



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

DOTTORATO DI RICERCA

DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA MOLECOLARE E CLINICA

Analisi trascrittomica sul rischio e la severità della NAFLD in pazienti affetti da obesità di III grado sottoposti ad intervento chirurgico

Coordinatore:

Prof. Antonino Tuttolomondo

Tutor:

Prof. Salvatore Petta

Dottoranda:

Dott.ssa Beatrice D'Orazio

SOMMARIO

INTRODUZIONE	2
MATERIALI E METODI	10
RISULTATI.....	16
CONCLUSIONI	24
FIGURE E TABELLE.....	24
Bibliografia	25

INTRODUZIONE

Per obesità si intende una condizione caratterizzata dalla presenza di un body mass index (BMI) $> 30 \text{ kg/m}^2$ [1] o, secondo la definizione della World Health Organisation (WHO), universalmente accettata sebbene non costantemente impiegata nella pratica clinica, come un eccessivo o anormale accumulo di grasso che determina un aumentato rischio per la salute [2]. L'obesità è una condizione morbosa di grande interesse in tutto il mondo e si contraddistingue per un alto tasso di insuccesso terapeutico, rappresentando una grande sfida di salute pubblica data l'associazione ad un generale aumento della morbi-mortalità [3]. L'incidenza di tale condizione morbosa è più che raddoppiata dal 1980 ad oggi, tanto da indurci a parlare di una vera e propria epidemia globale o "globesity" e, arrivando ad interessare dal 1980 ad oggi circa il 50% della popolazione adulta occidentale [4]. Nel 2008, secondo la WHO, 1.4 miliardi di adulti sopra i vent'anni di età erano sovrappeso e di questi 500 milioni erano obesi (oltre 200 milioni di uomini e 300 milioni di donne) [5-7].

L'eccesso di peso corporeo rappresenta la quinta causa di morte a livello mondiale [3], una recente metanalisi che include circa 3 milioni di soggetti, riporta che rispetto al normopeso, tutti i gradi di obesità, 1° (BMI $> 30 \text{ kg/m}^2$), 2° (BMI 35-40 kg/m^2) e 3° (BMI $> 40 \text{ kg/m}^2$) si associano ad un aumento del tasso di mortalità indipendentemente dall'eziologia [8]. Inoltre,

il sovrappeso e l'obesità si associano ad un notevole aumento del rischio individuale di morbidità (**Fig1**), in particolare, essi sono responsabili del 80% dei casi di diabete mellito di tipo 2 (DMT2) e del 55% delle cardiopatie negli adulti [7]; altre patologie quali apnee notturne (OSAS), dislipidemia, neoplasie, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), osteoartriti, disturbi respiratori, infertilità e disturbi psichiatrici, sono altrettanto correlate alle suddette condizioni [9,10].

Figura1. Comorbidità associate all'obesità [63]

Malattie metaboliche	Neoplasie	
<ul style="list-style-type: none"> • Diabete mellito di tipo 2 • Dislipidemia • Iperuricemia e gotta • Infertilità femminile • Sindrome dell'ovaio policistico 	<ul style="list-style-type: none"> • Mammella • Colon-retto • Endometrio • Esofago • Rene • Ovaio 	<ul style="list-style-type: none"> • Pancreas • Prostata • Fegato • Colecisti • Leucemie
Malattie cardiovascolari	Altre	
<ul style="list-style-type: none"> • Ipertensione arteriosa • Cardiopatia coronarica • Cardiopatia congestizia • Embolia polmonare • Ictus 	<ul style="list-style-type: none"> • Asma • Apnee ostruttive notturne • Steatoepatite non alcolica • Colecistopatia • Osteoartrite • Pseudotumor cerebri 	<ul style="list-style-type: none"> • Disordini psicologici • Reflusso gastroesofageo • Incontinenza urinaria • Intertrigine • Fascite plantare

Il risultato di quanto appena enunciato è una riduzione dell'aspettativa di vita nel paziente obeso di circa 5-20 anni rispetto alla popolazione generale [11].

In particolare, la NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease) è attualmente

la più comune causa di epatopatia cronica nel mondo occidentale e si prevede possa diventare la più importante indicazione al trapianto di fegato entro il 2030 [12]. L'incidenza di questa patologia è circa di 20 casi su 10000 abitanti/anno con un picco intorno alla sesta decade [13]; ha inoltre, una prevalenza nel sesso maschile (30-40%), insorgendo nel 70% circa dei soggetti affetti da diabete mellito di tipo II [14] e in oltre il 95% della popolazione obesa [15]. La correlazione di questa patologia con il diabete mellito, la sindrome metabolica, la dislipidemia e l'obesità sono ormai ben note, tanto da spingere recentemente la rivalutazione della nomenclatura della patologia stessa, con la proposta della sostituzione di NAFLD con MAFLD (metabolic fatty liver disease) [16]. I dati italiani suggeriscono una prevalenza del 27% nella popolazione generale e del 60%-70% [17] nella popolazione obesa a seconda degli studi, con una percentuale di evoluzione verso la steatoepatite e fibrosi epatica avanzata rispettivamente del 25-56% e 1-2%[18].

