



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato in Fisiopatologia del Metabolismo Lipidi e Lipoproteine
Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica (DIBIMIS).
Settore Scientifico Disciplinare – MED/09

Ruolo del gene PNPLA3 nella suscettibilità genetica della steatosi epatica non alcolica

IL DOTTORE
Anna Di Prima

IL COORDINATORE
Prof. Maurizio Averna

IL TUTOR
Dott. Carlo Maria Barbagallo

CICLO XXV
ANNO DI CONSEGUIMENTO DEL TITOLO 2015

INDICE

INTRODUZIONE	2
STEATOSI EPATICA NON ALCOLICA	
I. DEFINIZIONE.....	4
II. EPIDEMIOLOGIA	5
III. STORIA NATURALE.....	7
IV. PATOGENESI	8
1. Ruolo dell'insulino-resistenza	8
2. Ruolo dello stress ossidativo: "modello a due colpi".....	9
3. Ruolo delle cellule dell'immunità, cellule dell'infiammazione e delle citochine	10
4. Ruolo delle adipochine	11
VI. DIAGNOSI	13
1. Reperti clinici	13
2. Dati di laboratorio.....	13
VIII. RUOLO DEI FATTORI GENETICI NELLA PATOGENESI DELLA NAFLD.....	16
1. Geni che influenzano il metabolismo e la steatosi	19
2. Geni che influenzano lo stress ossidativo	21
3. Geni coinvolti nella risposta all'endotossina e nel polimorfismo delle citochine	21
4. Geni che influenzano il rimodellamento della matrice extracellulare e l'accumulo di fibrosi.....	22
5. Ruolo delle regioni geniche con variazione del numero di copie (CNV)	23
6. Stratificazione genetica del rischio	24
IX. GENE PNPLA3	25
1. Struttura e funzione	25
2. Nesso patogenetico tra PNPLA3 e NAFLD	26
X. LO STUDIO.....	31
1. Scopo dello studio	31
2. Pazienti e metodi	32
3. Studio del polimorfismo genetico rs738409	34
4. Analisi statistiche.....	42
5. Risultati	43
6. Discussione.....	49
7. Conclusioni.....	52
BIBLIOGRAFIA	53

INTRODUZIONE

La steatosi epatica non alcolica rappresenta nella maggior parte dei casi una manifestazione localizzata di un disordine metabolico sistemico, specialmente del versante glicolipidico.

L'alta prevalenza dei suddetti dismetabolismi e delle patologie ad essi correlate nella popolazione mondiale rende ragione dell'alta frequenza di riscontri ecografici, talvolta meramente occasionali, di steatosi epatica. Quest'ultima, di fatto, è la prima causa di epatopatia cronica in occidente³ e spesso si iscrive in un contesto di sindrome metabolica, in associazione a obesità, dislipidemia, ipertensione e intolleranza agli idrati del carbonio o diabete mellito di tipo 2.

L'accumulo a livello intra-epatocitario di lipidi viene favorito da diversi meccanismi, tra i quali maggiormente incidono l'insulino-resistenza e l'azione di cellule della flogosi con produzione di citochine e altri mediatori ad alto potere ossidante in grado di favorire l'innescamento e il mantenimento dello stato infiammatorio. Essi potenzialmente sono in grado sia di determinare un viraggio metabolico dell'epatocita verso una maggiore lipogenesi e una minore lipolisi, sia di consentire il progredire delle alterazioni istologiche verso l'evoluzione fibrotica e infine, nei casi più gravi, verso la cirrosi epatica e l'epatocarcinoma.

In questo contesto, si inseriscono i fattori genetici che molti studi hanno cercato di individuare per comprendere in toto la patogenesi della steatosi epatica non alcolica, soprattutto in quei pazienti nei quali questa si sviluppa indipendentemente da fattori di rischio concomitanti facenti parte del quadro clinico della sindrome metabolica.

Attualmente, gli studi sui fattori genetici favorevoli all'accumulo di lipidi nel fegato sono rivolti verso geni in grado di influenzare il metabolismo epatocitario, geni coinvolti nella detossificazione di sostanze ad alto potere ossidante e geni che regolano la risposta infiammatoria e l'accumulo di matrice extra-cellulare.

Tra questi, il gene PNPLA3 è uno dei più studiati in tutto il mondo, in modo particolare la sua variante I148M (rs738409 C > G). Questa variante sembra predisporre all'intero spettro di danni al fegato, che va dalla semplice steatosi fino alla steatoepatite e al danno fibrotico progressivo. Il ruolo del gene PNPLA3 e della

proteina da esso codificata, adiponutrina, tuttavia rimane poco chiaro e molti studi attribuiscono alla variante I148M (rs738409 C > G) diverse funzioni, alcuni di un'acquisita funzione lipogenica, altri di una perdita di funzionalità lipolitica.

Alla luce di queste considerazioni, abbiamo voluto eseguire questo studio, oggetto della tesi, che è stato condotto su un gruppo di pazienti con sindrome metabolica, selezionati nell'ambito di un progetto coordinato dalla Società Italiana per lo Studio dell'Aterosclerosi (SISA) e che ha coinvolto quattro diversi Centri ospedalieri italiani, tra cui quello attualmente coordinato dal prof. Maurizio Averna dell'AOU Policlinico di Palermo. In questi soggetti è stata studiata la prevalenza dei genotipi CC (wild type), CG e GG del polimorfismo rs738409 del gene PNPLA3 e successivamente la relazione tra questi, il grado di steatosi epatica e altri parametri metabolici come il colesterolo totale, l'HDL-colesterolo, i trigliceridi, la glicemia a digiuno, l'insulinemia e i livelli di Apo-B. La distribuzione dei genotipi rs738409 del gene PNPLA3 è stata valutata anche su un campione di popolazione più ampio selezionato nel contesto di uno studio epidemiologico eseguito sugli abitanti di Ventimiglia di Sicilia (provincia di Palermo) ai fini di ottenere un termine di paragone per meglio definire la prevalenza di questo polimorfismo.

STEATOSI EPATICA NON ALCOLICA

I. DEFINIZIONE

La steatosi epatica non alcolica (Non Alcoholic Fatty Liver Disease = NAFLD) rappresenta un'ampia gamma di disordini caratterizzati dalla presenza a livello epatico di steatosi in soggetti in cui sia stato escluso un significativo consumo di alcolici, potenzialmente associata ad una elevata morbilità e mortalità. Il limite alcolico affinché si riscontrino danno epatico varia in correlazione a diversi fattori come sesso, età e razza e si attesta sui 20 gr/die (alcuni studi lo differenziano in 30 gr/die per i maschi e 20 gr/die per le femmine)¹.

E' possibile il riscontro di semplice steatosi, oppure di steatosi con importante componente infiammatoria (NASH, Non Alcoholic SteatoHepatitis), o di quadri fibrotici fino alla cirrosi e al carcinoma epatocellulare. Con il termine steatosi epatica intendiamo l'accumulo di lipidi, di cui gran parte trigliceridi, all'interno dell'epatocita; l'accumulo di questi, per essere considerato non patologico, deve essere inferiore al 5% del peso del fegato².

La steatosi epatica può essere determinata da cause di varia natura: per questo occorre distinguere una NAFLD primitiva da una NAFLD secondaria.

La NAFLD primitiva è associata ad obesità (prevalentemente viscerale), diabete, ipertensione arteriosa e dislipidemia, ed è correlata a marcatori clinici e biologici di insulino-resistenza, elementi che configurano la sindrome metabolica, della quale può essere considerata una delle manifestazioni cliniche.

La NAFLD secondaria è l'espressione di un'alterazione del metabolismo epatico correlata ad una causa specifica, la quale può avere diversa natura (un'epatopatia da farmaci o un'epatite virale), oppure può essere correlata ad un determinato momento della vita, come la steatosi acuta della gravidanza, che è una delle forme più rare di steatosi.

II. EPIDEMIOLOGIA

La NAFLD è la causa più frequente di epatopatia cronica in occidente³.

Il tasso di incidenza di NAFLD è in aumento. Si prevede che, entro i prossimi due decenni, la NASH (20% dei casi di NAFLD) diventerà la causa predominante di cirrosi che necessiterà di trapianto di fegato⁴.

Dati basati sulla presenza di determinati marcatori (livello ematico di transaminasi ad esempio) indicano che la prevalenza della NAFLD varia e si aggira tra il 10 e il 25% della popolazione generale. In uno studio eseguito in Giappone l'incidenza di NAFLD è stata stimata in 31 casi su 1000 per anno, prendendo in considerazione i livelli ematici di aminotransferasi come marcatore surrogato per NAFLD⁵. In uno studio giapponese più recente, effettuando esami ecografici addominali bi-annuali in un gruppo di 1.635 persone, si notò che l'incidenza di NAFLD era di 19,9 per 1000 persone per anno (22,3 per gli uomini, 18,6 per le donne) con un picco nella sesta decade di vita⁶.

La prevalenza di NAFLD in relazione ai soli elevati livelli ematici di transaminasi, in assenza di supporto strumentale, varia tra il 7% e il 11%, ma questo è un valore approssimativo e sottostimato in quanto i livelli di aminotransferasi possono rientrare nel range della norma in un individuo con NAFLD.⁷ In uno studio effettuato tramite esami di biopsia epatica in potenziali donatori viventi per trapianto di fegato, la prevalenza di steatosi epatica significativa era del 20%⁸. Tale prevalenza arriva al 60-70% nei soggetti affetti da obesità e/o alterazioni del metabolismo glucidico, dall'intolleranza agli idrati del carbonio fino al diabete.

- Fattore etnico

L'appartenenza ad un determinato gruppo etnico influenza altrettanto la prevalenza di NAFLD: nel Dallas Heart Study, la prevalenza di steatosi epatica era del 45% in ispanici, del 33% in caucasici non ispanici, e del 24% nei paesi afro-americani⁹(Figura 1). Recentemente è stato approfondito uno studio sulla popolazione ispanica presente negli Stati Uniti, già di per sé caratterizzata da una maggiore incidenza di NAFLD, valutando eventuali differenze tra i sottogruppi ispanici più importanti, ovvero gli ispanici di origine messicana e gli ispanici di

origine portoricana. E' risultato che gli ispanici di origine messicana hanno una maggiore frequenza di NAFLD rispetto agli ispanici di origine portoricana, suggerendo la presenza di altri fattori di rischio nella popolazione messicana, diversi da quelli tradizionali, probabilmente di natura genetica¹⁰.

