero essere i seguenti: (i) miglioramento del bilancio energetico, (ii) miglioramento della sensibilità insulinica e (iii) riduzione dei livelli dei lipidi in circolo (22, 38). L'esercizio fisico migliora, infatti, sia la sensibilità insulinica epatica che quella sistemica, determinando, a sua volta, un miglioramento dell'azione dell'insulina nei tessuti periferici e riducendo la lipogenesi *de novo* (22, 38). L'esercizio fisico ha anche effetti diretti sul controllo della glicemia e sul flusso dei lipidi a livello epatico (22, 38). Inoltre, l'esercizio fisico promuove anche la riduzione del tessuto adiposo viscerale (22, 38). Il grasso viscerale è direttamente coinvolto nell'infiammazione e nella fibrosi epatica (22, 38). Infine, dato che i pazienti con NAFLD sono a maggior

rischio di sviluppare complicanze cardiovascolari, è importante ricordare che gli effetti benefici dell'esercizio sono estesi a tutto il sistema cardiovascolare (39).

## METFORMINA

Come è noto, la metformina è una biguanide ampiamente utilizzata nei pazienti con T2DM ed, ancora oggi, viene raccomandata come terapia di prima linea (40). La metformina è considerata sicura ed efficace (con una riduzione dei livelli di HbA1c di almeno 1%) nei pazienti con T2DM in assenza di specifiche controindicazioni (ad esempio, malattia renale cronica in stadio 4-5, scompenso cardiaco avanzato, malattia polmonare avanzata e storia di acidosi lattica) (40). La metformina riduce i livelli di glucosio nel sangue mediante pathways che attivano la AMPK (5' AMP-activated protein kinase), così da migliorare il metabolismo epatico del glucosio e promuovere il riassorbimento del glucosio da parte delle cellule muscolari (18, 20). Altri meccanismi che potrebbero spiegare l'azione ipoglicemizzante della metformina sono: la modulazione dello stato redox nelle cellule attraverso l'inibizione diretta del glicerolo-3-fosfato deidrogenasi nei mitocondri e la modificazione della carica energetica cellulare (18, 20). La metformina può anche ridurre il rischio di eventi cardiovascolari fatali e non fatali nei pazienti con T2DM, che sono in sovrappeso o obesi (40-41).

Diversi RCTs hanno testato il ruolo della metformina nel trattamento della NAFLD nei pazienti con e senza T2DM (42). Complessivamente, se consideriamo tutti i RCTs in cui erano disponibili dati di istologia epatica, emerge che, nonostante gli effetti positivi della metformina sulle transaminasi, sull'HbA1c e su altri parametri metabolici, essa ha una minima efficacia sulla steatosi epatica e nessun effetto sulla NASH e sulla fibrosi (42). Addirittura, nello studio *Treatment of NAFLD in Children* (TONIC), che ha incluso bambini e adolescenti obesi con diagnosi istologica di NASH, la metformina ha mostrato un effetto neutro (43). Benché la metformina sia generalmente ben tollerata (come accennato sopra), i sintomi gastrointestinali (quali diarrea, gonfiore, e dolore addominale) possono verificarsi in circa un quinto dei pazienti (con T2DM) (40). L'uso a lungo termine della metformina è stato inoltre associato ad una carenza di vitamina B12, nonché al peggioramento della neuropatia periferica (40). Al momento, le linee guida EASL-EASD-EASO (5) e quelle AASLD (6) per

la gestione ed il trattamento della NAFLD non raccomandano l'uso della metformina nei pazienti con NAFLD. Le linee guida NICE (21) sono in linea con quelle europee (5) ed americane (6).

Ciò detto, è importante sottolineare il fatto che i possibili vantaggi della metformina nel contesto della malattia epatica cronica, indipendentemente dall'eziologia, potrebbero essere dovuti al suo potenziale effetto benefico nel ridurre il rischio di cirrosi e/o epatocarcinoma (18, 44). A questo proposito, vale la pena ricordare che alcuni studi osservazionali, così come alcune meta-analisi, hanno documentato l'esistenza di un'associazione indipendente tra il trattamento con metformina e la riduzione dell'incidenza di epatocarcinoma nei i pazienti con T2DM e malattia epatica cronica (45-48). Ad esempio, in uno studio retrospettivo, che ha coinvolto 191 pazienti con T2DM e NAFLD (età media 57 anni; percentuale di soggetti di sesso femminile 58%; BMI medio 35 kg/m<sup>2</sup>; durata media del diabete 9 anni), diagnosticata mediante biopsia epatica, Vilar-Gomez et al. hanno documentato che l'utilizzo della metformina era associato ad un ridotto rischio di mortalità totale e ad un ridotto rischio di sviluppare epatocarcinoma, durante un follow-up medio di quasi 7 anni (46). In una meta-analisi pubblicata l'anno scorso, che ha incluso 6 studi osservazionali per un totale di circa 14.000 pazienti con epatocarcinoma, Zhou et al. hanno dimostrato che il trattamento con metformina, rispetto a quello con altri ipoglicemizzanti, si associava ad una migliore sopravvivenza (47). Dal punto di vista sperimentale, la metformina potrebbe inibire lo sviluppo del cancro e delle metastasi attraverso l'attivazione di AMPK, EMT (Epithelial-mesenchymal transition) ed alcune modifiche epigenetiche (18, 44, 49). Tuttavia, benché le evidenze descritte indichino che l'utilizzo della metformina si associa ad un ridotto rischio di sviluppare l'epatocarcinoma, così come ad un miglioramento della prognosi nei pazienti con neoplasia, è fondamentale sottolineare il fatto che sono necessari trial clinici controllati randomizzati specifici per corroborare questi risultati (18, 44).

## AGONISTI PPAR GAMMA (CHIAMATI ANCHE GLITAZONI O TIAZOLIDINDIONI)

Il rosiglitazone ed il pioglitazone (che è, attualmente, il solo tiazolidindione disponibile sul mercato) sono degli agonisti selettivi del recettore PPAR- $\gamma$  (peroxisome pro-

liferator-activated receptor-gamma) (18, 50). In breve, i PPARs, costituiti da 3 differenti isotipi ( $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  and  $\gamma$ ), sono dei recettori nucleari in grado di modulare selettivamente diversi elementi chiave implicati nel metabolismo del glucosio e dei lipidi (18, 50). I PPARs sono espressi nel tessuto adiposo, ma anche nelle cellule beta del pancreas, nell'endotelio, nei macrofagi e, in misura minore, nel muscolo scheletrico, nel cuore, nel fegato, nella milza, nell'intestino e nel surrene (18, 50). I PPARs sono in grado di modulare anche alcuni meccanismi implicati nell'attivazione delle cellule infiammatorie e dei processi fibrotici (18, 41, 50).

Considerate le tre isoforme dell'isotipo PPAR- $\gamma$ , l'isoforma 2 è particolarmente espressa nel tessuto adiposo, svolge un ruolo chiave nella redistribuzione del tessuto adiposo intra-addominale e sottocutaneo e favorisce l'accumulo di trigliceridi nei depositi periferici di tessuto adiposo (18, 41, 50). Questa isoforma è anche espressa nelle cellule di Kupffer, che sono le cellule maggiormente coinvolte nei processi di fibrosi a livello epatico. Sperimentalmente, nella cirrosi, l'attivazione del recettore PPAR- $\gamma$  è in grado di ridurre la pressione portale, l'infiammazione, l'angiogenesi e gli shunt porto-sistemici (18, 41, 50). Sulla base di questi dati (18, 41, 50), non sorprende pertanto il fatto che nell'ultimo decennio sono stati condotti numerosi trials (51-55), con lo scopo di testare gli effetti benefici dei tiazolidindioni nei pazienti con NAFLD/NASH. Una recente revisione sistematica, condotta dal nostro gruppo di ricerca, ha dimostrato come l'uso del pioglitazone nei pazienti con NASH è in grado di determinare importanti benefici sulla funzionalità epatica, sul contenuto di grasso epatico e sulla risoluzione della NASH (42). Per contro, l'effetto del pioglitazone sulla fibrosi epatica sembra essere modesto (42). In un RCT che ha incluso 101 pazienti diabetici di tipo 2 con NASH, randomizzati alla terapia con pioglitazone (45 mg una volta al giorno) o a placebo per un totale di 18 mesi, Cusi et al. hanno documentato che quasi il 60% dei pazienti trattati con pioglitazone aveva raggiunto l'endpoint primario, definito dalla riduzione di almeno 2 punti del NAFLD activity score in assenza di un peggioramento della fibrosi, e quasi il 50% di loro aveva raggiunto la risoluzione della NASH (53). In una meta-analisi pubblicata nel 2017, che ha incluso 8 RCT per un totale di quasi 500 pazienti adulti con NASH, Musso et al. hanno documentato che il pioglitazone migliorava la fibrosi avanzata nei pazienti con NASH, indipendentemente dalla pre-

senza di T2DM, dopo un periodo di follow-up di 24 mesi (56). I dati relativi al rosiglitazone sono invece limitati, anche perché è stato ritirato dal commercio a causa di un presunto aumento del rischio cardiovascolare. Lo studio FLIRT (*Fatty Liver Improvement with Rosiglitazone Therapy*) ha documentato che la steatosi epatica migliorava significativamente nei pazienti trattati con rosiglitazone, rispetto a quelli con placebo (47% vs 16%, rispettivamente;  $p < 0,05$ ) (55). Per contro, non si sono osservati cambiamenti significativi sulla fibrosi epatica tra i 2 gruppi (55).

Sulla base di questi dati, le linee guida EASL-EASO-EASD (5), AASLD (6) e NICE (21) per la gestione della NAFLD raccomandano l'uso del pioglitazone nei pazienti con NASH, soprattutto se affetti anche da T2DM (Tab. 2). Tuttavia, è importante sottolineare il fatto che il pioglitazone non è ancora stato ufficialmente approvato dalla maggior parte delle principali agenzie del farmaco all'utilizzo del trattamento al di fuori del T2DM. Pertanto, attualmente, l'uso del pioglitazone nei pazienti con NAFLD/NASH senza T2DM è *off-label* e richiede il consenso da parte del paziente (18, 41). Le preoccupazioni riguardanti l'aumento di peso (in particolare, è stato segnalato un aumento del peso corporeo intorno al 2-4% dopo 6-36 mesi di terapia con pioglitazone nella maggior parte degli RCTs), la ritenzione di liquidi ed il rischio di fratture ossee (soprattutto nelle donne) sembrerebbe limitare l'uso di questa molecola nei pazienti con NAFLD. È importante sottolineare anche il fatto che il pioglitazone esercita importanti benefici sul sistema cardiovascolare, diminuendo il rischio di infarto del miocardio e quello di ictus cerebri nei pazienti con T2DM o prediabete (57-58). Dato che i pazienti con NAFLD sono a maggior rischio di sviluppare complicanze cardiovascolari fatali e non fatali (59), indipendentemente dalla presenza di T2DM, l'utilizzo del pioglitazone in questi pazienti potrebbe, pertanto, avere importanti benefici extra-epatici (18). È interessante notare il fatto che, ad oggi, esistono evidenze che suggeriscono come alcuni specifici polimorfismi genetici siano in grado di favorire (o meno) la risposta al trattamento con pioglitazone nei pazienti con NAFLD. Per esempio, in un piccolo studio pilota condotto su 55 pazienti giapponesi appartenenti ad un RCT inizialmente disegnato per valutare l'efficacia del trattamento con pioglitazone a lungo termine nei pazienti con NASH (NCT00994682), Kawaguchi-Suzuki et al. hanno documentato che nei pazienti trattati con pioglitazone il polimorfismo rs903361 del gene ADORA1 (che codifica per il

recettore A<sub>1</sub> dell'adenosina) si associava alla risoluzione della NASH ed al miglioramento del *ballooning* (60).

Sono in fase di studio diverse molecole in grado di legarsi agli altri isotipi del recettore PPAR (18, 50). A questo proposito, è importante ricordare che, sperimentalmente, l'isotipo PPAR- $\alpha$  è in grado di promuovere l'ossidazione degli acidi grassi, mentre l'isotipo PPAR- $\delta$  esercita importanti effetti anti-infiammatori (50). Elafibrinor è un duplice agonista PPAR- $\alpha/\delta$  che può, quindi, migliorare sia l'insulino resistenza che l'infiammazione cronica (50). In un trial di fase 2b condotto su 274 pazienti con NASH che sono stati randomizzati al trattamento con elafibrinor (120 mg una volta al giorno) o a placebo per un totale di 52 settimane, elafibrinor è risultato superiore (al placebo) nell'ottenere la risoluzione della NASH senza un peggioramento della fibrosi epatica (20% nel gruppo elafibrinor vs 11% nel gruppo placebo,  $p < 0,05$ ) (61). L'analisi post-hoc di questo studio, basata su una re-definizione della risoluzione della NASH, ha ulteriormente corroborato questi risultati (61). Per contro, l'analisi *ad interim* del trial di fase 3 chiamato RESOLVE-IT (NCT02704403), che ha incluso pazienti con NASH e diversi gradi di fibrosi randomizzati al trattamento con elafibrinor o a quello con placebo, non ha documentato il raggiungimento dell'endpoint primario, costituito dalla risoluzione della NASH senza il peggioramento della fibrosi. Di conseguenza, questo studio è stato interrotto anzitempo (50).

Modelli animali della NASH suggeriscono, inoltre, che il doppio agonista PPAR- $\alpha/\gamma$ , saroglitazar, potrebbe avere effetti positivi sul fegato (50). Una meta-analisi di 18 studi osservazionali (5 pubblicati e 13 abstracts) ha dimostrato che, nei pazienti con dislipidemia diabetica, saroglitazar (4 mg una volta al giorno per almeno 12 settimane) è in grado di ridurre le concentrazioni sieriche delle transaminasi e migliorare il profilo cardio-metabolico (62). Risultati incoraggianti riguardo all'efficacia di saroglitazar nei pazienti con NASH provengono anche da un'analisi preliminare di un trial di fase 2, chiamato EVIDENZE II (NCT03061721) (50)). Infine, alcuni studi clinici che sono attualmente in corso indicano che anche gli agonisti pan-PPAR potrebbero avere effetti positivi nei pazienti con NASH (50).

## AGONISTI DEL RECETTORE DEL GLP-1

Gli agonisti del recettore del GLP-1 (Glucagon-Like Peptide 1) sono una classe di farmaci ipoglicemizzanti in grado di promuovere la perdita di peso (in media 3-5 kg), migliorare l'insulino resistenza e ridurre la glicemia plasmatica (18, 40-41). Sperimentalmente, i recettori del GLP-1 sono stati localizzati negli epatociti e la loro attivazione è in grado di promuovere la risoluzione della steatosi epatica, migliorare l'insulino resistenza epatica, ma anche la lipotossicità e la funzione mitocondriale degli epatociti (18, 40-41). Per tale ragione, negli ultimi anni, gli agonisti del recettore del GLP-1 sono stati ampiamente studiati per il trattamento della NASH (18). In una recentissima meta-analisi che ha incluso 11 RCTs di fase 2, per un totale di quasi 950 soggetti adulti con NAFLD/NASH che sono stati randomizzati alla terapia con agonisti del recettore del GLP-1 (liraglutide, exenatide, dulaglutide o semaglutide) o a placebo o ad altre classi di ipoglicemizzanti, Mantovani et al. hanno documentato che il trattamento con gli agonisti del recettore del GLP-1, dopo un follow-up di 26 settimane, si associava ad una riduzione significativa della percentuale assoluta del contenuto di grasso epatico misurato attraverso la risonanza magnetica (*Weighted Mean Difference* [WMD]: -3,92%, intervallo di confidenza al 95%: da -6,27% al -1,56%;  $I^2 = 97%$ ) (Fig. 1), ad una riduzione significativa dei livelli sierici degli enzimi epatici (principalmente ALT), nonché alla risoluzione della NASH senza un peggioramento della fibrosi epatica (random-effects odds ratio: 4,06; intervallo di confidenza al 95%: da 2,52 a 6,55;  $I^2 = 0%$ ; dato disponibile solo per liraglutide e semaglutide) (63).

Nello specifico, la liraglutide (che è un agonista del recettore del GLP-1 a lunga durata d'azione) è stata studiata per il trattamento della NAFLD nel contesto del programma LEAD (*Liraglutide Effect and Action in Diabetes*), LEAD-2 (64), nonché nello studio LEAN (*Liraglutide Efficacy and Action in NASH*) (65). Questi studi hanno documentato che la liraglutide migliora significativamente i livelli sierici degli enzimi epatici, riduce il contenuto di grasso epatico, promuove la risoluzione della NASH (64-65), mentre non sembra avere un effetto rilevante sulla fibrosi epatica (65). È ragionevole pensare che gli effetti benefici della liraglutide (così come degli altri agonisti del recettore del GLP-1) sui livelli sierici degli enzimi epatici, sulla steato-

**Tabella 2** ◆ **Trattamento della NAFLD secondo le linee guida EASL-EASD-EASO (5), AASLD (6) e NICE (21)**

	DIETA	ESERCIZIO FISICO	FARMACI
Linee guida EASL-EASD-EASO (5)	Preferire diete che abbiano un deficit di 500-1000 Kcal/giorno con l'obiettivo di una perdita di peso intorno al 7-10%; limitare il consumo di alcol; preferire la dieta mediterranea	Esercizio fisico aerobico di intensità moderata o esercizio contro resistenza (150-200 min/settimana in 3-5 sessioni)	Preferire il pioglitazone
Linee guida AASLD (6)	Preferire diete che abbiano un deficit di 500-1000 Kcal/giorno; limitare il consumo di alcol	Esercizio fisico di intensità moderata (≥150 min/settimana)	Preferire il pioglitazone nei pazienti con T2DM; preferire la vitamina E* in quelli che non sono diabetici
Linee guida NICE (21)	Preferire diete che abbiano un deficit di 600 Kcal/giorno o quelle a basso contenuto di grassi; limitare il consumo di alcol	Almeno 45-60 min al giorno di esercizio fisico di tipo aerobico di intensità moderata	Preferire il pioglitazone nei pazienti con T2DM; preferire la vitamina E* in quelli che non sono diabetici, ma hanno una fibrosi epatica avanzata

*Abbreviazioni:* AASLD, American Association for the Study of Liver Diseases; EASL-EASD-EASO, European Association for the Study of the Liver - European Association for the Study of Diabetes - European Association for the Study of Obesity; NICE, National Institute for Health and Care Excellence.

*Nota:* \* la vitamina E è un potente anti-ossidante che può essere utilizzato nel trattamento della NASH in alcune categorie di pazienti. Dato il contesto specifico di questa rassegna, tale farmaco non è stato discusso. Per ulteriori informazioni si rimanda alle seguenti rassegne: Mantovani A, Dalbeni A. Treatments for NAFLD: State of Art. *Int J Mol Sci* 22(5):2350. doi: 10.3390/ijms22052350; Petroni ML, Brodosi L, Bugianesi E, Marchesini G. Management of non-alcoholic fatty liver disease. *BMJ*. 372:m4747. doi: 10.1136/bmj.m4747, 2021

si e sulla NASH siano dovuti alla perdita di peso ma anche all'effetto diretto sul fegato (42).

Gli studi sulla semaglutide (66) e sulla dulaglutide (67), che sono due recenti agonisti del recettore del GLP-1 a dosaggio settimanale, hanno prodotto risultati interessanti. In particolare, nel trial di fase 2 che ha incluso 320 pazienti con NASH e differenti gradi di fibrosi epatica, randomizzati a semaglutide alla dose di 0,1 mg/die (80 pazienti), 0,2 mg/die (78 pazienti) e 0,4 mg/die (82 pazienti) o a placebo (80 pazienti), per un totale di 72 settimane, Newsome et al. hanno documentato che la percentuale di pazienti in cui si è osservata la risoluzione completa della NASH, senza un peggioramento della fibrosi epatica, era del 40% nel gruppo trattato con semaglutide al dosaggio di 0,1 mg, 36% nel gruppo trattato con semaglutide al dosaggio di 0,2 mg, 59% nel gruppo trattato con semaglutide al dosaggio di 0,4 mg e solo 17% nel gruppo placebo ( $p < 0,05$ ) (66). Per contro, non si è assistito ad un miglioramento significativo della fibrosi epatica in nessun dei 4 gruppi ( $p = 0,48$ ) (66). È fondamentale sottolineare il fatto che, in questo RCT (66), i partecipanti sono stati trattati con dosaggi giornalieri di semaglutide. Questo è un aspetto molto importante da tenere presente, perché tali dosaggi non sono quelli attualmente approvati per il trattamento del T2DM. Pertanto, ad oggi, non è certo se

i risultati di questo trial (66) possono essere traslati nella pratica clinica quotidiana.

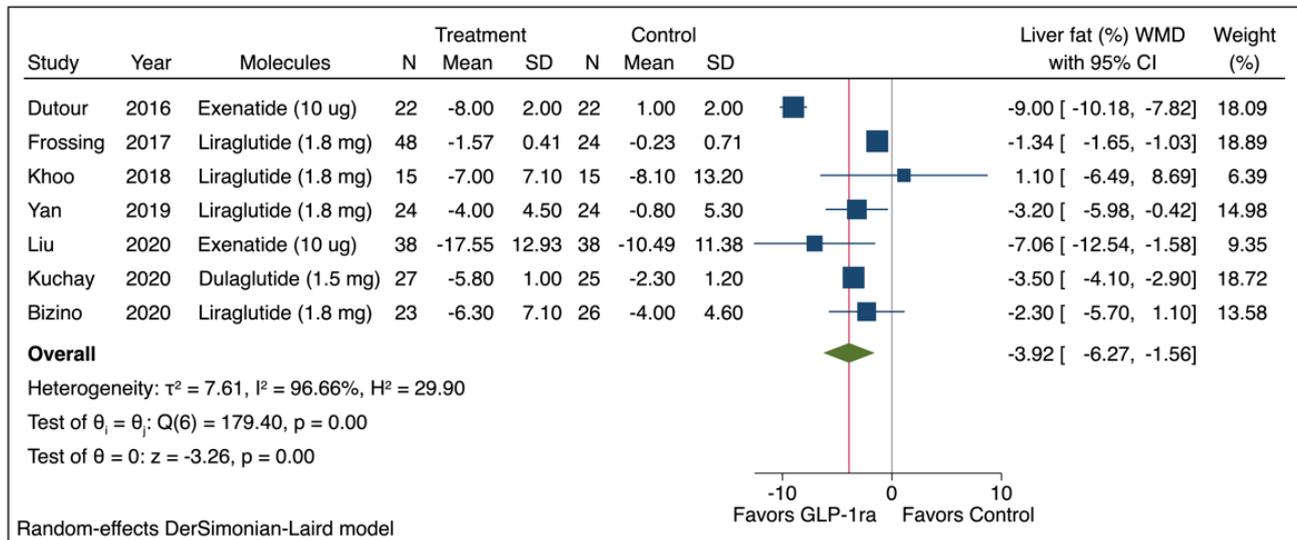
Gli agonisti del recettore del GLP-1 sono generalmente ben tollerati, anche se, rispetto al placebo o gli altri ipoglicemizzanti, si associano ad una maggiore frequenza di sintomi gastrointestinali, quali perdita di appetito, nausea, costipazione e diarrea (18, 42). Questi eventi avversi, tuttavia, sono transitori e generalmente di gravità da lieve a moderata (18, 42).

Infine, considerato il fatto che tutti gli agonisti del recettore del GLP-1 esercitano importanti effetti protettivi sul sistema cardiovascolare e renale sia nei pazienti con T2DM che in quelli senza (68-69), è ragionevole ipotizzare che questi farmaci diventeranno un'importante opzione terapeutica nei pazienti con NAFLD/NASH, specialmente per coloro che sono anche obesi o hanno T2DM (18).

#### INIBITORI DELLA DIPEPTIDIL-PEPTIDASI IV (GLIPTINE)

Gli inibitori della dipeptidil-peptidasi IV (DPP-IV), chiamati anche gliptine, sono una classe di ipoglicemizzanti orali che agiscono inibendo l'enzima DPP-IV, una proteasi capace di degradare rapidamente le incretine, inattivandole (40). Le incretine sono ormoni prodotti a livello

**Figura 1** ♦ Effetto dei diversi analoghi del recettore del GLP-1 sulla percentuale assoluta di grasso epatico, valutata mediante risonanza magnetica, rispetto al placebo o ad altri ipoglicemizzanti. I dati sono espressi come weighted mean difference (WMD). Da (63).

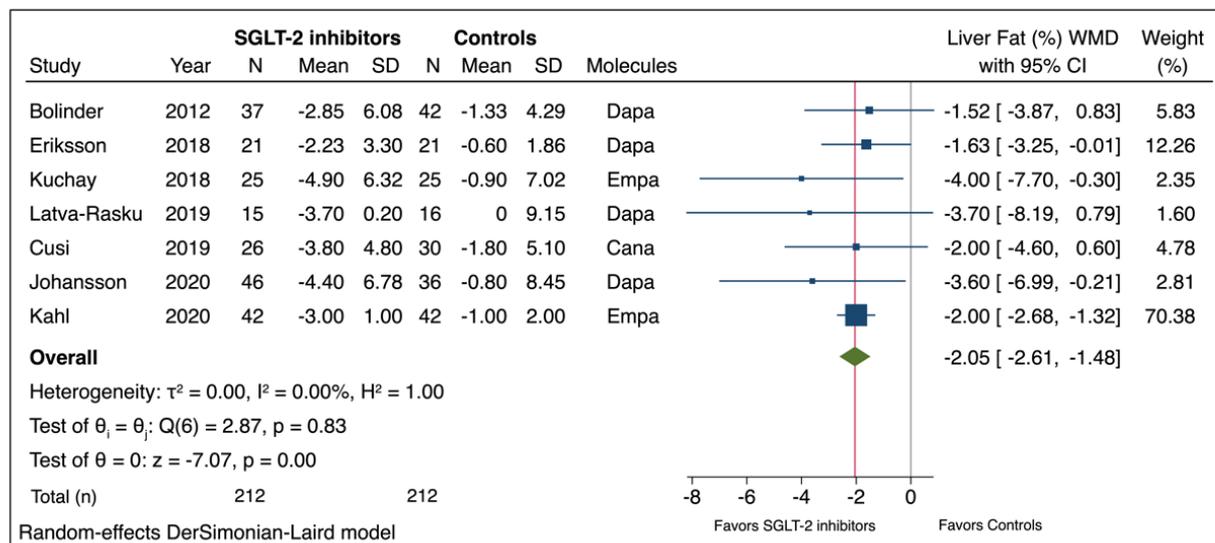


gastrointestinale (come ad esempio il GLP-1, prodotto dalle cellule L dell'ileo ed il GIP [*Gastric Inhibitory Peptide*], prodotto dalle cellule K del duodeno), che sono in grado di controllare la glicemia nel sangue attraverso l'aumento della secrezione di insulina da parte delle cellule beta del pancreas, la diminuzione della secrezione di glucagone inibendo le cellule alfa del pancreas, il rallentamento della motilità gastrica, la diminuzione dell'appetito ed il miglioramento della sensibilità insulinica attraverso diversi meccanismi (40). Va da sé che l'inibizione dell'enzima DPP-IV mediante questi farmaci permette di sfruttare l'azione favorevole delle incretine sulla glicemia e sulla resistenza insulinica (40). Ad oggi, esistono alcuni RCT e alcuni studi *open-label* (70-71) che hanno valutato l'efficacia degli inibitori della DPP-IV nei pazienti con NAFLD. Questi studi hanno evidenziato un effetto neutro di questa classe di farmaci sulla NAFLD e le sue forme avanzate (72). A questo proposito, ad esempio, una recente meta-analisi che ha incluso 7 trial per un totale di circa 270 pazienti con NAFLD ha documentato che il trattamento con sitagliptin non determinava una riduzione significativa del contenuto di grasso epatico, valutato attraverso varie tecniche radiologiche, rispetto alla terapia di controllo (73). Per tale motivo, questa classe di farmaci ipoglicemizzanti non viene attualmente considerata per il trattamento della NAFLD.

#### INIBITORI SGLT-2 (O GLIFLOZINE)

Gli inibitori del co-transportatore sodio-glucosio-2 (SGLT-2), chiamati anche gliflozine, sono una classe relativamente nuova di ipoglicemizzanti orali in grado di promuovere il riassorbimento del glucosio da parte dei reni (40). Il SGLT-2 è particolarmente espresso sulle cellule epiteliali renali localizzate nel segmento S<sub>1</sub> del tubulo contorto prossimale, promuovendo glicosuria (40). Di conseguenza, la regolazione del controllo della glicemia da parte di questi farmaci è indipendente alla secrezione di insulina (40). Studi sperimentali che hanno utilizzato modelli animali di NASH hanno suggerito un effetto favorevole degli inibitori SGLT-2 sulla steatosi epatica, la necro-infiammazione e la fibrosi, probabilmente attraverso il bilancio energetico negativo determinato dalla glicosuria (74). Per tale ragione, gli inibitori SGLT-2 sono stati studiati come possibile opzione terapeutica per la NAFLD/NASH in diversi RCTs ed in alcune analisi post-hoc. In una recente meta-analisi che ha incluso 12 RCTs che hanno valutato l'efficacia degli inibitori SGLT-2 (dapagliflozin, empagliflozin, ipragliflozin o canagliflozin) per trattare la NAFLD, Mantovani et al. hanno documentato che, rispetto al placebo o ad altri ipoglicemizzanti, il trattamento con gli inibitori SGLT-2, dopo un periodo di 24 settimane, si associava ad una maggiore riduzione dei

**Figura 2** ◆ Effetto delle diverse gliflozine sulla percentuale assoluta di grasso epatico, valutata mediante risonanza magnetica, rispetto al placebo o ad altri ipoglicemizzanti. I dati sono espressi come weighted mean difference (WMD). Da (75).



livelli sierici delle transaminasi e della percentuale assoluta di contenuto di grasso epatico valutato con la risonanza magnetica (*Weighted Mean Difference* [WMD]: -2,05%, intervallo di confidenza al 95% da -2,6 a -1,5%;  $I^2=0\%$ ) (Fig. 2) (75). Un'altra meta-analisi meno recente ha riportato risultati del tutto simili (76). Tuttavia, è importante sottolineare il fatto che la maggior parte degli RCTs pubblicati finora non ha utilizzato specifici *endpoint* istologici per valutare l'efficacia degli inibitori SGLT-2, rispetto al placebo o agli altri farmaci ipoglicemizzanti, nel trattamento della NAFLD/NASH (18). A questo proposito, recentemente, in un piccolo studio pilota che ha incluso 9 pazienti con NASH che sono stati trattati con empagliflozin 25 mg al giorno per un totale di 24 settimane e che avevano eseguito la biopsia epatica prima e dopo il trattamento, Lai et al. hanno documentato che empagliflozin era in grado di migliorare la steatosi, il *ballooning* ed addirittura la fibrosi (77).

Per quanto riguarda gli effetti avversi, negli RCTs pubblicati, gli inibitori del SGLT-2 hanno mostrato di avere un buon profilo di sicurezza ed una percentuale di eventi avversi simile al placebo (o agli ipoglicemizzanti), con l'eccezione di un rischio più elevato di avere infezioni genito-urinarie (42). Dato che gli inibitori SGLT-2 hanno documentato importanti benefici cardio-renali nei trials che hanno arruolato pazienti con e senza T2DM (78-79),

questi farmaci potrebbero avere un ruolo importante nel trattamento della NAFLD/NASH nel prossimo futuro.

## CONCLUSIONI

Nonostante l'aumento della nostra comprensione sull'epidemiologia e sulla patogenesi della NAFLD, attualmente l'unico trattamento veramente efficace per questa malattia è la perdita di peso, che deve essere almeno del 5% (18). Per quanto riguarda l'uso degli ipoglicemizzanti, che è il focus di questa rassegna, possiamo dire con relativa certezza che sia la pioglitazone che gli analoghi del recettore del GLP-1 sono utili nel trattamento della NAFLD, specialmente nei pazienti con T2DM, dal momento che sono in grado di ridurre il contenuto di grasso epatico, promuovere la risoluzione della NASH e migliorare la fibrosi epatica (questo però, al momento, vale solo per il pioglitazone). Anche le gliflozine sembrano essere promettenti, ma l'assenza di dati istologici come *endpoint* primario nei trials pubblicati impedisce di trarre conclusioni solide. Ciò detto, è importante sottolineare il fatto che, ad oggi, la maggior parte dei trials che hanno valutato l'efficacia di un singolo farmaco, rispetto al placebo, per il trattamento della NASH ha documentato percentuali di successo nel determinare una risoluzione della NASH, senza il peggioramento della fibrosi, comprese tra il 30%

ed il 50% (80). Considerata la complessità della patogenesi della NASH e la percentuale di soggetti che raggiunge l'endpoint primario nei trials che hanno testato un solo farmaco, è ragionevole pensare che la combinazione di più farmaci, in associazione ai cambiamenti dello stile di vita, sia la strategia più appropriata per trattare questa patologia (80). In linea teorica, tale strategia potrebbe aumentare la percentuale di risposta al trattamento e convertire i *non responder* (o i *responder* parziali) in *responder*. Ad oggi, sono in corso diversi studi sul trattamento della NASH che utilizzano due (o più) farmaci (80). Rimanendo sempre nell'ambito degli ipoglicemizzanti, ad esempio, la semaglutide in associazione con un agonista del recettore nucleare Farnesoide X (FXR), chiamato cilofexor, è attualmente in fase di studio in un trial di fase 2 che ha incluso pazienti con NASH (NCT03987074), mentre l'agonista del FXR, tropifexor, in combinazione con un inibitore SGLT-1/2, chiamato licoglifozin, è in fase di studio un trial di fase 2 che ha arruolato, per un totale di 48 settimane, pazienti con NASH e diversi gradi di fibrosi epatica (NCT04065841) (80).