Il modello patogenetico della NAFLD viene definito "2 hit model", in cui il primo step corrisponde all'accumulo di grasso a livello epatocitario e il secondo allo sviluppo di una risposta infiammatoria, che rende gli epatociti vulnerabili al danno cellulare conseguente[19]; i meccanismi coinvolti sono molteplici, tra questi ricordiamo innanzitutto l'insulinoresistenza , che determina un aumento dei livelli di acidi grassi liberi proveniente dal tessuto adiposo e in secondo luogo la dislipidemia con una conseguente

disregolazione della secrezione di VLDL (very low density lipoprotein) [20-23]. Solo una sottopopolazione di pazienti affetti da NAFLD presenta però un'evoluzione della patologia verso la fibrosi epatica o l'epatocarcinoma, con una scarsa nozione, ad oggi, dei meccanismi trigger del danno epatico progressivo, sebbene la predisposizione genetica sembra svolgere un ruolo chiave [24]. Infatti studi di associazione genomica (GWAS) hanno permesso di identificare alcune mutazioni genetiche come PNPLA3-rs738409 e TM6SF2- rs58542926 coinvolte nell'insorgenza ed evoluzione della NAFLD [25-30]. Nonostante ciò, quello che differenzia la progressione del danno epatico tra i portatori della mutazione e i soggetti wild type è ancora poco noto [24]. Come già accennato l'obesità è uno dei principali fattori di rischio per lo sviluppo della NAFLD [31-33], la prevalenza dell'obesità è in continua crescita nel mondo occidentale parallelamente a quello della suddetta epatopatia [34-35]. Nella popolazione obesa sottoposta a chirurgia bariatrica la prevalenza della NAFLD varia tra il 74 e il 98%, quella della NASH supera il 37% e circa il 15-20% dei pazienti sviluppa cirrosi [36]. Secondo uno studio italiano i fattori predittivi del danno epatico nella popolazione obesa sarebbero l'insulinoresistenza, ipertensione e aumento dei livelli di AST/ALT [37]. Uno stato di infiammazione cronica di basso grado è ciò che caratterizza l'obesità e rappresenta un fondamentale fattore predittivo per l'insorgenza della NAFLD, le citochine proinfiammatorie espresse nel tessuto adiposo

viscerale e a livello epatico sarebbero la chiave della via di attivazione del danno epatico caratteristico della NAFLD [38-40].

La non completa conoscenza dei meccanismi patogenetici delle NAFLD conduce ad una mancanza di strategie diagnostico-terapeutiche efficaci [41].

Inoltre, nella sottopopolazione obesa di III grado la diagnosi è tutt'oggi una sfida tecnica, in quanto basata su tecniche ecografiche, poco sensibili in questi pazienti; lo stesso staging del danno epatico, fondamentale a scopo prognostico, viene spesso raggiunto a seguito di una biopsia epatica invasiva, che risulta indaginosa costosa, e gravata da un elevato rischio di complicanze [42-43]. Inoltre, i marker sierologici in atto disponibili, sono stati sviluppati in una sotto-popolazione di soggetti con obesità moderata.

Il trattamento dell'obesità include numerose strategie terapeutiche tra le quali ricordiamo i trattamenti farmacologici e la terapia dietetico-comportamentale ma numerosi sono gli studi che hanno dimostrato la superiorità in termini di efficacia a lungo termine della chirurgia bariatrica (CB) [44]. L'obiettivo di questo approccio terapeutico è, non solo quello di mirare a una perdita di peso stabile nel tempo, ma anche, quello di trattare efficacemente le comorbidità associate all'obesità, configurandosi come una vera e propria chirurgia metabolica [45-46] che mira ad un miglioramento della qualità di vita dei pazienti obesi sul piano familiare, relazionale e

professionale [47], accanto ad una riduzione della morbi-mortalità e dei costi socio-sanitari ad essa correlati [48].

I criteri di indicazione della CB nella popolazione in età compresa tra i 18 e i 60 anni secondo le Linee Guida Europee [49] sono i seguenti:

- BMI \geq 40 kg/m²;
- BMI compreso tra 35-40 kg/m² in presenza di almeno una comorbidità (OSA, DMT2, ipertensione, NAFLD, asma, reflusso gastro esofageo, artrite ecc...)
- BMI compreso tra 30-35 kg/m² in presenza di DMT2;

Al contrario rappresentano controindicazioni alla CB le seguenti [49]:

- Assenza di un periodo di terapia medico-comportamentale identificabile;
- Incapacità di aderire ad un prolungato follow-up;
- Disturbi psichiatrici non stabilizzati;
- Patologie gravi con rischio di vita immediato;
- Forme di diabete secondario o di tipo I;
- Coagulopatie severe;
- Etilismo e tossicodipendenza.

Le procedure chirurgiche in CB si possono classificare in due grandi categorie, restrittive o malassorbitive, le prime determinano una riduzione dell'introito alimentare e le seconde, invece, un cortocircuito intestinale con conseguente riduzione dell'assorbimento del bolo alimentare [50]; i due più

comuni interventi di CB ad oggi eseguiti sono rappresentati dalla sleeve gastrectomy (SG) (**Fig 2**), che rientra nella prima categoria e, dal By pass gastrico con ansa alla Roux (LRYBPG) (**Fig 3**) o Mini bypass gastrico (OAGB) (**Fig 4**), che rientrano in entrambe le categorie riconoscendo un duplice meccanismo di azione [51].