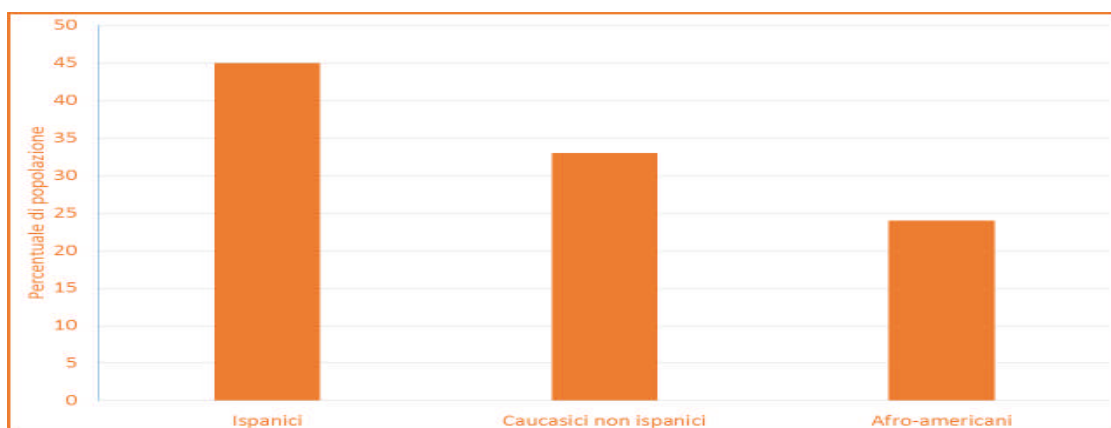
- Fattore sessuale

La prevalenza di NAFLD registrata nel Dallas Heart Study è stata del 42% negli uomini bianchi rispetto a solo il 24% nelle donne bianche, e inoltre questa differenza non è risultata attribuibile a differenze di peso corporeo o insulino-sensibilità¹¹. A sostegno della validità di questi dati, ulteriori studi hanno suggerito che gli estrogeni possono avere un ruolo protettivo nel ridurre il rischio di sviluppare NAFLD¹².

- Fattore iatrogeno

La prevalenza di NAFLD viene altresì influenzata da eventi iatrogeni, come l'intervento chirurgico di bypass digiuno-ileale, che è da tempo riconosciuto come causa di NAFLD, e la duodenocefalopancreatectomia si è dimostrata essere associata ad un aumentato rischio di successivo sviluppo di NAFLD¹³.

Fig.1. Prevalenza della NAFLD nei vari gruppi etnici secondo il Dallas Heart Study⁹.



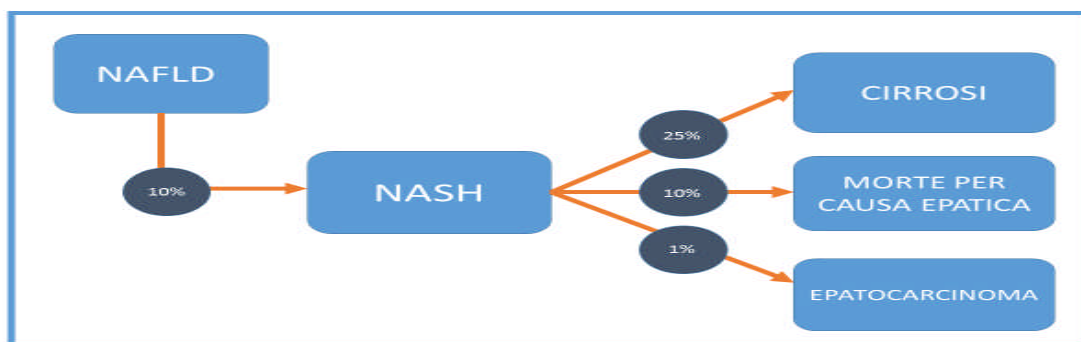
III. STORIA NATURALE

La maggior parte dei pazienti con il solo quadro di steatosi non svilupperà successivamente un quadro di NASH o di fibrosi avanzata, in quanto solo circa il 10% dei casi evolve in NASH, la quale però a sua volta può progredire verso forme più gravi quali la cirrosi, la morte per cause epatiche e l'epatocarcinoma rispettivamente nel 25%, 10% e 1% dei casi¹⁴(Figura 2).

Diversi aspetti sembrano essere correlati ad una più rapida progressione della patologia, ma l'età e il grado di infiammazione osservata nella biopsia epatica iniziale sono fattori di rischio più rilevanti per la progressione verso fenomeni di fibrosi¹⁵. L'evoluzione della NAFLD in quadri di franca cirrosi è stimata per il 5% dei casi¹⁶. Nelle fasi avanzate della patologia vi è una sovrapposizione tra causa (insulino-resistenza) ed effetto (fibrosi), la cirrosi infatti induce di per sé insulino-resistenza, aggravando ancor di più l'evoluzione della malattia¹⁷. I soggetti con NAFLD sono a rischio significativamente più alto per malattie cardiovascolari essendo la patologia correlata più frequentemente ad alterazioni dell'assetto lipidico, e in effetti gli eventi cardiovascolari rappresentano tutt'oggi la causa più comune di morte¹⁸. Rispetto alla semplice steatosi, la NASH ha un tasso di mortalità correlata a malattie epatiche più elevato, con un rischio circa 6 volte maggiore per la NASH semplice e circa 10 volte maggiore per la NASH con fibrosi avanzata.¹⁹

I pazienti con NAFLD, rispetto a pazienti con epatopatia cronica HCV-correlata o con NASH o con cirrosi epatica, hanno minore probabilità di mortalità per cause correlate alle malattie epatiche, ma hanno maggiore probabilità di morte per cause cardiovascolari, iscrivendosi spesso in contesti di sindrome metabolica, con relativa dislipidemia e relativo rischio cardiovascolare²⁰.

Fig. 2. Possibili evoluzioni patologiche in pazienti con steatosi epatica non alcolica¹⁴.



IV. PATOGENESI

Allo stato attuale l'obesità, l'insulino-resistenza e condizioni correlate quali il diabete mellito, lo stress ossidativo, l'azione delle citochine pro-infiammatorie, e altri fattori sono stati identificati come i maggiori responsabili della patogenesi della NAFLD (Figura 3), rappresentando quindi potenziali target terapeutici su cui intervenire²¹.

Fig.3 Meccanismi patogenetici della steatosi epatica non alcolica (Angulo, N Engl J Med 2002)



1. Ruolo dell'insulino-resistenza

L'IR è considerata il *primum movens* dei meccanismi che determinano la steatosi epatica, anche in assenza di diabete, ed un importante fattore di progressione verso forme più severe di danno epatico²².

In presenza di IR si ha un aumento della lipolisi a livello del tessuto adiposo, cui consegue un incremento del flusso di acidi grassi liberi (free fatty acids, FFA) nel fegato. L'IR, inoltre, promuove la sintesi *de novo* dei trigliceridi nel fegato ed inibisce la ossidazione epatica degli acidi grassi con conseguente accumulo dei trigliceridi²³. D'altra parte l'iperinsulinemia determina un aumento della sintesi degli acidi grassi ed una ridotta escrezione dei trigliceridi in forma di VLDL. Inoltre l'iperinsulinemia sopprime la produzione epatica di glucosio e ne aumenta l'uptake²⁴.

Tutte queste modificazioni interferiscono con la fosforilazione del recettore insulinico²⁵, contribuendo alla IR. L'insulina regola la lipogenesi, modulando

l'attività di diversi fattori di trascrizione, tra cui la *sterol regulatory element-binding protein-1* (SREBP-1)²⁶ ed il PPAR- γ ²⁷, coinvolto anche nell'attivazione della gluconeogenesi, nel trasporto e ossidazione degli acidi grassi e nella chetogenesi.

Gli elevati livelli di acidi grassi liberi osservati nei pazienti con NAFLD ed IR, sono spiegati dalla perdita di sensibilità all'insulina da parte del tessuto adiposo con conseguente mancata soppressione della lipolisi²⁸

2. Ruolo dello stress ossidativo: “modello a due colpi”

Sebbene il fegato sia l'organo maggiore per la distribuzione dei lipidi, la capacità epatica di accumulare tali sostanze è limitata, e solo piccole quantità di lipidi sembrano influenzare in modo critico la competenza metabolica del fegato.

Di conseguenza, una insufficiente funzione metabolica del tessuto adiposo determina un aumentato flusso di lipidi al fegato e dunque l'insorgenza di steatosi epatica. Questa deposizione reversibile di trigliceridi intra-epatocitari determina alterazioni metaboliche e molecolari, il cosiddetto “first hit”, che rendono il fegato sensibile ad un “*second hit*”, in grado di determinare lo switch dal semplice accumulo di lipidi allo sviluppo di infiammazione e quindi la progressione del danno epatico. Il “*second hit*” è conseguente all'accumulo dei lipidi e all'esposizione prolungata ad acidi grassi non esterificati plasmatici, che determinano la generazione di stress ossidativo, la produzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS), l'induzione della risposta cellulare allo stress e successivamente l'espressione di citochine pro-infiammatorie quali il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF-alfa), l'interleuchina 6 e l'interleuchina 1 β . Inoltre gli acidi grassi, non ossidati a livello mitocondriale, in presenza di ROS vanno incontro a perossidazione, con effetto tossico diretto sugli epatociti e significativo ruolo nel mantenere il processo infiammatorio. Il fatto che i pazienti con NASH presentino livelli sierici più bassi di antiossidanti, rendendo il fegato più suscettibile al danno ossidativo, supporta questo modello di sviluppo di steatosi: in questo contesto prende corpo il rationale di una terapia con antiossidanti, quali ad esempio vitamina E e glutazione. Tuttavia, ricerche successive hanno messo in dubbio questo modello, ed ora si suppone che gli acidi grassi liberi e alcuni loro prodotti metabolici (ad

esempio il diacilglicerolo) e prodotti secondari allo stesso metabolismo (ad esempio i radicali liberi) siano i probabili mediatori di danno epatocitario²⁹.

I radicali liberi potrebbero aumentare l'espressione di Fas-ligand negli epatociti, con conseguente innesco del meccanismo apoptotico negli stessi³⁰.

3. Ruolo delle cellule dell'immunità, cellule dell'infiammazione e delle citochine

Il fegato è un organo che ospita diverse popolazioni cellulari, e tra queste anche cellule dell'immunità, linfoidi e non linfoidi (macrofagi, cellule di Kupffer, cellule stellate, cellule dendritiche), che consentono ad esso di proteggersi dall'azione di vari patogeni. Le cellule di Kupffer si attivano a contatto con tossici (es. farmaci, agenti batterici...) cambiando la loro morfologia e secernendo diverse sostanze, tra cui citochine, enzimi proteolitici e ossido nitrico³¹. Le cellule stellate epatiche si attivano in presenza di danno epatico, proliferando e diventando cellule simil-miofibroblasti in grado di secernere collagene, di formare tessuto cicatriziale, e questo potrebbe spiegare un loro ruolo nella progressione verso la fibrosi in pazienti con NAFLD. In generale, l'attivazione su queste cellule di recettori Toll-like (TLR) porta alla produzione di citochine pro-infiammatorie, in grado di reclutare cellule immunitarie come macrofagi e linfociti T nel fegato; tale stato infiammatorio porterebbe ad uno squilibrio energetico con infarcimento lipidico degli epatociti e conseguenze metaboliche sistemiche come obesità, diabete mellito di tipo 2 e aterosclerosi³². Inoltre, queste cellule sono sensibili alle adipochine secrete dagli adipociti: sembrerebbe che questo meccanismo amplifichi ancor di più il processo infiammatorio, portando ad una progressione della patologia verso quadri più gravi, e dunque ad un peggioramento del danno epatico³³. In pazienti con NAFLD si è osservata una correlazione tra i livelli di TNF- α e il grado di attività della patologia, valutato attraverso il NAS (NAFLD Activity Score)³⁴ mentre i livelli di TNF- α nei pazienti con NASH sembrano essere correlati al grado di fibrosi³⁵.