Data l'eterogeneità dei pazienti con la NAFLD, è fondamentale identificare i soggetti che rispondono meglio ad uno specifico principio attivo (19, 80). L'identificazione dei polimorfismi genetici potrebbe fornire utili informazioni in questo senso (80). Come abbiamo visto, il polimorfismo rs903361 del gene *ADORA1* è stato associato ad una maggiore risposta al trattamento con pioglitazone nei pazienti con NASH. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi di farmacogenetica per migliorare la capacità ad identificare i pazienti con NAFLD in grado di rispondere meglio al trattamento con uno specifico principio attivo o con una strategia caratterizzata da più farmaci.

## BIBLIOGRAFIA

1. 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* 64(1): 73-84. Epub 2015/12/29. doi: 10.1002/hep.28431. PubMed PMID: 26707365, 2016.
2. Younossi ZM, Golabi P, de Avila L, Paik JM, Srishord M, Fukui N, et al. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 71(4): 793-801. Epub 2019/07/08. doi: 10.1016/j.jhep.2019.06.021. PubMed PMID: 31279902, 2019.
3. de Vries M, Westerink J, Kaasjager K, de Valk HW. Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in Patients With Type 1 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 105(12). Epub 2020/08/23. doi: 10.1210/clinem/dgaa575. PubMed PMID: 32827432; PubMed Central PMCID: PMC7526735, 2020.
4. Lonardo A, Mantovani A, Lugari S, Targher G. Epidemiology and pathophysiology of the association between NAFLD and metabolically healthy or metabolically unhealthy obesity. *Ann Hepatol* 19(4): 359-66. Epub 2020/05/01. doi: 10.1016/j.aohep.2020.03.001. PubMed PMID: 32349939, 2020.
5. 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* 64(6): 1388-402. Epub 2016/04/12. doi: 10.1016/j.jhep.2015.11.004. PubMed PMID: 27062661, 2016.
6. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 67(1): 328-57. Epub 2017/07/18. doi: 10.1002/hep.29367. PubMed PMID: 28714183, 2018.
7. Mantovani A, Scorletti E, Mosca A, Alisi A, Byrne CD, Targher G. Complications, morbidity and mortality of nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 111S:154170. Epub 2020/02/02. doi: 10.1016/j.metabol.2020.154170. PubMed PMID: 32006558, 2020.
8. Lonardo A, Nascimbeni F, Mantovani A, Targher G. Hypertension, diabetes, atherosclerosis and NASH: Cause or consequence? *J Hepatol* 68(2): 335-52. Epub 2017/11/11. doi: 10.1016/j.jhep.2017.09.021. PubMed PMID: 29122390, 2018.
9. Targher G, Lonardo A, Byrne CD. Nonalcoholic fatty liver disease and chronic vascular complications of diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 14(2): 99-114. Epub 2017/12/30. doi: 10.1038/nrendo.2017.173. PubMed PMID: 29286050, 2018.
10. Mantovani A, Petracca G, Beatrice G, Csermely A, Tilg H, Byrne CD, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and increased risk of incident extrahepatic cancers:

- a meta-analysis of observational cohort studies. *Gut*. Epub 2021/03/10. doi: 10.1136/gutjnl-2021-324191. PubMed PMID: 33685968, 2021.
11. Mantovani A, Petracca G, Beatrice G, Csermely A, Lonardo A, Schattenberg JM, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident chronic kidney disease: an updated meta-analysis. *Gut*. Epub 2020/12/12. doi: 10.1136/gutjnl-2020-323082. PubMed PMID: 33303564, 2020.
  12. Mantovani A, Petracca G, Beatrice G, Tilg H, Byrne CD, Targher G. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident diabetes mellitus: an updated meta-analysis of 501 022 adult individuals. *Gut*. Epub 2020/09/18. doi: 10.1136/gutjnl-2020-322572. PubMed PMID: 32938692, 2020.
  13. Eslam M, Sanyal AJ, George J, International Consensus P. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 158(7): 1999-2014 e1. Epub 2020/02/12. doi: 10.1053/j.gastro.2019.11.312. PubMed PMID: 32044314, 2020.
  14. Eslam M, Ratziu V, George J. Yet more evidence that MAFLD is more than a name change. *J Hepatol* 74(4): 977-9. Epub 2021/01/17. doi: 10.1016/j.jhep.2020.12.025. PubMed PMID: 33453331, 2021.
  15. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero-Gomez M, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol* 73(1): 202-9. Epub 2020/04/12. doi: 10.1016/j.jhep.2020.03.039. PubMed PMID: 32278004, 2020.
  16. Polyzos SA, Kang ES, Tsochatzis EA, Kechagias S, Ekstedt M, Xanthakos S, et al. Commentary: Nonalcoholic or metabolic dysfunction-associated fatty liver disease? The epidemic of the 21st century in search of the most appropriate name. *Metabolism* 113:154413. Epub 2020/11/10. doi: 10.1016/j.metabol.2020.154413. PubMed PMID: 33164861, 2020.
  17. Mantovani A, Dalbeni A. NAFLD, MAFLD and DAFLD. *Dig Liver Dis* 52(12): 1519-20. Epub 2020/10/06. doi: 10.1016/j.dld.2020.09.013. PubMed PMID: 33012657, 2020.
  18. Mantovani A, Dalbeni A. Treatments for NAFLD: State of Art. *Int J Mol Sci* 22(5). Epub 2021/03/04. doi: 10.3390/ijms22052350. PubMed PMID: 33652942; PubMed Central PMCID: PMC7956331 2021.
  19. Mantovani A. Not all NAFLD patients are the same: We need to find a personalized therapeutic approach. *Dig Liver Dis* 51(1): 176-7. Epub 2018/11/16. doi: 10.1016/j.dld.2018.10.009. PubMed PMID: 30429068, 2019.
  20. Petroni ML, Brodosi L, Bugianesi E, Marchesini G. Management of non-alcoholic fatty liver disease. *BMJ* 372:m4747. Epub 2021/01/20. doi: 10.1136/bmj.m4747. PubMed PMID: 33461969, 2021.
  21. Glen J, Floros L, Day C, Pryke R, Guideline Development G. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): summary of NICE guidance. *BMJ* 354:i4428. Epub 2016/09/09. doi: 10.1136/bmj.i4428. PubMed PMID: 27605111, 2016.
  22. Romero-Gomez M, Zelber-Sagi S, Trenell M. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *J Hepatol* 67(4): 829-846. Epub 2017/05/27. doi: 10.1016/j.jhep.2017.05.016. PubMed PMID: 28545937, 2017.
  23. Zelber-Sagi S, Salomone F, Mlynarsky L. The Mediterranean dietary pattern as the diet of choice for non-alcoholic fatty liver disease: Evidence and plausible mechanisms. *Liver Int* 37(7): 936-49. Epub 2017/04/04. doi: 10.1111/liv.13435. PubMed PMID: 28371239, 2017.
  24. Parra-Vargas M, Rodriguez-Echevarria R, Jimenez-Chillarón JC. Nutritional Approaches for the Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Evidence-Based Review. *Nutrients* 12(12). Epub 2020/12/23. doi: 10.3390/nu12123860. PubMed PMID: 33348700; PubMed Central PMCID: PMC7766941, 2020.
  25. Yaskolka Meir A, Rinott E, Tsaban G, Zelicha H, Kaplan A, Rosen P, et al. Effect of green-Mediterranean diet on intrahepatic fat: the DIRECT PLUS randomised controlled trial. *Gut* Epub 2021/01/20. doi: 10.1136/gutjnl-2020-323106. PubMed PMID: 33461965, 2021.
  26. Willett WC, Sacks F, Trichopoulos A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E, et al. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr* 61(6 Suppl):1402S-6S. Epub 1995/06/01. doi: 10.1093/ajcn/61.6.1402S. PubMed PMID: 7754995, 1995.
  27. Van Horn L, Carson JA, Appel LJ, Burke LE, Economos C, Karmally W, et al. Recommended Dietary Pattern to Achieve Adherence to the American Heart Association/American College of Cardiology (AHA/ACC) Guidelines: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* 134(22):e505-e29. Epub 2016/10/30. doi: 10.1161/CIR.0000000000000462. PubMed PMID: 27789558, 2016.

28. American Diabetes A. 5. Lifestyle Management: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. *Diabetes Care* 42(Suppl 1):S46-S60. Epub 2018/12/19. doi: 10.2337/dc19-S005. PubMed PMID: 30559231, 2019.
29. Ryan MC, Itsiopoulos C, Thodis T, Ward G, Trost N, Hofferberth S, et al. The Mediterranean diet improves hepatic steatosis and insulin sensitivity in individuals with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 59(1): 138-143. Epub 2013/03/15. doi: 10.1016/j.jhep.2013.02.012. PubMed PMID: 23485520, 2013.
30. Bozzetto L, Prinster A, Annuzzi G, Costagliola L, Mangione A, Vitelli A, et al. Liver fat is reduced by an isoenergetic MUFA diet in a controlled randomized study in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 35(7): 1429-1435. Epub 2012/06/23. doi: 10.2337/dc12-0033. PubMed PMID: 22723581; PubMed Central PMCID: PMC3379578, 2012.
31. Properzi C, O'Sullivan TA, Sherriff JL, Ching HL, Jeffrey GP, Buckley RF, et al. Ad Libitum Mediterranean and Low-Fat Diets Both Significantly Reduce Hepatic Steatosis: A Randomized Controlled Trial. *Hepatology* 68(5): 1741-1754. Epub 2018/05/08. doi: 10.1002/hep.30076. PubMed PMID: 29729189, 2018.
32. Targher G, Byrne CD. Ad Libitum Mediterranean or Low-Fat Diets as Treatments for Nonalcoholic Fatty Liver Disease? *Hepatology* 68(5): 1668-1671. Epub 2018/08/03. doi: 10.1002/hep.30142. PubMed PMID: 30070378, 2018.
33. Marchesini G, Petta S, Dalle Grave R. Diet, weight loss, and liver health in nonalcoholic fatty liver disease: Pathophysiology, evidence, and practice. *Hepatology* 63(6): 2032-2043. Epub 2015/12/15. doi: 10.1002/hep.28392. PubMed PMID: 26663351, 2016.
34. Bacchi E, Negri C, Targher G, Faccioli N, Lanza M, Zoppini G, et al. Both resistance training and aerobic training reduce hepatic fat content in type 2 diabetic subjects with nonalcoholic fatty liver disease (the RAED2 Randomized Trial). *Hepatology* 58(4): 1287-1295. Epub 2013/03/19. doi: 10.1002/hep.26393. PubMed PMID: 23504926, 2013.
35. Oh S, So R, Shida T, Matsuo T, Kim B, Akiyama K, et al. High-Intensity Aerobic Exercise Improves Both Hepatic Fat Content and Stiffness in Sedentary Obese Men with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Sci Rep* 7:43029. Epub 2017/02/23. doi: 10.1038/srep43029. PubMed PMID: 28223710; PubMed Central PMCID: PMC3379578, 2017.
36. Zhang HJ, Pan LL, Ma ZM, Chen Z, Huang ZF, Sun Q, et al. Long-term effect of exercise on improving fatty liver and cardiovascular risk factors in obese adults: A 1-year follow-up study. *Diabetes Obes Metab*. 2017; 19(2): 284-289. Epub 2016/10/21. doi: 10.1111/dom.12809. PubMed PMID: 27761987.
37. Shen J, Wong GL, Chan HL, Chan RS, Chan HY, Chu WC, et al. PNPLA3 gene polymorphism and response to lifestyle modification in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 30(1): 139-46. Epub 2014/07/22. doi: 10.1111/jgh.12656. PubMed PMID: 25040896, 2015.
38. Golabi P, Locklear CT, Austin P, Afdhal S, Byrns M, Gerber L, et al. Effectiveness of exercise in hepatic fat mobilization in non-alcoholic fatty liver disease: Systematic review. *World J Gastroenterol* 22(27): 6318-27. Epub 2016/07/29. doi: 10.3748/wjg.v22.i27.6318. PubMed PMID: 27468220; PubMed Central PMCID: PMC4945989, 2016.
39. Moreira JBN, Wohlwend M, Wisloff U. Exercise and cardiac health: physiological and molecular insights. *Nat Metab* 2(9): 829-839. Epub 2020/08/19. doi: 10.1038/s42255-020-0262-1. PubMed PMID: 32807982, 2020.
40. American Diabetes A. 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care* 43(Suppl 1): S98-S110. Epub 2019/12/22. doi: 10.2337/dc20-S009. PubMed PMID: 31862752, 2020.
41. Raschi E, Mazzotti A, Poluzzi E, De Ponti F, Marchesini G. Pharmacotherapy of type 2 diabetes in patients with chronic liver disease: focus on nonalcoholic fatty liver disease. *Expert Opin Pharmacother* 19(17): 1903-14. Epub 2018/10/10. doi: 10.1080/14656566.2018.1531126. PubMed PMID: 30299993, 2018.
42. Mantovani A, Byrne CD, Scroletti E, Mantzoros CS, Targher G. Efficacy and safety of anti-hyperglycaemic drugs in patients with non-alcoholic fatty liver disease with or without diabetes: An updated systematic review of randomized controlled trials. *Diabetes Metab* Epub 2020/01/11. doi: 10.1016/j.diabet.2019.12.007. PubMed PMID: 31923578, 2020.
43. Lavine JE, Schwimmer JB, Van Natta ML, Molleston JP, Murray KF, Rosenthal P, et al. Effect of vitamin E or metformin for treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: the TONIC randomized controlled trial. *JAMA* 305(16): 1659-68. Epub 2011/04/28. doi:

- 10.1001/jama.2011.520. PubMed PMID: 21521847; PubMed Central PMCID: PMC3110082, 2011.
44. Mantovani A, Targher G. Type 2 diabetes mellitus and risk of hepatocellular carcinoma: spotlight on nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Transl Med* 5(13): 270. Epub 2017/08/02. doi: 10.21037/atm.2017.04.41. PubMed PMID: 28758096; PubMed Central PMCID: PMC5515814, 2017.
  45. Kaplan DE, Serper M, John BV, Tessitore KM, Lerer R, Mehta R, et al. Effects of Metformin Exposure on Survival in a Large National Cohort of Patients with Diabetes and Cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. Epub 2020/08/18. doi: 10.1016/j.cgh.2020.08.026. PubMed PMID: 32798709, 2020.
  46. Vilar-Gomez E, Vuppalanchi R, Desai AP, Gawrieh S, Ghabril M, Saxena R, et al. Long-term metformin use may improve clinical outcomes in diabetic patients with non-alcoholic steatohepatitis and bridging fibrosis or compensated cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 50(3): 317-28. Epub 2019/06/04. doi: 10.1111/apt.15331. PubMed PMID: 31157422, 2019.
  47. Zhou J, Ke Y, Lei X, Wu T, Li Y, Bao T, et al. Meta-analysis: The efficacy of metformin and other anti-hyperglycemic agents in prolonging the survival of hepatocellular carcinoma patients with type 2 diabetes. *Ann Hepatol* 19(3): 320-8. Epub 2020/01/26. doi: 10.1016/j.aohep.2019.11.008. PubMed PMID: 31980358, 2020.
  48. Schulte L, Scheiner B, Voigtlander T, Koch S, Schweitzer N, Marhenke S, et al. Treatment with metformin is associated with a prolonged survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 39(4): 714-26. Epub 2019/01/22. doi: 10.1111/liv.14048. PubMed PMID: 30663219, 2019.
  49. Chen YC, Li H, Wang J. Mechanisms of metformin inhibiting cancer invasion and migration. *Am J Transl Res* 12(9): 4885-901. Epub 2020/10/13. PubMed PMID: 33042396; PubMed Central PMCID: PMC7540116, 2020.
  50. Francque S, Szabo G, Abdelmalek MF, Byrne CD, Cusi K, Dufour JF, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: the role of peroxisome proliferator-activated receptors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* Epub 2020/10/24. doi: 10.1038/s41575-020-00366-5. PubMed PMID: 33093663, 2020.
  51. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM, et al. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 362(18): 1675-85. Epub 2010/04/30. doi: 10.1056/NEJMoa0907929. PubMed PMID: 20427778; PubMed Central PMCID: PMC2928471, 2010.
  52. Belfort R, Harrison SA, Brown K, Darland C, Finch J, Hardies J, et al. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 355(22): 2297-307. Epub 2006/12/01. doi: 10.1056/NEJMoa060326. PubMed PMID: 17135584, 2006.
  53. Cusi K, Orsak B, Bril F, Lomonaco R, Hecht J, Ortiz-Lopez C, et al. Long-Term Pioglitazone Treatment for Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis and Prediabetes or Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Trial. *Ann Intern Med* 165(5): 305-15. Epub 2016/06/21. doi: 10.7326/M15-1774. PubMed PMID: 27322798, 2016.
  54. Aithal GP, Thomas JA, Kaye PV, Lawson A, Ryder SD, Spendlove I, et al. Randomized, placebo-controlled trial of pioglitazone in nondiabetic subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 135(4): 1176-84. Epub 2008/08/23. doi: 10.1053/j.gastro.2008.06.047. PubMed PMID: 18718471, 2008.
  55. Ratziu V, Giral P, Jacqueminet S, Charlotte F, Hartemann-Heurtier A, Serfaty L, et al. Rosiglitazone for nonalcoholic steatohepatitis: one-year results of the randomized placebo-controlled Fatty Liver Improvement with Rosiglitazone Therapy (FLIRT) Trial. *Gastroenterology* 135(1): 100-10. Epub 2008/05/28. doi: 10.1053/j.gastro.2008.03.078. PubMed PMID: 18503774, 2008.
  56. Musso G, Cassader M, Paschetta E, Gambino R. Thiazolidinediones and Advanced Liver Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis: A Meta-analysis. *JAMA Intern Med* 177(5): 633-40. Epub 2017/02/28. doi: 10.1001/jamainternmed.2016.9607. PubMed PMID: 28241279; PubMed Central PMCID: PMC5470366, 2017.
  57. Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Moules IK, et al. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitazone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet* 366(9493): 1279-89. Epub 2005/10/11. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67528-9. PubMed PMID: 16214598, 2005.
  58. Spence JD, Viscoli CM, Inzucchi SE, Dearborn-Tomazos J, Ford GA, Gorman M, et al. Pioglitazone Therapy in Patients With Stroke and Prediabetes: A Post Hoc Analysis of the IRIS Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol* 76(5): 526-35. Epub 2019/02/09. doi: 10.1001/jamaneu-

- rol.2019.0079. PubMed PMID: 30734043; PubMed Central PMCID: PMC6515584, 2019.
59. Anstee QM, Mantovani A, Tilg H, Targher G. Risk of cardiomyopathy and cardiac arrhythmias in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15(7): 425-39. Epub 2018/05/02. doi: 10.1038/s41575-018-0010-0. PubMed PMID: 29713021, 2018.
  60. Kawaguchi-Suzuki M, Cusi K, Bril F, Gong Y, Langae T, Frye RF. A Genetic Score Associates With Pioglitazone Response in Patients With Non-alcoholic Steatohepatitis. *Front Pharmacol* 9: 752. Epub 2018/08/02. doi: 10.3389/fphar.2018.00752. PubMed PMID: 30065651; PubMed Central PMCID: PMC6056641, 2018.
  61. Ratziu V, Harrison SA, Francque S, Bedossa P, Lehert P, Serfaty L, et al. Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-alpha and -delta, Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology* 150(5): 1147-59 e5. Epub 2016/02/14. doi: 10.1053/j.gastro.2016.01.038. PubMed PMID: 26874076, 2016.
  62. Kaul U, Parmar D, Manjunath K, Shah M, Parmar K, Patil KP, et al. New dual peroxisome proliferator activated receptor agonist-Saroglitazar in diabetic dyslipidemia and non-alcoholic fatty liver disease: integrated analysis of the real world evidence. *Cardiovasc Diabetol* 18(1): 80. Epub 2019/06/19. doi: 10.1186/s12933-019-0884-3. PubMed PMID: 31208414; PubMed Central PMCID: PMC6580520, 2019.
  63. Mantovani A, Petracca G, Beatrice G, Csermely A, Lonardo A, Targher G. Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists for Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis: An Updated Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Metabolites* 11(2). Epub 2021/01/31. doi: 10.3390/metabo11020073. PubMed PMID: 33513761, 2021.
  64. Armstrong MJ, Houlihan DD, Rowe IA, Clausen WH, Elbrond B, Cough SC, et al. Safety and efficacy of liraglutide in patients with type 2 diabetes and elevated liver enzymes: individual patient data meta-analysis of the LEAD program. *Aliment Pharmacol Ther* 37(2): 234-42. Epub 2012/11/21. doi: 10.1111/apt.12149. PubMed PMID: 23163663, 2013.
  65. Armstrong MJ, Gaunt P, Aithal GP, Barton D, Hull D, Parker R, et al. Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet* 387(10019): 679-90. Epub 2015/11/27. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00803-X. PubMed PMID: 26608256, 2016.
  66. Harrison SA, Calanna S, Cusi K, Linder M, Okanou T, Ratziu V, et al. Semaglutide for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: Trial design and comparison of non-invasive biomarkers. *Contemp Clin Trials* 106:174. Epub 2020/10/12. doi: 10.1016/j.cct.2020.106174. PubMed PMID: 33039693, 2020.
  67. Kuchay MS, Krishan S, Mishra SK, Choudhary NS, Singh MK, Wasir JS, et al. Effect of dulaglutide on liver fat in patients with type 2 diabetes and NAFLD: randomised controlled trial (D-LIFT trial). *Diabetologia* 63(11): 2434-45. Epub 2020/09/01. doi: 10.1007/s00125-020-05265-7. PubMed PMID: 32865597, 2020.
  68. Marso SP, Daniels GH, Brown-Frandsen K, Kristensen P, Mann JF, Nauck MA, et al. Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 375(4): 311-22. Epub 2016/06/14. doi: 10.1056/NEJMoa1603827. PubMed PMID: 27295427; PubMed Central PMCID: PMC4985288, 2016.
  69. Kristensen SL, Rorth R, Jhund PS, Docherty KF, Sattar N, Preiss D, et al. Cardiovascular, mortality, and kidney outcomes with GLP-1 receptor agonists in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cardiovascular outcome trials. *Lancet Diabetes Endocrinol* 7(10): 776-85. Epub 2019/08/20. doi: 10.1016/S2213-8587(19)30249-9. PubMed PMID: 31422062, 2019.
  70. Yan J, Yao B, Kuang H, Yang X, Huang Q, Hong T, et al. Liraglutide, Sitagliptin, and Insulin Glargine Added to Metformin: The Effect on Body Weight and Intrahepatic Lipid in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology* 69(6): 2414-26. Epub 2018/10/21. doi: 10.1002/hep.30320. PubMed PMID: 30341767; PubMed Central PMCID: PMC6594101, 2019.
  71. Smits MM, Tonneijck L, Muskiet MH, Kramer MH, Pouwels PJ, Pieters-van den Bos IC, et al. Twelve week liraglutide or sitagliptin does not affect hepatic fat in type 2 diabetes: a randomised placebo-controlled trial. *Diabetologia* 59(12): 2588-93. Epub 2016/09/16. doi: 10.1007/s00125-016-4100-7. PubMed PMID: 27627981; PubMed Central PMCID: PMC6518065, 2016.
  72. Cusi K. Incretin-Based Therapies for the Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Patients With Type

- 2 Diabetes. *Hepatology* 69(6): 2318-2322. Epub 2019/04/22. doi: 10.1002/hep.30670. PubMed PMID: 31006135, 2019.
73. Zhang Y, Cai T, Zhao J, Guo C, Yao J, Gao P, et al. Effects and Safety of Sitagliptin in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Horm Metab Res* 52(7): 517-26. Epub 2020/06/20. doi: 10.1055/a-1186-0841. PubMed PMID: 32559768, 2020.
74. Katsiki N, Perakakis N, Mantzoros C. Effects of sodium-glucose co-transporter-2 (SGLT2) inhibitors on non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: Ex quo et quo vadimus? *Metabolism* 98:iii-ix. Epub 2019/07/14. doi: 10.1016/j.metabol.2019.07.009. PubMed PMID: 31301336, 2019.
75. Mantovani A, Petracca G, Csermely A, Beatrice G, Targher G. Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitors for Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Metabolites* 11(1). Epub 2021/01/06. doi: 10.3390/metabo11010022. PubMed PMID: 33396949, 2020.
76. Coelho FDS, Borges-Canha M, von Hafe M, Neves JS, Vale C, Leite AR, et al. Effects of sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors on liver parameters and steatosis: A meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes Metab Res Rev*. Epub 2020/10/04. doi: 10.1002/dmrr.3413. PubMed PMID: 33010191, 2020:e3413, 2020.
77. Lai LL, Vethakkan SR, Nik Mustapha NR, Mahadeva S, Chan WK. Empagliflozin for the Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Dig Dis Sci* 65(2): 623-31. Epub 2019/01/27. doi: 10.1007/s10620-019-5477-1. PubMed PMID: 30684076, 2020.
78. Neuen BL, Young T, Heerspink HJL, Neal B, Perkovic V, Billot L, et al. SGLT2 inhibitors for the prevention of kidney failure in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol* 7(11): 845-54. Epub 2019/09/10. doi: 10.1016/S2213-8587(19)30256-6. PubMed PMID: 31495651, 2019.
79. Zelniker TA, Wiviott SD, Raz I, Im K, Goodrich EL, Bonaca MP, et al. SGLT2 inhibitors for primary and secondary prevention of cardiovascular and renal outcomes in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cardiovascular outcome trials. *Lancet* 393(10166): 31-39. Epub 2018/11/15. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32590-X. PubMed PMID: 30424892, 2019.
80. Dufour JF, Caussy C, Loomba R. Combination therapy for non-alcoholic steatohepatitis: rationale, opportunities and challenges. *Gut* 69(10): 1877-1884. Epub 2020/05/10. doi: 10.1136/gutjnl-2019-319104. PubMed PMID: 32381514; PubMed Central PMCID: PMC7497577, 2020.

# Ruolo dei farmaci non antidiabete nel trattamento della NAFLD

Maurizio Russello<sup>1</sup>, Maria Luisa Arpi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UOSD Epatologia, ARNAS Garibaldi, Catania; <sup>2</sup>UOC Endocrinologia, ARNAS Garibaldi, Catania

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2102c>

## INTRODUZIONE

La malattia da accumulo di grasso nel fegato (NAFLD) rappresenta la prima causa di epatopatia cronica nella maggior parte dei paesi occidentali e in Asia, con una prevalenza del 25-30% nella popolazione generale (1). La steatoepatite non alcolica (NASH) è la forma avanzata di NAFLD, con una prevalenza globale stimata di 1,5-6,5% (2). La frequenza di NAFLD è in continuo aumento a causa dell'epidemia di obesità e diabete mellito di tipo 2 (DMT2). La prevalenza di NAFLD aumenta notevolmente nei pazienti con DMT2 (>60%) e nei pazienti obesi (>90%), così come la presenza di NAFLD aumenta il rischio di insorgenza nel tempo di DMT2, anche in assenza di sovrappeso, a conferma della stretta correlazione tra le due condizioni (2).

È stato recentemente proposto, ma è ancora dibattuto, l'utilizzo del termine *Metabolic-Associated Fatty Liver Disease* (MAFLD), in sostituzione di NAFLD, e la modifica dei criteri diagnostici: presenza di steatosi epatica e di almeno due condizioni tra sovrappeso/obesità, T2DM e alterazioni metaboliche, indipendentemente dal consumo di alcol (3).

La NASH si caratterizza per la comparsa di danno epatocellulare che determina, a cascata, infiammazione, secrezione di citochine e attivazione dell'apoptosi epatica. Questi fenomeni sono responsabili dell'attivazione delle cellule stellate, implicate nel rilascio e accumulo di ma-

trice extra-cellulare, alla base dei meccanismi di fibrogenesi epatica.

Negli ultimi anni è emerso l'importante ruolo della alterazione del microbiota intestinale nel determinismo della NAFLD e nella progressione a NASH.

Ciascuno dei processi descritti in estrema sintesi rappresenta un potenziale target di terapie farmacologiche della NASH.

Nel paziente con NAFLD la malattia cardiovascolare (CV) è la prima causa di morte.

## FAD ECM "il Diabete"

Questa rassegna fa parte di un percorso di **formazione a distanza** accreditato a livello nazionale e disponibile gratuitamente nell'aula virtuale della SID ([www.fad.siditalia.it](http://www.fad.siditalia.it)).

Per partecipare al corso occorre:

1. Leggere la rassegna (disponibile on-line)
2. Registrarsi all'aula e iscriversi al corso "il Diabete"
3. Rispondere on-line al quiz di verifica e compilare il questionario di valutazione dell'evento FAD.

Una volta eseguito con successo il test di valutazione e compilato il questionario di valutazione dell'evento, sarà cura della Segreteria ECM della SID far pervenire l'attestato ECM del corso ai diretti interessati nei tempi e nelle modalità stabiliti dalla regolamentazione vigente.

**Per ulteriori informazioni: [www.fad.siditalia.it](http://www.fad.siditalia.it)**

**Tabella 1** ◆ Percorso regolatorio per l'approvazione di terapie per la NASH

NASH CON FIBROSI	CIRROSI
<b>Percorso accelerato</b>	
• Risoluzione della steatoepatite, senza peggioramento della fibrosi	Miglioramento della fibrosi
e/o	Riduzione degli <i>outcomes</i> clinici
• Miglioramento della fibrosi (di almeno 1 stadio) senza peggioramento dell'attività infiammatoria	Riduzione della necessità di trapianto epatico Riduzione della mortalità
<b>Estensione dello studio a lungo termine</b>	
• Riduzione della progressione a cirrosi • Riduzione degli <i>outcomes</i> clinici	

La progressione da steatosi semplice a steatoepatite aumenta invece il rischio di mortalità per cause epatiche (4). Anche il rischio di epatocarcinoma (HCC) cresce progressivamente in presenza di NASH e cirrosi (5), che sono tra le principali cause di trapianto epatico (6).

I dati epidemiologici attuali consentono di prevedere che la cura della NAFLD richiederà un impegno di risorse sempre maggiori e difficilmente sostenibili per i sistemi sanitari (7).

#### POPOLAZIONE TARGET E ENDPOINTS DELLA TERAPIA FARMACOLOGICA

La mortalità fegato-correlata è bassa nei pazienti con semplice steatosi, mentre aumenta in presenza di steatoepatite, con o senza fibrosi. La progressione del danno epatico in fibrosi avanzata, cirrosi e HCC aumenta anche il rischio CV (2).

Pertanto, l'obiettivo più urgente è identificare i pazienti a maggior rischio evolutivo, che necessitano di un trattamento farmacologico in grado di prevenire gli *outcomes* clinici e ridurre la mortalità.

In mancanza di biomarcatori non invasivi, la biopsia epatica è ancora oggi il *gold standard* per la diagnosi di infiammazione e di fibrosi, nonostante i limiti di variabilità dipendenti dal campionamento e dall'osservatore (2, 8).

Il criterio di classificazione maggiormente utilizzato (9) per la caratterizzazione delle diverse componenti della NAFLD si basa su:

- NAFLD activity score (NAS), indice ricavato dalla presenza di steatosi macrovescicolare (0-3), ballooning epatocellulare (0-2) e infiammazione lobulare (0-3): diagnosi di NASH con punteggio  $\geq 5$

- la fibrosi viene suddivisa in 4 stadi (0 = assenza di fibrosi; 4 = cirrosi).

La standardizzazione del referto istologico è utile non solo nella pratica clinica, ma anche per lo sviluppo di nuovi farmaci e per la corretta valutazione della loro efficacia nei trials clinici regolatori (10).

La NAFLD è stata definita una "epidemia silente" perché quasi sempre asintomatica, anche nelle fasi più avanzate. L'aumento delle transaminasi, generalmente utilizzato per selezionare i pazienti da riferire allo specialista epatologo, non sempre è correlato a maggior rischio di danno epatico, infatti pazienti con fibrosi anche avanzata possono presentarsi con transaminasi nel range della norma.