Figura 2. Sleeve Gastrectomy

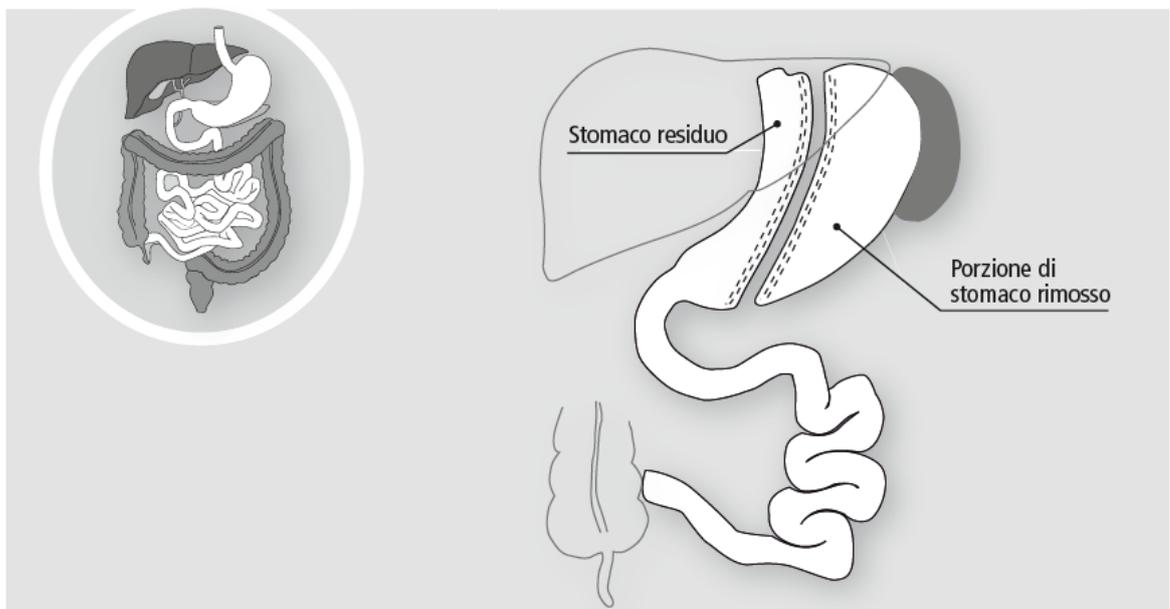


Figura 3. By pass gastrico con ansa alla Roux (LRYBPG)

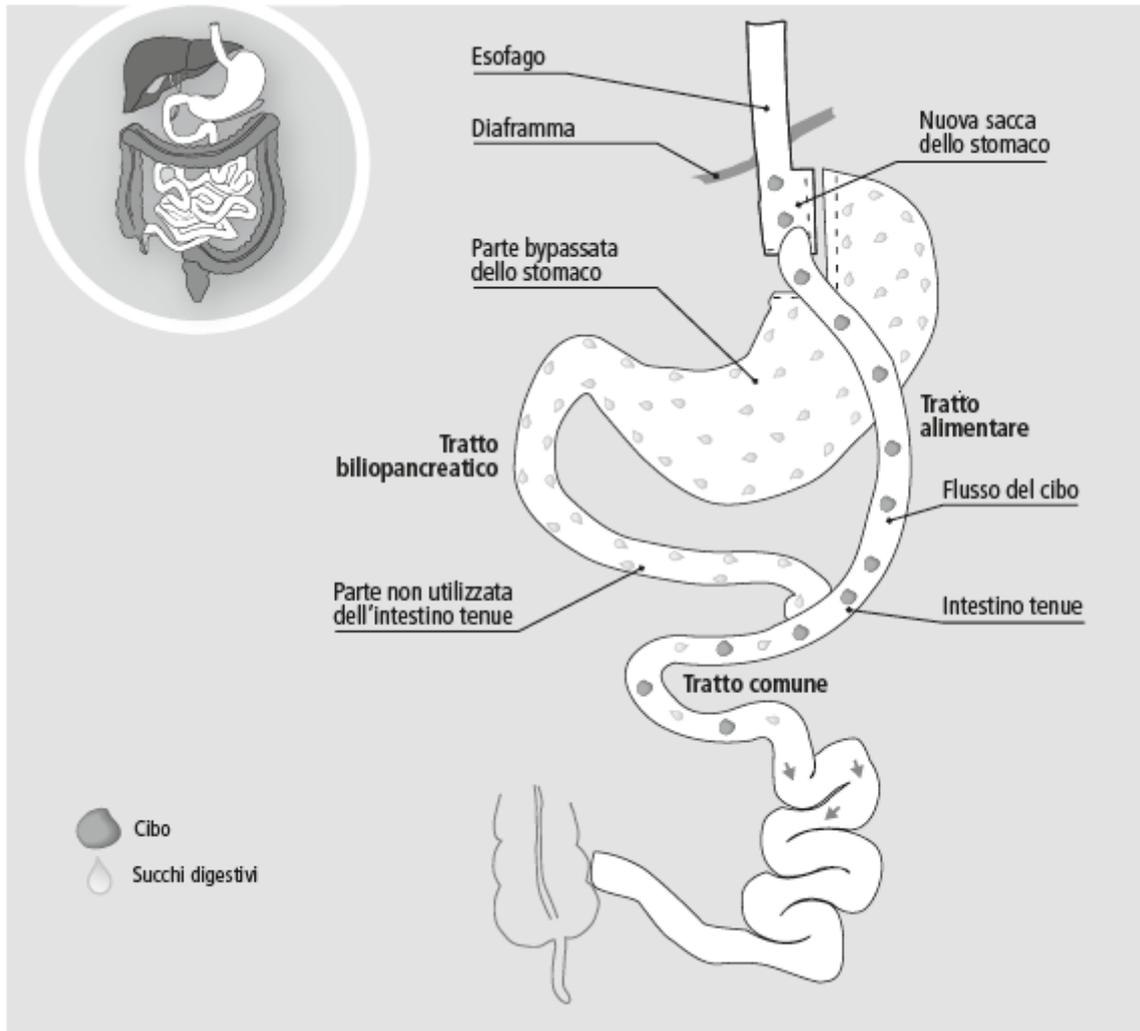
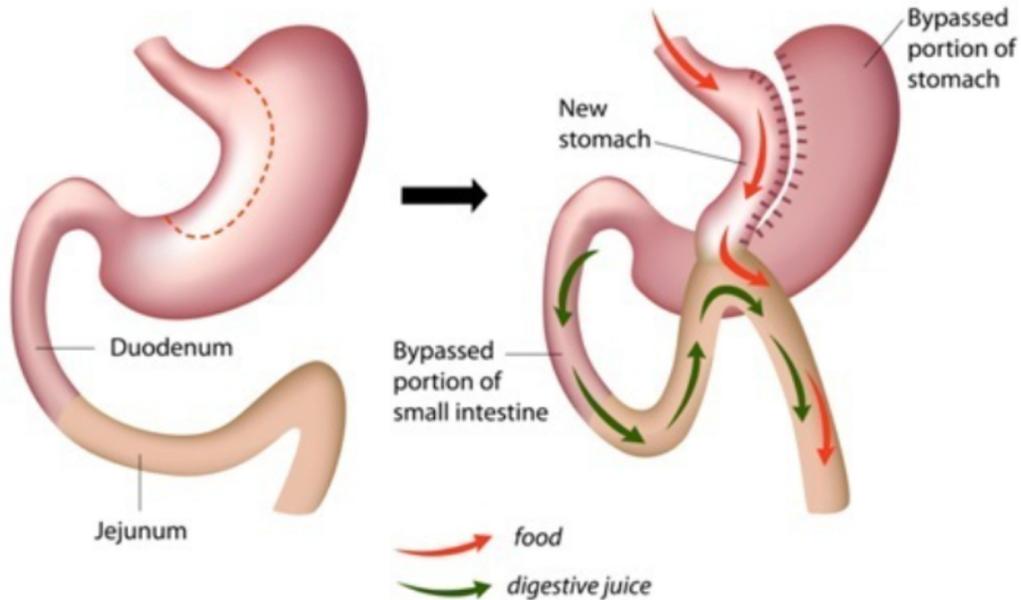