Kumar et al. nel 2012 hanno analizzato il ruolo di varie citochine nella patogenesi della NAFLD nella popolazione indiana, riscontrando un incremento dei livelli di citochine pro-infiammatorie nei pazienti con NAFLD rispetto ai pazienti sani di controllo e a pazienti con epatite B cronica, dunque una patologia epatica senza

steatosi. In modo particolare, questo studio ha evidenziato il ruolo dell'IL-6 nella patogenesi di NAFLD, in quanto i livelli sierici di questa citochina sembrerebbero aumentare selettivamente in pazienti con NAFLD, rivelando un'associazione inoltre con l'insulino-resistenza e con la severità del quadro istologico³⁶.

Questo microambiente caratterizzato da stress ossidativo determina l'accumulo di alterazioni negli organelli cellulari (mitocondri, perossisomi e microsomi), che in aggiunta alle alterazioni già descritte incrementano la quantità di processi che vanno a determinare il quadro istopatologico della NASH³⁷.

4. Ruolo delle adipochine

Oltre all'azione delle citochine, nello sviluppo della NASH è noto il ruolo delle adipochine, quali adiponectina, leptina e resistina, attraverso la modulazione dell'insulino-resistenza e del tasso di ossidazione dei lipidi. La leptina svolge un ruolo determinante nei meccanismi di fame/digiuno, essendo la sua sintesi soppressa nelle fasi di digiuno in correlazione alla ridotta sintesi di insulina, stimolando l'appetito. La sua sintesi viene invece aumentata da situazioni di flogosi acute, infezioni, sotto stimolo di citochine pro-infiammatorie. La leptina a sua volta sembra accelerare quella che è la secrezione di agenti infiammatori come il TNF- α e l'IL-1, svolgendo un ruolo simile a quello di questi agenti, promuovendo la flogosi tramite l'attivazione e la differenziazione di linfociti Th-1³⁸.

Uno studio recente condotto da Singh et al. sulla popolazione indiana ha mostrato che i livelli di leptina aumentati nel siero non si spiegano esclusivamente con l'obesità, ma in pazienti con NASH potrebbero essere la conseguenza di un incrementata resistenza periferica alla leptina stessa. Ciò altererebbe l'attività insulinica favorendo l'accumulo di trigliceridi negli epatociti e la progressione della patologia verso stadi più avanzati di steatoepatite. Questo studio inoltre sottolinea come l'incremento della leptina sierica sia un fattore aggravante la necro-infiammazione e la fibrosi in pazienti con NASH, ma non rappresenta un predittore indipendente di gravità della malattia³⁹.

L'adiponectina e la resistina correlano negativamente con l'accumulo epatico di lipidi, con il grado di infiammazione nella NASH e con l'IR, mentre la leptina

svolge un ruolo nelle fasi più avanzate favorendo il processo fibrogenetico. Questi dati evidenziano come la traslocazione batterica attraverso la parete intestinale e l'*overgrowth* batterico possano contribuire alla progressione della NAFLD ed al mantenimento dello stimolo infiammatorio nella NASH⁴⁰.

V. DIAGNOSI

La diagnosi di NAFLD richiede l'evidenza di steatosi epatica mediante tecniche di imaging ed esame istologico, dopo l'esclusione di un importante consumo di alcol o di altre cause secondarie di steatosi. (Tabella 3).

- Obesità, diabete di tipo 2, dislipidemia (NAFLD)
- Eccessivo consumo di alcol
- Epatite C (genotipo 3)
- Malattia di Wilson
- Lipodistrofia
- Nutrizione parenterale
- Abetalipoproteinemia e ipobetalipoproteinemia
- Farmaci (amiodarone, methotrexate, tamoxifene, corticosteroidi)

Tabella 3. Cause comuni di steatosi epatica macrovescicolare

1. Reperti clinici

La maggior parte dei pazienti con NAFLD non lamenta alcun disturbo al momento della diagnosi anche se alcuni riferiscono astenia e una sensazione di gonfiore addominale⁴¹.

2. Dati di laboratorio

Agli esami di laboratorio si riscontra quasi esclusivamente una modesta ipertransaminasemia, sebbene gli enzimi epatici possono essere nella norma anche nel 70% dei soggetti con NAFLD⁴². I livelli sierici di aminotransferasi aumentano e diminuiscono, e raramente superano le 200 U/L. Tipicamente, i livelli di ALT superano quelli di AST, anche se i livelli di quest'ultima risultano aumentati quando vi è fibrosi avanzata⁴³.

Anche i livelli di fosfatasi alcalina possono essere elevati, in più è possibile il riscontro di un aumento isolato della fosfatasi alcalina sierica con livelli sierici di aminotransferasi nella norma, in pazienti con NAFLD⁴⁴.

Inoltre, i cambiamenti dei livelli di transaminasi non risultano essere paralleli ai cambiamenti evolutivi verso stadi più severi di fibrosi, risultando quindi markers poco affidabili per la valutazione della progressione del processo fibrotico⁴⁵.

Valori lievemente elevati di ferritina sierica sono di comune riscontro nei pazienti con NAFLD, e la contemporanea saturazione della transferrina nei pazienti con sospetta NAFLD dovrebbe indurre medico ad eseguire il test genetico per l'emocromatosi ereditaria. E' possibile il rilievo di un lieve innalzamento degli autoanticorpi nei pazienti con NAFLD. Il Fatty Liver Index è un algoritmo basato su quattro parametri: BMI, circonferenza vita, trigliceridi e γ -glutamyl-transferasi. Questo indice è stato utilizzato da diversi studi su popolazione e ha raggiunto un buon grado di affidabilità nel rilevare la presenza di steatosi epatica⁴⁶.

La formula utilizzata per il calcolo del Fatty Liver Index è la seguente:

$$FLI = [e^{0.953} \times \log_e(\text{trigliceridi}) + 0,139 \times 0,718 \times BMI + \log_e(GGT) + 0,053 \times \text{circonferenza vita} - 15,745] / [1 + e^{0.953} \times \log_e(\text{trigliceridi}) + 0.139 \times BMI + 0,718 \times \log_e(GGT) + 0,053 \times \text{circonferenza vita} - 15,745] \times 100$$

Questa formula fornisce un determinato punteggio: se è inferiore a 30, è possibile escludere la steatosi epatica, invece un punteggio superiore a 60 la rende altamente sospetta e suggerisce un più approfondito percorso diagnostico⁴⁶.

Il *NAFLD fibrosis score* (NFS) è uno strumento che consente di identificare pazienti con NAFLD che sono ad alto rischio di evoluzione in stadi di fibrosi avanzata, utilizzando sei variabili facilmente reperibili, cioè età, iperglicemia, indice di massa corporea, conta piastrinica, albumina, e il rapporto AST/ALT⁴⁷.

La formula utilizzata per il calcolo del NAFLD fibrosis score è la seguente:

$$\begin{aligned}
 \text{NFS} &= -1,675 + 0,037 \times \text{età (anno)} + 0,094 \times \text{BMI (kg/m}^2\text{)} + 1,13 \\
 &\quad \times \text{IFG / diabete (sì = 1, no} \\
 &\quad = 0) + 0,99 \times \text{rapporto AST/ALT} - 0,013 \times \text{piastrine (} \\
 &\quad \times 109/\text{L)} - 0,66 \times \text{albumina (g/dl)}
 \end{aligned}$$

Questa formula è utilizzata per classificare la probabilità di evoluzione fibrotica in bassa ($< -1,5$), intermedia ($> -1,5$ e $< 0,67$) e alta ($> 0,67$). Inoltre, uno studio ha dimostrato che il NFS è utile nell'escludere uno stadio di fibrosi in pazienti con NAFLD, obesi e sottoposti a chirurgia bariatrica⁴⁸.

Un altro indice di fibrosi utilizzato recentemente è il *Fibrometer*. Questo prende in considerazione età, peso, glicemia a digiuno, transaminasi, ferritina e conta piastrinica per la diagnosi di fibrosi significativa⁴⁹.

La formula per il calcolo del Fibrometer è la seguente:

$$\begin{aligned}
 \text{Fibrometer} &= -0,007 \times \text{piastrine (} \times 109/\text{L)} - 0,049 \\
 &\quad \times \text{tempo di protrombina (\%)} + 0,012 \times \text{AST (U/L)} + 0,005 \\
 &\quad \times \alpha 2 \text{ macroglobulina (g/L)} + 0,021 \times \text{ialuronato (ng/mL)} \\
 &\quad - 0,270 \times \text{urea (mmol/L)} + 0,270 \times \text{età (anno)} + 3,718
 \end{aligned}$$

Calès et al. hanno confrontato il Fibrometer con il NFS, concludendo che il Fibrometer fornisce una diagnosi più affidabile in caso di fibrosi significativa rispetto al NFS⁵⁰.

Recentemente, uno studio ha dimostrato che ogni stadio evolutivo della NAFLD sembrerebbe essere correlato a particolari micro-RNA, e che la comprensione della loro espressione differente nel tessuto adiposo di pazienti obesi può essere utile per incrementare la comprensione dei meccanismi molecolari importanti per lo sviluppo di NAFLD/NASH, nonché di sfruttarli come strumenti diagnostici per distinguere pazienti con semplice steatosi da quelli con steatoepatite, e quindi consentire nuove terapie mirate⁵¹.

VI. RUOLO DEI FATTORI GENETICI NELLA PATOGENESI DELLA NAFLD

L'identificazione di profili genetici di rischio per la progressione della NAFLD potrebbe aiutare ad individualizzare il follow-up ed il trattamento dei pazienti. Dai dati disponibili si riscontra, nei pazienti con NAFLD, un pattern genetico intermedio tra i pazienti sani e i pazienti con NASH, e da qui si deduce che i pazienti con NAFLD e con un pattern genetico simile ai pazienti con NASH hanno una probabilità maggiore che la patologia abbia uno sviluppo più rapido⁵².