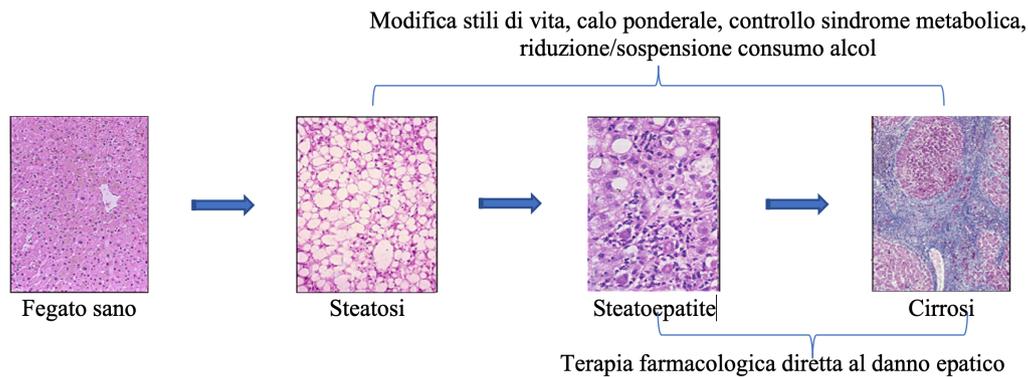
Per ridurre il ricorso alla biopsia è necessario selezionare i pazienti a maggior rischio di steatoepatite e di fibrosi da riferire ai centri di secondo livello.

Tra i numerosi score non invasivi proposti, i più semplici sono il NAFLD Fibrosis Score (NFS) e il Fibrosis-4 index (FIB-4), che, in combinazione sequenziale con la misurazione della stiffness epatica mediante elastografia (LSM, Fibroscan®), sono in grado di identificare con elevata accuratezza i pazienti con fibrosi avanzata e cirrosi (11).

Le linee guida del 2018 delle maggiori agenzie del farmaco (FDA ed EMA) richiedono l'inclusione di pazienti con fibrosi di grado  $\geq 2$  alla biopsia nei trials regolatori dei farmaci per il trattamento della NASH.

Perché il farmaco sia considerato efficace nei pazienti con fibrosi avanzata deve migliorare gli *outcomes* fegato-correlati: complicanze gravi della cirrosi, morte, trapianto.

Poiché la dimostrazione di questi obiettivi potrebbe richiedere una lunga osservazione (a causa della lenta progressione della malattia epatica), è previsto un percorso accelerato per favorire la ricerca e lo sviluppo di terapie per una

**Figura 1** ♦ Gestione terapeutica del paziente con NAFLD in base al diverso stadio del danno epatico (2, 8)

patologia che in atto non ha cure efficaci: il farmaco deve dimostrare di essere in grado a breve termine di risolvere la steatoepatite, senza peggiorare la fibrosi o di ridurre la fibrosi di almeno un grado senza peggiorare l'attività infiammatoria, e a lungo termine di rallentare o prevenire la progressione a cirrosi e ridurre gli outcomes clinici (Tab. 1).

#### TERAPIA ATTUALE DELLA NAFLD

##### Modifica degli stili di vita e calo ponderale (Fig.1)

Allo stato attuale il calo ponderale, ottenuto con la modifica degli stili di vita (riduzione dell'apporto calorico, dieta mediterranea e regolare attività fisica aerobica o di resistenza) o con la chirurgia bariatrica, rappresenta l'unico intervento efficace nel trattamento della NAFLD (2, 8). Una riduzione  $\geq 5\%$  del peso permette di migliorare la steatosi e l'infiammazione, mentre il calo ponderale  $\geq 10\%$  è in grado di risolvere la NASH e ridurre la fibrosi. Purtroppo non oltre il 50% dei pazienti raggiunge questi obiettivi (12).

##### Vitamina E

Lo stress ossidativo è uno dei meccanismi alla base del danno epatocellulare in corso di NASH. La vitamina E, agente antiossidante, ha dimostrato effetti positivi sulla steatosi epatica in modelli animali di NASH, bloccando l'apoptosi, riducendo lo stress ossidativo e migliorando il metabolismo glucidico e lipidico.

La vitamina E (800 UI/die per 96 settimane) è stata confrontata al placebo in pazienti adulti con NASH istologica nel trial PIVENS (Pioglitazone vs Vitamin E vs Placebo for Treatment of Non-Diabetic Patients With Nonalcoholic

Steatohepatitis), dimostrando una significativa riduzione delle transaminasi, della steatosi, dell'infiammazione e del *ballooning*, ma nessun effetto sulla fibrosi (13). Analoghi risultati sono stati ottenuti nella popolazione pediatrica (14).

Non sono disponibili dati sufficienti sull'utilizzo di vitamina E per lungo tempo, essendo stato segnalato un aumentato rischio di cancro della prostata e di stroke emorragico, nonostante una recente meta-analisi abbia escluso un aumento di mortalità per tutte le cause (15).

Le linee guida AASLD (*American Association for the Study of Liver Disease*) consigliano l'uso della vitamina E esclusivamente in pazienti non diabetici, con NASH senza cirrosi, valutando in ogni singolo paziente rischi e benefici (2). Anche le linee guida EASL (*European Association for the Study of the Liver*) (8) considerano l'utilizzo della vitamina E in pazienti con NASH, segnalando l'incertezza dei dati di sicurezza ed efficacia nel lungo periodo.

##### Pioglitazone

Il pioglitazone, agonista intra-nucleare di PPAR $\gamma$ , è in grado di modulare il segnale insulinico, stimolare l'uptake adipocitario degli acidi grassi (distribuendo il grasso a livello sottocutaneo e riducendo la steatosi epatica), regolare i processi di infiammazione e fibrosi epatica. Nel trial PIVENS il pioglitazone (30 mg/die per 2 anni), confrontato al placebo e alla vitamina E, in pazienti con NASH non diabetici, riduceva significativamente i livelli di transaminasi, steatosi e infiammazione, senza alcun effetto sulla fibrosi (13). Dati confermati anche in studi successivi (16). Il pioglitazone è associato a seppur modesto incremento ponderale e aumentato rischio di osteoporosi nel

**Tabella 2** ♦ **Farmaci attualmente utilizzati per il trattamento della NASH**

FARMACO TRIAL	MECCANISMO D'AZIONE PRINCIPALE	RISULTATI	RACCOMANDAZIONI AASLD (2)	RACCOMANDAZIONI EASL-EASD-EASO (8)
Vitamina E (PIVENS, 13)	Antiossidante	↓ steatosi/infiammazione ↔ fibrosi	Sì in non-diabetici con NASH (biopsia)	Sì in non-diabetici con NASH senza cirrosi
Pioglitazone (PIVENS, 13)	Agonista PPAR-γ ↓ insulino-resistenza	↓ steatosi/infiammazione ↔ fibrosi	Sì in NASH ± DMT2	Sì in NASH + DMT2
Metformina (19)	↓ insulino-resistenza	↓ steatosi ↔ infiammazione e fibrosi	No	No
Acido Ursodesossicolico (22-23)	↓ TNF-α Antiossidante ↓ insulino-resistenza	↓ steatosi ↔ infiammazione e fibrosi	No	No
Acidi grassi Omega-3 (25-26)	Antiossidante	↓ steatosi ↔ infiammazione e fibrosi	No (utilizzare per ipertrigliceridemia)	No (utilizzare per ipertrigliceridemia)

sesso femminile, mentre non è stata confermata correlazione con il cancro della colecisti (17).

Le linee guida AASLD suggeriscono l'utilizzo di questo farmaco per il trattamento della NASH, anche in assenza di diabete, valutando rischi e benefici in ogni singolo paziente (2). Le linee guida EASL-EASD-EASO (*European Association for the Study of the Liver - European Association for the Study of Diabetes - European Association for the Study of Obesity*) raccomandano il trattamento con pioglitazone in pazienti diabetici, ben selezionati, anche in associazione alla vitamina E (8).

Tuttavia, l'uso di pioglitazone per il trattamento della NASH è ancora poco frequente nella pratica clinica (solo il 2%) come dimostrato in uno studio retrospettivo (18). Verosimilmente l'incremento ponderale (spesso associato al trattamento) rappresenta un disincentivo al suo impiego in pazienti con NAFLD, in genere sovrappeso/obesi. L'utilizzo del pioglitazone potrebbe essere utile in particolare in pazienti normopeso con NAFLD (cosiddetti "lean NASH").

### Metformina

La metformina migliora la sensibilità insulinica ed ha dimostrato efficacia nel ridurre le transaminasi e la steatosi in pazienti con DMT2, ma nessun effetto sulla fibrosi (19). Una prima meta-analisi ha confermato i benefici su steatosi e *ballooning*, nessuno su infiammazione lobulare e fibrosi (20).

Sulla base di questi dati le linee guida AASLD e EASL non raccomandano l'uso della metformina nella terapia della NASH (2, 8).

Recenti dati della letteratura dimostrano che il trattamento con metformina nei pazienti diabetici con epatopatia cronica e cirrosi è sicuro ed è in grado di aumentare la sopravvivenza (20) e ridurre il rischio di insorgenza di cirrosi ed epatocarcinoma (21).

La metformina, il farmaco maggiormente prescritto nei pazienti diabetici, non è efficace nel trattamento della NASH, ma non è da sconsigliare nella terapia del diabete in pazienti con epatite cronica e cirrosi.

### Acido ursodesossicolico (UDCA)

L'UDCA è stato uno dei primi farmaci testati nel trattamento della steatoepatite non alcolica. Il primo studio pilota dimostrava significativa riduzione degli enzimi epatici e della steatosi (22).

Successivi studi randomizzati con placebo non hanno dimostrato alcuna significativa differenza su steatosi, infiammazione e fibrosi (23).

Le linee guida europee e americane non raccomandano l'utilizzo di UDCA nel trattamento della NASH (2, 8).

Uno studio di fase 2 ha recentemente dimostrato l'efficacia, rispetto al placebo, di **acido norursodesossicolico**, omologo a catena accorciata di UDCA, in pazienti con NASH (24).

### Acidi grassi Omega-3

Gli acidi grassi Omega-3, comunemente utilizzati nel trattamento dell'ipertrigliceridemia, hanno dimostrato un miglioramento della steatosi e dell'infiammazione in pazienti con NASH, tramite la riduzione dello stress ossidativo. Tuttavia, due trials randomizzati non hanno confermato questi dati (25-26), e pertanto gli acidi grassi Omega-3 non sono raccomandati per il trattamento della NASH.

Analoghe considerazioni riguardano altri farmaci ipolipemizzanti, ezetimibe e statine, che non hanno dimostrato effetti positivi su NASH e fibrosi. Poiché sono privi di tossicità epatica, possono essere utilizzati per ridurre i livelli di LDL colesterolo e il rischio cardiovascolare anche in pazienti con danno epatico avanzato.

### PROSPETTIVE FUTURE DI TRATTAMENTO DELLA NASH (TAB. 3)

La comprensione dei complessi meccanismi patogenetici alla base della NAFLD ha permesso l'identificazione di bersagli terapeutici potenzialmente in grado di prevenire l'evoluzione del danno epatico.

Sebbene nessuno dei farmaci sinora studiati abbia dimostrato efficacia e sicurezza superiore rispetto al placebo, nella *pipeline* per il trattamento della NASH e della cirrosi NASH-correlata vi sono numerosi farmaci, in diverse fasi di sviluppo, alcuni dei quali in terapia di combinazione.

### AGENTI CON AZIONE PREVALENTEMENTE METABOLICA

#### Agonisti di FXR

FXR (Farnesoid X Receptor) è un recettore nucleare espresso in diversi organi (fegato, colecisti, tessuto adiposo, rene, intestino) e cellule del sistema immunitario. Una volta attivato, FXR svolge un ruolo essenziale nella sintesi e circolazione enteroepatica degli acidi biliari, modulando anche il metabolismo glicidico/lipidico epatico e la risposta infiammatoria e fibrogenica immuno-mediata, sia direttamente a livello epatico, sia attraverso l'aumentato rilascio di FGF19 (Fibroblast Growth Factor 19). Quest'ultimo è un ormone intestinale che svolge un ruolo centrale favorendo tra l'altro la sintesi e la secrezione di GLP-1.

L'**acido obeticolico (OCA)**, un acido biliare semi-sintetico, analogo dell'acido chenodossicolico, con una intensi-

tà d'azione 100 volte maggiore di quest'ultimo, è il primo agonista di FXR utilizzato in campo terapeutico. Il legame di OCA con FXR inibisce l'assorbimento intestinale degli acidi biliari e ne riduce la sintesi epatica, bloccando la conversione del colesterolo ad acidi biliari (27).

OCA è attualmente registrato per il trattamento della colangite biliare primitiva (28).

Lo studio di fase 2b (FLINT), condotto in pazienti con NASH, senza cirrosi (il 50% diabetici), ha dimostrato riduzione del NAS  $\geq 2$  punti senza peggioramento della fibrosi (alla biopsia di fine trattamento) nel braccio con OCA (29). Inoltre, il trattamento con OCA riduceva significativamente le transaminasi, il peso e la pressione arteriosa sistolica; durante il trattamento si evidenziava incremento di insulina basale, colesterolo totale e LDL (con riduzione di HDL). Gli effetti sul profilo lipidico potrebbero, nel lungo periodo, influenzare negativamente gli outcomes clinici CV in pazienti con NASH, già ad elevato rischio, e richiedere la correzione con statine. L'unico evento avverso segnalato era il prurito.

È stato avviato lo studio multicentrico, randomizzato, controllato con placebo, di fase 3 (REGENERATE), che ha arruolato pazienti con NASH e fibrosi  $\geq 2$  (o F1 ma con almeno una co-morbilità), senza cirrosi. Il trial valuterà anche gli outcomes clinici fegato-correlati e la mortalità per tutte le cause.

Nel dicembre 2019 sono stati pubblicati (30) i risultati dell'analisi a 18 mesi su 931 pazienti: nei due gruppi trattati con OCA (10 mg e 25 mg) la riduzione della fibrosi è significativamente maggiore (18% e 23%) rispetto al placebo (12%). Anche se l'endpoint della risoluzione di NASH non è stato raggiunto, i risultati sembrano dimostrare un beneficio clinico nei pazienti trattati con OCA. Il prurito (sino al 51% nel gruppo a 25 mg) e l'elevazione di LDL-C, che ha richiesto l'uso di statine, sono stati i principali eventi avversi.

Per i suddetti effetti collaterali, l'FDA non ha concesso l'approvazione accelerata del farmaco e ha richiesto dati aggiuntivi, attesi entro la fine del 2021.

Un altro trial con OCA vs placebo (REVERSE Study, NCT03439254) ha di recente completato il reclutamento di pazienti con NASH e cirrosi compensata.

**Tropifexor** e **Cilofexor**, agonisti selettivi non-acidi biliari di FXR di seconda generazione, sembrerebbero causare minori effetti su prurito e ipercolesterolemia rispetto

**Tabella 3** ♦ Farmaci in fase di sperimentazione per il trattamento della NASH

CLASSE FARMACO	MECCANISMO D'AZIONE PRINCIPALE	FASE DI STUDIO/ GRUPPO DI CONTROLLO	POPOLAZIONE STUDIATA	PRINCIPALI EFFETTI COLLATERALI
Agonisti di FXR • OCA (29-30) • Tropifexor • Cilofexor	Metabolico FXR	Fase 3/Placebo Fase 2/Placebo Fase 2/Semaglutide-firsoostat	NASH ≥F2 NASH con cirrosi NASH F1-F3 NASH F2-F3	Prurito ↑LDL-C ↓Prurito e colesterolo
Analoghi FGF-19 • Aldafermin (31)	Metabolico FGF-19	fase 2-2b/Placebo <b>(INTERROTTO)</b>	NASH F2-F3 NASH con cirrosi comp.	Simili al placebo
Analoghi FGF-21 • Pegbelfermin (32)	Metabolico FGF-21	fase 2b/Placebo	NASH F3 NASH con cirrosi comp.	Diarrea, nausea
Agonisti di PPARs • MSDC-0602K (34) • Elafibranor (35-36)  • Saroglitazar (38-39)  • Lanifibranor (NCT03459079, NCT03008070, NCT04849728)	Metabolico PPARγ PPARα/δ  PPARα/γ  Pan-PPAR	fase 2b-3/Placebo fase 3/Placebo <b>(INTERROTTO)</b> Fase 3 <b>(APPROVATO IN INDIA)</b> Vitamina E Stili di vita Fase 2-3/placebo	NASH F1-F3 NASH e fibrosi  NASH  NASH F2-F3	Simili al placebo ↑Creatinina  ↑Ponderale lieve
Agonisti di THRβ • Resmetirom (40)	Metabolico THRβ	Fase 2-3/Placebo	NASH F2-F3	Diarrea, nausea, ipotensione lieve. Effetti positivi su profilo lipidico
Aramchol™ (41-42)	Metabolico Inibitore di SCD1	Fase 3/Placebo	NASH	Ben tollerato
Ceniciviroc (43)	Anti-infiammatorio Anti-fibrotico Antagonista CCR2/ CCR5	Fase 3/Placebo	NASH F2-F3	Disturbi vie respiratorie alte, nausea, astenia
Selonsertib (44)	Anti-infiammatorio Anti-fibrotico Inibitore di ASK1	Fase 3/Placebo <b>(RISULTATI NEGATIVI)</b>	NASH F3 NASH con cirrosi	Ben tollerato
Belapectin (47)	Inibitore di Galectin-3	Fase 2b-3/Placebo	NASH con cirrosi/ no varici esofagee	Ben tollerato

all'acido obetico, e sono in fase 2b di sperimentazione, da soli e in combinazione.

#### **Analoghi di FGF-19 (Fibroblast Growth Factor)**

FGF-19, ormone rilasciato a livello intestinale, su attivazione da parte di FXR, interviene nella sintesi degli acidi

biliari e nell'omeostasi glucidica ed energetica. L'utilizzo terapeutico di FGF-19 è stato limitato dalla sua potenziale epatocarcinogenicità.

**Aldafermin (NGM282)** è un analogo di FGF-19, ingegnerizzato non-tumorigenico, che migliora l'insulino-sensibilità, riduce la steatosi epatica, e sembrerebbe ridurre

anche l'infiammazione e la fibrosi epatica, tramite la soppressione della sintesi *de novo* degli acidi biliari.

È stata dimostrata una significativa riduzione della steatosi e un *trend* interessante, benché non significativo, nel miglioramento della fibrosi e risoluzione della steatoepatite, in uno studio randomizzato su pazienti con NASH. Aldafermin ha dimostrato un buon profilo di sicurezza (31). Tuttavia, nel maggio 2021 NGM ha comunicato che lo studio di fase 2b non ha raggiunto l'endpoint primario ed è stato interrotto (<https://www.biospace.com/article/ngm-s-nash-drug-misses-mark-in-phase-iiib-alpine-trial/>).

#### Analoghi di FGF-21 (Fibroblast Growth Factor)

Gli analoghi di FGF-21 rappresentano una nuova strategia terapeutica per la NASH e sono in atto sviluppati da diverse companies. FGF-21 è un ormone prodotto principalmente dal fegato, presente anche in altri organi (pancreas, tessuto adiposo e muscolo scheletrico). FGF-21 interviene nella regolazione del metabolismo glicidico e lipidico, migliorando la steatosi epatica.

Gli analoghi di FGF-21 hanno dimostrato di ridurre NASH e fibrosi in vivo, tramite l'effetto anti-infiammatorio (ridotto rilascio di citochine pro-infiammatorie), e anti-fibrotico (blocco dell'attivazione e proliferazione delle cellule stellate epatiche) di questo ormone.

**Pegbelfermin** è un analogo ricombinante umano di FGF-21, con prolungata emivita che ne permette la somministrazione settimanale. Il farmaco ha dimostrato, in un trial multicentrico randomizzato di fase 2, in pazienti con NASH in sovrappeso, di ridurre steatosi (valutata con MRI), stiffness epatica (valutata con Fibroscan®), transaminasi e biomarcatori non invasivi (32).

Sono stati avviati due trials di fase 2b in pazienti con NASH associata a fibrosi di grado 3 (FALCON 1) o cirrosi (FALCON 2), per valutare sicurezza ed efficacia nel migliorare la NASH, la fibrosi e il rischio di progressione in cirrosi (FALCON 1), e gli outcomes clinici della cirrosi e l'incidenza di epatocarcinoma (FALCON 2).

#### Agonisti di Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs)

I PPARs sono una famiglia di recettori nucleari che svolgono un ruolo essenziale nel metabolismo glucidico e lipidico e modulano i processi di infiammazione e di attivazione cellulare che conducono alla fibrosi. Essi rap-

presentano pertanto un target ideale per il trattamento della NASH (33).

Sono stati identificati 3 sottogruppi di PPARs:

- PPAR $\alpha$ , presente principalmente in organi che consumano energia (fegato, muscolo scheletrico, cuore, rene), interviene nel metabolismo dei trigliceridi, stimola la beta-ossidazione e aumenta la sintesi di HDL; attraverso la regolazione di geni pro-infiammatori, determina la riduzione di mediatori dell'infiammazione. I ligandi di PPAR $\alpha$  (fibrati) sono attualmente utilizzati per il trattamento delle dislipidemie.

- PPAR $\gamma$ , prevalente nel tessuto adiposo, svolge un ruolo essenziale nella redistribuzione dei depositi di grasso intra-addominale e sottocutaneo. L'agonista selettivo di PPAR $\gamma$ , pioglitazone, è comunemente utilizzato nel trattamento del diabete.

Un PPAR $\gamma$  di seconda generazione (**MSDC-0602K**) che agisce a livello del carrier piruvato mitocondriale, con ridotto legame PPAR $\gamma$ , avrebbe minori effetti collaterali rispetto al pioglitazone (34). Gli effetti positivi dimostrati sul profilo glicemico e sui biomarcatori di danno epatico in pazienti con NASH e fibrosi F1-F3, hanno indotto ad avviare uno studio di fase 3 (EMMINENCE, NCT03970031).

- PPAR  $\beta/\delta$ , con distribuzione ubiquitaria, interviene nel catabolismo del colesterolo, nel metabolismo glucidico e degli acidi grassi.

**Elafibranor**, agonista di PPAR $\alpha/\delta$ , che in uno studio di fase 2b (GOLDEN-505) aveva dimostrato, effetti positivi sulla NASH, senza un peggioramento della fibrosi (35), non ha confermato analoghi risultati in fase 3 (36), e pertanto lo studio è stato interrotto nel luglio 2020. Elafibranor ha confermato comunque sicurezza e tollerabilità.

**Saroglitazar**, agonista di PPAR $\alpha/\gamma$ , con effetto prevalente sul recettore  $\alpha$ , è in grado di ridurre la steatosi, l'infiammazione e la fibrosi in studi condotti su modelli animali di NASH (37).

In un piccolo studio pilota di fase 2 randomizzato, controllato, in pazienti con NASH, Saroglitazar non ha mostrato riduzione significativa del NAS (probabilmente per l'esiguità del campione), nonostante la tendenza al miglioramento dei parametri istologici (38).

Uno studio successivo di fase 2, condotto con Saroglitazar in pazienti sovrappeso/obesi con NASH e ALT  $\geq$  50 U/L, ha raggiunto l'endpoint della normalizzazione delle transaminasi, oltre a ridurre il contenuto epatico di grasso (valutato con MRI-PDFF), migliorare la sensibilità insu-

linica e il profilo lipidico, pur determinando un lieve incremento ponderale rispetto al placebo (39).

Saroglitazar ha un buon profilo di sicurezza e tollerabilità.

È in corso uno studio di fase 3 in combinazione con vitamina E, a confronto con la modifica degli stili di vita, in pazienti con NAFLD/NASH (NCT04193982).

Saroglitazar è stato recentemente approvato in India per il trattamento della NASH.

**Lanifibranor**, agonista pan-PPAR ( $\alpha$ ,  $\beta$  /  $\delta$  e  $\gamma$ ), agendo sui tre differenti recettori, ha dimostrato in modelli animali di migliorare la steatosi, l'infiammazione e la fibrosi.

Sono in corso due studi di fase 2 (NCT03459079, NCT03008070) e uno di fase 3 (NCT04849728) che dovranno dimostrare efficacia e sicurezza di Lanifibranor in pazienti con NASH senza cirrosi.

#### **Agonisti del recettore beta dell'ormone tiroideo (THR $\beta$ )**

Il recettore beta dell'ormone tiroideo è notevolmente espresso negli epatociti (a differenza del recettore  $\alpha$ , espresso principalmente a livello osseo e cardiaco), regola il metabolismo lipidico, migliora la sensibilità insulinica e riduce l'apoptosi epatocitaria. Agonisti selettivi del recettore nucleare beta, con profilo di attività sul fegato e privi di effetti su altri organi, hanno dimostrato un promettente ruolo terapeutico nella NASH. Segni clinici o subclinici di ipotiroidismo sono spesso presenti in pazienti con NAFLD, e pazienti con ipotiroidismo mostrano alterazioni epatiche simili alla NAFLD.

**Resmetirom (MGL-3196)**, agonista del recettore nucleare beta dell'ormone tiroideo, è 28 volte più selettivo dell'ormone tiroideo triiodotironina, con attività quasi esclusiva sul fegato. In uno studio di fase 2 randomizzato, controllato, in doppio cieco, recentemente pubblicato, sono stati valutati efficacia e sicurezza di Resmetirom (80 mg/die per os), in pazienti con NASH e fibrosi F1-F3 dimostrate alla biopsia (40). Il farmaco ha ridotto significativamente la steatosi, valutata con MRI-PDFF, con effetto anche sui marcatori sierologici e istologici di infiammazione, ma non sulla fibrosi. Resmetirom è ben tollerato e gli effetti collaterali più frequenti rispetto al placebo sono stati la diarrea e la nausea di lieve intensità. Un dato interessante emerso da questo trial è la riduzione significativa nel gruppo trattato con Resmetirom di LDL-C, APO-B, lipoprotein(a) e trigliceridi. Questi effetti su lipidi altamente aterogenetici potrebbero ridurre il rischio cardio-

vascolare, rendendo questa molecola potenzialmente più adatta a pazienti ad alto rischio CV.

Sulla base di questi dati promettenti è stato avviato un trial di fase 3 con Resmetirom nella NASH con fibrosi F2-F3 (NCT03900429).

#### **Inibitori di Stearoyl-CoA Desaturase-1 (SCD1)**

**Aramchol** è un inibitore di SCD1 che promuove la formazione di acidi grassi, previene la *de novo* lipogenesi e riduce l'insulinoresistenza.

In uno studio di fase 2 Aramchol si è dimostrato efficace nel ridurre il contenuto epatico di grasso (valutato con MRI), in pazienti con NAFLD dimostrata alla biopsia (41). Un successivo trial di fase 2b (ARREST) ha confermato l'efficacia del farmaco nel ridurre la steatosi epatica in pazienti affetti da NASH, sovrappeso/obesi con prediabete/DMT2. Nei pazienti trattati si notava anche riduzione delle transaminasi e dell'emoglobina glicata. Il farmaco era ben tollerato, e addirittura i principali effetti collaterali venivano segnalati nel gruppo placebo (42).

È in corso di arruolamento il trial di fase 3 (ARMOR, NCT04104321).

#### **AGENTI ANTI-INTIAMMATORI/ANTI-FIBROTICI**

##### **Inibitori dei recettori delle chemochine 2 e 5 (CCR2/CCR5)**

**Cenicriviroc** è un antagonista dei recettori delle chemochine (CCR2 e CCR5) con dimostrata azione anti-infiammatoria e anti-fibrotica. In uno studio di fase 2b (CENTAUR), in pazienti con NASH e fibrosi di stadio 1-3, diabetici o con sindrome metabolica, Cenicriviroc non ha raggiunto l'endpoint primario (riduzione del NAS e risoluzione della NASH), nonostante un significativo miglioramento della fibrosi rispetto al placebo (20% vs 10%). Questo risultato si manteneva nei 2 anni successivi nei pazienti in cui la fibrosi si era ridotta di almeno 1 stadio (60% vs 30%), in particolare nei soggetti con fibrosi avanzata. I risultati ottenuti anche nel gruppo placebo potrebbero essere giustificati dalla modifica degli stili di vita e un miglior controllo del diabete. Gli effetti collaterali più frequenti di Cenicriviroc comprendono disturbi delle alte vie respiratorie e nausea (43).

I promettenti risultati dimostrati sulla fibrosi hanno dato l'avvio ad un trial di fase 3 (AURORA), in pazienti con NASH e fibrosi avanzata (F2-F3), allo scopo di valutare la risoluzione della NASH, la riduzione della fibrosi, degli

eventi clinici fegato-correlati e della mortalità per tutte le cause (NCT03028740).

### Inibitori dell'apoptosi

**Selonsertib**, inibitore di ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1), agisce sui meccanismi di necrosi e apoptosi cellulare, con effetti anti-infiammatori e anti-fibrotici. I risultati di due studi di fase 3, recentemente pubblicati, non hanno purtroppo confermato le attese. Nel trial STELLAR-3 Selonsertib (ai dosaggi di 18 mg e 6 mg, per 48 settimane) è stato messo a confronto con placebo, in 1700 pazienti con NASH e fibrosi avanzata. L'endpoint primario (regressione di almeno uno stadio di fibrosi senza peggioramento della NASH) non è stato raggiunto, addirittura la riduzione della fibrosi è stata lievemente maggiore nel gruppo placebo.

Nel trial STELLAR-4, condotto su pazienti con NASH e cirrosi (F4), la riduzione della fibrosi era sovrapponibile al placebo. Selonsertib è ben tollerato (44).

Nonostante i risultati negativi dei due trials, ASK1 rimane un potenziale target terapeutico, e la sperimentazione di Selonsertib continua in combinazione con altri farmaci.

**Emricasan**, inibitore di caspasi, riduce l'apoptosi epatocitaria, dimostrando azione anti-fibrotica, sul modello murino di NASH. Il farmaco non è stato in grado di ridurre significativamente la fibrosi e gli outcomes clinici in due trials randomizzati in pazienti con NASH e fibrosi avanzata (45) e con cirrosi (46).

### Inibitori di Galectin-3

Galectin-3 è una proteina coinvolta nei processi di differenziazione intracellulare, infiammazione e fibrosi. Elevati livelli di Galectin-3 sono stati dimostrati in modelli animali di steatoepatite.

In uno studio di fase 2b, **Belapectin (GR-MD-02)**, inibitore selettivo di Galectin-3, non ha dimostrato efficacia nel ridurre la pressione portale in pazienti affetti da NASH con cirrosi e ipertensione portale, anche se, in un sottogruppo di pazienti senza varici esofagee al baseline si riduceva il rischio di sviluppo di varici (47).

È in corso di arruolamento uno studio di fase 2b/3 (NAVIGATE, NCT04365868), in pazienti con cirrosi e ipertensione portale senza varici esofagee, con l'obiettivo di valutare gli outcomes clinici.

### Ruolo del microbiota intestinale e potenziali target terapeutici

Studi recenti hanno dimostrato notevoli differenze nella composizione del microbiota intestinale in pazienti con NAFLD rispetto ad individui sani. La disbiosi intestinale svolge un importante ruolo nella patogenesi della NAFLD ed è correlata con la progressione del danno epatico.

Variazioni della composizione del microbiota aumentano la permeabilità della mucosa intestinale e alterano la barriera vascolare dell'intestino (48). I prodotti del microbiota (lipopolisaccaridi, DNA batterici, peptidoglicani) possono così attraversare la mucosa intestinale, passare nella circolazione portale e raggiungere direttamente il fegato. È evidente una stretta correlazione tra disbiosi, infiammazione e fibrosi epatica, ed è riconosciuto il ruolo dell'asse intestino-fegato nella patogenesi della NASH. Nel paziente con NAFLD è stata dimostrata una ridotta diversità microbica, anche se non si conosce la composizione specifica del microbioma in questi pazienti. In corso di NASH avanzata è stata dimostrata elevata presenza di bacteroides, ruminococcus e di batteri che producono etanolo (Escherichia e Klebsiella, 49).

Modifiche nella composizione della dieta, probiotici, prebiotici, antibiotici (quali la Rifaximina) e il trapianto fecale sono stati valutati in pazienti con NASH, in studi di piccole dimensioni e senza controllo istologico.

In una recente meta-analisi si dimostra che probiotici e prebiotici modificano significativamente alcuni marcatori indiretti della NASH, ma non influenzano gli outcomes clinici (50).

### Terapie di combinazione

La difficoltà di trovare una terapia efficace e sicura per il trattamento della NASH è giustificata dalla complessità dei meccanismi patogenetici che la determinano e dalla molteplicità degli organi coinvolti (fegato, tessuto adiposo, pancreas endocrino, intestino, apparato cardiovascolare). Inoltre, i pazienti con NASH sono estremamente eterogenei per fattori genetici, peso corporeo, profilo lipidico, presenza o meno di DMT2, tutti fattori che possono influenzare le manifestazioni cliniche nel singolo paziente. Pertanto, è verosimile che un farmaco potrebbe non essere adatto a tutti i pazienti.

Il farmaco ideale dovrebbe infatti dimostrare benefici sulle manifestazioni epatiche della NASH (steatosi, infiammazione e fibrosi), migliorando compenso glicemi-

co, profilo lipidico, peso corporeo e rischio CV, o almeno avere effetto neutro su di essi (Tab. 4).

A rendere ancora più complicata questa ricerca sono i risultati ottenuti nel gruppo placebo di quasi tutti i trials condotti, intorno al 20%, correlati all'effetto della modifica degli stili di vita dei pazienti arruolati (51).

Di fronte a queste difficoltà è ragionevole pensare che la combinazione di due o più farmaci, con diverso target d'azione, potrebbe aumentare l'efficacia complessiva del trattamento, ridurre il dosaggio di ciascuna molecola e quindi limitarne la tossicità e gli effetti collaterali.

La scelta dei farmaci da associare dipende dalla popolazione target.