Figura 4. Mini By pass gastrico con ansa ad omega (OAGB)

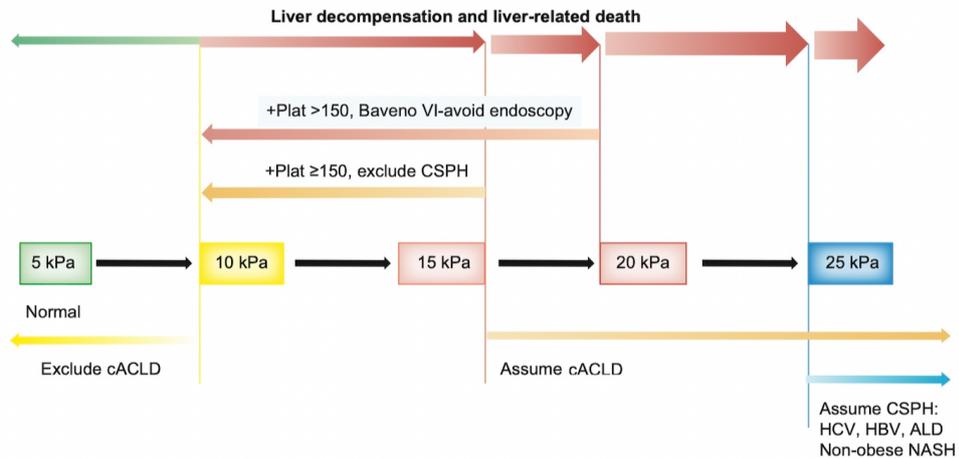


Alla luce di quanto detto finora, Lo scopo del nostro studio, dunque, è quello di identificare nuovi target terapeutici e markers sierologici per la NAFLD attraverso un'analisi trascrittomico epatica condotta in soggetti con obesità severa da sottoporre a chirurgia bariatrica, stratificati per la presenza delle già note mutazioni geniche PNPLA3 rs 738409 e TM6SF2 rs 58542926; al fine di ottimizzare il percorso diagnostico terapeutico per la NAFLD nei pazienti obesi e identificare la popolazione a maggior rischio per il danno epatico evolutivo.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto su una coorte di circa 50 pazienti affetti da obesità severa sottoposti a chirurgia Bariatrica, reclutati in maniera prospettica presso l'U.O.C. di Chirurgia Generale dell'ospedale Buccheri La Ferla. I criteri di indicazione all'intervento di chirurgia Bariatrica seguono i dettami delle linee guida internazionali, di conseguenza le controindicazioni alla stessa rappresenteranno criteri di esclusione per il nostro studio. Per tutti i pazienti è raccolta la storia clinica, è stato eseguito un esame obiettivo generale e valutazione laboratoristica di numerosi parametri quali glicemia, AST,ALT, GGT,ALP, albumina, bilirubina totale, colesterolo totale, trigliceridemia. I pazienti verranno sottoposti a Fibroscan con sonda XL preoperatorio e a 6-12 e 18 mesi dopo l'intervento chirurgico, la misurazione prevede la valutazione della sola stiffness epatica senza tenere conto del CAP **(Fig 5).**

Figura 5. Algoritmo per la determinazione non invasiva delle epatopatie croniche evolutive



I pazienti, dopo valutazione dell' idoneità sulla base degli esami necessari al work up preoperatorio, sono stati sottoposti ad intervento di chirurgia Bariatrica laparoscopico, sleeve gastrectomy o minibypass o bypassgastrico durante il quale è stata eseguita un' agobiopsia con Ago di ca 14 G.

La NAFLD verrà diagnosticata sulla base dell' analisi istologica del pezzo bioptico e la stadiazione del danno epatico seguirà i criteri della classificazione di Kleiner, l' anatomopatologo sarà all' oscuro delle caratteristiche fenotipiche e genotipiche dei pazienti.

Verrà eseguita l' analisi di genotipizzazione purificando il DNA genomico da campioni di sangue periferico, collezionati su EDTA e conservati a -20°C fino al momento dell' estrazione (QIamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen,

Hulsterweg, Germany). Il DNA totale purificato verrà sottoposto ad analisi spettrofotometrica mediante Qubit[®] (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) e conservato a -20°C fino al momento dell'esecuzione del saggio di genotipizzazione. La genotipizzazione per PNPLA3 e TM6SF2 verrà eseguita applicando il metodo di discriminazione allelica e la chimica TaqMan e, utilizzando lo strumento StepOnePlus Real Time PCR (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

La chimica TaqMan prevede l'uso di due primers e di una coppia di sonde (reazione in multiplex) la cui analisi verrà effettuata all'end point del processo di PCR.

L'utilizzo di due sonde nella stessa reazione permetterà di discriminare la presenza/ assenza delle due varianti geniche dei geni in esame (le varianti C e G per il gene PNPLA3 e le varianti C e T per il gene TM6SF2). Alla fine del saggio, in base alla fluorescenza rilevata, ciascun campione verrà identificato omozigote per un allele, omozigote per l'altro allele o come eterozigote.