Lo studio e la ricerca di geni che risultano essere legati alla suscettibilità di malattie complesse come la NAFLD si servono dell'elaborazione di studi di associazione su geni candidati, cioè geni con un ruolo patogenetico noto nella patologia considerata, oppure di studi di *Whole Genome Scanning*. Quest'ultimo è un metodo che, non partendo da un'ipotesi circa i geni coinvolti nella malattia, sfrutta la possibilità, data dai polimorfismi di singoli nucleotidi (SNPs), di fare un completo esame del genoma, con l'obiettivo di individuare contemporaneamente multipli polimorfismi genici, e successivamente ci permette di valutare il possibile ruolo di questi nella patologia in studio. L'approccio più utilizzato nella NAFLD è la realizzazione di studi di associazione caso-controllo su geni candidati. I geni più frequentemente associati a NAFLD sono numerosi (Tabella 5).

Tabella 5. Principali geni coinvolti nella patogenesi di NAFLD⁵².

Gene	Descrizione
PNPLA3	patatin-like phospholipase domain containing 3
FGF21	fibroblast growth factor 21
RBP4	retinol binding protein 4
RETN	Resistin
RDH5	retinol dehydrogenase 5
LUM	Lumican
RGN	Regucalcin
FABP4	fatty acid binding protein 4

PLIN2	perilipin 2
MTTP	microsomal triglyceride transfer protein
DGAT2	diacylglycerol O-acyltransferase 2
HFE	Hemochromatosis
CHIT1	chitinase 1
UCP2	uncoupling protein 2
ADIPOQ	Adiponectin
ADIPOR1	adiponectin receptor 1
ADIPOR2	adiponectin receptor 2
SREBF1	sterol regulatory element binding transcription factor 1
GCKR	glucokinase regulatory
KLF6	Kruppel-like factor 6
GPLD1	glycosylphosphatidylinositol specific phospholipase D1
APLN	Apelin
FABP1	fatty acid binding protein 1
FDFT1	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1
NPC1L1	NPC1-like 1
NAMPT	nicotinamide phosphoribosyltransferase
PEMT	phosphatidylethanolamine N-methyltransferase
PPARGC1A	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha
SCD	stearoyl-CoA desaturase
PPARA	peroxisome proliferator-activated receptor alpha
SREBF2	sterol regulatory element binding transcription factor 2
CYP2E1	cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1
LEPR	leptin receptor
PPARG	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
NR1I2	nuclear receptor subfamily 1, group I, member 2
APOC3	apolipoprotein C-III
APOB	apolipoprotein B
GHRL	Ghrelin
CYP2A6	cytochrome P450, family 2, subfamily A, polypeptide 6
DPP4	dipeptidyl-peptidase 4
CYP2B6	cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6

CCL3	chemokine (C-C motif) ligand 3
CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5
CRP	C-reactive protein
SOD1	superoxide dismutase 1
TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
TLR4	toll-like receptor 4
TNF	tumor necrosis factor
APOA1	apolipoprotein A-I
AGTR1	angiotensin II receptor, type 1
HMOX1	heme oxygenase 1
NPY	neuropeptide Y
IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3
IL1A	interleukin 1, alpha
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
CYP2D6	cytochrome P450, family 2, subfamily D, polypeptide 6
CYP2C9	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9
PTEN	phosphatase and tensin homolog
CYP2C19	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19
CYP1A2	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2
CYP3A4	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4
ACE	angiotensin I converting enzyme 1
IL6	interleukin 6
IL8	interleukin 8
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2
APOE	apolipoprotein E
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1
IGF1	insulin-like growth factor 1
NOS2	nitric oxide synthase 2

1. Geni che influenzano il metabolismo e la steatosi

Diversi risultano i geni coinvolti nei processi di sintesi, immagazzinamento e trasporto dei trigliceridi epatici: i polimorfismi di questi geni possono influenzare l'entità di accumulo intra-epatocitario di grasso e il rischio di sviluppare le forme più avanzate di malattia. Di recente, è stata focalizzata l'attenzione sui polimorfismi dei geni codificanti enzimi coinvolti nella regolazione della sintesi epatica dei trigliceridi (Stearoyl-CoA desaturasi, SREBP-1c²⁷).

La Stearoyl-CoA Desaturasi (SCD) è un enzima chiave nel metabolismo degli acidi grassi monoinsaturi (MUFA) in quanto catalizza l'inserzione di un doppio legame in posizione cis- $\Delta 9$ in un largo spettro di acidi grassi a media e lunga catena. Uno studio ha dimostrato che la steatosi epatica, in particolare quella indotta dalla dieta, è associata alla riduzione dell'espressione epatica di SCD, e questi cambiamenti non erano molto influenzati dallo stato di insulino-resistenza periferico⁵³.

Gli SREBPs (*Sterol Regulatory Element-Binding Proteins*) sono fattori di trascrizione, codificati dai geni SREBF1 e SREBF2. Essi risiedono inattivi attaccati alla membrana nucleare e alle membrane del reticolo endoplasmatico. Nelle cellule con bassi livelli di steroli, questi vengono attivati e si trasferiscono al nucleo, dove legano determinate sequenze di DNA, favorendo così la sintesi degli enzimi coinvolti nella biosintesi degli steroli. Considerando il ruolo antisteatosico della leptina (diminuendo la sintesi di SCD-1 e SREBP-1c) e dell'adiponectina (attivazione della chinasi AMPciclico-dipendenti e PPAR alfa), sono stati analizzati i polimorfismi dei geni che le codificano⁵⁴ e dei geni che codificano le proteine coinvolte nella regolazione della loro secrezione.

Un recente studio ha dimostrato che un determinato polimorfismo del recettore della leptina (LEPR G3057A) è risultato presente più frequentemente nei soggetti con diabete mellito e steatosi rispetto a quelli con solo diabete mellito e con normale tolleranza glucidica⁵⁵. Un altro studio ha dimostrato che il polimorfismo del recettore della leptina RS1137100, specificamente l'allele G, è associato ad una forma meno grave di malattia epatica in pazienti con NAFLD. L'interazione tra polimorfismi dei geni LEPR e PNPLA3 ha mostrato un aumento del rischio di

NAFLD rispetto ad un gene da solo⁵⁶. Inoltre il polimorfismo Lys656Asn del gene LEPR è associato ai parametri di obesità, insulino-resistenza e elevati livelli di glucosio nei pazienti con NAFLD⁵⁷. Uno studio giapponese ha analizzato il ruolo delle varianti genetiche del recettore dell'IL-1 β e dei recettori adrenergici nella regolazione della spesa energetica mediante lo stimolo alla lipolisi⁵⁸. Altri importanti geni coinvolti nella sintesi e nel trasporto dei trigliceridi sono quelli che codificano per le apolipoproteine. La sintesi dell'apoB-100 è un fattore limitante nel trasporto epatocitario dei lipidi, dunque una diminuita sintesi di questa proteina può essere un fattore importante nello sviluppo della steatosi epatica, e un prerequisito per lo sviluppo di NASH⁵⁹. Anche il gene codificante per l'apo E, che è un importante regolatore del metabolismo plasmatico delle lipoproteine, è polimorfico⁶⁰. La proteina microsomiale di trasferimento dei trigliceridi (MTP) regola la sintesi, l'accumulo e la secrezione dei trigliceridi ed è fondamentale per la sintesi e la secrezione delle proteine a densità molto bassa nel fegato (VLDL) e nell'intestino. Si è evidenziato che l'allele G nel promotore MTP porta alla diminuzione della trascrizione della MTP, una riduzione del trasporto di trigliceridi dagli epatociti, e un maggiore accumulo intracellulare di trigliceridi. L'allele T nella sequenza di targeting mitocondriale della MnSOD (Manganese SuperOssido Dismutasi) porta a un ridotto trasporto di MnSOD ai mitocondri. Pertanto, polimorfismi funzionali in MTP e MnSOD possono essere coinvolti nel determinare la suscettibilità di sviluppo di NAFLD e di progressione in NAFLD⁶¹. Un recente studio condotto tra gli altri dal Professore Craxì ha sottolineato il ruolo svolto dal polimorfismo rs780094 C>T del gene GCKR (glucokinase regulatory protein). Il principale risultato di questo studio su un'ampia coorte di pazienti italiani con NAFLD è l'associazione tra GCKR rs780094 C > T SNP e alti livelli di trigliceridi e la gravità della fibrosi epatica, indipendente da altri fattori di rischio noti per danni al fegato⁶². Uno studio del 2005 riporta un'associazione tra NAFLD ed uno SNP con bassa funzione nel gene che codifica la fosfatidiletanolamina metiltransferasi (PEMT), che è coinvolta nella sintesi della fosfatidilcolina richiesta nelle VLDL⁶³.

2. Geni che influenzano lo stress ossidativo

L'ossidazione degli acidi grassi gioca un ruolo molto complesso nella patogenesi della NAFLD. Se da un lato i processi di ossidazione prevengono l'accumulo di grasso nel fegato, la loro eccessiva ossidazione e/o un'ossidazione impropria sono probabilmente responsabili, almeno in parte, dello stress ossidativo. I polimorfismi potrebbero avere un ruolo in quanto determinerebbero un "acquisto di funzione" o una "perdita di funzione" in enzimi coinvolti nel metabolismo dei grassi, predisponendo allo sviluppo di NAFLD e successivamente di NASH; sebbene, al momento, siano pochi i dati relativi a questo aspetto⁶⁴. Qualche evidenza scientifica suppone il ruolo di polimorfismi di PPAR- γ (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) nella patogenesi e nella progressione di NAFLD. Questa proteina regola il deposito degli acidi grassi e il metabolismo del glucosio. Uno studio condotto su un gruppo di pazienti brasiliani ha documentato una minore prevalenza dell'allele 12Ala del gene PPAR nei pazienti con NASH rispetto al gruppo di controllo. Nei pazienti con NAFLD, non c'erano le associazioni tra la presenza di Pro12Ala SNP e la presenza di determinati parametri clinici, ematochimici e istologici. Si è inoltre documentata la fibrosi più avanzata nel polimorfismo Leu162Val. I dati ottenuti indicano che il polimorfismo Pro12Ala può determinare protezione contro il danno epatico, e che invece il polimorfismo Leu162Val può essere coinvolto nella progressione di NAFLD⁶⁵.

3. Geni coinvolti nella risposta all'endotossina e nel polimorfismo delle citochine

Tra questi sembrano essere associati alla induzione e progressione della steatosi i polimorfismi del CD14 (co-recettore del liposaccaride)⁶⁶, del TNF alfa⁶⁷, delle interleuchine (IL--51130, IL 644), dell'antigene di differenziazione delle plasmacellule (quest'ultimo, in particolare, sembra essere coinvolto nel determinare l'insulino- sensibilità)⁶⁸.

4. Geni che influenzano il rimodellamento della matrice extracellulare e l'accumulo di fibrosi

Le cellule di Ito, conosciute anche come cellule stellate epatiche (HSCs) o cellule immagazzinatrici di grasso, sono periciti che si trovano nello spazio perisinusoidale, chiamato spazio di Disse. In presenza di danno epatico e citochine infiammatorie, queste si attivano proliferando, determinando produzione di matrice fibrosa. Di conseguenza, variazioni in geni che svolgono un ruolo cruciale nell'attivazione delle HSCs possono determinare la progressione verso la cirrosi indipendentemente dall'eziologia del danno epatico. I corpi di Mallory sono un riscontro istopatologico caratteristico della NASH e derivano dal cattivo ripiegamento ed aggregazione delle cheratine.