Ad esempio, in pazienti con DMT2 è naturale associare un farmaco antidiabetico ad uno con azione anti-infiammatoria e anti-fibrotica che migliori la NASH. Il trial PIVENS è stato il primo a dimostrare la superiorità della combinazione di pioglitazone e vitamina E rispetto al farmaco anti-diabetico da solo e al placebo (13).

Diversi agonisti di GLP-1 e inibitori di SGLT2 sono in fase di sperimentazione in combinazione con agonisti di FXR (Cilofexor, Tropifexor), anti-infiammatori e anti-fibrotici (Selonsertib, Cenicriviroc).

Il trial ATLAS (NCT03449446) è un esempio di combinazione di tre target farmacologici: Cilofexor (agonista di FXR di seconda generazione), Selonsertib (inibitore dell'apoptosi), Firsocostat (inibitore di acetyl-CoA carboxylase, con effetto sulla de novo lipogenesi).

È stato recentemente completato l'arruolamento del trial di fase 2, con Semaglutide in combinazione con Selonsertib e Firsocostat (NCT03987074).

Un esempio di combinazione utile alla riduzione degli effetti indesiderati è il trial di fase 2 CONTROL (NCT02633956) che valuta l'efficacia e il profilo di sicurezza di OCA (Agonista di FXR) con Atorvastatina, allo scopo di ridurre l'effetto negativo del primo su LDL colesterolo. La maggior parte di queste combinazioni sono ancora in fase 2 di sperimentazione (ClinicalTrials.gov).

**Tabella 4** ♦ **Le caratteristiche del farmaco ideale per la NASH**

<b>Target epatico</b>
risoluzione NASH
regressione fibrosi
riduzione <i>outcomes</i> clinici
riduzione necessità di trapianto
riduzione mortalità
<b>Target extra-epatico</b>
miglioramento del compenso glicemico
effetto positivo/neutro sul profilo lipidico
effetto positivo/neutro sul peso corporeo
effetto positivo/neutro su funzione cardiovascolare e renale
<b>Sicurezza e tollerabilità</b>
<b>Costo economico sostenibile</b>

## CONCLUSIONI

La NAFLD/NASH è la principale causa emergente di danno epatico. A fronte dei progressi nella comprensione dei meccanismi patogenetici, ad oggi la perdita di peso è l'unica terapia efficace, anche se è prevedibile che nei prossimi 3-4 anni numerosi farmaci saranno disponibili per il trattamento della NASH e delle sue più gravi complicanze.

Probabilmente sarà necessaria la combinazione di 2 o 3 farmaci con diverso bersaglio d'azione (metabolico, anti-infiammatorio, anti-fibrotico).

Le strategie terapeutiche farmacologiche dovranno essere "personalizzate", tenendo in considerazione le caratteristiche di ogni singolo paziente.

Pertanto è necessario individuare i pazienti a rischio nel setting della medicina generale e degli specialisti di diabete ed obesità tramite test sierologici e strumentali non invasivi.

In considerazione della complessità patogenetica e della eterogeneità clinica, solo un approccio multidisciplinare (epatologo, diabetologo, endocrinologo, chirurgo bariatrico, psicologo, nutrizionista, cardiologo), che metta il paziente al centro delle cure, permetterà di ridurre il "peso" sociale ed economico della NAFLD e delle sue conseguenze.

## BIBLIOGRAFIA

1. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease -meta-analytic assessment of prevalence, incidence and outcomes. *Hepatology* 64: 73-84, 2016.
2. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of Liver Disease. *Hepatology* 67(1): 328-357, 2018.
3. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: an international expert consensus statement. *J Hepatol* 73(1): 202-209, 2020.
4. Simon TG, Roelstraete B, Khalili H, et al. Mortality in biopsy-confirmed nonalcoholic fatty liver disease: results from a nationwide cohort. *Gut* doi:10.1136, 2020.
5. Simon TG, Roelstraete B, Sharma R, et al. Cancer risk in patients with biopsy-confirmed non-alcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Hepatology* doi:10.1002, 2021.
6. Cholaneril G, Wong RJ, Hu M, et al. Liver transplantation for non-alcoholic steatohepatitis in the US: temporal trends and outcomes. *Dig Dis Sci* 62: 2915-2922, 2017.
7. Lazarus JV, Palayew A, Carrieri P, et al. European "NAFLD Preparedness Index" - Is Europe ready to meet the challenge of fatty liver disease?. *JHEP Rep* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2021.100234>.
8. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 64(6): 1388-1402, 2016.
9. Kleiner DE, Brunt EM, Natta MV, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 41(6): 1313-21, 2005.
10. Brunt EM, Kleiner DE, Carpenter DH, et al. NAFLD: reporting histological findings in clinical practice. *Hepatology* 73(5): 2028-2038, 2021.
11. Mozes FE, Lee JA, Selvaraj EA, Jayaswal ANA, Trauner M, Boursier J, et al. Diagnostic accuracy of non-invasive tests for advanced fibrosis in patients with NAFLD: an individual patient data meta-analysis. *Gut* 0:1-14. doi:10.1136, 2021.
12. Vilar-Gomez E, Martinez-Perez Y, Calzadilla-Bertot L, et al. Weight loss through lifestyle modification significantly reduces features of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 149(2): 367-378, 2015.
13. Sanjal AJ, Chalasani N, Kowdely KV, et al. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 6, 362(18): 1675-1685, 2010.
14. Lavine JE, Schwimmer JB, Van Natta ML, et al. Effect of vitamin E or metformin for treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: the TONIC randomized controlled trial. *JAMA* 305(16): 1659-1668, 2011.
15. Abner EL, Schmitt FA, Mendiondo MS, et al. Vitamin E and all-cause of mortality: a meta-analysis. *Curr Aging Sci* 4(2): 158-70, 2011.
16. Musso G, Cassader M, Paschetta E, Gambino R. Thiazolidinediones and advanced liver fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis: a meta-analysis. *JAMA Intern Med* 177: 633-640, 2017.
17. Yau H, Rivera K, Lomonaco R, Cusi K. The future of thiazolidinedione therapy in the management of type 2 diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* 13(3): 329-341, 2013.
18. Chan WK, Treeprasertsuk S, Imajo K, et al. Clinical features and treatment of nonalcoholic fatty liver disease across the Asia Pacific region-the GO ASIA initiative. *Aliment Pharmacol Ther* 47(6): 816-825, 2018.
19. Bugianesi E, Gentilcore E, Manini R, et al. A randomized controlled trial of metformin versus vitamin E or prescriptive diet in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 100(5): 1082-1090, 2005.
20. Shulte L, Scheiner B, Voigtlander T, et al. Treatment with metformin is associated with a prolonged survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 39(4): 714-726, 2019.
21. Singh S, Singh PP, Singh AG, et al. Anti-diabetics medications and risk of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*, 108(6), 881-891, 2013.
22. Laurin J, Lindor KD, Crippin JS, et al. Ursodeoxycholic acid or clofibrate in the treatment of non-alcoholic-induced steatohepatitis: a pilot study. *Hepatology* 23(6): 1464-1467, 1996.
23. Lindor KD, Kowdley KV, Heathcote EJ, et al. Ursodeoxycholic acid for treatment of non-alcoholic steatohepatitis: results of a randomized trial. *Hepatology* 2004, 39(3), 770-778, 2004.
24. Traussnigg S, Schattenberg J, Demir M, et al. Norursodeoxycholic acid versus placebo in the treatment of

- non-alcoholic fatty liver disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled, phase 2 dose-finding trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 4(10): 781-793, 2019.
25. Sanjal AJ, Abdelmalek MF, Suzuki A, Cummings OW, Chojkier M, EPE-A Study Group. No significant effect of ethyl-eicosapentaenoic acid on histologic features of non-alcoholic steatohepatitis in a phase 2 trial. *Gastroenterology* 147: 377-384, 2014.
  26. Argo CK, Patrie JT, Lackner JC, et al. Effects of n-3 fish oil on metabolic and histological parameters in NASH: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Hepatol* 62: 190-197, 2015.
  27. Pellicciari R, Costantino G, Camaioni E, et al. Bile acid derivative as ligands of the farnesoid X receptor. Synthesis, evaluation, and structure-activity relationship of a series of body and side chain modified analogues of chenodeoxycholic acid. *J Med Chem* 47(18): 4559-4569, 2004.
  28. Nevens F, Andreone P, Mazzella G, et al. A placebo-controlled trial of obeticholic acid in primary biliary cholangitis. *N Engl J Med* 375(7): 631-643, 2016.
  29. Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanjal AJ, et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 385(9972): 956-965, 2015.
  30. Younossi ZM, Ratziu V, Loomba R, et al. Obeticholic acid for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: interim analysis from a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* 394 (10215) 2184-2196, 2019.
  31. Harrison SA, Neff C, Guy GD, et al. Efficacy and safety of Aldafermin, an engineered FGF19 analog, in a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 160: 219-231, 2021.
  32. Sanyal AJ, Charles ED, Neuschwander-Tetri BA, et al. Pegbelfermin (BMS-986036), a PEGylated fibroblast growth factor 21 analogue, in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 2a trial. *Lancet* 392: 2705-2717, 2019.
  33. Fougerat A, Montagner A, Loiseau N, et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and their novel ligands as candidates for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Cells* 9(7): 1638, 2020.
  34. Colca JR, McDonald WG, Cavey GS, et al. Identification of a mitochondrial target of thiazolidinedione insulin sensitizers (mTOT): relationship to newly identified mitochondrial pyruvate carrier proteins. *PLoS One* 8; e61551, 2013.
  35. Ratziu V, Harrison SA, Francque S, et al. Elafibranor, an agonist of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  and  $-\delta$ , induces resolution of nonalcoholic steatohepatitis without fibrosis worsening. *Gastroenterology* 150, (5): 1147-1159, 2016.
  36. Francque S, Szabo G, Abdelmalek MF, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: the role of peroxisome proliferator-activated receptors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18(1), 24-39, 2021.
  37. Jain MR, Giri SR, Bhoi B, et al. Dual PPAR $\alpha/\gamma$  agonist saroglitazar improves liver histopathology and biochemistry in experimental NASH models. *Liver Int* 38(6), 1084-1094, 2018.
  38. Siddiqui MS, Idowu MO, Parmar D, et al. A phase 2 double blinded, randomized controlled trial of saroglitazar in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* S1542-3565(20)31509-3, 2020.
  39. Gawrieh S, Noureddin M, Loo N, et al. Saroglitazar, a PPAR- $\alpha/\gamma$  agonist, for treatment of nonalcoholic fatty liver disease: a randomized controlled double-blind phase 2 trial. *Hepatology* doi: 10.1002/hep.31843, 2021.
  40. Harrison SA, Bashir MR, Guy CD, et al. Resmetirom (MGL-3196) for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet* 394(10213), 2012-24.2019, 2019.
  41. Safadi R, Konikoff FM, Mahamid M, et al. The fatty acid-bile acid conjugate Aramchol reduces liver fat content in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 12(12): 2085-2091, 2014.
  42. Ratziu V, de Guevara L, Safadi R, et al. One-year results of the global phase 2b randomized placebo controlled ARREST trial of Aramchol, a stearyl CoA desaturase modulator in NASH patients. *Hepatology* 68, LB-5, 2018.
  43. Ratziu V, Sanjal A, Harrison SA, et al. Cenicriviroc treatment for adults with nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis: final analysis of the phase 2b CENTAUR study. *Hepatology* 72(3): 892-905, 2020.
  44. Harrison SA, Wong VW, Okanoue T, et al. Selonsertib for patients with bridging fibrosis or compensated cir-

- rhosis due to NASH: Results from randomized phase III STELLAR trials. *J Hepatol* 73(1): 26-39, 2020.
45. Harrison SA, Goodman Z, Jabbar A, et al. A randomized, placebo-controlled trial of emricasan in patients with NASH and F1-F3 fibrosis. *J Hepatol* 72: 816-827, 2020.
  46. Garcia-Tsao G, Bosch J, Kayali Z, et al. Randomized placebo-controlled trial of emricasan for non-alcoholic steatohepatitis-related cirrhosis with severe portal hypertension. *J Hepatol*, 72(5): 885-895, 2020.
  47. Chalasani N, Abdelmalek MF, Garcia-tsao G, et al. Effects of Belapectin, an inhibitor of Galectin-3, in patients with non-alcoholic steatohepatitis with cirrhosis and portal hypertension. *Gastroenterology* 158(5): 1334-1345, 2020.
  48. Mouries J, Brescia P, Silvestri A, et al. Microbiota-driven gut vascular barrier disruption is a prerequisite for non-alcoholic steatohepatitis development. *J Hepatol* 71(6): 1216-1228, 2019.
  49. Zhu L, Baker SS, Gill C. Characterization of gut microbioma in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology* 57: 601-609, 2013.
  50. Sharpton SR, Maraj B, Harding-Theobald E, et al. Gut microbiome-targeted therapies in nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Am J Clin Nutr* 110(1): 139-149, 2019.
  51. Han MAT, Altayar O, Hamdeh S, et al. Rates of and factors associated with placebo response in trials of pharmacotherapies for nonalcoholic steatohepatitis: Systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 17(4): 616-629, 2019.

a cura di Simona Frontoni

*Ospedale Fatebenefratelli Isola Tiberina, Dipartimento Medicina dei Sistemi, Università di Roma Tor Vergata*

## La gestione della pandemia di NAFLD: il ruolo del diabetologo

Ilaria Barchetta, Flavia Agata Cimini, Laura Bertocchini, Maria Gisella Cavallo

*Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università Sapienza, Roma*

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2102d>

### NOTE EPIDEMIOLOGICHE

La steatosi epatica non alcolica (NAFLD) è la causa più comune di malattia epatica cronica in tutto il mondo, con una prevalenza globale stimata attorno al 25-30% nella popolazione generale (1), che raggiunge punte del 70% negli adulti con diabete di tipo 2 (DT2) (2-3). L'aumento costante della prevalenza di NAFLD, che si manifesta in parallelo con l'aumento della diffusione del diabete e delle patologie metaboliche legate all'obesità, non colpisce solo i paesi industrializzati ma anche quelli in via di sviluppo e le economie emergenti (3).

La NAFLD è una condizione spesso asintomatica ed in molti casi non accompagnata da significative alterazioni ematochimiche; inoltre, l'opportunità di implementare misure di screening sulla popolazione generale piuttosto che su specifiche categorie a rischio è tuttora dibattuta, principalmente in relazione alla mancanza a tutt'oggi di una strategia terapeutica validata (3).

A livello epidemiologico, a parità di fattori di rischio metabolici, il sesso femminile appare quello maggiormente colpito. Ad esserne maggiormente affetti sono gli individui di età avanzata e gli anziani, probabilmente per la prevalenza in queste popolazioni dei principali fattori di rischio per NAFLD (sovrappeso/obesità, DT2, dislipidemia, stile di vita sedentario) (1). La diffusione della NAFLD nei soggetti non obesi è influenzata da sesso, presenza di suscettibilità genetica ed etnia; la prevalenza di NAFLD nell'Asia meridionale è molto più alta negli uomini non obesi rispetto alle donne (4) ed è in genere maggiore negli ispanici e nelle popolazioni afro-americane (5).

### NAFLD e diabete: una relazione pericolosa

La NAFLD e il DT2 sono condizioni comunemente coesistenti nel paziente con sindrome metabolica. Più in generale, i pazienti con NAFLD sono identificabili tra coloro che presentano le componenti della sindrome metabolica (6-8). Il rischio e la severità di NAFLD e NASH, inoltre, aumentano all'aumentare del numero di componenti della sindrome metabolica (9). In ogni modo, il DT2 rappresenta il più importante fattore di rischio per lo sviluppo di NAFLD e il principale predittore di esiti sfavorevoli e rapida progressione della NAFLD verso stadi di fibrosi avanzata ed epatocarcinoma. La prevalenza di NAFLD tra i pazienti diabetici aumenta linearmente con il BMI (10-13).

Il diabetologo riveste un ruolo cardine nella identificazione dei pazienti con NAFLD, in quanto rappresenta la figura specialistica che, più o meno consapevolmente, viene maggiormente a contatto con individui ad alto rischio di epatopatia metabolica. Diversi studi epidemiologici hanno infatti documentato che la prevalenza della NAFLD nei pazienti con DT2 è molto superiore a quella rilevata nella popolazione generale di pari età, variando tra circa il 45% e il 75% (14-16). D'altro canto, dati da meta-analisi riportano che, tra i pazienti con NAFLD, la prevalenza di T2D è di oltre il 22% (1). Altri studi hanno suggerito che la prevalenza di NAFLD nei pazienti con T2D ed enzimi epatici normali è superiore al 50%, ovvero più di due volte superiore rispetto alla popolazione generale (3, 17).

Nell'ambito del *Valpolicella Heart Diabetes Study*, che ha coinvolto circa 3.000 pazienti con DT2, è stata riscontrata una prevalenza di NAFLD di circa il 70% (14). Williamson e collaboratori hanno rilevato una prevalenza di NAFLD di circa il 45% nella coorte di 900 diabetici anziani dell'*Edinburgh type 2 diabetes study* (15). In uno studio che coinvolgeva circa 2000 giapponesi adulti la prevalenza della NAFLD era del 27% nei soggetti con normale glicemia a digiuno, del 43% nei pazienti con alterata glicemia a digiuno e del 62% in quelli con diabete neo-diagnosticato (18).

In linea con quanto evidenziato negli individui con diabete, anche nella popolazione generale la prevalenza della NAFLD appare estremamente variabile a livello globale, attestandosi in Europa attorno al 25% con picchi massimi in Grecia e Spagna (fino al 40% nella popolazione generale). In genere, grado e prevalenza di fibrosi epatica tendono comunque ad aumentare progressivamente con l'età, essendo espressione di una maggior durata della malattia e una più lunga esposizione ai fattori di danno epatico (19). Diversi studi osservazionali (20-22) e alcune meta-analisi (1, 23) hanno indagato la prevalenza di NAFLD in relazione all'età.

#### **NAFLD: una questione di sesso ed età?**

Come accennato in precedenza, l'invecchiamento si associa ad un aumento della prevalenza e severità di NAFLD; tuttavia, questa associazione è rispettata principalmente nelle fasce d'età tra i 30 e i 65 anni, mentre la prevalenza di NAFLD tende a raggiungere un plateau dopo i 65 anni (24). Anche il rapporto tra prevalenza maschile e femminile può variare in base al gruppo di età, con il rapporto maschi-femmine più basso tra gli individui di età inferiore a 30 anni e più alto tra gli individui di età compresa tra 40 e 49 anni (24). In uno studio osservazionale statunitense condotto su 3227 individui, Golabi e collaboratori hanno documentato che la prevalenza della NAFLD era del 40,3% tra 60 e 74 anni e del 39,2% in chi aveva più di 75 anni, indicando che la NAFLD è comune tra la popolazione anziana, ma che non esiste alcuna differenza sostanziale nella sua prevalenza tra lo specifico sottogruppo di età avanzata (cioè, 60-74 vs >75 anni) (22). Sulla base dei dati del National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) III, Lazo e collaboratori hanno mostrato che negli uomini il picco di prevalenza della NAFLD era nell'età compresa tra 50 e 60 anni, con il 16% nell'età compresa tra 30 e 40 anni, il 22% tra 41 e 50 anni, il 29% tra 51 e 60 anni e il 28% in quelli di età superiore a 60 anni. Nelle donne, invece, la prevalenza di NAFLD aumentava con l'età soprattutto dopo la menopausa, con il 12% tra i 30 e i 40 anni, il 16% tra i 41 e i 50 anni, il 22% tra i 51 e i 60 anni e il 25% in quelli di età superiore a 60 anni (21).

Risultati diversi sono stati in parte osservati nei pazienti asiatici. In uno studio trasversale che ha coinvolto 6.648 soggetti coreani, la prevalenza di NAFLD aumentava con l'età solo tra le donne, mentre la sua prevalenza negli uomini differiva di poco in tutti i gruppi di età (25). Il risultato di questo studio può essere spiegato dalla prevalenza relativamente alta dell'obesità tra gli uomini di età inferiore ai 50 anni (25). In uno studio trasversale condotto su 2782 partecipanti del Bangladesh, Alam e collaboratori hanno osservato che la prevalenza di NAFLD aumentava con l'età avanzata (26). Questi risultati sono confermati da dati da meta-analisi di 86 studi che hanno reclutato un campione totale di quasi 9.000.000 di individui con e senza DT2 (1): in questo studio, Younossi e collaboratori hanno osservato che la prevalenza di NAFLD era del 27,4% tra i 50-59 anni, 28,9% tra i 60-69 anni e 33,9% tra i 70 e i 79 anni. Recentemente, un'altra meta-analisi di 80 studi con un totale di 49.419 individui con DT2, ha mostrato che la prevalenza di NAFLD era di circa il 56% negli individui di età inferiore a 50 anni, circa il 57% negli individui da 50 a 59 anni, e intorno al 63% in quelli di oltre 60 anni (23).

L'insieme dei numerosi dati epidemiologici disponibili, provenienti da studi di prevalenza ed incidenza condotti in tutto il mondo, dimostrano chiaramente che nell'ultimo decennio la NAFLD è diventata la malattia epatica cronica

più comune al mondo (1) con tassi di incidenza in costante aumento. Dati allarmanti relativi al 2016 mostrano che il totale di pazienti affetti da NAFLD in Francia, Germania, Italia e Regno Unito ammontava a circa 52 milioni di persone, con costi sanitari annuali che sfioravano i 35 miliardi di euro, rendendo pertanto la NAFLD una emergenza socio-economica di primaria rilevanza (1).

## DIABETE DI TIPO 2 E NAFLD: CENNI DI FISIOPATOLOGIA

Alla base della notevole sovrapposizione epidemiologica tra presenza di DT2 e NAFLD vi è la condivisione di origini patogenetiche comuni tra queste due entità patologiche. La NAFLD, come il DT2, è infatti conseguenza stretta di un quadro di insulino-resistenza, ed in particolare rispecchia una alterata azione insulinica a livello epatico. Nel 1999 Marchesini e collaboratori dimostravano come la presenza di insulino-resistenza, iperglicemia ed iperinsulinemia si associava al riscontro di steatosi epatica indipendentemente da fattori di rischio noti di potenziale confondimento, non solamente in individui obesi, ma anche in condizioni di normopeso, fino a riscontrare una associazione tra un certo grado di insulino-resistenza subclinica e presenza di NAFLD anche in soggetti magri normoglicemici (27). Studi successivi hanno dimostrato come, in termini clinici, l'associazione tra NAFLD ed insulino-resistenza si manifesti con l'aumento progressivo della quantità di grasso intraepatico in presenza di più componenti della sindrome metabolica (9).

### Grasso intraepatico e NAFLD: una questione di insulino-resistenza

Una ridotta azione dell'insulina a livello di muscolo scheletrico, tessuto adiposo e fegato provoca un aumento stabile delle concentrazioni di acidi grassi liberi (FFA) circolanti. Se in condizioni fisiologiche, un'elevazione dei livelli plasmatici di FFA viene tamponata a livello epatico attraverso (1) l'aumento dell'accumulo di glicogeno, (2) la riduzione della *de novo lipogenesis* (DNL), (3) l'aumento della secrezione epatica di lipoproteine a densità molto bassa (VLDL), e (4) dalla maggiore ossidazione degli FFA, la persistenza di alti livelli circolanti di FFA e l'iperglicemia persistente determinano una serie di cambiamenti nel metabolismo epatico degli FFA che esita nello sviluppo di steatosi epatica. In particolare, gli FFA circolanti vengono trasportati attraverso le membrane degli epatociti ed incorporati in trigliceridi. In condizioni di insulino-resistenza, vi è un aumento della DNL, accompagnato da una riduzione della ossidazione degli FFA e della sintesi e secrezione di apolipoproteina B (ApoB), con conseguente diminuzione del rilascio di VLDL. Conseguenza finale dell'alterato metabolismo lipidico intraepatico, è lo sviluppo di epatosteatosi (28). A partire da queste evidenze, veniva quindi elaborata nei primi anni del 2000, la teoria conosciuta come “*Two hits hypothesis*” in base alla quale, in presenza di un quadro sottostante di insulino-resistenza epatica con accumulo intraepatocitario di lipidi, lo stress ossidativo legato alla saturazione dei sistemi di ossidazione lipidica, è in grado di scatenare una serie di processi che conducono ad infiammazione locale, rilascio di citochine e chemochine, danno epatocellulare, necrosi e fibrosi (28).

### Insulino-resistenza, sì, ma non solo...

Successivi studi hanno evidenziato come, sebbene l'insulino-resistenza rappresenti il *primum movens* per lo sviluppo e la successiva progressione di NAFLD e NASH, l'alterazione di altri sistemi ed organi centrali nella regolazione del metabolismo sia un elemento necessario per lo sviluppo di malattia (“*Multiple hits hypothesis*”). Inoltre, dati di lipidomica mostrano come la storia naturale della NAFLD dipende non solo dalla quantità ma anche dal tipo di grassi intraepatici. Mentre, infatti, i trigliceridi eserciterebbero un effetto pressoché neutrale sul fegato (29), altri lipidi come diacilglicerolo e ceramidi svolgerebbero un ruolo cardine nella progressione da steatosi semplice (NAFL) a NASH e fibrosi (30-31).

### Il tessuto adiposo

In condizione di eccesso calorico cronico, alterazioni a carico del tessuto adiposo e dell'asse entero-epatico produrrebbero effetti decisivi per lo sviluppo di NAFLD e NASH. Dati sperimentali suggeriscono che il tessuto adiposo, quando esposto ad un eccesso energetico cronico, va incontro a complessi processi reattivi caratterizzati inizialmente da una

fase di plasticità, con ipertrofia adipocitaria funzionale all'immagazzinamento dei lipidi in eccesso. Successivamente, lo stress tissutale reiterato può dare luogo a fenomeni di ipossia per la riduzione della tensione di ossigeno all'interno di adipociti aumentati di volume e insufficiente neoangiogenesi, con produzione e rilascio di fattore indotto dall'ipossia HIF-1, necrosi e piroptosi adipocitaria, alterato metabolismo lipidico e rapporto tra LPL e ANGPTL4 (32), infiammazione locale sostenuta dal rilascio di IL6, TNF- $\alpha$ , WISP1 (33) fibrosi e rimodellamento (34-37). Questi fenomeni morfo-funzionali limitano la capacità del tessuto adiposo di immagazzinare i lipidi e si accompagnano al rilascio di FFA e citochine pro-infiammatorie nel circolo ematico, con esacerbazione dell'insulino-resistenza locale e sistemica e deposito di lipidi in sedi ectopiche, come appunto il parenchima epatico (38-39).

### L'intestino

Alterazioni della permeabilità intestinale, squilibri a carico di metaboliti e del microbiota intestinale legati all'obesità e ad una dieta sbilanciata, possono essere associati allo sviluppo di insulino-resistenza, DT2 (40) e progressione di NAFLD e NASH, attraverso meccanismi diretti ed indiretti (41). Oltre a correlarsi con la presenza di endotossinemia, le alterazioni del microbiota intestinale si associano ad uno squilibrio di metaboliti intestinali, ridotta produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA), modulatori positivi della sensibilità insulinica, alterato rapporto tra acidi biliari. Una aberrante secrezione di peptidi intestinali può essere alla base di una aumentata predisposizione allo sviluppo di DT2, ma anche di NAFLD in corso di obesità. Questo è il caso della neurotensina (NT), una molecola secreta dalle cellule neuroendocrine intestinali in risposta all'ingestione di lipidi, di cui facilita l'assorbimento, causando un aumento della trigliceridemia post-prandiale, oltre a fenomeni infiammatori e di proliferazione cellulare (42-43). Aumentati livelli circolanti del peptide stabile pro-NT predicono lo sviluppo di obesità, DT2, cancro e si associano ad aumento della mortalità cardiovascolare e per tutte le cause in ampi studi longitudinali. Studi condotti dal nostro gruppo hanno recentemente dimostrato, inoltre, l'esistenza di una stretta associazione tra pro-NT circolante e presenza e severità di NAFLD e NASH (43), oltre che di disfunzione del tessuto adiposo (44) sia in pazienti obesi che in individui normopeso, indipendentemente dalla presenza di fattori di rischio noti.

Pertanto, appare evidente come alla base dello sviluppo di DT2 e NAFLD vi sia non soltanto un comune substrato di insulino-resistenza, ma anche l'alterazione della omeostasi di organi ed apparati, come il tessuto adiposo e l'intestino, che giocano un ruolo essenziale nella regolazione metabolica e che possono incidere in maniera preponderante nella manifestazione clinica e nella progressione di queste due entità patologiche. Pertanto, la conoscenza dei meccanismi alla base delle alterazioni metaboliche di questi sistemi biologici rappresenta un punto di partenza irrinunciabile per lo sviluppo di strategie terapeutiche integrate volte a contrastare lo sviluppo e l'evoluzione della NAFLD.

### SCREENING E DIAGNOSI DI NAFLD: DALLE LINEE GUIDA AI NUOVI ALGORITMI DIAGNOSTICI

Numerosi studi trasversali e longitudinali hanno dimostrato che i pazienti con diabete e coesistente NAFLD presentano un maggior rischio di sviluppare malattia cardiovascolare (45), malattia renale cronica (46) ed eventi cardiovascolari maggiori (14), indipendentemente da altri fattori di rischio. A sua volta, la presenza di diabete di per sé si associa ad una maggior progressione della NAFLD verso forme istologicamente più severe (NASH, cirrosi e epatocarcinoma) ed è stato stimato che i soggetti con diabete hanno una prevalenza di fibrosi avanzata e cirrosi che è almeno tre volte superiore rispetto a quanto riscontrato negli individui senza diabete (47-48). A tal proposito è importante ricordare che la presenza e severità della fibrosi, indipendentemente da qualsiasi altra caratteristica istologica, predice la mortalità dei soggetti affetti da NAFLD e rappresenta il più importante predittore di esito a lungo termine (49).

Pertanto, è di grande importanza per lo specialista diabetologo poter identificare mediante screening mirato la presenza di NAFLD nei pazienti con sindrome metabolica e/o DT2, in modo da giungere ad una diagnosi precoce di NASH e identificarla prima che evolva in stadi avanzati. A questo proposito, esiste ampio consenso a livello internazionale sulla necessità di eseguire uno screening accurato per NAFLD/NASH nei soggetti con diabete (50-53).

### Metodiche diagnostiche di NAFLD/NASH

Secondo le linee guida nazionali ed internazionali dell'AISF, EASL ed AASLD, l'esame *gold standard* per la diagnosi e stadiazione di NASH è la biopsia epatica (51-53), in quanto rappresenta l'unica metodica in grado di fornire informazioni accurate in merito al grado di steatosi, necro-infiammazione e fibrosi. La biopsia epatica è però un metodo diagnostico invasivo non utilizzabile come strumento di screening su ampie popolazioni a causa dei costi elevati e di una serie di questioni etiche legate al rischio non trascurabile di complicanze, seppur di incidenza limitata (globale 0.75%; ospedalizzazione 0.51%; sanguinamento 0.35%) (54), e potenziali errori di campionamento dovuti all'accessibilità del tessuto. Nella pratica clinica, metodiche non invasive, soprattutto se utilizzate in modo combinato, consentono di identificare con buona sensibilità soggetti affetti da NASH, e di individuare coloro a maggior rischio di progressione della malattia (55).

In questo ambito vengono presi in considerazione due approcci complementari, uno basato sulla valutazione di biomarcatori ematici, l'altro su metodiche radiologiche che stimano la rigidità del parenchima epatico ("stiffness") tramite tecniche elastografiche in corso di ecografia o di risonanza magnetica (56).

In merito alle tecniche di *imaging*, l'ecografia epatica ha un'ottima accuratezza diagnostica per definire la presenza di steatosi di grado moderato, è un'indagine poco costosa e può aiutare ad escludere altre patologie epatiche e ad identificare eventuali segni precoci di cirrosi ed ipertensione portale. Presenta però dei limiti, in quanto è operatore-dipendente e non è in grado di differenziare la steatosi semplice dalla NASH e ha una bassa sensibilità per gradi di steatosi con interessamento inferiore al 20% del parenchima epatico. Maggior sensibilità ed accuratezza sono garantite invece da metodiche di *imaging* superiori, come l'elastografia, in quanto essa permette di misurare la rigidità epatica, mediante *Fibroscan* o mediante ecografia con metodica *Acoustic Radiation Force Impulse* (ARFI) (57-58) e di ottenere una significativa stima del grado di steatosi e di fibrosi, con un buon livello di correlazione con il dato istologico (59), a discapito di costi più elevati e minor fruibilità della metodica.

Differentemente, il dosaggio sierico degli enzimi epatici, molto utilizzato nella pratica clinica, non fornisce indicazioni specifiche sul coinvolgimento del fegato in corso di malattia metabolica ed è poco sensibile per l'identificazione della NASH (17, 60-1). Visto lo scarso potere predittivo di presenza e severità di NAFLD e della incapacità di predire la presenza di fibrosi epatica, il dosaggio sierico delle transaminasi non dovrebbe essere utilizzato come esclusivo strumento di screening e di monitoraggio, ma piuttosto inserito in un contesto di indagini strumentali e score validati. Nello specifico, alcuni score clinici risultanti dall'elaborazione di parametri clinici e biochimici valutati di routine nella pratica ambulatoriale, permettono di escludere la presenza di fibrosi epatica avanzata con buona accuratezza diagnostica (62).