Per l'analisi trascrittomica, l'RNA totale verrà purificato a partire da campioni di tessuto epatico o siero utilizzando il mini-kit miRNeasy (Qiagen, Hulsterweg, Germania).

Il tessuto epatico, trasportato in azoto liquido, verrà conservato a secco a -80°C fino al momento della distruzione/ omogenizzazione del campione e alla successiva estrazione degli acidi nucleici. L'RNA totale purificato verrà

sottoposto ad analisi spettrofotometrica (Qubit Invitrogen) e conservato a -80°C fino al momento dell'esecuzione dell'analisi trascrittomico.

Il sequenziamento dell'RNA sarà condotto utilizzando il sequenziatore NGS del sistema ION 5S (Thermo Fisher, Scientific) e il kit Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression (Thermo Fisher, Scientific). Questo sistema consente l'amplificazione simultanea di oltre 20.000 geni RefSeq in un'unica provetta, a partire da 10 ng di RNA totale estratto.

L'analisi dei dati verrà effettuata utilizzando il software Torrent Suite, in grado di fornire letture di allineamento e rilevamento automatico delle trascrizioni sui target.

Un elenco di geni espressi in modo differenziale (DEG) sarà facilmente generato utilizzando il plug-in Ion AmpliSeq™ RNA ed è altamente correlato con gli array MAQC, la qPCR e i dati dell'intero trascrittoma.

La valutazione dei pattern di espressione dell'RNA sarà effettuata mediante trascrizione inversa seguita da Real-Time PCR e microarray.

Per quanto riguarda l'analisi statistica, le variabili continue saranno espresse come media e deviazione standard e quelle categoriche come frequenza e percentuale. Le differenze tra i gruppi di polimorfismi verranno analizzate usando il test del chi-quadro e del *t*-student. L'analisi univariata e il modello di regressione logistica verranno utilizzati per valutare l'associazione dei

diversi fattori con la NAFLD, NASH o fibrosi epatica avanzata e la loro severità. Un $p \leq 0,05$ verrà considerato statisticamente significativo. L'analisi di regressione verrà eseguita utilizzando (SPSS Inc. Released 2009. PASW Statistics for Windows, Version 18.0. Chicago: SPSS Inc.).

Presso l'U.O.C. di Chirurgia Generale dell'Ospedale Buccheri La Ferla verranno arruolati i pazienti successivamente sottoposti ad intervento chirurgico, agobiopsia epatica e biopsia del tessuto adiposo viscerale al momento della chirurgia; presso questa struttura verrà altresì prelevato il materiale ematico biologico. Una parte della biopsia epatica sarà poi sottoposta ad analisi istopatologica presso il servizio afferente all'ospedale succitato mentre l'altra porzione di materiale epatico, la biopsia del tessuto adiposo e i campioni ematici verranno inviati presso il laboratorio di patologia molecolare del Dipartimento PROMISE dell'università di Palermo dove verrà effettuata l'analisi genetica e trascrittomica.

RISULTATI

I risultati fino ad oggi disponibili sono frutto dell'elaborazione dei dati raccolti sui primi 25 pazienti arruolati nello studio.

I pazienti sono rappresentati da 9 uomini e 16 donne tutti affetti da Obesità di III grado e rispondenti ai criteri di inclusione per la chirurgia bariatrica, essi presentano un BMI medio di 46,4 kg/m² ed un età media di 41 anni.

Per quanto riguarda il tipo di intervento chirurgico 5 pazienti sono stati sottoposti a Sleeve Gastrectomy, 4 a Mini Bypass Gastrico e 16 a Bypass Gastrico, la totalità degli interventi chirurgici è stata eseguita in laparoscopia e tutti i pazienti sottoposti ad anestesia generale opioid free.

Tra i pazienti oggetto di studio 16 erano affetti da ipertensione arteriosa, 10 da diabete mellito di tipo II e 10 da OSAS già in terapia con CPAP notturna.

Per tutti i pazienti sono stati monitorati i parametri laboratoristici preoperatori (**Tabella 1**).

A questo proposito e con particolare riguardo rispetto ai valori di AST e Alt rilevati, riportiamo innanzitutto il range di normalità di riferimento del laboratorio sede di analisi dei campioni comprese tra 10 e 50 U/L; posto questo possiamo rilevare quanto segue:

- nessuno dei pazienti oggetto di studio ha presentato valori di ALT preoperatori superiori ai valori di normalità;

- 6 pazienti, ovvero il 24% del gruppo di studio, ha presentato valori di ALT superiori al range di normalità, seppure siano stati rilevati valori di entità non superiore a 2x il limite superiore. Tra questi 2 pazienti hanno presentato valori di stiffness epatica al Fibroscan > 10 kpa e gli altri valori compresi tra 6 e 8 kpa.

Tabella 1. Caratteristiche demografiche e parametri bio-umorali pre e post-operatori della popolazione oggetto di studio

	Valori
Sesso	
Donne	16
Uomini	9
Eta'	41±12,8
BMI (kg/m²)	46,4±6,9
Bilirubina pre-operatoria (mg/dl)	0,5±0,2
WBC (mila/μL)	9,5±2,1
Hb (g/dl)	13,1±1,7
AST(U/L)	28,1±7,3
ALT(U/L)	35,5±15,2
Piastrine (mila/μL)	290±62,9
INR	1,01±0,04
aPTT (sec)	11,04±5,5
Albumina (g/dl)	3,7±0,4
GGT (U/L)	46±59
FA (U/L)	82±37,8
HbA1C%	6±1
Colesterolo totale (mg/dl) pre-operatorio	195±44
HDL (mg/dl)	45±12
LDL (mg/dl) pre-operatorio	123±35
Trigliceridi (mg/dl) pre-operatorio	163±98
Tipo di chirurgia	
SG	5
LRYBPG	16
OAGB	4

Tutti i pazienti hanno eseguito un'ecografia dell'addome completo preoperatoria questa ha evidenziato in 4 pazienti una steatosi di grado moderato, in 10 pazienti una steatosi di grado severo, in un solo paziente una steatosi lieve e in 10 pazienti nessuna caratteristica patologica.