Ad esempio, si è visto che la CK18 rappresenta un utile biomarcatore non invasivo per la diagnosi di NASH nei bambini steatosi epatica⁶⁹. Inoltre, anche l'acido ialuronico si è dimostrato essere un adatto marcatore sierico in grado di prevedere la progressione della malattia in bambini con diagnosi di NAFLD⁷⁰.

Ci sono studi che evidenziano come mutazioni nei geni che codificano le cheratine possono causare la cirrosi criptogenetica⁷¹.

Recentemente, il polimorfismo del gene KLF-6, codificante per un fattore di trascrizione coinvolto in multipli processi di differenziazione cellulare, crescita, apoptosi ed angiogenesi, è stato associato alla presenza di una fibrosi meno severa nei pazienti con NAFLD⁷².

Un recente studio in cui sono stati analizzati i polimorfismi del gene per il recettore di tipo 1 dell'angiotensina 2 (ATGR1) ha dimostrato una stretta correlazione tra questi e la severità della steatosi⁷³.

In uno studio italiano, il polimorfismo rs13412852 del gene LPIN1 è risultato essere collegato all'evoluzione della NAFLD in NASH e fibrosi nei pazienti pediatrici⁷⁴.

5. Ruolo delle regioni geniche con variazione del numero di copie (CNV)

Un recente studio ha individuato possibili CNVs che potrebbero essere coinvolti nella patogenesi e nella progressione della NAFLD⁷⁵. In pazienti con NASH, la regione più frequentemente amplificata è la 14q11.2, che si arricchisce in geni della famiglia OR (*olfactory receptors*), mentre una grande varietà di geni della famiglia TASR (*taste receptors*) è stata trovata nella regione 12p13.2. Anche se le famiglie OR e TASR svolgono ruoli precisi, rispettivamente nei sistemi olfattivo e gustativo, una ricerca ha rivelato l'espressione genica di TASR e OR in molti tessuti e organi, compreso il fegato. Una compromissione della funzione olfattiva e gustativa è stata riportata in malattie epatiche croniche, compresa la cirrosi; la funzione sensitiva risulta comunque migliorata dopo trapianto di fegato⁷⁶. Una delezione CNV è stata notata al locus 16q12.2; comprende il gene CES1, che è importante nel metabolismo degli acidi grassi e colesterolo, e la cui espressione si è rivelata essere più elevata nel tessuto epatico steatosico rispetto al non-steatosico⁷⁷. Il locus 16q12.2 è noto per essere sede di diverse varianti genetiche (SNPs) associate con alterazioni del peso corporeo e del BMI⁷⁸. Frequente tra i pazienti con NASH risulta essere la perdita di numero di copie al locus 14q24.3, regione importante per la sintesi dell'acil-CoA tioesterasi1 (ACOT1), che consente l'equilibrio tra la quantità di acidi grassi liberi e l'acetil-CoA, importante nel metabolismo lipidico⁷⁹. Sempre questo studio ha evidenziato quattro CNV meno comuni, che hanno il potenziale per essere coinvolti nella patogenesi della NASH, e sembrano essere verosimilmente più correlabili rispetto a CNV già noti: due di questi sono rari (12q24.33 e 13q12.11), mentre due sono nuovi (12q13.2 e 21p11.1 - 11.2). Di particolare nota è stata un'aberrazione al 13q12.11 locus che potrebbe servire come un potenziale biomarker per NASH. Questa regione contiene il gene soppressore del tumore Exportin 4 (XPO4), la cui inattivazione promuove HCC nei topi⁸⁰. D'altra parte, l'espressione aumentata di XPO4 in HCC umano è associata con una prognosi migliore e un migliore tasso di sopravvivenza⁸¹.

La fosfodiesterasi 1B, calmodulina -dipendente (PDE1B), gene che attraversa la regione 12q13.2, è importante in molte vie di trasduzione del segnale. Il locus

12q13.2 è stato identificato come amplificazione chiara, sostenendo in tal modo la sua candidatura come potenziale marker di rischio associato alla malattia. Tuttavia, ci sono un numero limitato di pubblicazioni sulla XPO4 e PDE1B e il loro ruolo nella malattia epatica. Dunque, ulteriori studi approfonditi incentrati su questi due geni saranno necessari per confermare o confutare tale conclusione. Per quanto riguarda la semplice steatosi, la regione più frequentemente amplificata è la 12p13.31, che risulta essere tra le regioni più fortemente amplificate in NASH. La regione 10q11.22 invece contiene il gene NPYR4: questo gene è coinvolto nella regolazione dell'appetito e del metabolismo energetico⁸².

6. Stratificazione genetica del rischio

Dal momento che la diagnosi di NAFLD richiede ancora la biopsia epatica, vi è urgente necessità di sviluppare marcatori non invasivi precoci. Uno studio recente si è posto l'obiettivo di valutare se la rilevazione simultanea dei fattori di rischio genetici poteva prevedere la possibilità di sviluppo di NASH. Sono stati arruolati 152 bambini obesi e adolescenti con NAFLD documentata dalla biopsia e da un aumento degli enzimi epatici. I polimorfismi valutati sono stati: PNPLA3 rs738409 C> G (I148 M), SOD2 rs4880 C> T, rs3750861 KLF6 G> A, e LPIN1 rs13412852 C> T. La presenza di tali polimorfismi si è rivelata essere di maggiore supporto nei confronti di altri indici clinici come l'età, i livelli di AST e la pressione diastolica. Un punteggio basato su fattori di rischio genetici predice significativamente l'evoluzione di NASH in bambini obesi con aumento degli enzimi epatici, dunque rappresenta una prova affinché i punteggi genetici possano essere utili per prevedere i risvolti a lungo termine della malattia e guidare infine la gestione clinica⁸³.

VII. GENE PNPLA3

1. Struttura e funzione

Il genoma umano esprime nove fosfolipasi contenenti proteine con dominio patatin-like (PNPLA1 - 9). Queste strutture proteiche condividono un dominio scoperto inizialmente in patatin, che risulta essere la proteina più abbondante del tubero di patata (40% del contenuto proteico). Patatin possiede una struttura secondaria peculiare che la differisce dalle altre idrolasi lipidiche e possiede un'aspecifica attività sui trigliceridi mediata da una diade serina-aspartato, che differisce dalla canonica triade catalitica⁸⁴.

Il gene PNPLA3 (*patatin-like phospholipase domain-containing 3 gene*) si trova sul cromosoma 22 (22q13.31). Noto anche come adiponutrina, codifica una proteina di 481 aminoacidi che contiene un dominio patatin-like altamente conservato all'estremità N della sua struttura. PNPLA3 è stato originariamente identificato come un prodotto specifico del tessuto adiposo che risponde rapidamente alle variazioni dello stato nutrizionale, e si localizza nelle membrane cellulari degli adipociti⁸⁵. La sua sintesi è indotta nel fegato dopo l'alimentazione e durante la resistenza all'insulina dal principale regolatore della lipogenesi (*Steroid Regulatory Element Binding Protein-1c*). I livelli aumentano durante la differenziazione degli adipociti o dopo stimolazione insulinica e diminuiscono drasticamente durante il digiuno⁸⁶. La funzione biochimica della proteina sembra essere riconducibile ad un'attività di idrolasi e di transacilasi sui trigliceridi; tuttavia rimane poco chiara, poiché in vitro l'adiponutrina esposta a trigliceridi mostra una blanda attività, mentre in un contesto cellulare queste attività appaiono di minore intensità⁸⁷. Un recente studio ha mostrato che PNPLA3 è altamente espresso nelle cellule stellate epatiche, e sembrerebbe avere un ruolo specifico, ovvero quello di promuovere il rilascio di retinolo dalle cellule stellate in risposta all'insulina, agendo sul retinil-palmitato idrolizzandolo e ottenendo retinolo e acido palmitico⁸⁸. Inoltre, è stato recentemente dimostrato che la PNPLA3 può anche avere un ruolo nell'adipogenesi, essendo sovra-espressa durante la

differenziazione degli adipociti bianchi⁸⁹. L'espressione di PNPLA3 varia nei diversi tessuti e uno studio ha evidenziato come questa sia maggiore nel fegato, seguito da cute e tessuto adiposo⁹⁰(Figura 6).

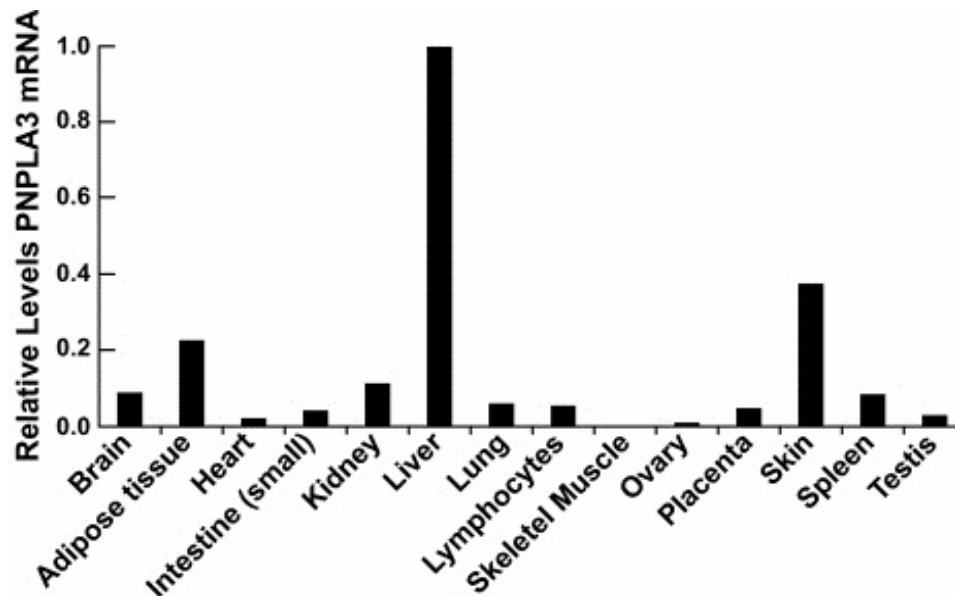


Fig.6. Distribuzione dei livelli di PNPLA3 mRNA nei vari tessuti⁹⁰.