Uno degli indici più in uso in quanto maggiormente predittivo di fibrosi è il Fibrosis-4 Index (FIB-4), un indice basato su età, piastrine, aspartato aminotransferasi (AST) e alanina aminotransferasi (ALT) (63) validato inizialmente in pazienti con infezione da virus dell'epatite C (63-64) e successivamente in ampie coorti di soggetti con NASH (65-67).

Simile al FIB-4 per caratteristiche ed accuratezza diagnostica, è il NAFLD Fibrosis Score (NFS), che prende in considerazione non solo l'età, le piastrine e il rapporto AST/ALT, ma anche i livelli di albumina, l'indice di massa corporea e la presenza di diabete (68). Il NFS è stato estensivamente valutato per l'esclusione di fibrosi epatica avanzata nei pazienti con NAFLD e si è dimostrato in grado di predire eventi clinici a lungo termine a livello epatico, oltre che mortalità totale (68) in ampi studi epidemiologici, sebbene per le sue caratteristiche non mostri una accuratezza ottimale nelle popolazioni con diabete (69).

Indicatori più semplici, come il rapporto AST/ALT e l'AST/platelet ratio index (APRI), mostrano una accuratezza diagnostica discreta e comunque migliore della semplice misurazione delle transaminasi nell'identificazione di NAFLD (70). Sono stati inoltre validati una serie di indicatori che prevedono l'impiego di biomarcatori più specifici per fibrosi e quindi scarsamente utilizzati nella pratica clinica, tra questi possiamo citare l'*Enhanced Liver Fibrosis* (ELF) (71), l'*Hepa-score* (72) e il *FibroTest* (73).

In accordo con gli Standard di Cura Italiani SID-AMD, le linee guida europee redatte da EASD/EASO/EASL e il recente update degli Standard di Cura dell'American Diabetes Association (51-53), il diabetologo dovrebbe sottoporre a screening per la presenza di NAFLD i pazienti con DT2 ogni due anni, attraverso dosaggio delle transaminasi sieriche ed ecografia epatica.

Nei pazienti diabetici con NAFLD deve essere esclusa periodicamente la progressione in fibrosi mediante l'uso di score non invasivi, in particolare il FIB-4, per il cui calcolo sono spesso disponibili tutti i dati necessari in cartella diabetologica.

Nelle situazioni in cui i risultati delle metodiche non invasive siano suggestive di evoluzione fibrotica, il paziente potrà essere inviato allo specialista epatologo che valuterà l'opportunità di approfondire l'iter diagnostico mediante elastografia ed eventualmente porre indicazione all'esecuzione di biopsia epatica.

## IL DIABETOLOGO, TRA IDENTIFICAZIONE, MONITORAGGIO E TRATTAMENTO DELL'EPIDEMIA DI NAFLD

Alla luce di quanto emerge dai dati epidemiologici e in relazione agli esiti clinici sfavorevoli cui il paziente con diabete è esposto in presenza di NAFLD/NASH, appare evidente come la patologia epatica in corso di malattia metabolica debba essere considerata a tutti gli effetti una complicanza vera e propria del diabete, oltre che un fattore di rischio per l'insorgenza di DT2 e delle sue complicanze sia micro- sia macrovascolari.

La sovrapposizione epidemiologica, il forte nesso patogenetico e pertanto anche la parziale condivisione di potenziali strategie terapeutiche permettono di inquadrare sempre più la NAFLD come una patologia correlata alla disfunzione metabolica. Questa consapevolezza, che si rafforza costantemente grazie alla sempre più vasta produzione di dati scientifici in questa direzione, ha indotto negli ultimi tempi gruppi di esperti internazionali a proporre un cambiamento di nomenclatura della patologia stessa, sostituendo la definizione "per esclusione" di NAFLD, con la dicitura ben più specifica di MAFLD, *Metabolic (Dysfunction) Associated Fatty Liver Disease* (74-75).

Questa dicitura pone l'accento sulla necessità della compresenza di sovrappeso/obesità o DT2 per porre diagnosi di MAFLD in presenza di riscontro ecografico di steatosi epatica, o richiede la presenza di almeno due alterazioni metaboliche, anche subcliniche, nei soggetti normopeso che non presentino una diagnosi di diabete.

È quindi evidente come il paradigma della gestione e del trattamento della NAFLD ponga sempre di più il diabetologo in un ruolo centrale. Ruolo che è rafforzato, inoltre, dalla presenza di evidenze promettenti su una efficacia dei nuovi trattamenti antidiabetici nel miglioramento della steatosi, infiammazione e fibrosi nei pazienti con DT2 e NAFLD/NASH. Sebbene infatti non sia stata ancora identificata una terapia validata per la NAFLD, e dieta e cambiamento dello stile di vita rappresentino gli unici interventi ad oggi in grado di indurre regressione della NASH nell'ambito di studi clinici controllati, agenti come tiazolidinedioni, agonisti recettoriali del GLP-1 e gliflozine hanno mostrato iniziali dati di efficacia e sicurezza nella terapia della NAFLD/NASH, mediante meccanismi diretti ed indiretti.

In conclusione, i dati a disposizione sulla fisiopatologia e diffusione della NAFLD, insieme alle evidenze sulle sue conseguenze epatiche e cardio-metaboliche, evidenziano come il diabetologo possa rappresentare una figura centrale nella identificazione e nella gestione multidisciplinare del paziente ad alto rischio di NAFLD, quella che ora siamo chiamati a riconoscere, e non solo a definire, come patologia epatica associata alla malattia metabolica.

## BIBLIOGRAFIA

1. 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* 64: 73-84, 2016.
2. Younossi ZM, Golabi P, de Avila L, Paik JM, Srishord M, Fukui N, Qiu Y, Burns L, Afendy A, Nader F. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J. Hepatol* 71, 793-801, 2019.
3. Mantovani A, Scorletti E, Mosca A, Alisi A, Byrne CD, Targher G. Complications, morbidity and mortality of nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 111, 154170, 2020.

4. Petersen KE, Dufour S, Feng J, Befroy D, Dziura J, Dalla Man C, Cobelli C, Shulman GI. Increased prevalence of insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in Asian-Indian men. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 18273-18277, 2006.
5. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 114, 147-152, 2004.
6. Byrne CD, Targher G. NAFLD: a multisystem disease. *J Hepatol* 62: S47-64, 2015.
7. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 40: 1387-1395, 2004.
8. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15: 11-20, 2018.
9. Angelico F, Del Ben M, Conti R, Francioso S, Feole K, Fiorello S, Cavallo MG, Zalunardo B, Lirussi F, Alessandri C, Violi F. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 90(3): 1578-1582, 2005.
10. Younossi ZM, Gramlich T, Matteoni CA, Boparai N, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2: 262-5, 2004.
11. Hossain N, Afendy A, Stepanova M, Nader F, Srishord M, Rafiq N, et al. Independent predictors of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 7: 1224-1229, 1229.e1-2, 2009.
12. Stepanova M, Rafiq N, Makhlof H, Agrawal R, Kaur I, Younoszai Z, et al. Predictors of allcause mortality and liver-related mortality in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Dig Dis Sci* 58: 3017-3023, 2013.
13. Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi E, Andreoletti M, Colli A, Vanni E, et al. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. *Hepatology* 48: 792-798, 2008.
14. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Tessari R, Zenari L, Day C, Arcaro G. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 30: 1212-1218, 2007.
15. Williamson RM, Price JF, Glancy S, Perry E, Nee LD, Hayes PC, Frier BM, Van Look LA, Johnston GI, Reynolds RM, Strachan MW; Edinburgh Type 2 Diabetes Study Investigators. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis and nonalcoholic fatty liver disease in people with type 2 diabetes: the Edinburgh Type 2 Diabetes Study. *Diabetes Care* 34: 1139-1144, 2011.
16. Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, Landt CL, Harrison SA. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology* 140: 124-131, 2011.
17. Portillo-Sanchez P, Bril F, Maximos M, Lomonaco R, Biernacki D, Orsak B, et al. High Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Normal Plasma Aminotransferase Levels. *J Clin Endocrinol Metab* 100: 2231-2238, 2015.
18. Jimba S, Nakagami T, Takahashi M, Wakamatsu T, Hirota Y, Iwamoto Y, Wasada T. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with impaired glucose metabolism in Japanese adults. *Diabet Med* 22: 1141-1145, 2005
19. Lonardo A, Nascimbeni F, Maurantonio M, et al. *Non-alcoholic fatty liver disease: evolving paradigms*. *World J Gastroenterol* 23: 6571-6592, 2017.
20. Noureddin M, Yates KP, Vaughn IA, et al. NASH CRN. Clinical and histological determinants of nonalcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis in elderly patients. *Hepatology* 58: 1644-1654, 2013.
21. Lazo M, Hernaez R, Eberhardt MS, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the United States: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Am J Epidemiol* 178: 38-45, 2013.
22. Golabi P, Paik J, Reddy R, et al. Prevalence and long-term outcomes of nonalcoholic fatty liver disease among elderly individuals from the United States. *BMC Gastroenterol* 19: 56, 2019.
23. Younossi ZM, Golabi P, de Avila L, et al. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 71: 793-801, 2019.
24. Estes C, Razavi H, Loomba R, et al. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology* 67: 123-133, 2018.

25. Park SH, Jeon WK, Kim SH, et al. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease among Korean adults. *J Gastroenterol Hepatol* 21: 138-143, 2006.
26. Alam S, Fahim SM, Chowdhury MAB, et al. Prevalence and risk factors of nonalcoholic fatty liver disease in Bangladesh. *JGH Open* 2: 39-46, 2018.
27. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, Forlani G, Melchionda N. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 107(5): 450-455, 1999.
28. Gastaldelli A, Cusi K, Pettiti M, Hardies J, Miyazaki Y, Berria R, Buzzigoli E, Sironi AM, Cersosimo E, Ferrannini E, De-fronzo RA. Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Gastroenterology* 133(2): 496-506, 2007.
29. Liao W, Hui TY, Young SG, Davis RA. Blocking microsomal triglyceride transfer protein interferes with apoB secretion without causing retention or stress in the ER. *J Lipid Res* 44, 978-985, 2003.
30. Yamaguchi K. et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 45, 1366-1374, 2007.
31. Roden M, Shulman GI, The integrative biology of type 2 diabetes. *Nature* 576, 51-60, 2019.
32. Barchetta I, Chiappetta C, Ceccarelli V, Cimini FA, Bertocchini L, Gaggini M, Cristofano CD, Silecchia G, Lenzi A, Leonetti F, Baroni MG, Gastaldelli A, Cavallo MG. Angiopoietin-Like Protein 4 Overexpression in Visceral Adipose Tissue from Obese Subjects with Impaired Glucose Metabolism and Relationship with Lipoprotein Lipase. *Int J Mol Sci* 21(19): 7197, 2020.
33. Barchetta I, Cimini FA, Capoccia D, De Gioannis R, Porzia A, Mainiero F, Di Martino M, Bertocchini L, De Bernardinis M, Leonetti F, Baroni MG, Lenzi A, Cavallo MG. WISP1 Is a Marker of Systemic and Adipose Tissue Inflammation in Dysmetabolic Subjects With or Without Type 2 Diabetes. *J Endocr Soc* 1(6): 660-670, 2017.
34. Spalding KL, Bernard S, Näslund E, Salehpour M, Possnert G, Appelsved L, Fu KY, Alkass K, Druid H, Thorell A, Rydén M, Arner P. Impact of fat mass and distribution on lipid turnover in human adipose tissue. *Nat Commun.* 8, 15253, 2017.
35. Skurk T, Mack I, Kempf K, Kolb H, Hauner H, Herder C. Expression and secretion of RANTES (CCL5) in human adipocytes in response to immunological stimuli and hypoxia. *Horm Metab Res* 2009 Mar;41(3): 183-189.
36. Giordano A, Murano I, Mondini E, Perugini J, Smorlesi A, Severi I, Barazzoni R, Scherer PE, Cinti S. Obese adipocytes show ultrastructural features of stressed cells and die of pyroptosis. *J Lipid Res* 54(9): 2423-2436, 2013.
37. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, Furukawa S, Tochino Y, Komuro R, Matsuda M, Shimomura I. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* 56(4): 901-911, 2007.
38. du Plessis J, van Pelt J, Korf H, Mathieu C, van der Schueren B, Lannoo M, Oyen T, Topal B, Fetter G, Nayler S, van der Merwe T, Windmolders P, Van Gaal L, Verrijken A, Hubens G, Gericke M, Cassiman D, Francque S, Nevens F, van der Merwe S. Association of Adipose Tissue Inflammation With Histologic Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 149(3): 635-48.e14, 2015.
39. Cimini FA, Barchetta I, Ciccarelli G, Leonetti F, Silecchia G, Chiappetta C, Di Cristofano C, Capoccia D, Bertocchini L, Ceccarelli V, Carletti R, Fraioli A, Baroni MG, Morini S, Cavallo MG. Adipose tissue remodelling in obese subjects is a determinant of presence and severity of fatty liver disease. *Diabetes Metab Res Rev* 37(1):e3358, 2021.
40. Salamone D, Rivellese AA, Vetrani C. The relationship between gut microbiota, short-chain fatty acids and type 2 diabetes mellitus: the possible role of dietary fibre. *Acta Diabetol* 2021.
41. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 52(5): 1836-1846, 2010.
42. Fawad A, Fernandez C, Bergmann A, Struck J, Nilsson PM, Bennet L, Orho-Melander M, Melander O. Magnitude of rise in proneurotensin is related to amount of triglyceride appearance in blood after standardized oral intake of both saturated and unsaturated fat. *Lipids Health Dis* 19(1): 191, 2020.

43. Barchetta I, Cimini FA, Leonetti F, Capoccia D, Di Cristofano C, Silecchia G, Orho-Melander M, Melander O, Cavallo MG. Increased Plasma Proneurotensin Levels Identify NAFLD in Adults With and Without Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 103(6): 2253-2260, 2018.
44. Barchetta I, Cimini FA, Capoccia D, Bertocchini L, Ceccarelli V, Chiappetta C, Leonetti F, Di Cristofano C, Silecchia G, Orho-Melander M, Melander O, Cavallo MG. Neurotensin Is a Lipid-Induced Gastrointestinal Peptide Associated with Visceral Adipose Tissue Inflammation in Obesity. *Nutrients* 10(4): 526, 2018.
45. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Tessari R, Zenari L, Day C, Arcaro G. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 30: 1212-1218, 2007.
46. Targher G, Bertolini L, Rodella S, Zoppini G, Lippi G, Day C, Muggeo M. Non-alcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased prevalence of chronic kidney disease and proliferative/laser-treated retinopathy in type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 51: 444-450, 2008.
47. Zoppini G, Fedeli U, Gennaro N, Saugo M, Targher G, Bonora E. Mortality from chronic liver diseases in diabetes. *Am J Gastroenterol* 109: 1020-1025, 2014.
48. Adams LA, Harmsen S, St Sauver JL, Charatcharoenwitthaya P, Enders FB, Therneau T, Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease increases risk of death among patients with diabetes: a community-based cohort study. *Am J Gastroenterol* 105: 1567-1573, 2010.
49. Dulai PS, Singh S, Patel J, et al. Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis. *Hepatology* 65: 1557-1565, 2017.
50. Younossi ZM, Corey KE, Alkhoury N, et al. Clinical assessment for high-risk patients with non-alcoholic fatty liver disease in primary care and diabetology practices. *Aliment Pharmacol Ther* 52: 513-526, 2020.
51. Comprehensive Medical Evaluation and Assessment of Comorbidities: Standards of Medical Care in Diabetes-2021 American Diabetes Association *Diabetes Care* 44 (Supplement 1): S40-S52. <https://doi.org/10.2337/dc21-S004>, 2021.
52. European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO clinical practice guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 64: 1388-1402, 2016.
53. Standard Italiani per la Cura del Diabete Mellito 2018 <https://www.siditalia.it/clinica/standard-di-cura-amd-sid>.
54. Myers RP, Fong A, Shaheen AA. Utilization rates, complications and costs of percutaneous liver biopsy: A population-based study including 4275 biopsies. *Liver Int* 28: 705-712, 2008.
55. Younossi ZM, Noureddin M, Bernstein D, Kwo P, Russo M, Shiffman ML, Younes Z, Abdelmalek M. Role of Noninvasive Tests in Clinical Gastroenterology Practices to Identify Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis at High Risk of Adverse Outcomes: Expert Panel Recommendations. *Am J Gastroenterol*. 1; 116 (2): 254-262, 2021.
56. Xiao G, Zhu S, Xiao X, et al. Comparison of laboratory tests, ultrasound, or magnetic resonance elastography to detect fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A meta-analysis. *Hepatology* 66: 1486-1501, 2017.
57. Hsu C, Caussy C, Imajo K, et al. Magnetic resonance vs transient elastography analysis of patients with nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and pooled analysis of individual participants. *Clin Gastroenterol Hepatol* 17: 630-637, 2019.
58. Petzold G, Bremer SCB, Knoop RF, et al. Noninvasive assessment of liver fibrosis in a real-world cohort of patients with known or suspected chronic liver disease using 2D-shear wave elastography. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 32: 1559-1565, 2020.
59. Newsome PN, Sasso M, Deeks JJ, et al. FibroScan-AST (FAST) score for the non-invasive identification of patients with non-alcoholic steatohepatitis with significant activity and fibrosis: A prospective derivation and global validation study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 5: 362-373, 2020.
60. Verma S, Jensen D, Hart J, et al. Predictive value of ALT levels for non- alcoholic steatohepatitis (NASH) and advanced fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Liver Int* 33: 1398-1405, 2013.
61. Mofrad P, Contos MJ, Haque M, et al. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology* 37: 1286-1292, 2003.

62. Boursier J, Guillaume M, Leroy V, et al. New sequential combinations of non-invasive fibrosis tests provide an accurate diagnosis of advanced fibrosis in NAFLD. *J Hepatol* 71: 389-396, 2019.
63. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/ HCV coinfection. *Hepatology* 43: 1317-1325, 2006.
64. Vallet-Pichard A, Mallet V, Nalpas B, et al. FIB-4: An inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. Comparison with liver biopsy and fibrotest. *Hepatology* 46: 32-36, 2007.
65. Shah AG, Lydecker A, Murray K, et al. Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 7: 1104-1112, 2009.
66. Vilar-Gomez E, Chalasani N. Non-invasive assessment of non-alcoholic fatty liver disease: Clinical prediction rules and blood-based biomarkers. *J Hepatol* 68: 305-315, 2018.
67. Anstee QM, Lawitz EJ, Alkhoury N, et al. Noninvasive tests accurately identify advanced fibrosis due to NASH: Baseline data from the STELLAR trials. *Hepatology* 70: 1521-1530, 2019.
68. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, et al. The NAFLD fibrosis score: A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology* 45: 846-854, 2007.
69. Patel P, Hossain F, Horsfall LU, et al. A pragmatic approach identifies a high rate of nonalcoholic fatty liver disease with advanced fibrosis in diabetes clinics and at-risk populations in primary care. *Hepatol Commun* 2: 893-905, 2018.
70. Wai CT, Greenon JK, Fontana RJ, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 38: 518-526, 2003.
71. Stauber RE, Staufer K, Stift J, et al. Enhanced liver fibrosis (ELF) score accurately detects advanced fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *J Hepatol* 68 (Suppl 1): S563, 2018.
72. Adams LA, Bulsara M, Rossi E. et al. Hepascore: An accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. *Clin Chem* 51: 1867-1873, 2005.
73. Poynard T, Morra R, Halfon P, et al. Meta-analyses of FibroTest diagnostic value in chronic liver disease. *BMC Gastroenterol* 7: 40, 2007.
74. Tilg H, Effenberger M. From NAFLD to MAFLD: when pathophysiology succeeds. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 17(7): 387-388, 2020.
75. Eslam M, George J. MAFLD: A holistic view to redefining fatty liver disease. *J Hepatol* 74(4): 983-985. doi: 10.1016/j.jhep.2020.12.027. Epub 2021 Jan 13. PMID: 33453330, 2021.

a cura di Marta Letizia Hribal

Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università Magna Graecia di Catanzaro

ARTICOLI SELEZIONATI E COMMENTATI

## Il Diabete n. 2/2021

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2102e>

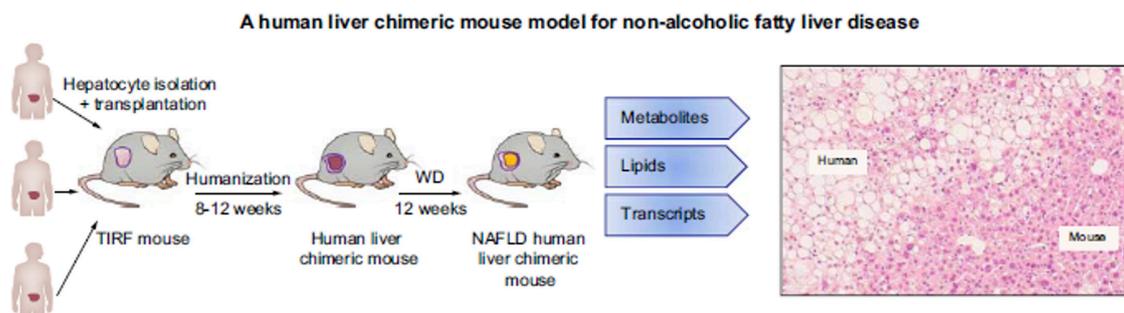
### A human liver chimeric mouse model for non-alcoholic fatty liver disease ● *Caratterizzazione di un nuovo modello sperimentale per lo studio della NAFLD*

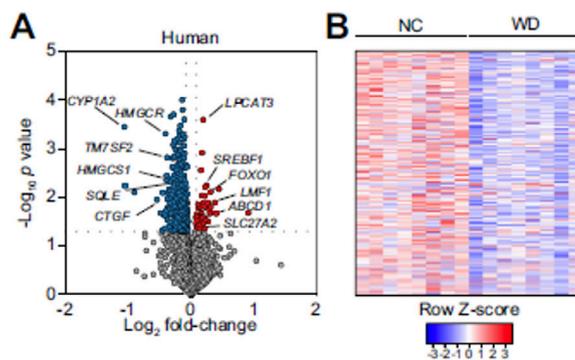
Beatrice Bissig-Choisat, Michele Alves-Bezerra, Barry Zorman, Scott A. Ochsner, Mercedes Barzi, Xavier Legras, Diane Yang, Malgorzata Borowiak, Adam M. Dean, Robert B. York, N. Thao N. Galvan, John Goss, William R. Lagor, David D. Moore, David E. Cohen, Neil J. McKenna, Pavel Sumazin, Karl-Dimiter Bissig  
 JHEP Reports 2021

Nonostante la ricerca, sia di base che clinica, nel campo della steatosi epatica non alcolica (NAFLD) sia estremamente attiva, come emerge chiaramente dai contributi raccolti in questo numero monotematico, non esiste allo stato attuale un modello animale che riproduca in modo pienamente soddisfacente tutte le caratteristiche della patologia umana. In questo studio, gli Autori hanno generato un topo chimerico, cercando di ottenere un buon modello di NAFLD in vivo. A tale scopo, come schematizzato in figura 1, hanno inizialmente generato un animale transgenico immunodeficiente nel quale hanno impiantato epatociti umani, isolati da donatori sani.

Topi immunodeficienti TIRF sono stati sottoposti a trapianto di epatociti umani e dopo 8-12 settimane hanno iniziato ad assumere una dieta ad elevato contenuto di grassi e zuccheri semplici (WD) per altre 12 settimane.

**Figura 1** ♦ Rappresentazione schematica della generazione del modello chimerico di NAFLD



**Figura 2** ♦ Risultati dell'analisi del profilo trascrizionale

Il modello così generato è stato poi sottoposto ad una dieta ad elevato contenuto di lipidi e di zuccheri semplici (Western Diet, WD) per 12 settimane. Durante il periodo di trattamento, gli animali che assumevano WD non hanno preso più peso o mostrato alterazioni degli enzimi epatici o della glicemia rispetto ad animali di controllo nutriti con una dieta standard (NC). I livelli di colesterolo mostravano invece un aumento significativo. Per valutare il numero di epatociti umani presenti, sono stati valutati i livelli circolanti di albumina umana, utilizzando un saggio specie-specifico; tali livelli si riducevano da 4,8 mg/ml a 2,2 mg/ml negli animali del gruppo WD ad indicare che la dieta ad elevato contenuto di grassi e zuccheri era associata a distruzione degli epatociti di origine umana. L'analisi immunoistochimica delle biopsie epatiche, ottenute al termine del trattamento, mostrava inoltre presenza di depositi lipidici negli epatociti umani, mentre quelli murini mantenevano una morfologia normale. Per confermare a livello molecolare la corrispondenza tra il modello murino e le caratteristiche metaboliche della patologia umana, i ricercatori hanno condotto inoltre un'analisi metabolomica dei sieri degli animali chimerici sottoposti o meno a WD. La WD causava un aumento dei livelli di 48 metaboliti, tra cui colesterolo, 4-cholestenone (un intermedio della sintesi degli acidi biliari) e alfa-tocoferolo. Per 59 metaboliti analizzati si riscontrava invece una significativa riduzione negli animali del gruppo WD; tra questi metaboliti erano compresi gli acidi grassi polinsaturi (PUFA). Tali variazioni risultano sovrapponibili a quelle osservate nel siero di pazienti con NAFLD. L'esame del profilo trascrizionale degli epatociti chimerici mostrava inoltre come i geni espressi dagli epatociti umani fossero significativamente differenti rispetto a quelli presenti negli epatociti murini, la WD causava inoltre alterazioni trascrizionali evidenti negli epatociti umani (Fig. 2).

Nel pannello B sono riassunte le differenze osservate tra gli epatociti di animali a dieta normale (NC) e quelli di animali a dieta con elevato contenuto di lipidi e zuccheri semplici (WD), mentre nel pannello A sono riportati i trascritti per i quali si osservavano le variazioni maggiormente significative.

Alcune delle alterazioni maggiormente significative si osservavano a livello del pathway biosintetico del colesterolo; anche tali alterazioni risultano perfettamente sovrapponibili con quelle caratteristiche della NAFLD umana.

Il topo chimerico generato in questo studio sembra quindi presentare caratteristiche ottimali per poter essere utilizzato quale modello sperimentale nello studio della NAFLD. Oltre ai limiti tecnici legati alla complessità del modello, è necessario però porre attenzione al fatto che i topi sottoposti a WD non sviluppavano obesità o alterazioni del profilo lipidico; nonostante anche nell'uomo i casi di NAFLD in soggetti normopeso non siano infrequenti, la patologia si sviluppa però comunemente in individui affetti da sindrome metabolica, che presentano obesità e dislipidemia e questa differenza potrebbe quindi limitare la validità dei risultati ottenuti, a maggior ragione in considerazione del fatto che non sono chiare le ragioni alla base del mancato aumento di peso corporeo nel modello sperimentale.

Nonostante questo importante limite, il modello generato da Bissig-Choisat e colleghi potrà sicuramente rappresentare un importante strumento per lo studio dei meccanismi patogenetici delle NAFLD e per condurre studi preclinici sull'efficacia di possibili trattamenti di tale patologia.

*In questo numero monotematico abbiamo selezionato per la Rubrica relativa ai “Journal Club” commenti a tema. Troverete a seguire i commenti con il maggior numero di visualizzazioni sull’argomento, commentati nell’ambito di diverse aree tematiche nel corso dell’ultimo anno.*

### **Aspetti molecolari nella patogenesi del diabete di tipo 2**

#### **L’assenza di KLF10 nei linfociti CD4+T induce obesità, insulino-resistenza e steatosi epatica - A cura di Francesco Oriente**

Wara AK, Wang S, Wu C, Fang F, Haemmig S, Weber BN, Aydogan CO, Tesmenitsky Y, Aliakbarian H, Hawse JR, Subramaniam M, Zhao L, Sage PT, Tavakkoli A, Garza A, Lynch L, Banks AS, Feinberg MW. KLF10 Deficiency in CD4+ T Cells Triggers Obesity, Insulin Resistance, and Fatty Liver. *Cell Rep* 33(13): 108550, 2020.

Link al commento del Journal Club: KLF10 Deficiency in CD4+ T Cells Triggers Obesity, Insulin Resistance, and Fatty Liver ([siditalia.it](http://siditalia.it))

### **Mortalità, tumori ed altri tipi di danno d’organo**

#### **Diabete ed epatopatia... un connubio sempre indigesto! - A cura di Agostino Milluzzo e Laura Sciacca**

Yang JD, Ahmed F, Mara KC, Addissie BD, Allen AM, Gores GJ, Roberts LR. Diabetes is Associated with Increased Risk of Hepatocellular Carcinoma in Cirrhosis Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology* 71(3): 907-916, 2020.

Link al commento del Journal Club: Diabetes is Associated with Increased Risk of Hepatocellular Carcinoma in Cirrhosis Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease ([siditalia.it](http://siditalia.it))

### **Obesità e tessuto adiposo**

#### **I GLP1-RA: oltre la glicemia, l’obesità e le complicanze cardiovascolari - A cura di Sebastio Perrini**

Newsome PN, Buchholtz K, Cusi K, Linder M, Okanou T, Ratziu V, Sanyal AJ, Sejling AS, Harrison SA. NN9931-4296 Investigators. A Placebo-Controlled Trial of Subcutaneous Semaglutide in Nonalcoholic Steatohepatitis. *N Engl J Med* 384(12): 1113-1124, 2021.

Link al commento del Journal Club: A Placebo-Controlled Trial of Subcutaneous Semaglutide in Nonalcoholic Steatohepatitis ([siditalia.it](http://siditalia.it))

### **Terapia del diabete: dieta e farmaci**

#### **SGLT-2 inhibitors: cuore, rene e fegato? - A cura di Matteo Monami**

Sinha B, Datta D, Ghosal S. Meta-analysis of the effects of sodium glucose cotransporter 2 inhibitors in non-alcoholic fatty liver disease patients with type 2 diabetes. *JGH Open* 5(2): 219-227, 2020.

Link al commento del Journal Club: Meta-analysis of the effects of sodium glucose cotransporter 2 inhibitors in non-alcoholic fatty liver disease patients with type 2 diabetes ([siditalia.it](http://siditalia.it))

a cura di Lorella Marselli

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Pisa

## Biomarcatori clinici e molecolari per la diagnosi e la stadiazione della NAFLD

Alessandra Scamporrino, Stefania Di Mauro, Agnese Filippello, Francesco Purrello, Salvatore Piro

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Catania

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2102f>

### INTRODUZIONE

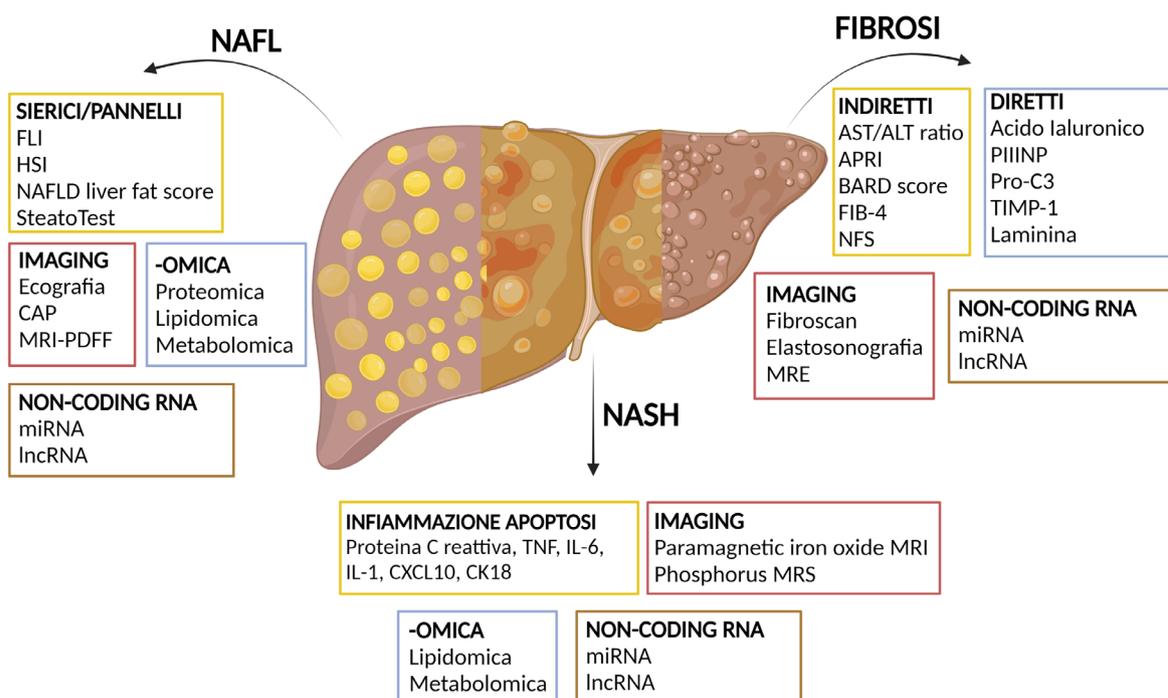
La steatosi epatica non alcolica (NAFLD, *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*) è l'epatopatia cronica più comune dei paesi industrializzati ed è associata ad un incremento della morbilità e mortalità (1). Si stima che la NAFLD colpisca circa il 25% della popolazione generale (2) anche se la reale prevalenza non è del tutto nota a causa della mancanza di test diagnostici specifici e sensibili. La NAFLD comprende un ampio spettro di condizioni patologiche che vanno dalla semplice steatosi alla steatoepatite non alcolica (NASH, *Non-Alcoholic SteatoHepatitis*) con necro-infiammazione epatica e rapida progressione verso la fibrosi, la cirrosi e, infine, il carcinoma epatocellulare (HCC, *HepatoCellular Carcinoma*) (2-3). La diagnosi di NAFLD è una diagnosi di esclusione e la biopsia epatica è ancora oggi il *gold standard* per differenziare la steatosi semplice dalla NASH e per stadiale il grado di fibrosi. Data l'elevata prevalenza nella popolazione generale, la possibilità di progressione verso condizioni patologiche più gravi e l'impossibilità di applicare la biopsia epatica su larga scala a causa dei rischi connessi all'invasività della metodica, negli ultimi anni uno degli obiettivi principali della ricerca in campo epatologico, è stato quello di identificare nuovi biomarcatori non invasivi per differenziare la steatosi semplice dalla NASH e per stadiale la fibrosi.