I pazienti sono stati sottoposti a Fibroscan nel periodo preoperatorio con un valore di stiffness epatica medio di 7,9 kpa, un valore massimo di 10,3 kpa e un valore minimo di 4,5 kpa. In soli 3 pazienti è stato valutato il CAP con i seguenti valori 323 db/m, 310 db7m e 240 db/m.

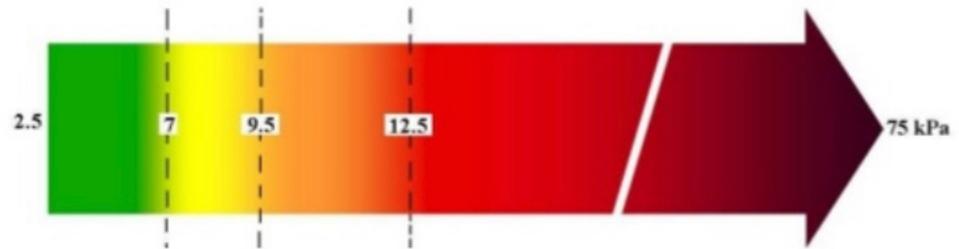
In particolare correlando i valori di stiffness epatica alla scala Metavir rileviamo quanto segue (**Fig 6**):

- 3 pazienti , il 12% nel campione in oggetto, hanno presentato stiffness epatica > 10 kpa suggestiva di fibrosi epatica severa;
- 3 pazienti, il 12% nel campione oggetto di studio, hanno presentato stiffness epatica > 8 kpa suggestiva di fibrosi moderata;
- 1 solo paziente ha presentato stiffness epatica pari a 4,5 kpa e dunque fibrosi assente;
- I restanti pazienti e dunque il 76% nel campione oggetto di studio ha presentato stiffness epatica compresa tra 6 e 8 kpa compatibile con un grado di fibrosi lieve;

- in tutti i pazienti in cui è stato rilevato il CAP, il 12% del campione di studio, il valore è apparso in un solo caso pari a 240 db/m compatibile con assenza di steatosi e in tutti gli altri superiore a 300 db/m e dunque compatibile con un grado di steatosi severa.

Fig 6. Scala di interpretazione del Fibroscan

Liver stiffness cut-offs in chronic liver diseases



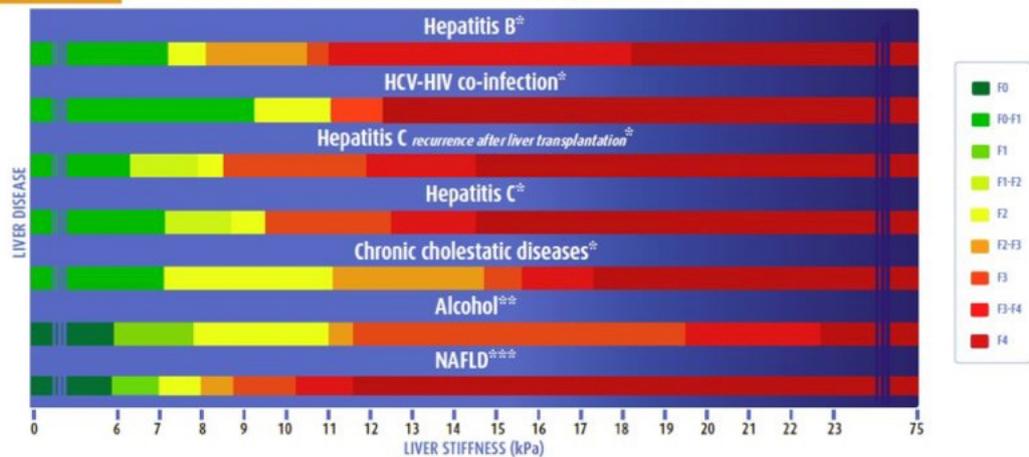
Matavir	F0-F1	F2	F3	F4
---------	-------	----	----	----

Fibrosis	Mild	Sign	Severe	Cirrhosis
----------	------	------	--------	-----------



SCORING CARD

CORRELATION BETWEEN LIVER STIFFNESS (kPa) & FIBROSIS STAGE



CAP Score	Steatosis Grade	Amount of Liver showing Fatty Change
150 – 248 dB/m	S0	0 – 10%
248 – 260 dB/m	S1	11% - 33%
260 – 280 dB/m	S2	34% - 66%
Higher than 280 dB/m	S3	Higher than 67%

Current Meta-analysis 2020 interpretation guide however these are NOT absolute and should be discussed with your physician

I dati relativi al follow up a 6 mesi sono in corso di elaborazione.

Durante l'intervento chirurgico sono state effettuate biopsie epatiche e biopsie del tessuto adiposo viscerale.

Le biopsie del tessuto adiposo viscerale sono state effettuate mediante l'utilizzo di forbici a freddo in corrispondenza del grande epiploon ed estratte attraverso il trocar mesogastrico.

Le biopsie epatiche sono state realizzate con ago da 14G inserito in corrispondenza dell'incisione del trocar epigastrico e in corrispondenza del lobo epatico di sinistra, parte del materiale prelevato è stato inviato dopo conservazione in formalina per esame istologico. I risultati dell'analisi anatomopatologica ad oggi disponibili mostrano nella totalità dei pazienti un quadro di steatoepatite.

La restante quota di tessuto epatico e la porzione di tessuto adiposo viscerale sono stati dapprima fissati in azoto liquido e successivamente conservati a -80°C.