2. Nesso patogenetico tra PNPLA3 e NAFLD

Una metanalisi del 2011 ha dimostrato come sia inequivocabile il ruolo della variante I148M (rs738409 C/G) come potente modificatore della storia naturale della NAFLD in differenti popolazioni nel mondo⁹¹. La variante PNPLA3 I148M è una guanina a sostituzione di una citosina che trasforma il codone 148 da isoleucina in metionina. La variante I148M predispone verso l'intero spettro di danni al fegato, che spaziano dalla semplice steatosi fino alla steatoepatite e alla fibrosi progressiva. Inoltre, la variante I148M rappresenta un importante determinante anche della progressione da steatoepatite alla cirrosi conclamata in soggetti alcolisti, ed è in grado di influenzare i processi di fibrogenesi nell'epatite cronica C e B, ed eventualmente nell'emocromatosi ereditaria e colangite sclerosante primaria⁹². Nel 2008, diversi studi di associazione genome-wide hanno

cercato di collegare il polimorfismo rs738409 di PNPLA3 (I148M) con il contenuto di grassi a livello epatico e i livelli di ALT⁹³. Sorprendentemente risultò che l'associazione tra PNPLA3 I148M e il grasso del fegato era indipendente dalla composizione corporea, dal diabete e dai livelli di lipoproteine sieriche, e che la variante I148M era più prevalente negli ispanici rispetto agli europei, mostrando quindi l'influenza del ceppo etnico nella suscettibilità di sviluppo di steatosi epatica. Da allora, diversi studi e una recente meta -analisi hanno replicato l'associazione tra il polimorfismo I148M e NAFLD in tutti i gruppi etnici. L'associazione tra la variante I148M e il contenuto lipidico epatico è incrementata in presenza di altri fattori di rischio, come l'obesità grave, adiposità viscerale⁹⁴, una maggiore assunzione di zuccheri e altri fattori genetici⁹⁵, mentre una perdita di peso determina una rapida diminuzione del grasso intra-epatico e degli indici di danno epatico in soggetti omozigoti per questa variante⁹⁶. Ad oggi, l'esatto ruolo del polimorfismo PNPLA3 I148M in NAFLD è chiaro, anche se sono stati ipotizzati meccanismi attraverso i quali la variazione in PNPLA3 può influenzare il contenuto di trigliceridi nel fegato. La mutazione 148M determina una sostituzione aminoacidica critico accanto al dominio catalitico, probabilmente riducendo l'attività enzimatica di PNPLA3, determinando così lo sviluppo di steatosi⁹⁷. La sostituzione di metionina per isoleucina in posizione 148 determinerebbe una marcata diminuzione della Vmax dell'enzima per i suoi substrati, ovvero i glicerolipidi. La sostituzione non modifica l'orientamento della serina o aspartato che compongono la diade catalitica, piuttosto la catena laterale più lunga della metionina, che limita l'accesso del substrato al serina catalitica, inattivando così l'enzima. Inoltre, altri studi attribuiscono alla medesima mutazione un'acquisita funzione lipogenica che incrementa la capacità di sintetizzare acido fosfatidico da acido lisofosfatidico⁹⁸ (Figura 7).

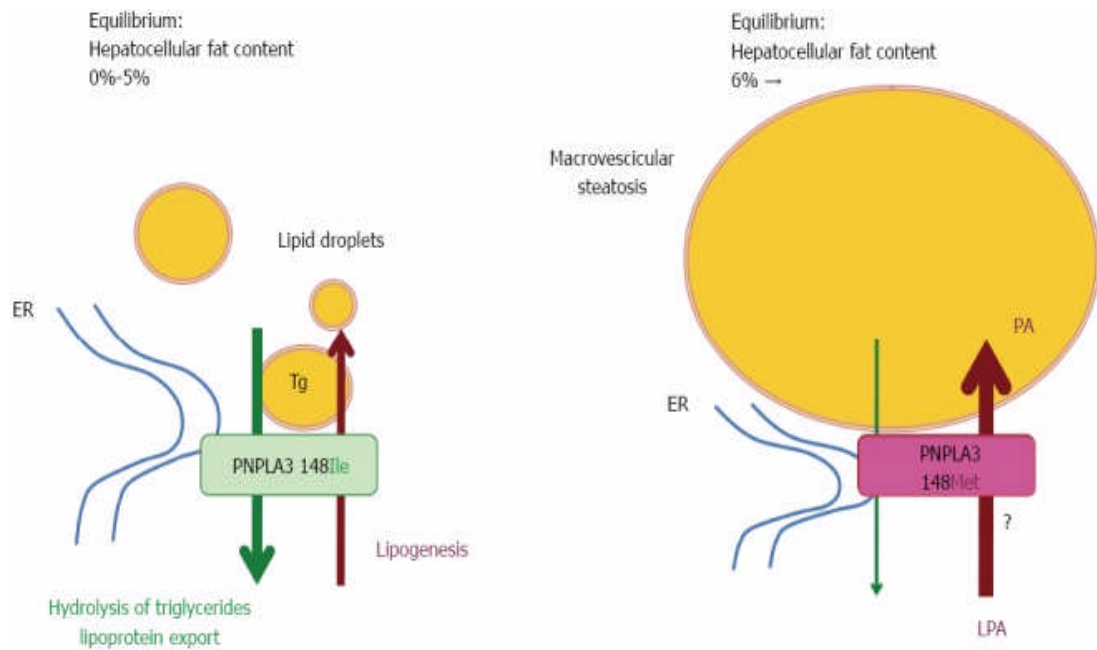


Figura 7. Probabili meccanismi attraverso i quali PNPLA3 148Met determina l'accumulo lipidico intraepatocitario⁹⁸.

Diversi dati suggeriscono che rs738409 PNPLA3 (allele G) può contribuire allo sviluppo della steatosi epatica anche modulando dimensione degli adipociti, che riflette la quantità di accumulo di lipidi nel deposito di grasso sottocutaneo. L'espandibilità limitata del deposito tessuto adiposo sottocutaneo è stato considerata come un possibile conseguenza di accumulo di grasso in sedi ectopiche e in organi quali il fegato. È verosimile che la capacità del tessuto adiposo di immagazzinare trigliceridi sia molto più ridotta nei soggetti che portano l'allele G rispetto a coloro che sono omozigoti per l'allele C⁹⁹. Recentemente una meta- analisi di 16 studi (2937 soggetti) è stata eseguita per valutare l'associazione di PNPLA3 con NAFLD. I risultati hanno mostrato che PNPLA3 esercita una forte influenza non solo sull'accumulo di grasso epatico (i soggetti omozigoti GG avevano una maggiore presenza di lipidi rispetto a quelli CC), ma anche su una maggiore suscettibilità a disturbi epatici (soggetti omozigoti GG avevano un rischio 3,24 volte più alto di quadri istologici di necro-infiammazione avanzata e 3.2 volte più alto di sviluppare fibrosi rispetto a quelli omozigoti CC). Il genotipo GG PNPLA3 vs il genotipo CC è stato associato con un aumento del 28% dei livelli transaminasi (ALT)⁹¹.

In uno studio americano effettuato su due sottopopolazioni (americani ispanici e afro-americani), la variante rs738409 G è associata a una minore densità del fegato in immagini TC, cioè maggiore infiltrazione di grasso nel fegato, e maggiore incremento degli enzimi epatici. La frequenza della variante (40 e il 19% negli americani ispanici e afro-americani, rispettivamente) risulta essere strettamente parallela alla prevalenza di NAFLD (24 e 9% rispettivamente). Tuttavia, PNPLA3 ha un ruolo importante nella variazione della densità del fegato nelle popolazioni di minoranza negli Stati Uniti, ma non spiega l'insolita alta prevalenza della NAFLD in ispanici americani¹⁰⁰.

Vi è evidenza di una forte associazione tra PNPLA3 e i parametri istologici di attività di malattia (infiammazione, corpi di Mallory, grado di fibrosi), quindi la presenza dell'allele minore di rs738409 è un forte predittore di gravità del quadro istologico in pazienti con NAFLD. I risultati indicano che il polimorfismo rs738409 allele G è risultato significativamente associato con un aumento steatosi, infiammazione portale, e infiammazione lobulare, senza un forte effetto sulle caratteristiche dei componenti della sindrome metabolica. Inoltre, la presenza dell'allele rs738409 G è stata associata con una più giovane età al momento della biopsia epatica, suggerendo una più giovane età di presentazione della malattia. L'allele rs738409 G può predisporre i pazienti ad accumulo di grasso nel fegato, ma diversi studi sottolineano il fatto che altri fattori, ambientali o ereditari, può essere richiesto per lo sviluppo di infiammazione, danno cellulare e fibrosi. Tuttavia, una volta che i pazienti sviluppano NASH, l'allele rs738409 G li predispone a lesioni peggiori e ingravescenti¹⁰¹.

E' stato recentemente riportato che la variante I148M PNPLA3 è un fattore di rischio per lo sviluppo di carcinoma epatocellulare in soggetti gravemente obesi, soprattutto nelle regioni del Nord Europa¹⁰².

In uno studio cinese effettuato sulla popolazione Han, è stato osservato un aumento del rischio di NAFLD per la variazione rs139051 C > T sempre a carico del gene PNPLA3. I risultati hanno rivelato che gli individui con due alleli di rischio (rs738409 e rs139051) mostravano un più alto rischio di NAFLD rispetto a quelli senza un allele di rischio, ed è stato osservato un significativo trend di aumento del

rischio, con un numero crescente di alleli di rischio, suggerendo che l'accumulo di alleli di rischio nel gene PNPLA3 può aumentare il rischio di NAFLD. Inoltre, altri risultati dello stesso studio suggeriscono che il polimorfismo rs738409 sembra avere un effetto moltiplicativo congiunto con il bere del tè e un effetto congiunto additivo con l'obesità, ipertrigliceridemia o ipertensione nell'identificazione dei rischi per lo sviluppo di NAFLD¹⁰³.

Uno studio recente coordinato dal Professore Craxì et al. ha dimostrato che il genotipo GG del gene codificante la PNPLA3 è associato ad una maggiore severità dell'aterosclerosi carotidea nei pazienti più giovani con NAFLD. I meccanismi alla base di questa associazione e la sua rilevanza clinica tuttavia necessitano di ulteriori indagini¹⁰⁴. Un altro dato importante che emerge dallo studio è l'osservazione che l'associazione tra il polimorfismo e la steatosi epatica è indipendente dai due principali fattori di rischio attualmente riconosciuti per la NAFLD (obesità e diabete), aprendo la strada alla comprensione della patogenesi della steatosi epatica in soggetti magri senza IR.

Un altro studio condotto dal Professore Craxì già precedentemente citato ha messo in relazione il polimorfismo rs780094 C > T del gene GCKR (glucokinase regulatory protein) con il polimorfismo rs738409 C > G del gene PNPLA3, mostrando una possibile interazione tra i due polimorfismi in grado di influenzare l'entità del danno epatico in termini di fibrosi: infatti, la gravità della fibrosi epatica ha mostrato un aumento graduale da pazienti portatori di un allele rischio a coloro che trasportano due alleli di rischio¹⁰⁵.