In questo articolo ci proponiamo di analizzare sia i biomarcatori di *routine* impiegati nella pratica clinica che i nuovi potenziali biomarcatori per le diverse condizioni patologiche associate alla NAFLD, ovvero, la steatosi semplice (NAFL, *Non-Alcoholic Fatty Liver*), la NASH e la fibrosi focalizzando l'attenzione sui biomarcatori clinici o combinazioni di questi, biomarcatori di *imaging* fino ai biomarcatori ottenuti mediante metodiche -omiche (Fig. 1).

### BIOMARCATORI DI NAFL

La diagnosi di NAFL si basa sulla valutazione della presenza di steatosi epatica (steatosi  $\geq 5\%$  degli epatociti tramite analisi istologica o accumulo di trigliceridi intraepatico  $\geq 5\%$  tramite risonanza magnetica) e sull'esclusione della presenza di altre malattie epatiche (4). La diagnosi di NAFL è importante per iniziare una serie di valutazioni che determinino il grado della malattia. Per questo motivo nella pratica clinica sono stati sviluppati numerosi metodi non invasivi che tentano di sostituire la biopsia epatica per la diagnosi di NAFL (5-6). Questi si basano principalmente sullo sviluppo di biomarcatori e sulle metodiche di *imaging*.

Figura 1 ♦ Rappresentazione schematica dei principali biomarcatori circolanti nella NAFLD



Biomarcatori specifici per la NAFL (*Non-Alcoholic Fatty Liver*), per la NASH (*Non-Alcoholic SteatoHepatitis*) e per la fibrosi epatica. FLI (*Fatty Liver Index*); HSI (*Hepatic Steatosis Index*); CAP (*Controlled Attenuation Parameter*); MRI-PDFF (*Magnetic Resonance Imaging Proton Density Fat Fraction*); TNF (*Tumor Necrosis Factor*); IL-6 (*Interleukin 6*); IL-10 (*Interleukin 10*); CXCL10 (*C-X-C Motif Chemokine Ligand 10*); CK18 (*Cytokeratin 18*); APRI (*AST To Platelet Ratio Index*); FIB-4 (*Fibrosis 4*); NFS (*NAFLD Fibrosis Score*); PIIINP (*N-terminal type III collagen propeptide*); Pro-C3 (*C-terminal cleavage site of N-terminal type II collagen propeptide*); TIMP1 (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1*); MRE (*Magnetic Resonance Elastography*)

### Biomarcatori sierici e pannelli

In questi anni sono stati sviluppati numerosi indici e *score* per diagnosticare la steatosi epatica (7-8). FLI (*Fatty Liver Index*) comprende BMI, circonferenza vita, livelli sierici di trigliceridi e GGT (*Gamma-Glutamil Transferasi*). FLI ha un'accuratezza diagnostica moderata ( $AUC=0.84$ ) nel diagnosticare la presenza di grasso nel fegato come determinato dall'analisi strumentale ecografica (9), tuttavia risulta essere poco accurato nel distinguere i differenti gradi di steatosi epatica (10). HSI (*Hepatic Steatosis Index*) è un pannello di biomarcatori che include ALT/AST, BMI, sesso e presenza di diabete di tipo 2, anch'esso presenta un'accuratezza diagnostica moderata ( $AUC=0.81$ ) nel diagnosticare la presenza di steatosi epatica (11), questa accuratezza decrementa notevolmente nei bambini obesi ( $AUC=0.67$ ) (12). Inoltre come FLI è poco accurato nel distinguere i differenti gradi di steatosi epatica (10). Un metodo più accurato e sensibile che usa la spettroscopia con tecnica di risonanza magnetica (MRS) per determinare il contenuto di grasso nel fegato è il *NAFLD Liver Fat Score*, un algoritmo che considera diversi parametri: presenza di sindrome metabolica e diabete di tipo 2, insulinemia, AST, ALT/AST. Questo *score* ha una buona accuratezza per la diagnosi di steatosi, definita come presenza di grasso nel fegato  $\geq 5.6\%$  con un  $AUC$  di  $0.87$  (13), ma l'inclusione dell'insulinemia (che non è un test di *routine*) nella formula potrebbe limitare il suo utilizzo nell'ambito clinico. *SteatoTest* è un pannello che include parametri più specifici per diagnosticare la steatosi. Questo pannello è stato costruito usando la combinazione di sei componenti del *Fibrotest* ( $\alpha$ 2-macroglobulina, aptoglobina, apolipoproteina A1, GGT, bilirubina totale ed ALT) in aggiunta a BMI, colesterolo, trigliceridi, glicemia e viene aggiustato per età e sesso. *SteatoTest* mostra una moderata accuratezza nel predire la steatosi ottenuta da biopsia epatica ( $AUC=0.80$ ) (14). Questo test essendo molto costoso viene difficilmente utilizzato e come gli altri indici non riesce a distinguere i diversi gradi di steatosi.

### Biomarcatori di *imaging*

I metodi di *imaging* sono frequentemente utilizzati nella pratica clinica, in questi anni sono stati applicati anche alla NAFL. L'ecografia è il test comunemente utilizzato nei soggetti con sospetta NAFL per la sua facile reperibilità e per il basso costo. In una metanalisi è stato dimostrato che l'ecografia ha un'elevata accuratezza nel distinguere la steatosi moderata da severa (AUC=0.93) (15); tuttavia questa metodica presenta dei limiti: non è in grado di rilevare una steatosi inferiore al 20%, viene influenzata dalla presenza di fibrosi ed è osservatore-dipendente (5). CAP (*Controlled Attenuation Parameter*) determina il grado di steatosi misurando il livello di attenuazione degli ultrasuoni determinato dalla presenza di grasso epatico. È stato riportato che CAP ha un AUC di 0.82 nella diagnosi di qualsiasi grado steatosi vs non steatosi (16). CAP presenta dei limiti, una bassa sensibilità nella diagnosi di steatosi lieve ed è osservatore-dipendente. La risonanza magnetica (MRI) basata sulla densità protonica della frazione grassa (MRI-PDFF) è una metodica non invasiva di *imaging* che consente di mappare il grasso presente in tutto il fegato. MRI-PDFF è più precisa di CAP nel rilevare i diversi gradi di steatosi nei pazienti con NAFLD (AUC=0.99) (17), tuttavia è una metodica lunga, molto costosa e che richiede personale specializzato.

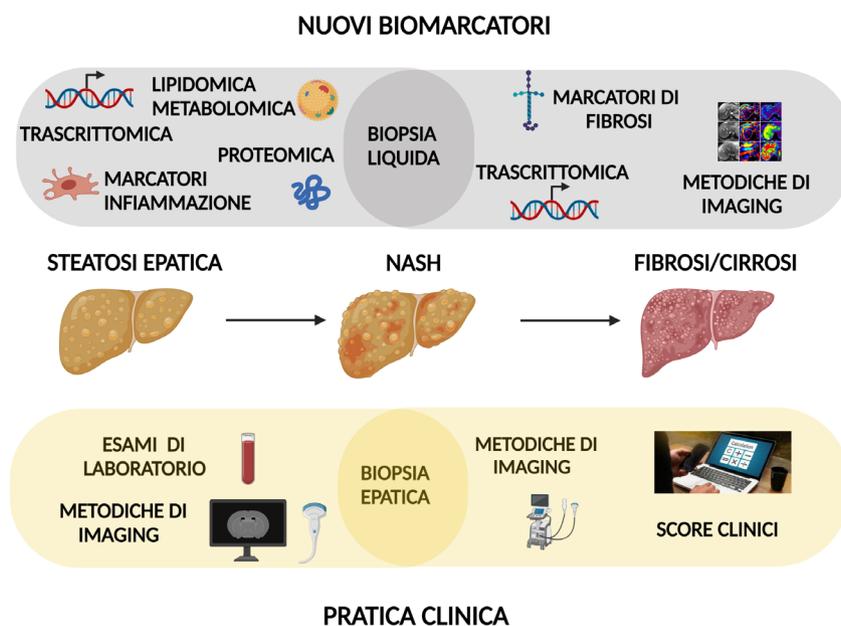
### Biomarcatori-omici

Lo sviluppo di nuove tecnologie basate sulle analisi massive ha permesso di identificare nuovi biomarcatori, che potrebbero essere utilizzati nella diagnosi di NAFL, attraverso la misurazione contemporanea di migliaia di molecole. La proteomica permette di analizzare più proteine simultaneamente utilizzando piccole quantità di fluidi biologici. Uno studio effettuato su 70 pazienti (35 controlli e 35 NAFL) ha identificato 20 picchi proteici differenzialmente espressi nei NAFL rispetto ai controlli (sensibilità 89% e specificità 83%), inoltre con questo approccio è stato evidenziato che i pazienti con NAFL avevano livelli di emoglobina basale più alti (18). In un altro studio usando una metodica di proteomica ancora più sensibile (LFQP) sono state identificate 605 proteine differenzialmente espresse nei pazienti NAFL, tuttavia questa tecnica falliva nel distinguere i pazienti con steatosi semplice dai NASH (19). La metabolomica è stata utilizzata per identificare dei sottotipi metabolici specifici della NAFL come gli acidi biliari ed il glutatione dove i loro livelli sierici si modificano in corso di NAFLD (20). Studi basati sulle tecniche di lipidomica hanno permesso di identificare variazioni nei livelli di alcuni lipidi come gli acidi grassi a catena corta e gli eicosanoidi (7); uno studio effettuato su 679 pazienti ha evidenziato un profilo lipidico specifico rappresentato da tre lipidi ("*lipid triplet*") in grado di diagnosticare la NAFL, tuttavia la *performance* diagnostica di questi biomarcatori era modesta (AUC=0.71-0.74) (21). I biomarcatori -omici potrebbero essere usati anche per monitorare la progressione della malattia e valutarne la severità, in una coorte di studio di 467 pazienti NAFLD sono stati identificati due pannelli di trigliceridi che erano in grado di discriminare sia tra soggetti NAFL e controlli (AUC=0.88) sia tra NAFL e NASH (AUC=0.79) (22). Queste metodiche presentano però dei limiti: questi studi mancano frequentemente di una validazione esterna, il numero di pazienti in cui vengono trovati i biomarcatori è limitato ed infine spesso falliscono nel discriminare i diversi gradi di steatosi e la sua progressione (Fig. 2).

### BIOMARCATORI DI NASH

I pazienti con la NASH presentano una maggiore probabilità di sviluppare cirrosi e di morire per cause cardiovascolari o per cause fegato-correlate (23), di conseguenza l'identificazione precoce dei pazienti con NASH e fibrosi all'interno dei pazienti NAFLD quando la patologia è ancora reversibile è di estrema importanza per poter ridurre la mortalità dei pazienti. Questa sfida clinica ha pertanto stimolato l'interesse allo sviluppo di test non-invasivi di diagnosi differenziale tra NAFL e NASH mediante l'identificazione di nuovi marcatori biochimici coinvolti in specifiche *pathway* di progressione da NAFL a NASH quali l'apoptosi, lo stress ossidativo, l'infiammazione e la deregolazione del *signalling* delle adipochine.

**Figura 2** ♦ Confronto tra le metodiche attualmente utilizzate nella pratica clinica ed i differenti campi della ricerca volti ad identificare nuovi biomarcatori non invasivi in grado di diagnosticare la steatosi semplice, la NASH e di studiare la fibrosi



### Biomarcatori proteici sierici o plasmatici associati all'apoptosi ed all'infiammazione

L'apoptosi gioca un ruolo fondamentale nel danno epatico che si osserva nella NASH, e la citocheratina 18 (CK-18), rappresenta un biomarcatore di tale processo. La CK-18 è infatti la principale proteina che costituisce dei filamenti intermedi degli epatociti, e nelle cellule che vanno incontro ad apoptosi viene clivata ad opera della caspasi 3, i frammenti di CK-18 vengono quindi rilasciati a livello extracellulare (24). I livelli sierici dei frammenti di CK-18 sono facilmente misurabili mediante saggio ELISA. Una metanalisi relativa a 11 studi ha evidenziato che la CK-18 presenta una sensibilità complessiva del 66% ed una specificità complessiva dell'82%; per cui la limitata accuratezza di questo biomarcatore ne impedisce l'applicazione clinica ai fini dello *screening* e della definizione di NASH (25). La CK-18 è stata combinata con altri indicatori per costituire dei pannelli di biomarcatori nel tentativo di incrementare l'efficienza diagnostica per la discriminazione dei pazienti NASH. I livelli sierici dei frammenti M30 della CK-18 sono stati combinati con i livelli sierici dell'antigene di superficie che media l'apoptosi sFAS, coinvolto nell'attivazione della via estrinseca dell'apoptosi negli epatociti. La combinazione di questi due *marker* ha determinato un incremento considerevole dell'accuratezza diagnostica raggiungendo un AUC di 0.79-0.93. Tuttavia lo studio è stato condotto su una numerosità campionaria ristretta, questo risultato necessita pertanto di ulteriori validazioni sperimentali (26). Younossi et al. hanno associato i livelli della CK-18 e dei suoi frammenti, al rilevamento dell'adiponectina e della resistina in una coorte di 101 pazienti ottenendo in questo modo valori di AUC tra 0.73 e 0.91; questo studio è stato condotto su un numero limitato di pazienti obesi per cui necessita di ulteriori validazioni (27). Un ulteriore studio ha dimostrato che la combinazione del *Fibroblast Growth Factor 12* (FGF12) e CK-18 determina il raggiungimento di valori di sensibilità e specificità superiori al 90% (28). La steatoepatite è associata ad uno stato di infiammazione cronica, diversi studi hanno proposto il dosaggio di indicatori di infiammazione quali la proteina C reattiva (PCR), TNF, IL-6, IL-1, IL-1RA (*receptor antagonist protein*), CXCL10 (CSC-*chemokine 10*). Tuttavia tali studi hanno portato a risultati discordanti ed inconsistenti ed a mancanza di specificità per la condizione di NASH (29). Ajmera et al. in una coorte di 648 pazienti con NAFLD accertata mediante biopsia hanno testato l'efficienza diagnostica di 32 *biomarker* plasmatici, tra cui diversi associati ad infiammazione. Tra i biomarcatori analizzati, a seguito di correzione per fattori clinici e metabolici solamente l'*Activated Plasminogen Activator Inhibitor* (APAI-1) manteneva il suo valore predittivo per la condizione di NASH (30).

### Biomarcatori-omici

Lo stress ossidativo è uno dei meccanismi chiave del danno epatico e porta alla formazione di prodotti di ossidazione dei lipidi che possono essere rilevabili nei campioni di siero.

Studi di lipidomica effettuati mediante l'impiego della spettrometria di massa hanno portato all'identificazione di specifici prodotti derivanti dall'ossidazione di acidi grassi associati alla NASH. In particolare sono stati identificati i prodotti dell'ossidazione dell'acido arachidonico, *11-hydroxyeicosatetraenoic acid* (11-HETE) ed i prodotti dell'ossidazione dell'acido linoleico *13 hydroxyoctadecadienoic acid* (HODE) e *9 and 13 oxo-octadecadienoic acids* (oxo-ODE) come indicatori di NASH. Il rapporto tra acido linoleico e 13-HODE è stato inoltre incorporato insieme ad altri parametri clinici (età, BMI e AST) per costituire un pannello denominato oxNASH. Questo pannello raggiunge una sensibilità dell'81% ed una specificità del 97% nella discriminazione dei pazienti NASH rispetto ai *not-NASH* (31).

In un altro studio basato sull'approccio della metabolomica è stato riscontrato un incremento della taurina, di coniugati della glicina e degli acidi biliari primari e secondari nei pazienti NASH in fase post-prandiale (32).

### Biomarcatori di imaging

Le metodiche di *imaging* di routine quali l'ultrasonografia addominale, CT o MRI non sono in grado di distinguere la NAFL dalla NASH. Diverse tecniche basate sull'MRI sono state sperimentate negli animali ed in studi pilota effettuati nell'uomo per la diagnosi di pazienti NASH. La *super paramagnetic iron oxide MRI* è in grado di rilevare la funzione di *uptake* delle cellule di Kupffer, che è alterata in modelli *in vivo* e nell'uomo in presenza di NASH, ma il protocollo attuale richiede *scanning* ripetuti nel corso di 72 ore per cui questa metodica presenta limiti logistici (33). Il *turnover* della membrana degli epatociti e l'ATP intracellulare sono alterati nella NASH e possono essere misurati tramite *phosphorus MRS*. In particolare, il rapporto tra *alpha-nucleotide triphosphate/total phosphate* presenta un AUC di 0.71 per la discriminazione dei pazienti NASH (34). Infine la *performance* diagnostica della *stiffness* epatica, misurata mediante risonanza magnetica elastografica, necessita di essere valutata in coorti più ampie a seguito di correzione per gli stadi di fibrosi (35) (Fig. 2).

## BIOMARCATORI DI FIBROSI

La fibrosi associata alla NASH ha diversi stadi che vanno dall'assenza di fibrosi (F0) alla cirrosi (F4); dal punto di vista clinico viene distinta la fibrosi clinicamente significativa (F2-F4) dalla fibrosi avanzata o severa (F3-F4). Tale distinzione è stata utilizzata per interpretare gli studi che hanno utilizzato test non invasivi per la diagnosi di fibrosi epatica. È noto che esistono differenti fattori di rischio in grado di predire lo sviluppo della fibrosi, quali l'età avanzata, l'obesità grave, il diabete di tipo 2, l'elevato rapporto AST-ALT, l'ipertensione, la dislipidemia e la presenza della sindrome metabolica (36-38).

Secondo uno studio pubblicato su *Hepatology*, lo stadio della fibrosi epatica potrebbe essere il fattore più importante nel determinare la prognosi della NAFLD e nel prevedere il rischio di progressione verso la cirrosi e le complicanze ad essa associate (39).

Pertanto l'individuazione di nuovi biomarcatori è tra le strategie non invasive ad oggi più ricercare per comprendere come stadiare la fibrosi epatica in questa popolazione di pazienti.

Tra i biomarcatori utilizzati per stadiare la fibrosi possiamo distinguere: a) i biomarcatori indiretti per la fibrosi epatica; b) i biomarcatori specifici per la fibrogenesi o la fibrinolisi; c) biomarcatori di *imaging* per la fibrosi.

### Biomarcatori indiretti per la fibrosi epatica

I biomarcatori indiretti non misurano direttamente la fibrogenesi o la fibrinolisi ma sono spesso associati a fattori di rischio per la fibrosi; inoltre a causa della loro ridotta accuratezza vengono spesso utilizzati come pannelli cioè una combinazione di 2 o più marcatori di rischio per la fibrosi epatica.

AAR (AST: ALT Ratio) e APRI (AST: *platelet ratio index*) sono tra i pannelli più semplici da calcolare ma presentano una bassa accuratezza nel diagnosticare la fibrosi avanzata di stadio 3 (AUC AST: ALT ratio: tra 0.66-0.74; AUC APRI: 0.74)

(40-41). Il *BARD score* deriva dalla somma di 3 variabili (BMI, AST-ALT Ratio, presenza di diabete) e mostra una moderata accuratezza nell'individuare i soggetti con fibrosi F<sub>3</sub> (AUC compreso tra 0.69 e 0.81) (42-43). *FIB-4 index (Fibrosis Index Based on four factors)* prevede un calcolo più complesso e spesso vengono utilizzati dei calcolatori *on-line*, comprende l'età, AST, ALT e la conta piastrinica, ha una buona *performance* diagnostica (AUC di 0.80 nell'individuare i soggetti con fibrosi F<sub>3</sub>) (44). Il *NAFLD fibrosis score (NFS)* (45) si ottiene dalla combinazione di età, presenza di diabete, indice di massa corporea, piastrine, albumina e AAR. Questo *score* è stato validato in più studi con un AUC stimato tra 0.75 e 0.83 nel prevedere la fibrosi F<sub>3</sub> (46).

Nonostante questi *score* siano meno accurati rispetto a specifici *marker* di fibrosi sono tra gli strumenti di screening più utilizzati grazie alla loro elevata applicabilità.

### **Biomarcatori specifici per la fibrosi**

I biomarcatori specifici per la fibrosi prendono in considerazione molecole direttamente coinvolte nella fibrogenesi e/o nella fibrinolisi. La fibrosi epatica si sviluppa attraverso la deposizione epatica della matrice extracellulare di cui l'acido ialuronico (HA) è un componente principale (47). Se usato da solo, i livelli sierici di HA mostrano un AUC di 0.87 per la fibrosi F<sub>2</sub> e di 0.92 per la cirrosi (48). Altri componenti principali della matrice extracellulare includono il collagene, i proteoglicani, l'elastina, la fibronectina e la laminina. Il peptide ammino-terminale procollagene III (PIIINP) del siero deriva dalla sintesi di nuovo collagene di tipo III o dalla degradazione di fibrille di collagene di tipo III esistenti; i livelli di PIIINP da soli non sono un buon marker diagnostico per la fibrosi epatica nella NAFLD (49) ma è stato osservato che Pro-C3 (il neo-epitopo di PIIINP) riflette la vera formazione del collagene di tipo III (50) ed è stato dimostrato che l'aumento dei livelli sierici di Pro-C3 è correlato ai componenti chiave della NASH e della fibrosi (51). I livelli circolanti dell'inibitore tissutale delle metalloproteinasi 1 (TIMP1) sono responsabili della composizione della matrice extracellulare, della guarigione della ferita e riflettono le alterazioni nel rimodellamento della matrice tissutale durante la fibrogenesi epatica e la fibrinolisi (52). TIMP1 ha un'eccellente accuratezza diagnostica (AUC: 0.97) nel differenziare i pazienti obesi e affetti da fibrosi NASH-correlata da soggetti di controllo sani di pari età (53). La laminina è la glicoproteina più abbondante nelle membrane basali ed il livello di laminina sierica è in grado di diagnosticare la fibrosi in pazienti con NAFLD con un'ottima *performance* diagnostica (AUC: 0.87) (54). Sebbene i biomarcatori specifici per la fibrosi siano più promettenti, il loro costo e la loro disponibilità hanno limitato il loro utilizzo nella pratica di *routine*. Tra i pannelli di biomarcatori specifici della fibrosi troviamo l'*Enhanced Liver Fibrosis test (ELF)* che è stato sviluppato in base al concetto secondo cui la fibrosi epatica è un processo dinamico che determina un aumento dei livelli sierici dei *marker* del *turnover* della matrice extracellulare. L'ELF comprende tre biomarcatori della fibrosi (HA, TIMP1 e PIIINP) e presenta un'eccellente *performance* diagnostica nel predire la fibrosi avanzata in pazienti adulti e pediatrici con NAFLD (rispettivamente AUC 0.93 e 0.99) (55-56). Un altro strumento, ottenuto dalla combinazione di cinque biomarcatori (aptoglobina,  $\alpha$ 2-macroglobulina, apolipoproteina A<sub>1</sub>, bilirubina totale e GGT), utilizzato per predire la presenza di fibrosi è il *FibroTest*. Il valore diagnostico del *FibroTest* è stato valutato in un'ampia coorte di pazienti NAFLD con un AUC di 0.88 (56).

Il *NAFLD FibroMeter* è un indice composto da peso corporeo, indice di protrombina e livelli sierici di ALT, AST, ferritina e glucosio a digiuno. In due studi condotti in Europa e in Asia, il *NAFLD FibroMeter* ha superato altri test sierici per la diagnosi di fibrosi con un AUC di 0.76 nel discriminare la fibrosi F<sub>2</sub> e 0.77 nel discriminare la fibrosi F<sub>3</sub> (57-58). Infine, l'*Hepascore*, composto da età, sesso e livelli sierici di bilirubina, GGT, HA e  $\alpha$ 2-macroglobulina, ha una buona *performance* diagnostica (AUC: 0.82) per diagnosticare la fibrosi avanzata (stadio F<sub>3</sub>-F<sub>4</sub>) in pazienti con NAFLD (59).

Nonostante presentino una *performance* diagnostica superiore a quella dei biomarcatori indiretti di fibrosi il loro utilizzo su larga scala è limitato dalla scarsa disponibilità di marcatori specifici di fibrosi, dal loro costo e dall'utilizzo di formule brevettate.

### Biomarcatori di *imaging* per la fibrosi

Negli ultimi dieci anni, i progressi negli studi di *imaging* hanno rivoluzionato la gestione delle malattie del fegato migliorando la capacità di quantificare in modo non invasivo la fibrosi epatica.

Il *Fibroscan* o VTCE (*Vibration Controlled Transient Elastography*) prevede l'utilizzo di una sonda ecografica che trasmette un'onda di vibrazione che si propaga attraverso il fegato consentendo di valutarne l'elasticità; la velocità di propagazione è direttamente proporzionale alla rigidità del tessuto. I risultati sono espressi in kilopascal (kPa), solitamente il valore medio di 10 misurazioni in individui sani è compreso tra 1.5 e 7.5 kPa mentre valori >10.5 kPa sono indice di presenza di fibrosi e cirrosi avanzata (60). Sfortunatamente, la sonda VTCE o sonda M sono meno affidabili nei pazienti gravemente obesi con NAFLD, perché il tessuto adiposo attenua sia l'onda elastica sia gli ultrasuoni (61). Pertanto, per superare questo problema in pazienti con BMI >30 kg/m<sup>2</sup> è stata sviluppata una nuova sonda chiamata sonda XL. La *performance* diagnostica delle sonde *FibroScan* M e XL per la diagnosi di fibrosi avanzata sono rispettivamente 0.88 e 0.85 (62).

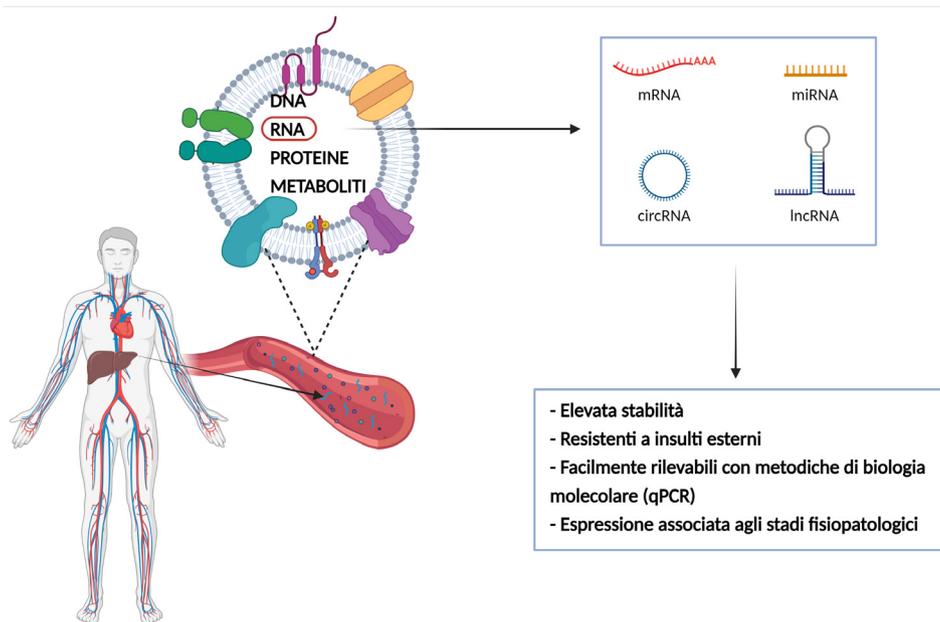
L'elastografia con tecnica ARFI (*Acoustic Radiation Force Impulse*) è una metodica alternativa per stimare la rigidità del tessuto epatico che può essere integrata ad una sonda ad ultrasuoni convenzionale, fornendo così la *stiffness* durante l'ecografia di *routine*. Durante l'esecuzione dell'*imaging*, una regione di interesse del fegato viene eccitata meccanicamente usando impulsi acustici. La rigidità epatica è espressa in m/s, questa metodica presenta un *range* ristretto (0,5-4,4 m/s) e ciò ne limita la definizione dei valori di *cut-off* per discriminare alcuni stadi di fibrosi; è stato infatti osservato che l'accuratezza diagnostica dell'elastografia con tecnica ARFI è superiore nel discriminare la fibrosi e la cirrosi grave (AUC: 0.74-0.97 per F3; AUC: 0.78-0.89 per F4) rispetto a quelle meno gravi (AUC: 0.70-0.83 per F2) (63).

L'elastografia a risonanza magnetica (MRE) è un'altra tecnica non invasiva per diagnosticare la fibrosi nei pazienti con NAFLD. Funziona combinando la risonanza magnetica con onde sonore per creare una mappa visiva (elastogramma), che mostra la rigidità del tessuto epatico. In differenti studi è stato osservato che i valori di *stiffness* del tessuto epatico, ottenuti mediante MRE, sono abbastanza riproducibili (64-65). In particolare, una metanalisi di nove studi comprendenti 232 pazienti con NAFLD ha evidenziato che la MRE è in grado di rilevare la fibrosi con un alto livello di accuratezza, indipendente dall'infiammazione epatica e dal BMI (a differenza del *FibroScan*), con valori AUC di 0.86-0.91 per tutti gli stadi della fibrosi (66). Questa tecnica è più accurata del *FibroScan* nel rilevare la fibrosi F2 (AUC: 0.86-0.89 contro AUC: 0.84) e la fibrosi F4 (AUC: 0.88-0.97 contro AUC: 0.95) (67). Tuttavia, la sua applicazione su larga scala è limitata dal costo e dalla mancata disponibilità rendendo improbabile che MRE possa essere applicata come test di screening (Fig. 2).

### BIOMARCATORI AD RNA

Nei fluidi biologici sono presenti molecole di RNA appartenenti a differenti classi tra cui RNA messaggeri, long non-coding RNA (lncRNA), circular RNA (circRNA), microRNA (miRNA). La presenza di molecole di *cell-free* RNA (*cf-RNA*) nei fluidi corporei ha stimolato l'interesse allo studio di queste molecole come nuovi biomarcatori non invasivi diagnostici, prognostici e di monitoraggio di risposte terapeutica in diversi tipi di patologie (68-69).

Una caratteristica fondamentale che rende le molecole di *cf-RNA* degli ottimi biomarcatori è data dalla loro elevata stabilità, queste molecole infatti sono protette dall'attività delle RNasi endogene presenti nei fluidi corporei e sono resistenti a diversi insulti esterni, quali cicli multipli di congelamento-scongelo, bollitura, condizioni di pH estreme, conservazione prolungata, trattamento con RNasi esogene (70-71). L'estrema stabilità degli RNA circolanti è determinata dal fatto che essi non si trovano liberi nei fluidi corporei ma inglobati all'interno di vescicole membranose (i.e. microvescicole, esosomi, corpi apoptotici), complessati ad *RNA binding protein* (i.e. *NPM1*, *ArgonAUTA 2*) o associati a lipoproteine, tutti questi meccanismi hanno un ruolo protettivo nei confronti della degradazione (72). Un'altra caratteristica che rende le molecole di RNA degli ottimi biomarcatori è data dal fatto che le tecniche utilizzate per la loro rivelazione sono estremamente sensibili. A differenza delle proteine, infatti, gli acidi nucleici vengono rilevati e quantificati mediante metodiche basate sulla PCR, che determina un'amplificazione esponenziale del *template* originale. Di conseguenza, le tecniche di rilevazione delle proteine sono molto meno sensibili rispetto a quelle sviluppate

**Figura 3** ◆ Rappresentazione schematica dei biomarcatori circolanti nella NAFLD

Gli RNA circolanti (i.e. mRNA, miRNA, lncRNA e circRNA) possono essere inglobati all'interno di vescicole membranose o liberi ed associati a RNA binding protein. Le vescicole membranose, oltre l'RNA, racchiudono molecole di diversa natura tra cui DNA, proteine e metaboliti

per gli acidi nucleici. Teoricamente infatti persino una singola molecola di RNA potrebbe essere rilevata mediante PCR quantitativa (73). Infine è importante sottolineare che diversi studi hanno riportato che differenti profili di espressione di molecole di RNA circolanti sono associati a differenti stati fisiologici o patologici (74), questi studi avvalorano quindi l'utilizzo di queste molecole come biomarcatori non invasivi; l'intero profilo di espressione delle molecole di RNA inoltre nei fluidi biologici può essere valutato mediante metodiche *high-throughput*, tra cui la *Next Generation Sequencing* (NGS) ed i *microarray*, per cui l'analisi di queste molecole ha un ruolo fondamentale nella *biomarker discovery* (73) (Fig. 3).