Su tutti i pazienti sono stati effettuati prelievi ematici pre-operatori da cui è stato estratto mediante centrifuga il plasma, il siero e il fondello, questi sono stati successivamente conservati a -20°C.

I campioni biologici rappresentati dalle biopsie epatiche, tessuto adiposo viscerale e il materiale saranno successivamente e nel corso dello studio inviati per l'estrazione dell'm-RNA e l'analisi trascrittomico.

CONCLUSIONI

I dati fino ad ora raccolti e su cui è stata eseguita un'analisi puramente descrittiva sono dati parziali clinico-laboratoristici e strumentali, l'epidemia da SARS COV-2 e il conseguente rallentamento della chirurgia bariatrica elettiva nonché la difficoltà logistica legata alla necessità di eseguire all'estero l'analisi trascrittomica hanno determinato la necessità di un più lungo periodo per l'ottenimento dei risultati di cui all'oggetto della tesi.

I pazienti sono tutt'ora in corso di arruolamento e i campioni continueranno ad essere prelevati al fine di ottenere risultati conclusivi e raggiungere l'obiettivo di studio in termini di correlazione tra fattori predittivi e prevenzione del danno epatico nella sottopopolazione di pazienti con indicazione a chirurgia bariatrica per obesità di III grado.

Bibliografia

1. Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, Ogden CL. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. *JAMA*. 2012 Feb 1;307(5):491-7.
2. Blundell JE, Dulloo AG, Salvador J, Frühbeck G; EASO SAB Working Group on BMI. Beyond BMI--phenotyping the obesities. *Obes Facts*. 2014;7(5):322-8.
3. Landecho MF, Valentí V, Moncada R, Frühbeck G. Eligibility and Success Criteria for Bariatric/Metabolic Surgery. *Adv Exp Med Biol*. 2017;960:529-543.
4. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, Singh GM, Gutierrez HR, Lu Y, Bahalim AN, Farzadfar F, Riley LM, Ezzati M; Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Body Mass Index). National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet*. 2011 Feb 12;377(9765):557-67.
5. World Health Organisation (WHO)_Obesity. Available at www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/noncommunicable-disease/obesity (last accessed September 9,2013)
6. World Health Organisation (WHO): FactSheet No.311 (updated March 2013). Available at www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/ (last accessed September 9,2013)
7. Frühbeck G, Toplak H, Woodward E, Yumuk V, Maislos M, Oppert JM; Executive Committee of the European Association for the Study of Obesity. Obesity: the gateway to ill health - an EASO position statement on a rising public health, clinical and scientific challenge in Europe. *Obes Facts*. 2013;6(2):117-20.

8. Flegal KM, Kit BK, Orpana H, Graubard BI. Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2013 Jan 2;309(1):71-82.
9. Finkelstein EA, Trogon JG, Cohen JW, Dietz W. Annual medical spending attributable to obesity: payer-and service-specific estimates. *Health Aff (Millwood)*. 2009 Sep-Oct;28(5):w822-31.
10. Frühbeck G. Obesity: Screening for the evident in obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2012 Oct;8(10):570-2.
11. Sjöström L. Review of the key results from the Swedish Obese Subjects (SOS) trial - a prospective controlled intervention study of bariatric surgery. *J Intern Med*. 2013 Mar;273(3):219-34.
12. Byrne CD, Targher G. NAFLD: a multisystem disease. *J Hepatol*. 2015 Apr;62(1 Suppl):S47-64.
13. Tsuneto A, Hida A, Sera N, Imaizumi M, Ichimaru S, Nakashima E, Seto S, Maemura K, Akahoshi M. Fatty liver incidence and predictive variables. *Hypertens Res*. 2010. Jun;33(6):638-43.
14. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*. 2004. Dec;40(6):1387-95.
15. Coccia F, Testa M, Guarisco G, Bonci E, Di Cristofano C, Silecchia G, Leonetti F, Gastaldelli A, Capoccia D. Noninvasive assessment of hepatic steatosis and fibrosis in patients with severe obesity. *Endocrine*. 2020. Mar;67(3):569-578.
16. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero-Gomez M, Zelber-Sagi S, Wai-Sun Wong V, Dufour JF, Schattenberg JM, et al. A new definition for

- metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol.* 2020. Jul;73(1):202-209.
17. Petta S, Di Marco V, Pipitone RM, Grimaudo S, Buscemi C, Craxi A, Buscemi S. Prevalence and severity of nonalcoholic fatty liver disease by transient elastography: Genetic and metabolic risk factors in a general population. *Liver Int.* 2018. Nov;38(11):2060-2068.
18. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology.* 2016. Jul;64(1):73-84.
19. Mathurin P, Hollebecque A, Arnalsteen L, Buob D, Leteurtre E, Caiazzo R, Pigeyre M, Verkindt H, Dharancy S, Louvet A, Romon M, Pattou F. Prospective study of the long-term effects of bariatric surgery on liver injury in patients without advanced disease. *Gastroenterology.* 2009. 2009 Aug;137(2):532-40.
20. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH Jr, Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med* 2006. Mar 23;354(12):1264-72.
21. 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.* 1999. Nov;107(5):450-5.
22. Dongiovanni P, Petta S, Maglio C, Fracanzani AL, Pipitone R, Mozzi E, Motta BM, Kaminska D, Rametta R, Grimaudo S, et al. Transmembrane 6 superfamily member 2 gene variant disentangles nonalcoholic steatohepatitis from cardiovascular disease. *Hepatology.* 2015. Feb;61(2):506-14.
- Eslam M, Valenti L, Romeo S. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. *J Hepatol.* 2018. Feb;68(2):268-279.