VIII. LO STUDIO

1. Scopo dello studio

La NAFLD costituisce, come già accennato, la più frequente causa di ipertransaminasemia nei soggetti asintomatici e di epatopatia cronica in occidente, coinvolgendo circa un terzo della popolazione generale. Le basi patogenetiche della NAFLD si fondano su fattori metabolico-endocrini (insulino-resistenza, citochine pro-infiammatorie) e su fattori genetici in grado sia di predisporre una determinata popolazione alla formazione del danno epatico, sia di modificare la storia naturale della patologia stessa favorendo l'evoluzione di questa verso stadi più avanzati di danno istologico^{123,126,162}. Alla luce di queste considerazioni, questo studio si propone di valutare l'associazione tra NAFLD, il genotipo CC (*wild type*) del gene PNPLA3 e la variante I148M (rs738409 C > G) del medesimo gene nelle sue variabili genotipiche CG e GG, le quali sono già state analizzate in vari studi e associate a determinati meccanismi patogenetici responsabili dell'accumulo di grasso intra-epatocitario^{99,100,101}.

L'obiettivo principale è quello di valutare la prevalenza dei genotipi nella popolazione generale e poi analizzare l'associazione con la sindrome metabolica. Inoltre, si vuole verificare se esista una correlazione tra un determinato genotipo e la gravità di danno epatico espresso in termini di progressione della steatosi e della sua evoluzione in steatoepatite, indipendentemente dai fattori di rischio concomitanti. Tutto questo allo scopo di ricercare e confermare l'eventuale esistenza di una predisposizione genetica.

Dallo studio di questi dati sarà possibile individuare, nell'ambito della popolazione generale, la presenza di quei soggetti maggiormente predisposti allo sviluppo di NAFLD e nello stesso tempo potrà suggerire validi spunti di ricerca utili per lo sviluppo di terapie in grado di prevenire e/o modificare la storia naturale della malattia nel futuro.

2. Pazienti e metodi

I pazienti arruolati nello studio sono stati selezionati nell'ambito di un progetto coordinato dalla Società Italiana per lo Studio dell'Aterosclerosi (SISA) e che negli anni 2007-2009 ha coinvolto quattro diversi Centri ospedalieri italiani tra cui quello attualmente coordinato dal prof. Maurizio Averna dell'AOU Policlinico di Palermo. Sono stati selezionati 342 pazienti (204 M;138 F; età media 57 ± 10.9 anni) con sindrome metabolica.

La sindrome metabolica è stata definita secondo i criteri dell'ATPIII e confermati dall'ATP IV (vedi cap. Correlazione tra NAFLD, diabete e obesità).

Nei soggetti analizzati è stata valutata la distribuzione del genotipo “*wild type*” CC e dei genotipi rs738409 del gene PNPLA3 (CG e GG) in entrambi i sessi.

La distribuzione dei genotipi rs738409 del gene PNPLA3 è stata valutata anche su un campione di popolazione più ampio costituito da 1186 pazienti (577 M; 606 F; età tra 18 anni e 91 anni) rappresentato prevalentemente da un gruppo di pazienti dello studio epidemiologico “Ventimiglia di Sicilia” per valutare la prevalenza dei polimorfismi in una popolazione rappresentativa della nostra area geografica e valutare se esiste una relazione indipendente tra prevalenza del polimorfismo e sindrome metabolica.

Questo studio ha avuto inizio nel 1989 con lo scopo di valutare il rischio cardiovascolare in una popolazione a basso rischio come quella di Ventimiglia di Sicilia, un paese rurale nel sud Italia, caratterizzata da bassi livelli di colesterolo e da una bassa incidenza di mortalità per malattia coronarica precoce. Il progetto prevedeva l'esecuzione di un questionario medico, rilevazione della pressione arteriosa, misurazioni dei parametri antropometrici e biochimici e la registrazione di un elettrocardiogramma. La popolazione è stata rivalutata più volte ed è attualmente in corso una ulteriore rivalutazione. Nel corso del follow up sono stati registrati tutti i decessi e le relative cause di mortalità e si è cercato di valutare quali fattori tra quelli valutati sono stati in grado di predire la mortalità in questi soggetti. Il campionamento del sangue per lo studio del polimorfismo del gene PNPLA3 in questa popolazione è stato eseguito nel 2004.

I 342 pazienti con sindrome metabolica sono stati sottoposti a misurazione dei principali parametri antropometrici con valutazione dell'indice di massa corporea ($BMI = \text{peso corporeo in kg} / \text{altezza in m}^2$) e della circonferenza addominale. Tutti i pazienti di questo gruppo avevano una circonferenza addominale >102 cm negli uomini e 88 cm nelle donne.

Sono stati valutati i principali parametri ematochimici correlati alla sindrome metabolica: trigliceridi (TG), HDL-colesterolo (HDL-C), glicemia, insulinemia, ApoB e anche il colesterolo totale (CT).

La storia di diabete mellito è stata diagnosticata per valori di glicemia a digiuno di almeno 126 mg/dl o dall'anamnesi farmacologica con ipoglicemizzanti orali o insulina, invece la presenza di alterata glicemia a digiuno è stata diagnosticata per valori di glicemia a digiuno compresa tra 100 e 125 mg/dl.

Il grado di steatosi epatica è stato valutato tramite esame ecografico, distinguendo un'assenza di steatosi, steatosi lieve, moderata e severa. L'assenza di steatosi è stata definita in presenza di una normale ecogenicità del parenchima epatico, non differente a sua volta dall'ecogenicità della corticale renale. La steatosi lieve è stata definita in presenza di un incremento dell'ecogenicità del parenchima epatico rispetto alla corticale renale, in assenza di un'attenuazione importante del fascio ultrasonoro, consentendo un'adeguata visualizzazione della struttura epatica anche in profondità. La steatosi moderata è stata definita in presenza di un incremento dell'ecogenicità del parenchima epatico in associazione ad un'attenuazione del fascio ultrasonoro profondo, con diaframma ancora visibile e vasi epatici mal definibili. La steatosi severa è stata definita in presenza di un incremento dell'ecogenicità del parenchima epatico con un'importante attenuazione del fascio ultrasonoro in profondità tale da non rendere più evidente le strutture vascolari, la biforcazione portale ilare e il diaframma. Da questa selezione, sono stati esclusi i soggetti con steatosi epatica in presenza di un consumo giornaliero significativo di alcolici, 30 g/die per gli uomini e 20 g/die per le donne.

3. Studio del polimorfismo genetico rs738409

Le indagini genetiche che hanno permesso lo studio del polimorfismo rs738409 del gene PNPLA3 e la discriminazione allelica dello stesso, sono state effettuate dallo staff scientifico tecnico del Laboratorio di Biologia e Genetica Molecolare delle Dislipidemie Genetiche – Responsabile dott. Angelo Baldassare Cefalù – dell'Unità Operativa Semplice di Medicina Interna e Dislipidemie Genetiche del Policlinico Universitario Paolo Giaccone di Palermo, diretta dal Professore Maurizio Averna.

3.1 Analisi del polimorfismo rs738409

1.1.1. Materiali e metodi

I soggetti in studio sono stati sottoposti ad un prelievo di sangue venoso dopo 12-14 ore di digiuno. Il prelievo è stato eseguito mediante venipuntura di una vena periferica, e posto in una provetta contenente anticoagulante (EDTA); aliquote di sangue intero ed aliquote di plasma sono state congelate a – 80 °C per le successive analisi genetiche. Per le indagini biochimiche iniziali è stato utilizzato plasma fresco (colesterolo totale, HDL-colesterolo, LDL-colesterolo, trigliceridi). I dati sono stati registrati su computers disponibili nel Laboratorio di Biologia e Genetica Molecolare del Centro di Riferimento Regionale per le Dislipidemie Genetiche. Per la diagnosi clinica di sindrome metabolica sono stati adottati i criteri diagnostici dell'ATP III e confermati dall'ATP IV.

1.1.2. Analisi biochimiche di primo livello

I livelli di colesterolo totale (CT), trigliceridi (TG) e lipoproteine ad alta densità (HDL-C) sono stati determinati con metodi enzimatici standard (Roschlau P. 1974; Wahalefeld A.W. 1974; Llopez-virella H.F. et al., 1970). I livelli di lipoproteine a bassa densità (LDL-C) sono stati calcolati utilizzando la formula di Friedewald (Friedewald W.T. et al., 1972).

1.2. Estrazione del DNA genomico da sangue intero

Il DNA genomico è stato estratto da leucociti isolati da campioni di sangue periferico. Per l'estrazione del DNA genomico è stato utilizzato il Wizard® Genomic DNA purification Kit della PROMEGA che si basa su un processo composto da 4 fasi: lisi dei globuli rossi, lisi dei globuli bianchi e dei rispettivi nuclei, precipitazione delle proteine, concentrazione e lavaggio del DNA.

Nella prima fase di lisi dei globuli rossi, 900 µl di Cell Lysis solution sono stati trasferiti in eppendorfs sterili da 1,5 ml. La provetta contenente il sangue intero è stata agitata delicatamente fino ad ottenere una miscelazione ed il sangue è stato poi aggiunto alle eppendorfs contenenti la Cell Lysis Solution. I tubi sono stati invertiti 5 – 6 volte per mescolarne il contenuto. Quest'ultimo è stato incubato per 10 minuti a temperatura ambiente, invertendo 2 – 3 volte, per una volta, durante l'incubazione, per lisare i globuli rossi. Al termine dell'incubazione i tubi sono stati centrifugati a 14,000 x g per 4 minuti a temperatura ambiente. Dai tubi centrifugati è stato rimosso ed eliminato quanto più supernatante fosse possibile, mediante una pipetta Pasteur monouso, evitando di toccare il pellet visibile bianco e lasciando approssimativamente 10 – 20 µl di fase liquida nel tubo da 1,5 ml. I tubi sono stati, quindi, mixati vigorosamente tramite vortex per 10 – 15 secondi al fine di risospendere i globuli bianchi.

Nella seconda fase di lisi dei globuli bianchi e dei rispettivi nuclei, 300 µl di Nuclei Lysis Solution sono stati aggiunti ai tubi contenenti le cellule risospese. La soluzione è stata pipettata 5 – 6 volte per lisare i globuli bianchi fino ad ottenere una soluzione viscosa priva di aggregati cellulari.

Nella terza fase di precipitazione salina delle proteine, sono stati aggiunti 100 µl di Protein Precipitation Solution al lisato nucleare, e quest'ultimo è stato mixato vigorosamente tramite vortex per 10 – 20 secondi al termine dei quali è stato possibile osservare piccoli aggregati proteici. I campioni così ottenuti sono stati centrifugati a 14,000 x g per 3 minuti a temperatura ambiente, al termine dei quali è stato possibile osservare un pellet proteico marrone scuro al fondo dell'eppendorf.