#### RNA circolanti per la diagnosi di NAFLD nella popolazione generale

La maggior parte dei dati riguardanti il dosaggio degli RNA circolanti come biomarcatori di NAFL è relativa ai miRNA. Akuta et al. hanno analizzato i livelli di espressione sierici del miR-122 in pazienti NAFL che sono andati incontro a due prelievi biopsici seriali. In questo modo hanno riscontrato che i pazienti che andavano incontro ad un miglioramento degli *score* istopatologici presentavano un decremento dei livelli di espressione del miR-122 alla seconda biopsia rispetto alla prima biopsia. Inoltre vi era un'associazione significativa tra il rapporto dei livelli di espressione del miR-122 (alla seconda biopsia rispetto alla prima) ed i cambiamenti degli *score* istopatologici. Gli autori hanno infine riscontrato un'associazione anche tra il rapporto dei livelli di espressione del miR-122 ed i parametri clinici di *routine* quali i livelli di AST ed ALT (75). In uno studio è stato riportato che anche i livelli del miR-21 erano più bassi nei NAFL rispetto ai soggetti sani (76). Yamada et al. hanno studiato la presenza di steatosi epatica ed i livelli sierici di cinque miRNA (miR-21, -34a, -122, -145, -451) associati all'omeostasi lipidica in 403 soggetti. I livelli sierici di quattro su cinque miRNA analizzati (miR-21, -34a, -122, -451) erano significativamente più alti nei soggetti NAFL (92/403) rispetto ai sani, inoltre i livelli di espressione del miR-122 erano correlati anche al grado di steatosi (77).

In un altro studio tecnicamente più avanzato è stata valutata, tramite *deep sequencing*, l'espressione dei miRNA circolanti su 20 pazienti NAFL e 20 controlli. Successivamente i miRNA differenzialmente espressi sono stati analizzati in una coorte più ampia di pazienti (90 controlli vs 152 NAFL) ed i risultati sono stati validati in una coorte esterna (80 controlli

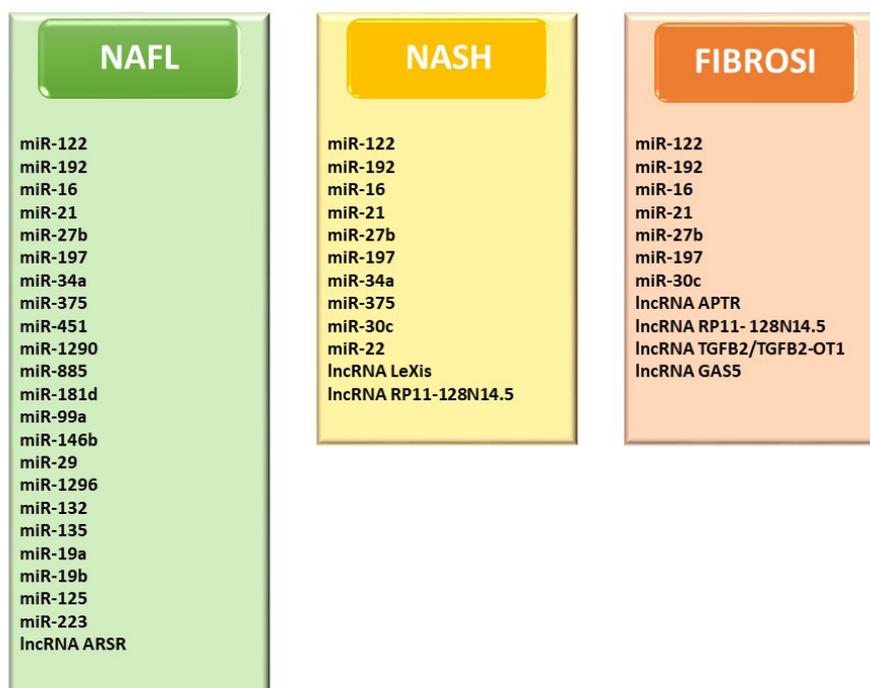
vs 103 NAFL). Il pannello di miRNA trovato (miR-122, -1290, -27b, -192) mostrava un'elevata accuratezza diagnostica per NAFL (AUC: 0.86; sensibilità=85.6%, specificità=73.3%), inoltre questi miRNA avevano una sensibilità e specificità superiore rispetto ad ALT e FIB-4 (78). Raitoharju et al. hanno riportato l'associazione dei livelli nel sangue dei miR-122 e -885 con la steatosi epatica rilevata attraverso ecografia in un'ampia coorte di pazienti (n=871) di età compresa tra i 34 ed i 49 anni. I livelli di espressione dei miR-122 e -885 erano up-regolati nei soggetti con steatosi epatica con una *performance* diagnostica paragonabile, per il miR-122, ai livelli di transaminasi nel sangue. Inoltre tramite approccio di metabolomica veniva mostrata una correlazione positiva tra i livelli del miR-122 e di alcune classi di lipoproteine (VLDL, IDL, LDL) ed una correlazione negativa tra miR-885 ed i livelli di colesterolo HDL (79). In un altro studio sono stati saggiati altri miRNA: i livelli di espressione dei miR-181d, -99a, -197 e -146b erano più bassi nei NAFL rispetto ai controlli, inoltre i livelli dei miR-197 e -146b erano inversamente correlati con il grado di infiammazione del fegato ed i miR-181d e -99a erano inversamente correlati con i livelli di GGT nei pazienti NASH (80). Infine studi recenti hanno mostrato che i livelli di espressione di altri miRNA (miR-29, -1296, -132, -135) erano alterati nei soggetti con NAFL ed erano associati al rischio di insorgenza della malattia (81-85). Ad oggi, invece, solo un lncRNA è stato riconosciuto come potenziale biomarcatore della NAFL: i livelli d'espressione del lncRNA ARSR sono elevati nel siero dei pazienti NAFL rispetto ai controlli, inoltre in modelli murini di NASH è stato riportato che questo lncRNA promuove la lipogenesi regolando la steatosi a livello epatico (86).

Le vescicole extracellulari circolanti (esosomi ed ectosomi) contengono differenti molecole (miRNA, mRNA, proteine, DNA) e possono essere utilizzati come biomarcatori di NAFLD (6). Gli ectosomi sono vescicole che derivano da frammenti della membrana plasmatica e che vengono rilasciati nello spazio extracellulare dove si legano a cellule riceventi rilasciando le loro informazioni molecolari. Nei pazienti NAFL è stato osservato un incremento del numero di ectosomi nei monociti e nelle cellule *natural-killer* ed un decremento nei neutrofilo e nelle cellule endoteliali, i livelli degli ectosomi sono stati associati, quindi, alla diagnosi di NAFL; inoltre questi livelli sono differenti nei pazienti NAFL rispetto ai NASH (87) (Fig. 4).

### RNA circolanti per la diagnosi differenziale di NAFL e NASH

Così come evidenziato per la NAFL, la maggior parte dei dati riguardanti il dosaggio degli RNA circolanti come biomarcatori di NASH è relativa ai miRNA. Il primo tentativo dell'utilizzo dei miRNA circolanti come biomarcatori di diagnosi differenziale e di progressione da NAFL a NASH è rappresentato dallo studio pionieristico svolto da Cermelli et al. del 2011. In particolare, essi hanno riscontrato un incremento dei livelli di espressione sierici dei miRNA-122, -16, -34a in 34 pazienti affetti da NAFLD rispetto a 19 controlli. In media il miRNA-122 presentava un incremento dei livelli di espressione di circa 7.2 volte, il miRNA-34a di circa 5.3 volte ed infine il miRNA-16 passava da livelli di espressione irrilevabili nei controlli a circa 1000 copie per mL di siero (88). Ancora più interessante è il risultato che i ricercatori hanno ottenuto sottostratificando la popolazione NAFLD, tramite questa analisi infatti hanno osservato che i miRNA-122 e -34a presentavano un ulteriore incremento dei livelli di espressione rispettivamente di circa 2 e 3 volte nei pazienti NASH rispetto ai pazienti con steatosi semplice. Inoltre, mediante analisi delle curve ROC è stato riportato che i miRNA-122 e -34a presentavano un'elevata efficienza diagnostica (miRNA-122 AUC: 0.93; miRNA-34a AUC: 0.96) nella distinzione dei pazienti NAFLD rispetto ai controlli sani, che tuttavia si abbassava a 0.70 e 0.76 nella distinzione NASH *versus* NAFL (88).

Un altro importante studio volto all'identificazione di miRNA come biomarcatori di diagnosi differenziale di NAFL o NASH è stato condotto da Pirola et al. nel 2015. Essi hanno effettuato il *profiling* di un *set* di 84 miRNA in pazienti affetti da NAFL e da NASH rispetto ai controlli sani (n=48), successivamente hanno confermato la sovraespressione (superiore a 2 volte) di 6 miRNA su una coorte di pazienti indipendente (n=96): miR-122, -192, -19a, -19b, -125 e -375. Tra questi miRNA solamente tre, ovvero il miR-122, -192 e -375 erano associati in maniera statisticamente significativa alla severità istologica della patologia e significativamente sovraespressi nei pazienti affetti da NASH rispetto ai pazienti con NAFL, con un'efficienza diagnostica rispettivamente di AUC: 0.69, 0.68, 0.72 nella distinzione dei pazienti NAS>5 rispetto a NAS<5 (89).

**Figura 4** ◆ Rappresentazione schematica del pattern degli RNA non codificanti nella NAFLD

L'illustrazione descrive tre gruppi di miRNA e lncRNA correlati alla diagnosi di NAFL (*Non-Alcoholic Fatty Liver*), NASH (*Non-Alcoholic SteatoHepatitis*) e fibrosi epatica

Successivamente Becker et al. hanno fornito un'ulteriore validazione dei miRNA miR-122 e -192 come indicatori della severità istologica della patologia (90).

In particolare essi hanno analizzato l'alterazione dell'espressione genica di 4 microRNA: miR-122, -192, -21, -223 in 137 pazienti NAFLD con obesità moderata o con obesità severa (di cui 87 NASH e 50 *Simple Steatosis* SS) rispetto a 61 controlli, ed hanno analizzato la correlazione tra i loro livelli di espressione ed i livelli di biomarcatori di routine quali AST, ALT ed i frammenti CK18-Asp396, rilasciati dagli epatociti durante l'apoptosi. Tra i miRNA analizzati, i miR-122 e -192 erano sovraespressi nei pazienti NASH con obesità severa rispetto ai pazienti SS con obesità severa. Questa deregolazione invece non veniva confermata nel confronto NASH/SS nei pazienti con obesità moderata. Il miR-21 era sovraespresso nei pazienti NASH rispetto ai pazienti SS con obesità sia moderata che severa. Il miR-223 era sovraespresso nei pazienti NASH rispetto ai controlli, ma non era in grado di discriminare tra i due fenotipi patologici (90).

Inoltre i livelli di espressione dei miR-122 e -192 presentavano una correlazione positiva con i livelli di ALT, CK18-Asp396 e con il NAS score ed i livelli del miR-21 presentavano una correlazione positiva con ALT ed il NAS score. Successivamente, le concentrazioni sieriche di questi tre microRNA sono state utilizzate per determinare uno *scoring system* con un range da 0 a 3 sulla base del quale è stata valutata l'efficienza diagnostica per la distinzione dei pazienti NASH rispetto a NAFL. Tramite queste analisi Becker et al. sono arrivati alla conclusione che la combinazione dello *scoring system* basato sui miRNA ed il biomarcatore CK18-Asp396 portava ad un AUC di 0.83 con una sensibilità del 93% ed una specificità dell'83% (90).

In uno studio successivo del 2016 (91), Liu et al. hanno riscontrato un incremento di espressione dei miRNA miR-122, -192, -34a e -16 in pazienti affetti da NAFLD (con diagnosi accertata mediante biopsia epatica n=48) rispetto ai soggetti di controllo sani (n=37); tra questi miRNA inoltre i miR-122, -16 e -34a erano in grado di discriminare tra i pazienti affetti da NAFL (n=17) ed i pazienti affetti da NASH (n=31). Gli autori hanno inoltre riscontrato che il miR-34a presentava un'efficienza diagnostica ed una sensibilità (AUC: 0.81, sensibilità: 0.70, specificità: 0.86) per la condizione di NASH superiori rispetto a quella di altri biomarcatori clinici già noti, in particolare l'ALT (AUC: 0.68, sensibilità: 0.84, spe-

cificità: 0.94) e la CK-18 M30 e M60 (M30 AUC: 0.70 sensibilità: 0.41, specificità: 0.94; M60 AUC: 0.72 sensibilità: 0.52, specificità: 0.94).

Infine lo studio più recente relativo ai miRNA come biomarcatori di progressione della steatosi epatica è stato condotto nel 2018 da Mireia Lopez-Riera et al. che riesaminando sperimentalmente miRNA precedentemente riportati in letteratura, hanno dimostrato che i miRNA -27b, -34a, -22, -122, -192 e -21 sono indotti ed i miRNA -30c, -16 e 197 sono repressi nel siero di pazienti con patologia severa rispetto ai pazienti con steatosi semplice. Inoltre i rapporti miR-34a/miR-197 e miR-27b/miR-30c rappresentavano i biomarcatori con efficienza diagnostica migliore per l'identificazione rispettivamente dei pazienti con NASH definita mediante SAF  $\geq 2$  AUC: 0.81 e dei pazienti con NASH definita tramite NAS score  $\geq 5$  AUC: 0.79 (92). Ad oggi quindi, sulla base dei dati finora riportati emerge che l'up-regolazione dei miRNA-122, -192, -34a è concordante in diversi studi, per cui la validazione in coorti più ampie di pazienti e successivamente in trial clinici potrebbe portare all'introduzione di questi biomarker a RNA nella pratica clinica utili per l'identificazione di pazienti a rischio di progressione dalla steatosi semplice alla steatoepatite non alcolica.

Pochi studi, invece, hanno valutato il dosaggio di lncRNA come biomarcatori di NASH. Jung Gil Park et al. hanno analizzato i livelli di espressione mediante PCR quantitativa del lncRNA LeXis nel plasma di 35 pazienti NASH rispetto a 9 pazienti NAFL con diagnosi accertata mediante biopsia. In questo modo, hanno osservato che il lncRNA LeXis era sovraespresso nei pazienti NASH rispetto ai pazienti NAFL con una performance diagnostica di AUC: 0.74, sensibilità del 54.3% e specificità del 100% (93).

In uno studio pubblicato nel 2019 dal nostro gruppo (94), a seguito dell'analisi *microarray* è stata validata la sovraespressione a livello sierico del lncRNA RP11-128N14.5 in pazienti con patologia severa (NAS score  $\geq 5$  versus NAS score  $\leq 4$ ) con un'efficienza diagnostica di 0.71 (sensibilità=73,7%, specificità=70,4%) superiore all'efficienza diagnostica di AST (AUC=0.66) ed ALT (AUC=0.37) (Fig. 4).

### RNA circolanti per la stadiazione di fibrosi

È ormai noto il coinvolgimento dei miRNA nella patogenesi della NAFLD e la loro deregolazione nel fegato di pazienti con fibrosi NASH-correlata (95). Purtroppo nonostante siano differenti i lavori che hanno valutato il ruolo dei miRNA come biomarcatori sierici sia nella NAFL che nella NASH ad oggi solo pochi studi hanno analizzato i miRNA come biomarcatore di fibrosi nella popolazione NAFLD.

Nello studio condotto da Miyaak et al. è stata analizzata l'espressione del miR-122 su 67 pazienti NAFLD stadiati per fibrosi. È stato osservato che i livelli sierici del miR-122 erano significativamente down-regolati nei pazienti con fibrosi severa rispetto ai pazienti con fibrosi lieve. Inoltre è stato valutato il valore diagnostico di questo biomarcatore non invasivo ed è stato confrontato con altri biomarcatori di fibrosi come l'acido ialuronico e il collagene di tipo IV. La curva ROC del miR-122 mostrava una *performance* diagnostica migliore (0.82) rispetto a quella dell'acido ialuronico e collagene di tipo IV rispettivamente di 0.74 e 0.72 (96).

Nello studio condotto da Pirola et al., precedentemente menzionato, invece, il miR-122 era up-regolato nei pazienti con fibrosi avanzata (F 2-3) rispetto ai pazienti con fibrosi 0-1 con un AUC pari a 0.61. Sebbene questo valore predittivo non sia ideale per un buon biomarcatore, la *performance* diagnostica del miR-122 era nettamente superiore a quella della CK-18 (AUC: 0.49) e leggermente più di ALT (AUC: 0.59) e AST (AUC: 0.64) nel predire la fibrosi (89).

Nel 2018, López-Riera ed il suo gruppo hanno effettuato una validazione in una coorte indipendente di pazienti NAFLD (stadiati anche per fibrosi) dei miRNA sierici precedentemente identificati. In particolare, è stata analizzata la deregolazione di questi miRNA dividendo la coorte anche in base al grado di fibrosi in 2 gruppi (F $\leq 2$  o F $> 2$ ) o in 5 gruppi (F<sub>0</sub>, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>). Dividendo la coorte da F<sub>0</sub> a F<sub>5</sub> è stato osservato che i livelli d'espressione del miR-122 e del miR-192 tendono ad aumentare negli stadi di fibrosi lieve (F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>) e a diminuire nella fibrosi severa (F<sub>3</sub> e F<sub>4</sub>). Il miR-122 in questo studio, presentava un trend d'espressione opposto rispetto a quello riportato da Miyaak; questo purtroppo ne limita l'utilizzo nel prevedere la fibrosi severa nei pazienti NAFLD (92).

Un altro microRNA che presentava un andamento opposto rispetto ai dati presenti in letteratura è il miR-16; infatti nello studio condotto da López-Riera miR-16 era down-regolato nei soggetti con fibrosi F<sub>3-4</sub> a differenza dello studio

condotto da Liu et al. dove il miR-16 era up-regolato e presentava una buona *performance* diagnostica nel predire la fibrosi (AUC: 0.71) (91).

Invece sempre il gruppo di López-Riera ha dimostrato per la prima volta l'associazione dei miRNA-21, -27b e -30c con la fibrosi F3-4 in particolare miR-27b e miR-21 erano up-regolati nel confronto F $\leq$ 2 vs F $>$ 2 mentre miR-30c era down-regolato nello stesso confronto. Nello stesso studio è stata valutata anche la *performance* diagnostica di questi miRNA nel discriminare i soggetti con fibrosi severa. Dai risultati è emerso che i miRNA non mostrano una *performance* diagnostica migliore rispetto agli algoritmi di fibrosi convenzionali. Tra i miRNA analizzati quello con un AUC (0.72) più elevato era il miR-30c (down-regolato in F $>$ 2). È stato inoltre osservato che la combinazione dei miRNA miR-27b con -30c e miR-27b con -197 presentava una *performance* diagnostica leggermente superiore con AUC rispettivamente di 0.77 e 0.75 (92).

Ad oggi, sono ancora pochi gli studi che prendono in esame i lncRNA come biomarcatori di fibrosi NASH-correlata. Un potenziale biomarcatore di cirrosi epatica NASH correlata è rappresentato dal lncRNA APTR (*Alu-mediated p21 transcriptional regulator*). In uno studio condotto da Yu et al. nel siero di 34 pazienti con cirrosi epatica (accertata mediante biopsia) e 24 soggetti sani è stata osservata un up-regolazione dei livelli sierici di APTR rispetto ai soggetti di controllo. Inoltre il lncRNA APTR era up-regolato anche nel siero di pazienti con cirrosi epatica scompensata rispetto a quelli con cirrosi compensata (97).

Nel nostro studio del 2019 precedentemente citato (94), abbiamo validato, dopo l'analisi dei *microarray*, l'up-regolazione a livello sierico del lncRNA TGFB2/TGFB2-OT1 nei pazienti con fibrosi 3-4 rispetto a fibrosi 0-2. Dall'analisi delle curve ROC è emerso che il lncRNA TGFB2/TGFB2-OT1 presentava un AUC di 0.80 nel confronto F=3-4 rispetto a F=0-2 (sensibilità=65%, specificità=81.3%). Inoltre, le combinazioni di TGFB2-OT1 con FIB-4 o il Fibroscan miglioravano l'accuratezza diagnostica nel rilevare i pazienti con fibrosi F 3-4 rispetto alla fibrosi F 0-2. Il nostro studio fornisce nuovi dati *high-throughput* sull'espressione dei non-coding RNA nel siero di pazienti con NAFLD e pone le basi per l'identificazione di nuovi biomarcatori come alternative future alla biopsia epatica.

Infine, in uno studio più recente, condotto da Han et al. (98), è stata analizzata l'espressione del lncRNA GAS5 a livello plasmatico in pazienti NAFLD stadiati per il grado di fibrosi. È stato osservato che i livelli plasmatici di GAS5 erano significativamente più elevati nei pazienti con fibrosi avanzata (F3) rispetto ai soggetti con fibrosi assente o moderata (F $<$ 2) e l'espressione di GAS5 correlava positivamente con i vari stadi della fibrosi (da F0 a F3). Sebbene l'espressione di GAS5 risultava essere up-regolata nel confronto F3 vs F $<$ 2, la sua espressione era down-regolata nel confronto tra i pazienti NAFLD con cirrosi (F4) rispetto ai pazienti con fibrosi avanzata (F3). Questo è stato il primo studio a rivelare che i livelli di GAS5 differiscono durante la progressione della fibrosi e lo sviluppo della cirrosi (Fig. 4).

## CONCLUSIONI

Attualmente la NAFLD rappresenta una preoccupazione per la salute globale a causa dell'elevata prevalenza nella popolazione generale e alla morbilità e mortalità ad essa associata (99).

Una delle principali sfide per la gestione di questa patologia sta nel differenziare correttamente gli individui con NASH dalla più ampia popolazione di pazienti con NAFL e nello stadiare il grado di fibrosi. Al momento, la biopsia epatica rimane il *gold standard* per la diagnosi di NASH e la stadiazione della fibrosi. Purtroppo a causa dei rischi connessi a questa metodica, i clinici si affidano spesso ad una combinazione di test biochimici e di *imaging*, se pur con efficienze diagnostiche limitate, per la diagnosi e la stadiazione della patologia (7, 8, 15). L'identificazione di metodi non invasivi e l'integrazione sempre più estesa dei vari trattamenti rende necessario studiare e caratterizzare tale patologia in modo da poter monitorare la risposta al trattamento e la progressione della patologia.

Negli ultimi anni numerosi biomarcatori sono stati studiati al fine di poter diagnosticare la NAFL, la NASH e stadiare la fibrosi. Per quanto riguarda i biomarcatori sierici non possono ancora essere utilizzati per lo *screening* e la stadiazione della NAFLD a causa della loro limitata accuratezza; nel corso di questi anni è stato dimostrato che i pannelli di biomarcatori sierici avendo una promettente *performance* diagnostica potranno essere utilizzati in futuro nella diagnosi della steatosi.

L'introduzione di nuovi approcci "omici" nella ricerca dei biomarcatori non invasivi potrebbe portare all'identificazione di molecole in grado di individuare i pazienti NAFL, differenziare i soggetti NASH e stadiare il grado di fibrosi. Questi studi "omici" necessitano tuttavia di essere validati su coorti più ampie ed eterogenee prima di essere utilizzati nella pratica clinica.

## BIBLIOGRAFIA

1. Younossi ZM, Stepanova M, Afendy M, Fang Y, Younossi Y, Mir H, et al. Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clin Gastroenterol Hepatol* 9: 524-530 e1; quiz e60, 2011.
2. 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* 64: 73-84, 2016.
3. Di Mauro S, Ragusa M, Urbano F, Filippello A, Di Pino A, Scamporrino A, et al. Intracellular and extracellular miRNome deregulation in cellular models of NAFLD or NASH: Clinical implications. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 26: 1129-1139, 2016.
4. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 67: 328-357, 2018.
5. Zhou JH, Cai JJ, She ZG, Li HL. Noninvasive evaluation of nonalcoholic fatty liver disease: Current evidence and practice. *World J Gastroenterol* 25: 1307-1326, 2019.
6. Piazzolla VA, Mangia A. Noninvasive Diagnosis of NAFLD and NASH. *Cells* 9, 2020.
7. Wong VW, Adams LA, de Ledinghen V, Wong GL, Sookoian S. Noninvasive biomarkers in NAFLD and NASH - current progress and future promise. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15: 461-478, 2018.
8. Kogachi S, Noureddin M. Noninvasive Evaluation for Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin Ther* 43: 455-472, 2021.
9. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol* 6: 33, 2006.
10. Fedchuk L, Nascimbeni F, Pais R, Charlotte F, Housset C, Ratziu V, et al. Performance and limitations of steatosis biomarkers in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 40: 1209-1222, 2014.
11. Lee JH, Kim D, Kim HJ, Lee CH, Yang JI, Kim W, et al. Hepatic steatosis index: a simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis* 42: 503-508, 2010.
12. Koot BG, van der Baan-Slootweg OH, Bohte AE, Nederveen AJ, van Werven JR, Tamminga-Smeulders CL, et al. Accuracy of prediction scores and novel biomarkers for predicting nonalcoholic fatty liver disease in obese children. *Obesity (Silver Spring)* 21: 583-590, 2013.
13. Kotronen A, Peltonen M, Hakkarainen A, Sevastianova K, Bergholm R, Johansson LM, et al. Prediction of non-alcoholic fatty liver disease and liver fat using metabolic and genetic factors. *Gastroenterology* 137: 865-872, 2009.
14. Poynard T, Ratziu V, Naveau S, Thabut D, Charlotte F, Messous D, et al. The diagnostic value of biomarkers (SteatoTest) for the prediction of liver steatosis. *Comp Hepatol* 4: 10, 2005.
15. Hernaez R, Lazo M, Bonekamp S, Kamel I, Brancati FL, Guallar E, et al. Diagnostic accuracy and reliability of ultrasonography for the detection of fatty liver: a meta-analysis. *Hepatology* 54: 1082-1090, 2011.
16. Karlas T, Petroff D, Sasso M, Fan JG, Mi YQ, de Ledinghen V, et al. Individual patient data meta-analysis of controlled attenuation parameter (CAP) technology for assessing steatosis. *J Hepatol* 66: 1022-1030, 2017.
17. Park CC, Nguyen P, Hernandez C, Bettencourt R, Ramirez K, Fortney L, et al. Magnetic Resonance Elastography vs Transient Elastography in Detection of Fibrosis and Noninvasive Measurement of Steatosis in Patients With Biopsy-Proven Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 152: 598-607 e2, 2017.
18. Yu C, Xu C, Xu L, Yu J, Miao M, Li Y. Serum proteomic analysis revealed diagnostic value of hemoglobin for nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 56: 241-247, 2012.

19. Bell LN, Theodorakis JL, Vuppalanchi R, Saxena R, Bemis KG, Wang M, et al. Serum proteomics and biomarker discovery across the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 51: 111-120, 2010.
20. Kalhan SC, Guo L, Edmison J, Dasarathy S, McCullough AJ, Hanson RW, et al. Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 60: 404-413, 2011.
21. Oresic M, Hyotylainen T, Kotronen A, Gopalacharyulu P, Nygren H, Arola J, et al. Prediction of non-alcoholic fatty-liver disease and liver fat content by serum molecular lipids. *Diabetologia* 56: 2266-2274, 2013.
22. Mayo R, Crespo J, Martinez-Arranz I, Banales JM, Arias M, Minchole I, et al. Metabolomic-based noninvasive serum test to diagnose nonalcoholic steatohepatitis: Results from discovery and validation cohorts. *Hepatol Commun* 2: 807-820, 2018.
23. Ekstedt M, Hagstrom H, Nasr P, Fredrikson M, Stal P, Kechagias S, et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology* 61: 1547-1554, 2015.
24. Eguchi A, Wree A, Feldstein AE. Biomarkers of liver cell death. *J Hepatol* 60: 1063-74, 2014.
25. Kwok R, Tse YK, Wong GL, Ha Y, Lee AU, Ngu MC, et al. Systematic review with meta-analysis: non-invasive assessment of non-alcoholic fatty liver disease--the role of transient elastography and plasma cytokeratin-18 fragments. *Aliment Pharmacol Ther* 39: 254-269, 2014.
26. Tamimi TI, Elgouhari HM, Alkhoury N, Yerian LM, Berk MP, Lopez R, et al. An apoptosis panel for nonalcoholic steatohepatitis diagnosis. *J Hepatol* 54: 1224-129, 2011.
27. Younossi ZM, Jarrar M, Nugent C, Randhawa M, Afendy M, Stepanova M, et al. A novel diagnostic biomarker panel for obesity-related nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Obes Surg* 18: 1430-1437, 2008.
28. Shen J, Chan HL, Wong GL, Choi PC, Chan AW, Chan HY, et al. Non-invasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis by combined serum biomarkers. *J Hepatol* 56: 1363-1370, 2012.
29. Fitzpatrick E, Dhawan A. Noninvasive biomarkers in non-alcoholic fatty liver disease: current status and a glimpse of the future. *World J Gastroenterol* 20: 10851-10863, 2014.
30. Ajmera V, Perito ER, Bass NM, Terrault NA, Yates KP, Gill R, et al. Novel plasma biomarkers associated with liver disease severity in adults with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 65: 65-77, 2017.
31. Feldstein AE, Lopez R, Tamimi TA, Yerian L, Chung YM, Berk M, et al. Mass spectrometric profiling of oxidized lipid products in human nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *J Lipid Res* 51: 3046-3054, 2010.
32. Ferslew BC, Xie G, Johnston CK, Su M, Stewart PW, Jia W, et al. Altered Bile Acid Metabolome in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Dig Dis Sci* 60: 3318-3328, 2015.
33. Smits LP, Coolen BF, Panno MD, Runge JH, Nijhof WH, Verheij J, et al. Noninvasive Differentiation between Hepatic Steatosis and Steatohepatitis with MR Imaging Enhanced with USPIOs in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Proof-of-Concept Study. *Radiology* 278: 782-791, 2016.
34. Abrigo JM, Shen J, Wong VW, Yeung DK, Wong GL, Chim AM, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: spectral patterns observed from an in vivo phosphorus magnetic resonance spectroscopy study. *J Hepatol* 60: 809-815, 2014.
35. Chen J, Talwalkar JA, Yin M, Glaser KJ, Sanderson SO, Ehman RL. Early detection of nonalcoholic steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease by using MR elastography. *Radiology* 259:749-756, 2011.
36. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology* 121: 91-100, 2001.
37. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 30: 1356-1362, 1999.
38. Ratziu V, Giral P, Charlotte F, Bruckert E, Thibault V, Theodorou I, et al. Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology* 118: 1117-1123, 2000.
39. Angulo P. Long-term mortality in nonalcoholic fatty liver disease: is liver histology of any prognostic significance? *Hepatology* 51: 373-375, 2010.
40. Sheth SG, Flamm SL, Gordon FD, Chopra S. AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 93: 44-48, 1998.