23. Danford CJ, Yao ZM, Jiang ZG. Non-alcoholic fatty liver disease: a narrative review of genetics. *J Biomed Res.* 2018. Nov 20;32(5):389-400.
24. Singal AG, Manjunath H, Yopp AC, Beg MS, Marrero JA, Gopal P, Waljee AK. The effect of PNPLA3 on fibrosis progression and development of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis[J]. *Am J Gastroenterol*, 2014. Mar;109(3):325-34.
25. Petta S, Miele L, Bugianesi E, Cammà C, Rosso C, Boccia S, Cabibi D, Di Marco V, et al. Glucokinase regulatory protein gene polymorphism affects liver fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *PLoS One*, 2014. Feb 3;9(2):e87523.
26. Kozlitina J, Smagris E, Stender S, Nordestgaard BG, Zhou HH, Tybjaerg-Hansen A, Vogt TF, Hobbs HH, Cohen JC. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Nat Genet*, 2014. Apr;46(4):352-6.
27. Mancina RM, Dongiovanni P, Petta S, Pingitore P, Meroni M, Rametta R, Borén J, Montalcini T, Pujia A, Wiklund O, Hindy G, et al. The MBOAT7/TMC4 variant rs641738 increases risk of nonalcoholic fatty liver disease in individuals of European descent[J]. *Gastroenterology*, 2016. May;150(5):1219-1230.e6.
28. Dongiovanni P, Valenti L.. Genetics of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Metabolism*, 2016. Aug;65(8):1026-37.
29. Mokdad AH, Serdula MK, Dietz WH, Bowman BA, Marks JS, Koplan JP..The spread of the obesity epidemic in the United States, 1991-1998.*JAMA.* 1999. Oct 27;282(16):1519-22.
30. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Johnson CL. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000.*JAMA.* 2002. Oct 9;288(14):1723-7.
31. Deitel M. The breadth of "obesity".*Obes Surg.* 2003. Oct;13(5):665-7.

32. Clain DJ, Lefkowitz JH. Fatty liver disease in morbid obesity. *Gastroenterol Clin North Am.* 1987. Jun;16(2):239-52.
33. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM.
The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol.* 2003. May;98(5):960-7.
34. Liew PL, Lee WJ, Lee YC, Wang HH, Wang W, Lin YC..Hepatic histopathology of morbid obesity: concurrence of other forms of chronic liver disease. *Obes Surg.* 2006. Dec;16(12):1584-93.
35. Papadia FS, Marinari GM, Camerini G, Murelli F, Carlini F, Stabilini C, Scopinaro N.Liver damage in severely obese patients: a clinical-biochemical-morphologic study on 1,000 liver biopsies. *Obes Surg.* 2004. Aug;14(7):952-8.
36. Day CP.From fat to inflammation. *Gastroenterology.* 2006. Jan;130(1):207-10.
37. Koda M, Kawakami M, Murawaki Y, Senda M..The impact of visceral fat in nonalcoholic fatty liver disease: cross-sectional and longitudinal studies. *J Gastroenterol.* 2007. Nov;42(11):897-903.
38. Das SK, Balakrishnan V..Role of cytokines in the pathogenesis of non-alcoholic Fatty liver disease. *Indian J Clin Biochem.* 2011. Apr;26(2):202-9.
39. Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H..Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol.* 2006. Oct;45(4):600-6.
40. Jorge ASB, Andrade JMO, Paraíso AF, Jorge GCB, Silveira CM, de Souza LR, Santos EP, Guimaraes ALS, Santos SHS, De-Paula AMB. Body mass index and the visceral adipose tissue expression of IL-6 and TNF-alpha are associated with the morphological severity of non-alcoholic fatty liver disease in individuals with class III obesity. *Obes Res Clin Pract.* 2018. Jan-Feb;12(Suppl 2):1-8.

41. Bedossa P, Tordjman J, Aron-Wisnewsky J, Poitou C, Oppert JM, Torcivia A, Bouillot JL, Paradis V, Ratziu V, Clément K..Systematic review of bariatric surgery liver biopsies clarifies the natural history of liver disease in patients with severe obesity.Gut. 2017. Sep;66(9):1688-1696.
42. Polyzos SA, Mantzoros CS..Necessity for timely noninvasive diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease.Metabolism. 2014. Feb;63(2):161-7.
43. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 2005. Jun;41(6):1313-21.
44. Gloy VL, Briel M, Bhatt DL, Kashyap SR, Schauer PR, Mingrone G, Bucher HC, Nordmann AJ. Bariatric surgery versus non-surgical treatment for obesity: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials.BMJ. 2013 Oct 22;347:f5934.
45. Sjöström L, Lindroos AK, Peltonen M, Torgerson J, Bouchard C, Carlsson B, Dahlgren S, Larsson B, Narbro K, Sjöström CD, Sullivan M, Wedel H; Swedish Obese Subjects Study Scientific Group. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery N Engl J Med. 2004 Dec 23;351(26):2683-93.
46. Raz I, Eldor R, Cernea S, Shafrir E. Diabetes: insulin resistance and derangements in lipid metabolism. Cure through intervention in fat transport and storage. Diabetes Metab Res Rev. 2005 Jan-Feb;21(1):3-14.
47. Scott DJ, Villegas L, Sims TL, Hamilton EC, Provost DA, Jones DB. Intraoperative ultrasound and prophylactic ursodiol for gallstone prevention following laparoscopic gastric bypass.Surg Endosc. 2003 Nov;17(11):1796-802.
48. Neovius M, Narbro K, Keating C, Peltonen M, Sjöholm K, Agren G, Sjöström L, Carlsson L. Health care use during 20 years following bariatric surgery.JAMA. 2012 Sep 19;308(11):1132-41.

49. Fried M, Yumuk V, Oppert JM, Scopinaro N, Torres A, Weiner R, Yashkov Y, Frühbeck G; International Federation for Surgery of Obesity and Metabolic Disorders-European Chapter (IFSO-EC); European Association for the Study of Obesity (EASO); European Association for the Study of Obesity Obesity Management Task Force (EASO OMTF).
Interdisciplinary European guidelines on metabolic and bariatric surgery. *Obes Surg*. 2014 Jan;24(1):42-55.
50. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrback K, Schoelles K. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2004 Oct 13;292(14):1724-37.