41. Shaheen AA, Myers RP. Diagnostic accuracy of the aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index for the prediction of hepatitis C-related fibrosis: a systematic review. *Hepatology* 46: 912-921, 2007.
42. Shah AG, Lydecker A, Murray K, Tetri BN, Contos MJ, Sanyal AJ, et al. Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 7: 1104-1112, 2009.
43. McPherson S, Stewart SF, Henderson E, Burt AD, Day CP. Simple non-invasive fibrosis scoring systems can reliably exclude advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 59: 1265-1269, 2010.
44. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, Sola R, Correa MC, Montaner J, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology* 43: 1317-1325, 2006.
45. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology* 45: 846-854, 2007.
46. Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Ann Med* 43: 617-649, 2011.
47. Gudowska M, Gruszewska E, Panasiuk A, Cylwik B, Flisiak R, Swiderska M, et al. Hyaluronic acid concentration in liver diseases. *Clin Exp Med* 16: 523-528, 2016.
48. Suzuki A, Angulo P, Lymp J, Li D, Satomura S, Lindor K. Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 25: 779-786, 2005.
49. Monarca A, Petrini C, Perolini S, Pozzi F, Adelasco L, Natangelo R, et al. Procollagen-type III peptide serum concentrations in alcoholic and non-alcoholic liver disease. *Ric Clin Lab* 15: 167-171, 1985.
50. Nielsen MJ, Nedergaard AF, Sun S, Veidal SS, Larsen L, Zheng Q, et al. The neo-epitope specific PRO-C3 ELISA measures true formation of type III collagen associated with liver and muscle parameters. *Am J Transl Res* 5: 303-315, 2013.
51. al. LDJe. Estimation of serum "true collagen type III formation" (Pro-C3) levels as a marker of non-alcoholic steatohepatitis in a prospective cohort. *Journal of Hepatology* 66 (Suppl. 1), S154, 2017.
52. Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb E. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol* 46: 955-975, 2007.
53. Abdelaziz R, Elbasel M, Esmat S, Essam K, Abdelaaty S. Tissue Inhibitors of Metalloproteinase-1 and 2 and Obesity Related Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Is There a Relationship. *Digestion* 92: 130-137, 2015.
54. Santos VN, Leite-Mor MM, Kondo M, Martins JR, Nader H, Lanzoni VP, et al. Serum laminin, type IV collagen and hyaluronan as fibrosis markers in non-alcoholic fatty liver disease. *Braz J Med Biol Res* 38: 747-453, 2005.
55. Guha IN, Parkes J, Roderick P, Chattopadhyay D, Cross R, Harris S, et al. Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Validating the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers. *Hepatology* 47: 455-460, 2008.
56. Nobili V, Parkes J, Bottazzo G, Marcellini M, Cross R, Newman D, et al. Performance of ELF serum markers in predicting fibrosis stage in pediatric non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 136: 160-167, 2009.
57. Boursier J, de Ledinghen V, Leroy V, Anty R, Francque S, Salmon D, et al. A stepwise algorithm using an at-a-glance first-line test for the non-invasive diagnosis of advanced liver fibrosis and cirrhosis. *J Hepatol* 66: 1158-1165, 2017.
58. Loong TC, Wei JL, Leung JC, Wong GL, Shu SS, Chim AM, et al. Application of the combined FibroMeter vibration-controlled transient elastography algorithm in Chinese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 32: 1363-1369, 2017.
59. Boursier J, Vergniol J, Guillet A, Hiriart JB, Lannes A, Le Bail B, et al. Diagnostic accuracy and prognostic significance of blood fibrosis tests and liver stiffness measurement by FibroScan in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 65: 570-578, 2016.
60. Wilder J, Patel K. The clinical utility of FibroScan((R)) as a noninvasive diagnostic test for liver disease. *Med Devices (Auckl)* 7: 107-114, 2014.
61. Bonder A, Tapper EB, Afdhal NH. Contemporary assessment of hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis* 19: 123-134, 2015.
62. Xiao G, Zhu S, Xiao X, Yan L, Yang J, Wu G. Comparison of laboratory tests, ultrasound, or magnetic resonance elastography to detect fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A meta-analysis. *Hepatology* 66: 1486-1501, 2017.

63. Cassinotto C, Boursier J, de Ledinghen V, Lebigot J, Lapuyade B, Cales P, et al. Liver stiffness in nonalcoholic fatty liver disease: A comparison of supersonic shear imaging, FibroScan, and ARFI with liver biopsy. *Hepatology* 63: 1817-1827, 2016.
64. Venkatesh SK, Wang G, Teo LL, Ang BW. Magnetic resonance elastography of liver in healthy Asians: normal liver stiffness quantification and reproducibility assessment. *J Magn Reson Imaging* 39: 1-8, 2014.
65. Lee Y, Lee JM, Lee JE, Lee KB, Lee ES, Yoon JH, et al. MR elastography for noninvasive assessment of hepatic fibrosis: reproducibility of the examination and reproducibility and repeatability of the liver stiffness value measurement. *J Magn Reson Imaging* 39: 326-331, 2014.
66. Singh S, Venkatesh SK, Wang Z, Miller FH, Motosugi U, Low RN, et al. Diagnostic performance of magnetic resonance elastography in staging liver fibrosis: a systematic review and meta-analysis of individual participant data. *Clin Gastroenterol Hepatol* 13: 440-451 e6, 2015.
67. Imajo K, Kessoku T, Honda Y, Tomeno W, Ogawa Y, Mawatari H, et al. Magnetic Resonance Imaging More Accurately Classifies Steatosis and Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease Than Transient Elastography. *Gastroenterology* 150: 626-637 e7, 2016.
68. Drag MH, Kilpelainen TO. Cell-free DNA and RNA-measurement and applications in clinical diagnostics with focus on metabolic disorders. *Physiol Genomics* 53: 33-46, 2021.
69. Di Mauro S, Scamporrino A, Fruciano M, Filippello A, Fagone E, Gili E, et al. Circulating Coding and Long Non-Coding RNAs as Potential Biomarkers of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Int J Mol Sci* 21, 2020.
70. Happel C, Ganguly A, Tagle DA. Extracellular RNAs as potential biomarkers for cancer. *J Cancer Metastasis Treat* 6, 2020.
71. Zhu H, Fan GC. Extracellular/circulating microRNAs and their potential role in cardiovascular disease. *Am J Cardiovasc Dis* 1: 138-149, 2011.
72. Pos O, Biro O, Szemes T, Nagy B. Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications. *Eur J Hum Genet* 26: 937-945, 2018.
73. Turchinovich A, Baranova A, Drapkina O, Tonevitsky A. Cell-Free Circulating Nucleic Acids as Early Biomarkers for NAFLD and NAFLD-Associated Disorders. *Front Physiol* 9: 1256, 2018.
74. Velu VK, Ramesh R, Srinivasan AR. Circulating MicroRNAs as Biomarkers in Health and Disease. *J Clin Diagn Res* 6: 1791-1795, 2012.
75. Akuta N, Kawamura Y, Suzuki F, Saitoh S, Arase Y, Fujiyama S, et al. Analysis of association between circulating miR-122 and histopathological features of nonalcoholic fatty liver disease in patients free of hepatocellular carcinoma. *BMC Gastroenterol* 16: 141, 2016.
76. Sun C, Huang F, Liu X, Xiao X, Yang M, Hu G, et al. miR-21 regulates triglyceride and cholesterol metabolism in non-alcoholic fatty liver disease by targeting HMGR. *Int J Mol Med* 35: 847-853, 2015.
77. Yamada H, Suzuki K, Ichino N, Ando Y, Sawada A, Osakabe K, et al. Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver. *Clin Chim Acta* 424: 99-103, 2013.
78. Tan Y, Ge G, Pan T, Wen D, Gan J. A pilot study of serum microRNAs panel as potential biomarkers for diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One* 9:e105192, 2014.
79. Raitoharju E, Seppala I, Lyytikainen LP, Viikari J, Ala-Korpela M, Soininen P, et al. Blood hsa-miR-122-5p and hsa-miR-885-5p levels associate with fatty liver and related lipoprotein metabolism-The Young Finns Study. *Sci Rep* 6: 38262, 2016.
80. Celikbilek M, Baskol M, Taheri S, Deniz K, Dogan S, Zararsiz G, et al. Circulating microRNAs in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol* 6: 613-620, 2014.
81. Jampoka K, Muangpaisarn P, Khongnomnan K, Treeprasertsuk S, Tangkijvanich P, Payungporn S. Serum miR-29a and miR-122 as Potential Biomarkers for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Microna* 7: 215-222, 2018.
82. Yu F, Wang X, Zhao H, Hao Y, Wang W. Decreased Serum miR-1296 may Serve as an Early Biomarker for the Diagnosis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Lab*. 65, 2019.
83. He Z, Yang JJ, Zhang R, Li HT, Wu L, Jiang F, et al. Circulating miR-29b positively correlates with non-alcoholic fatty liver disease in a Chinese population. *J Dig Dis* 20: 189-195, 2019.

84. Zong Y, Yan J, Jin L, Xu B, He Z, Zhang R, et al. Relationship between circulating miR-132 and non-alcoholic fatty liver disease in a Chinese population. *Hereditas* 157: 22, 2020.
85. Jiang H, Qian Y, Shen Z, Liu Y, He Y, Gao R, et al. Circulating microRNA135a3p in serum extracellular vesicles as a potential biological marker of nonalcoholic fatty liver disease. *Mol Med Rep* 24, 2021.
86. Zhang M, Chi X, Qu N, Wang C. Long noncoding RNA lncARSR promotes hepatic lipogenesis via Akt/SREBP-1c pathway and contributes to the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 499: 66-70, 2018.
87. Kornek M, Lynch M, Mehta SH, Lai M, Exley M, Afdhal NH, et al. Circulating microparticles as disease-specific biomarkers of severity of inflammation in patients with hepatitis C or nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 143: 448-458, 2012.
88. Cermelli S, Ruggieri A, Marrero JA, Ioannou GN, Beretta L. Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One* 6:e23937, 2011.
89. Pirola CJ, Fernandez Gianotti T, Castano GO, Mallardi P, San Martino J, Mora Gonzalez Lopez Ledesma M, et al. Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut* 64: 800-812, 2015.
90. Becker PP, Rau M, Schmitt J, Malsch C, Hammer C, Bantel H, et al. Performance of Serum microRNAs -122, -192 and -21 as Biomarkers in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis. *PLoS One* 10:e0142661, 2015.
91. Liu XL, Pan Q, Zhang RN, Shen F, Yan SY, Sun C, et al. Disease-specific miR-34a as diagnostic marker of non-alcoholic steatohepatitis in a Chinese population. *World J Gastroenterol* 22: 9844-9852, 2016.
92. Lopez-Riera M, Conde I, Quintas G, Pedrola L, Zaragoza A, Perez-Rojas J, et al. Non-invasive prediction of NAFLD severity: a comprehensive, independent validation of previously postulated serum microRNA biomarkers. *Sci Rep* 8:10606, 2018.
93. Park JG, Kim G, Jang SY, Lee YR, Lee E, Lee HW, et al. Plasma Long Noncoding RNA LeXis is a Potential Diagnostic Marker for Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Life (Basel)* 10, 2020.
94. Di Mauro S, Scamporrino A, Petta S, Urbano F, Filippello A, Ragusa M, et al. Serum coding and non-coding RNAs as biomarkers of NAFLD and fibrosis severity. *Liver Int* 39: 1742-1754, 2019.
95. Sun C, Fan JG, Qiao L. Potential epigenetic mechanism in non-alcoholic Fatty liver disease. *Int J Mol Sci* 16: 5161-5179, 2015.
96. Miyaaki H, Ichikawa T, Kamo Y, Taura N, Honda T, Shibata H, et al. Significance of serum and hepatic microRNA-122 levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 34:e302-7, 2014.
97. Yu F, Zheng J, Mao Y, Dong P, Li G, Lu Z, et al. Long non-coding RNA APTR promotes the activation of hepatic stellate cells and the progression of liver fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 463: 679-685, 2015.
98. Han MH, Lee JH, Kim G, Lee E, Lee YR, Jang SY, et al. Expression of the Long Noncoding RNA GAS5 Correlates with Liver Fibrosis in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Genes (Basel)* 11, 2020.
99. Estes C, Razavi H, Loomba R, Younossi Z, Sanyal AJ. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology* 67: 123-133, 2018.

a cura di Giuseppe Defeudis

Policlinico Universitario Campus Bio-Medico di Roma

## Steatosi epatica non alcolica: non sempre una condizione benigna

Stefano Ciardullo<sup>1,2</sup>, Gianluca Perseghin<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Dipartimento di Medicina e Riabilitazione, Policlinico di Monza<sup>2</sup>Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Milano BicoccaDOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2102g>

Nel maggio 2017 giunge in visita diabetologica presso il nostro centro una donna di 47 anni inviata dal medico di medicina generale con il quesito diagnostico di “diabete scompensato ed ipotiroidismo”.

**Anamnesi familiare.** La paziente nega familiarità per diabete mellito sia nella linea materna che paterna. Padre affetto da cardiopatia ischemica con recente procedura di rivascolarizzazione coronarica e posizionamento di stent medicati all'età di 76 anni. Madre e una sorella affette da ipotiroidismo.

**Anamnesi fisiologica.** Menarca a 13 anni, cicli sempre regolari in assenza di terapia estroprogestinica, una gravidanza all'età di 27 anni complicata da diabete gestazionale gestito con terapia insulinica, parto cesareo non complicato. Nega fumo di sigaretta e consumo di bevande alcoliche. Alvo e diuresi nella norma, non allergie stagionali né a farmaci o alimenti.

**Anamnesi patologica remota.** Ipotiroidismo primario a genesi autoimmune noto dal 1998, in terapia con levotiroxina. Asportazione di cisti ovarica nel 2008. Non altri interventi chirurgici, non precedenti cardiovascolari. Dislipidemia mista in terapia con statina.

**Anamnesi diabetologica.** Diagnosi di diabete mellito di tipo 2 (DMT2) dal 2011, seguita presso altro centro diabetologico. Riferisce in passato tentativi terapeutici con exenatide LAR sospesa per comparsa di nausea e vomito e saxagliptin sospeso per mancato raggiungimento del target glicemico. Riferisce precedente screening complicanze micro e macro-vascolari negativo.

**Terapia domiciliare.** Metformina 850 mg 1 cp x 3/die, glimepiride/pioglitazone 4/30 mg 1 cp/die, atorvastatina 20 mg 1 cp/die, levotiroxina 75 mg 1 cp/die per 5 giorni/settimana e 100 mg 1 cp/die per 2 giorni/settimana.

**Esame obiettivo.** Obesità di classe III (altezza 160 cm, peso 115 kg, BMI 44.9 kg/m<sup>2</sup>, circonferenza vita 134 cm), pressione arteriosa ambulatoriale 140/85 mmHg, frequenza cardiaca 80 bpm ritmica. Esame obiettivo cardio-polmonare nei limiti; fegato debordante circa 2-3 cm dall'arcata costale, tiroide non palpabile.

**Esami ematochimici.** Glicemia basale 154 mg/dl, HbA1c 9.4% (reca in visione ematochimici precedenti dell'ottobre 2016 con HbA1c 6.4%). Creatinina 0.66 mg/dl, eGFR (CKD-EPI) 105.7 ml/min/1.73m<sup>2</sup>, UACR 13.4 mg/g. AST 55 U/L, ALT 50 U/L. Colesterolo totale 164 mg/dl, HDL 49 mg/dl, trigliceridi 156 mg/dl, LDL (Friedewald) 84 mg/dl. TSH 1.76 mU/L.

### Esami strumentali:

Fundus oculi: non segni di retinopatia diabetica.

Elettrocardiogramma: ritmo sinusale, frequenza 91 bpm, alterazioni aspecifiche della ripolarizzazione.

Eco addome superiore: fegato di dimensioni lievemente aumentate, margini regolari, ecotessitura parenchimale omogenea; ecogenicità notevolmente aumentata per steatosi di grado severo. Non splenomegalia. Restanti reperti nei limiti.

Ecodoppler TSA: non ispessimenti miointimali, né placche aterosclerotiche individuabili.

**Tabella 1** ♦ **Andamento temporale dei principali dati clinici e laboratoristici della paziente**

TERAPIA	DATA	BMI (KG/M <sup>2</sup> )	HBA1C (%)	TSH (MU/L)	PA (MMHG)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	GGT (IU/L)	LDL (MG/DL)
Metformina 2550, Glargine 40	08/17	43.9	8.5	-	170/95	-	-	-	120
Met/Dapa 2000/10, Glargine 28	12/17	41.4	7.3	1.05	128/89	26	37	82	97
Met/Dapa 2000/10, Glargine 30	06/18	39.9	-	-	130/70	37	37	68	-
Met/Dapa 2000/10, Glargine 30	07/18	40.3	7.1	-	124/94	-	-	-	-
Met/Dapa 2000/10, Glargine 28	02/19	40.3	7.1	-	122/88	-	-	-	-
Met/Dapa 2000/10, Glargine 30	08/19	37.5	6.7	2.13	145/101	-	-	-	86
Met/Dapa 2000/10, Glargine 18	02/20	31.2	6.4	0.05	119/82	24	23	37	129
Met/Dapa 2000/10, Glargine 14	09/20	31.0	6.6	1.68	121/81	-	-	-	94

**Conclusioni.** Paziente affetta da DMT2 in attuale fase di scompenso glicometabolico. Si consegna schema dietetico da seguire con attenzione e si raccomanda regolare esecuzione di esercizio fisico aerobico. Si consiglia sospensione di glimepiride/pioglitazione, prosecuzione di metformina ed introduzione di insulina glargine 16 UI con istruzione della paziente ad auto-titolazione della stessa. Al prossimo controllo valutazione di introduzione di GLP1-RA o SGLT2-i.

**Successive rivalutazioni.** L'andamento del compenso glicemico e di parametri clinici e laboratoristici selezionati è mostrato in tabella 1. Al controllo a tre mesi la paziente mostra un miglioramento del compenso glicemico, con titolazione dell'analogo lento fino a 40 UI, che non rimane comunque soddisfacente. Viene introdotto dapagliflozin in associazione preconstituita con metformina. In relazione ai valori pressori non controllati viene anche introdotta terapia antipertensiva con associazione preconstituita di bloccante del recettore dell'angiotensina e diuretico tiazidico. Ai successivi controlli (12/2017-08/2019) si riscontra progressivo miglioramento del controllo glicemico e buon calo ponderale, unitamente a riduzione delle transaminasi, mentre permane elevato il livello di  $\gamma$ -GT. La paziente riferisce maggiore attenzione alla dieta ed attività fisica. In relazione alla giovane età della paziente ed al grado di obesità, che permane elevato nonostante l'importante calo ponderale, si propone intervento di chirurgia bariatrica (Laparoscopic Sleeve Gastrectomy, LSG). Il ricorso ad interventi di chirurgia bariatrica viene infatti raccomandato dagli standard di cura AMD-SID in pazienti di età 18-65 anni in caso di BMI  $\geq 40$  kg/m<sup>2</sup> indipendentemente dal compenso glicemico o in caso di BMI  $\geq 35$  kg/m<sup>2</sup> e scompenso glicemico. Esso può comunque essere preso in considerazione in pazienti con BMI compreso tra 35 e 40 kg/m<sup>2</sup> e buon compenso glicemico (1). La paziente si dimostra ben disposta all'intervento ed inizia quindi il percorso presso il

nostro centro. Esegue visita chirurgica, stadiazione endocrino-metabolica senza riscontro di controindicazioni e calorimetria indiretta in cui viene riscontrata modica contrazione del dispendio energetico (rapporto tra misurato e predetto mediante equazione di Harris-Benedict pari al 79%), condizione che abbiamo riscontrato di frequente in pazienti ipotiroidi, nonostante adeguata supplementazione con levotiroxina documentata da TSH a target (2). Dal colloquio di consultazione psicologica non emergono disturbi del comportamento alimentare e problematiche psicopatologiche in generale. La paziente è motivata all'intervento al fine di migliorare la qualità della propria vita ed ha aspettative realistiche rispetto all'efficacia dello stesso. Per questi motivi non si riscontrano controindicazioni psicologiche assolute all'intervento.

L'intervento viene programmato nel febbraio 2019; tuttavia, durante la valutazione laparoscopica si evidenzia fegato megalico con cirrosi micronodulare bilobare misconosciuta ed imponente ernia jatale con risalita dello stomaco in torace. In considerazione di quest'ultima si decide di non proseguire con l'intervento bariatrico programmato. Si procede con riduzione dell'ernia in addome e jatoplastica. Il decorso post-operatorio risulta comunque non complicato. La paziente viene quindi inviata a visita epatologica. Vengono escluse epatopatie virali, alcol-mediate, auto-immuni, legate a farmaci o ad emocromatosi e malattia di Wilson, ponendo diagnosi di cirrosi epatica compensata (Child-Pugh A5) correlata a steatosi epatica non alcolica (NAFLD, Nonalcoholic Fatty Liver Disease). Viene effettuata inoltre presso il nostro centro elastografia epatica mediante 2-dimensional shear-wave elastography (2D-SWE), che conferma il quadro di cirrosi (liver stiffness (LSM) pari a 18,3 kPa, IQR/med 18%), al fine di poter seguire l'andamento temporale della fibrosi epatica in modo non invasivo mediante sua ripetizione. Viene inoltre eseguita esofagogastroduodenoscopia che non evidenzia la presenza di varici esofagee.

**1° QUESITO**

Qual è la prevalenza di NAFLD e fibrosi avanzata in pazienti affetti da diabete tipo 2 e/o obesità? È indicato lo screening di questa condizione?

Le stime di prevalenza di NAFLD in pazienti affetti da DMT2 variano in base all'etnia ed alla metodica utilizzata per la sua identificazione (ecografia dell'addome, marker sierici, risonanza magnetica, metodi elastografici, biopsia). Una recente metanalisi ha riscontrato una prevalenza media a livello globale del 55%, includendo soprattutto studi basati sull'ecografia (3), mentre studi basati su una metodica con maggiore sensibilità come la risonanza magnetica mostrano una prevalenza intorno al 65-70% (4). L'impatto del DMT2 risulta negativo sulla prognosi della NAFLD e la prevalenza di forme di steatoepatite (NASH, *nonalcoholic steatohepatitis*) e di fibrosi epatica avanzata (che risulta il principale predittore di eventi clinici epato-relati (5)) si attestano intorno al 35% e 17%, rispettivamente (6,7). Allo stesso modo, casistiche di pazienti inviati a chirurgia bariatrica con biopsia epatica intra-operatoria hanno mostrato tassi di prevalenza variabili soprattutto in base alla proporzione di donne, all'età media ed alle comorbilità metaboliche dei soggetti arruolati. Una metanalisi di studi biotici ha identificato la presenza di steatosi, NASH e fibrosi avanzata nel 91%, 37% e 10%, rispettivamente (8).

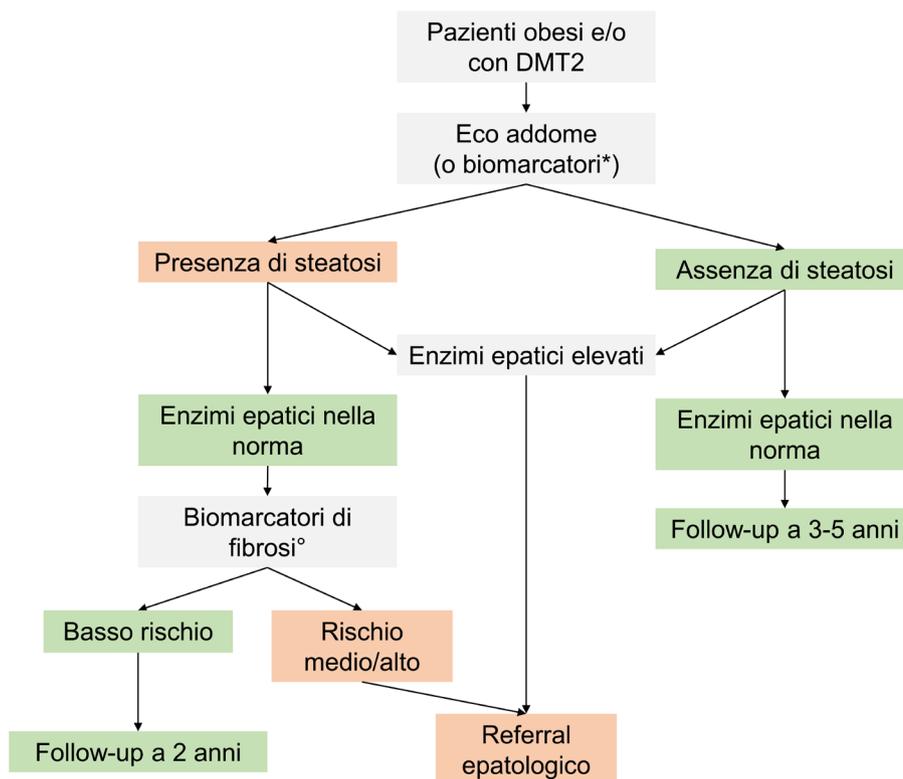
Nonostante questi elevati tassi di prevalenza, non vi è accordo tra le principali società scientifiche internazionali circa la necessità di eseguire uno screening sistematico di questa condizione, soprattutto per l'assenza di dati sulla costo-efficacia e la mancanza di terapie farmacologiche approvate. Mentre le linee guida congiunte delle società europee per lo studio del fegato (EASL), del diabete (EASD) e dell'obesità (EASO) suggeriscono lo screening sistematico mediante ecografia epatica seguita dall'utilizzo di biomarcatori non invasivi di fibrosi (quali il FIB-4, il NAFLD fibrosis score e il AST to platelet ratio index, Fig. 1) (9), l'*American Association for the Study of Liver Diseases* (AASLD) non consiglia uno screening sistematico, ma soltanto vigilanza attiva (10).

**2° QUESITO**

La cirrosi rappresenta una controindicazione ad interventi di chirurgia bariatrica?

Questo quesito è stato oggetto di una recente consensus di esperti dell'*American Gastroenterology Association* (11). Viene innanzitutto riconosciuta l'obesità come un fattore prognostico negativo sulla storia naturale delle epatopatie croniche di diversa eziologia e si sottolinea come la perdita di peso mediante modifica dello stile di vita (idealmente >10%) determini miglioramento del quadro epatico. Ciononostante, una simile perdita di peso viene raggiunta da pochi pazienti, limitandone l'utilità clinica per i pazienti con cirrosi. L'opzione della chirurgia bariatrica deve essere considerata in casi selezionati in pazienti con cirrosi epatica compensata al fine di ridurre il rischio di epatocarcinoma e complicanze quali ascite, sindrome epatorenale, sanguinamento da varici ed encefalopatia epatica. Questi pazienti dovrebbero essere operati in centri ad alto volume di interventi bariatrici da un team di chirurghi ed anestesisti esperti nella gestione dei pazienti con epatopatia cronica ed è fondamentale la valutazione pre-operatoria della presenza di ipertensione portale clinicamente significativa attraverso esecuzione di esofagogastroduodenoscopia ed eventuale misurazione del gradiente pressorio porto-cavale. Poiché infine è stato descritto un incremento del consumo di alcolici dopo interventi di chirurgia bariatrica, risulta fondamentale approfondire questo aspetto prima dell'intervento e durante il successivo follow-up. La tipologia di intervento da prediligere in questi pazienti è la LSG, in quanto permette di preservare un accesso endoscopico all'albero biliare, determina una perdita di peso graduale nel tempo ed è meno gravata da rischio di malassorbimento rispetto ad altri interventi. Infine si sottolinea come la chirurgia bariatrica sia indicata in pazienti con cirrosi scompensata esclusivamente contemporaneamente o successivamente ad intervento di trapianto epatico. Sono infatti state descritte casistiche di pazienti che hanno eseguito simultaneamente trapianto di fegato ed LSG con buoni risultati (12).

**Figura 1** ♦ Flowchart per lo screening della steatosi epatica nei pazienti obesi o affetti da diabete mellito di tipo 2



\* Esempi di biomarcatori di steatosi sono il Fatty Liver Index (FLI), l’Hepatic Steatosis Index (HSI) ed il NAFLD Liver Fat Score (NLFS)

° Esempi di biomarcatori di fibrosi sono il Fibrosis-4 (FIB-4) ed in NAFLD Fibrosis Score (NFS).

Adattata da (9)

### 3° QUESITO

#### Qual è l’effetto della chirurgia bariatrica sulla severità istologica della NAFLD e sugli eventi epatici?

Non esistono ad oggi trial clinici che abbiano randomizzato pazienti a chirurgia bariatrica e gruppo di controllo e valutato endpoint epatici istologici o clinici. L’evidenza disponibile giunge quindi da studi osservazionali. Una metanalisi ha incluso 32 studi di coorte con biopsia epatica al basale e dopo intervento per un totale di 3093 pezzi bioptici. La chirurgia bariatrica ha determinato risoluzione della steatosi epatica nel 66% dei pazienti, dell’inflammatione nel 50%, della degenerazione balloniforme nel 76% e della fibrosi del 40%, mentre un peggioramento del quadro di fibrosi si è verificato nel 12% dei pazienti (13). In un successivo ampio studio prospettico monocentrico sono stati arruolati 180 pazienti con NASH ed è stata eseguita una biopsia epatica durante l’intervento chirur-

gico, poi ripetuta ad 1 ed a 5 anni di distanza. A 5 anni dall’intervento vi era stata una risoluzione della NASH senza peggioramento della fibrosi nell’85% dei pazienti, il grado di fibrosi si era ridotto nel 70% ed il 56% dei pazienti con fibrosi epatica avanzata (F3) al baseline era privo di qualsiasi grado di fibrosi.

I dati sugli eventi epatici in seguito a chirurgia bariatrica sono invece più scarsi. In una recente analisi dello studio svedese SOS gli autori non hanno identificato una significativa differenza nell’incidenza di ricoveri e morti per eventi epatici tra pazienti trattati con chirurgia bariatrica ed un gruppo di controllo matchato per diversi fattori confondenti. Nonostante la potenza statistica fosse probabilmente inadeguata visto il basso numero di eventi verificatisi, è stato possibile individuare un trend di riduzione degli eventi correlati a NAFLD ed un incremento dei casi di cirrosi associati ad eccessivo consumo di alcol (14).

## DECORSO CLINICO DELLA PAZIENTE

Una volta escluse complicanze della cirrosi e presenza di ipertensione portale, la paziente è stata sottoposta ad intervento di LSG nell'ottobre 2019 con decorso post-operatorio non complicato. Il calo ponderale nei successivi mesi è stato soddisfacente, anche se inferiore alla media dei pazienti trattati mediante questa procedura nel nostro centro (Tab. 1). Ad esso si è associata maggiore facilità a mantenere un buon compenso glicemico con dosi all'incirca dimezzate dell'analogo insulinico lento, con mantenimento della terapia con metformina ed SGLT-2 inibitore ben tollerati. In relazione al rischio di ipoglicemia sarà da valutare eventuale nuovo tentativo di sostituzione di insulina basale con GLP1-RA, il cui profilo di effetti collaterali in pazienti operati di chirurgia bariatrica è risultato simile alle esperienze nella popolazione diabetica generale (15). È possibile per la nostra paziente che la correzione della voluminosa ernia jatale faciliti la tollerabilità del farmaco, sebbene non vi siano evidenze in tal senso. Inoltre, in prevenzione cardiovascolare, visti gli effetti modesti della LSG sul colesterolo LDL già documentati in letteratura (16) e confermati nella nostra paziente, si procederà ad incrementare la posologia della terapia ipolipemizzante.

Dal versante epatologico abbiamo assistito ad una riduzione sia degli enzimi epatici sia della stiffness epatica valutata nel febbraio 2021 (LSM 10.4 kPa, IQR/Med 22%). Sebbene questa rapida riduzione di stiffness non indichi necessariamente una regressione della cirrosi, è stato dimostrato che l'andamento temporale della stessa incrementi il valore predittivo di futuri eventi epatici rispetto ad una singola valutazione (17). È inoltre indicata l'esecuzione di ecografia addome superiore semestrale come procedura di screening per l'epatocarcinoma (18).

## BIBLIOGRAFIA

1. AMD-SID. Standard italiani per la cura del diabete mellito 2018.
2. Muraca E, Ciardullo S, Oltolini A, et al. Resting energy expenditure in obese women with primary hypothyroidism and appropriate levothyroxine replacement therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 105(4):E1741-E48, 2020.
3. Younossi ZM, Golabi P, de Avila L, et al. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 71(4): 793-801, 2019.
4. Doycheva I, Cui J, Nguyen P, et al. Non invasive screening of diabetics in primary care for NAFLD and advanced fibrosis by MRI and MRE. *Aliment Pharmacol Ther* 43(1): 83-95, 2016.
5. Taylor RS, Taylor RJ, Bayliss S, et al. Association Between Fibrosis Stage and Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* 2020.
6. Ciardullo S, Monti T, Perseghin G. High Prevalence of Advanced Liver Fibrosis Assessed by Transient Elastography Among U.S. Adults With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 44(2): 519-525, 2021.
7. Lomonaco R, Leiva EG, Bril F, et al. Advanced Liver Fibrosis Is Common in Patients With Type 2 Diabetes Followed in the Outpatient Setting: The Need for Systematic Screening. *Diabetes Care* 44(2): 399-406, 2021.
8. Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol* 45(4): 600-606, 2006.
9. Marchesini G, Day CP, Dufour J-F, et al. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 64(6): 1388-1402, 2016.
10. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 67(1): 328-57, 2018.
11. Patton H, Heimbach J, McCullough A. AGA Clinical Practice Update on Bariatric Surgery in Cirrhosis: Expert Review. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2020.
12. Zamora Valdes D, Watt KD, Kellogg TA, et al. Long term outcomes of patients undergoing simultaneous liver transplantation and sleeve gastrectomy. *Hepatology* 68(2): 485-495, 2018.
13. Lee Y, Doumouras AG, Yu J, et al. Complete Resolution of Nonalcoholic Fatty Liver Disease After Bariatric Surgery: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 17(6): 1040-60.e11, 2019.
14. Hagström H, Ekstedt M, Olbers T, et al. Bariatric surgery versus standard obesity treatment and the risk of severe liver disease: Data from the Swedish Obese Subjects study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2020.
15. Miras AD, Pérez-Pevida B, Aldhwayan M, et al. Adjunctive liraglutide treatment in patients with persistent

- or recurrent type 2 diabetes after metabolic surgery (GRAVITAS): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The lancet Diabetes & endocrinology* 7(7): 549-559, 2019.
16. Heffron SP, Parikh A, Volodarskiy A, et al. Changes in lipid profile of obese patients following contemporary bariatric surgery: a meta-analysis. *The American journal of medicine* 129(9): 952-959, 2016.
  17. Petta S, Sebastiani G, Viganò M, et al. Monitoring occurrence of liver-related events and survival by transient elastography in patients with nonalcoholic fatty liver disease and compensated advanced chronic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2020.
  18. Loomba R, Lim JK, Patton H, et al. AGA clinical practice update on screening and surveillance for hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic fatty liver disease: expert review. *Gastroenterology* 158(6): 1822-1830, 2020.