Nella quarta ed ultima fase di concentrazione e lavaggio del DNA, il supernatante è stato trasferito in una eppendorf pulita da 1.5 ml contenente 300 µl di isopropanolo 100% a temperatura ambiente. La soluzione, così ottenuta, contenuta all'interno dell'eppendorf, è stata delicatamente mischiata per inversione fin quando dei filamenti di DNA bianchi non hanno formato una massa visibile. I campioni sono stati, quindi, centrifugati a 14,000 x g per 1 minuto a temperatura ambiente e al termine della suddetta centrifugazione è stato possibile osservare un piccolo pellet bianco di DNA. Il supernatante è stato eliminato e sono stati aggiunti, al DNA, 300 µl di etanolo 70% a temperatura ambiente. I medesimi tubi sono stati invertiti delicatamente diverse volte per lavare il pellet di DNA e le pareti delle eppendorfs. Queste ultime sono state centrifugate a 14,000 x g per 1 minuto a temperatura ambiente. L'etanolo è stato aspirato, mediante l'ausilio di una pipetta e di puntali, facendo attenzione a non aspirare anche il pellet all'interno del puntale. Le eppendorfs sono state invertite su carta assorbente pulita e il pellet è stato lasciato asciugare all'aria per 10 – 15 minuti. Infine, sono stati aggiunti 100 µl di DNA Rehydration Solution a ciascun tubo per reidratare il DNA e i campioni sono stati lasciati in incubazione per una notte a temperatura ambiente. Il DNA è stato conservato a 4°C fino al momento dell'utilizzo.

1.3. Quantificazione del DNA estratto

La quantità di DNA di ogni singolo campione estratto è stata determinata mediante misure allo spettrofotometro (BioPhotometer, Eppendorf) della Densità Ottica (D.O.) di diluizioni degli acidi nucleici alla lunghezza d'onda di 260 nm, che corrisponde al picco di assorbimento delle basi azotate. La concentrazione è stata ricavata attraverso la legge di Lambert – Beer. La presenza di eventuali contaminazioni è stata rilevata mediante lettura a 280 nm, alla quale il legame peptidico ha il massimo assorbimento. Tutte le soluzioni presentavano un buon grado di purezza, poiché il rapporto D.O.260/D.O.280 era compreso tra 1.8 e 2.

1.4. Genotipizzazione tramite Real-Time PCR ed analisi dei genotipi

L'analisi dello SNP, con codice di accesso in banca dati rs738409, è stata effettuata tramite un saggio di genotipizzazione dei campioni di DNA con Real Time PCR qualitativa mediante l'uso della sonda TaqMan (Applied Biosystem) c_1754666_10. Il saggio di genotipizzazione eseguito si compone di tre fasi: amplificazione tramite PCR, discriminazione allelica con lettura della piastra e analisi end-point e con curva di melting.

Durante la prima fase di amplificazione tramite PCR, l'AmpliTaq Gold® DNA polimerasi, contenuta nella TaqMan Universal PCR Master Mix, amplifica il target usando dei primers sequenza – specifici, contenuti nella SNP Genotyping Assay 40X insieme alle TaqMan® MGB probes: una sonda marcata con il fluorocromo VIC®, che riconosce la sequenza dell'allele 1, e una sonda marcata con il fluorocromo FAM™, che riconosce la sequenza dell'allele 2. Queste consentono una successiva lettura della fluorescenza derivante dall'amplificazione di ogni allele.

Per ogni esperimento sono state disegnate piastre composte da 48 pozzetti rappresentabili tramite il seguente schema:

Controllo (-) I	N 1	N 2	N 3	N 4	N 5	N 6	N 7
Controllo (-) II	N 8	N 9	N 10	N 11	N 12	N 13	N 14
N 15	N 16	N 17	N 18	N 19	N 20	N 21	N 22
N 23	N 24	N 25	N 26	N 27	N 28	N 29	N 30
N 31	N 32	N 33	N 34	N 35	N 36	N 37	N 38
N 39	N 40	N 41	N 42	N 43	N 44	N 45	Controllo +

in cui, oltre ai campioni con genotipo sconosciuto per lo SNP d'interesse, sono stati inseriti due controlli negativi, dove il campione di DNA è stato sostituito

con acqua DNase - free, per orientare i clusters dei fluorocromi VIC e/o FAM ad un'origine e per permettere la rilevazione di un'eventuale contaminazione di DNA; un controllo positivo contenente un DNA con genotipo noto per lo SNP di interesse, fornito dalla ditta produttrice. Ogni saggio di genotipizzazione è stato ripetuto in triplicato. Dopo aver trasferito i campioni di DNA genomico in ognuna delle posizioni assegnate della piastra, è stata preparata la mix di reazione.

Il protocollo di amplificazione per la genotipizzazione, per un volume finale di 20 µl, viene riassunto nella seguente tabella (Tabella 6).

REAGENTE	VOLUME IMPIEGATO	CONCENTRAZIONE FINALE
TaqMan Genotyping Master Mix (2X)	10 µl	1 X
SNP Genotyping Assay Mix (40X) c_1754666_10	0,5 µl	1 X
Templato (campione di DNA genomico)	1 µl	1 – 20 ng
H ₂ O priva di DNase	8,5 µl	/

Tabella 6. Ottimizzazione della reazione di genotipizzazione.

La soluzione TaqMan Universal PCR Master Mix (2X) No AmpErase UNG è stata agitata delicatamente e la SNP Genotyping Assay 40X è stata mixata al vortex ed in seguito centrifugata. È stata preparata la mix di reazione contenente i volumi totali di TaqMan Universal PCR Master Mix (2X) No AmpErase UNG, SNP Genotyping Assay 40X e acqua in una eppendorf sterile DNase-free mediante l'ausilio di una pipetta. L'eppendorf è stata invertita diverse volte per mixare le soluzioni contenute al suo interno e successivamente centrifugata per raccogliere il contenuto al fondo ed eliminare eventuali bolle d'aria presenti nella mix di reazione. Quest'ultima, così preparata, è stata aggiunta ad ognuno dei campioni contenuti nei pozzetti della piastra di reazione, mediante l'ausilio di una pipetta e cambiando puntale di volta in volta per evitare contaminazioni. Al termine, la piastra è stata controllata, per verificare l'uniformità dei volumi presenti in ogni pozzetto, è stata sigillata con l'apposito coperchio, è stata

mixata tramite vortex ed infine centrifugata per convogliare il contenuto al fondo dei tubi ed eliminare eventuali bolle d'aria. La preparazione della mix di reazione e l'aggiunta di questa nei pozzetti della piastra sono state effettuate avendo cura di non esporre i reagenti alla luce per evitarne il deterioramento.

Le amplificazioni sono state effettuate tramite l'utilizzo dello strumento StepOne™ Real Time PCR System (Applied Biosystems). La reazione prevede, un'incubazione a 60°C per 30" (pre – PCR Read), 95° per 10' per l'attivazione dell'AmpliTaq Gold® polimerasi, presente all'interno della TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystem), e 40 cicli di amplificazione secondo i seguenti parametri:

DENATURAZIONE	15 sec.	92°C
ANNEALING	1 min.	60°C
ESTENSIONE	1 min.	60°C

Segue una fase di post – PCR Read a 60°C per 30". Dopo avere impostato lo strumento con le condizioni sopra citate, la piastra è stata caricata nel termociclatore.

Alla fase di amplificazione tramite PCR è seguita la discriminazione allelica con lettura della piastra e analisi.

Il saggio di genotipizzazione adoperato prevede l'utilizzo di una chimica di PCR fluorescente, che consente la discriminazione allelica utilizzando simultaneamente una coppia di primers e una coppia di sonde MGB TaqMan®, marcate all'estremità 5' ognuna con un differente fluorocromo:

VIC®	CATACTAACCATATGATCAACAGTT C AAAAGCAGCCACTCGCAGAGGTAAG
FAM™	CATACTAACCATATGATCAACAGTT G AAAAGCAGCCACTCGCAGAGGTAAG

Durante la PCR ciascuna delle due sonde alternative esegue un annealing in modo specifico alla sequenza complementare sul filamento bersaglio, interposta tra i primers forward e reverse. Poiché la sonda è ancora intatta, in questa fase la vicinanza dei fluorocromi, quencer (non fluorescente) e reporter, posti alle sue estremità 5' e 3', impedisce l'emissione del segnale del reporter. Nella fase successiva di estensione, l'AmpliTaq Gold® polimerasi estende i primers, legati al template di DNA genomico ed essendo, inoltre, dotata di attività 5' nucleasica, separa le sonde, ibridate alla sequenza target, con conseguente allontanamento di reporter e quencer e successiva emissione di fluorescenza.

Dopo l'amplificazione tramite PCR è stata eseguita una lettura della piastra endpoint usando l'Applied Biosystems Real-Time PCR System. Il software Sequence Detection System (SDS) usa le misurazioni di fluorescenza eseguite durante la lettura della piastra per tracciare i valori di fluorescenza (Rn) sulla base dei segnali provenienti da ogni pozzetto. I segnali di fluorescenza vengono rappresentati in un plot di amplificazione. Per l'analisi di genotipizzazione dei campioni è stato utilizzato il software StepOne™ 2.0 che scompone la fluorescenza nelle due componenti FAM e VIC. In una prima fase, il software normalizza la fluorescenza dei fluorocromi reporter alla fluorescenza del background presente in ogni pozzetto. Quindi, il software visualizza le intensità normalizzate (Rn) dei coloranti reporter presenti in ogni pozzetto e corrispondenti a ciascun campione su un plot di discriminazione allelica (Figura 8). Inoltre, il software StepOne™2.0 assegna ai campioni un genotipo sulla base della posizione da essi occupata nel plot: asse orizzontale (allele 1), asse verticale (allele 2) oppure diagonale (allele 1/allele 2). Il prevalere di una componente della fluorescenza sull'altra è dovuto alla presenza di un genotipo omozigote, mentre la rilevazione di entrambe è legata alla presenza di un genotipo eterozigote.

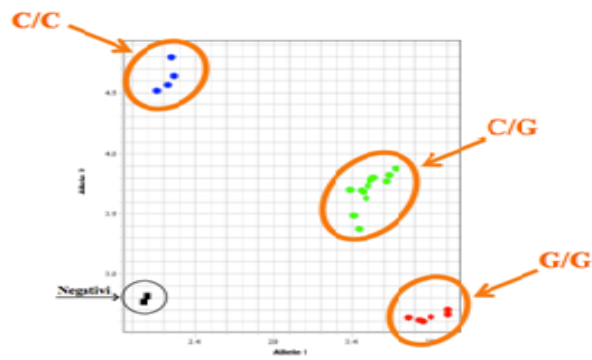


Fig. 8. Plot di discriminazione allelica ottenuto al termine della fase di lettura della piastra.

Infine, per verificare la correttezza dell'assegnazione dei genotipi ai campioni effettuata dal software, è stata eseguita l'analisi dei plots di amplificazione di ciascun campione che consente di visualizzare l'amplificazione del campione, in seguito all'acquisizione da parte dello Strumento StepOne™ dei dati di fluorescenza durante la sessione di analisi. Ogni plot evidenzia la fluorescenza del colorante normalizzata (ΔRn) e il numero di ciclo (Figura 9).

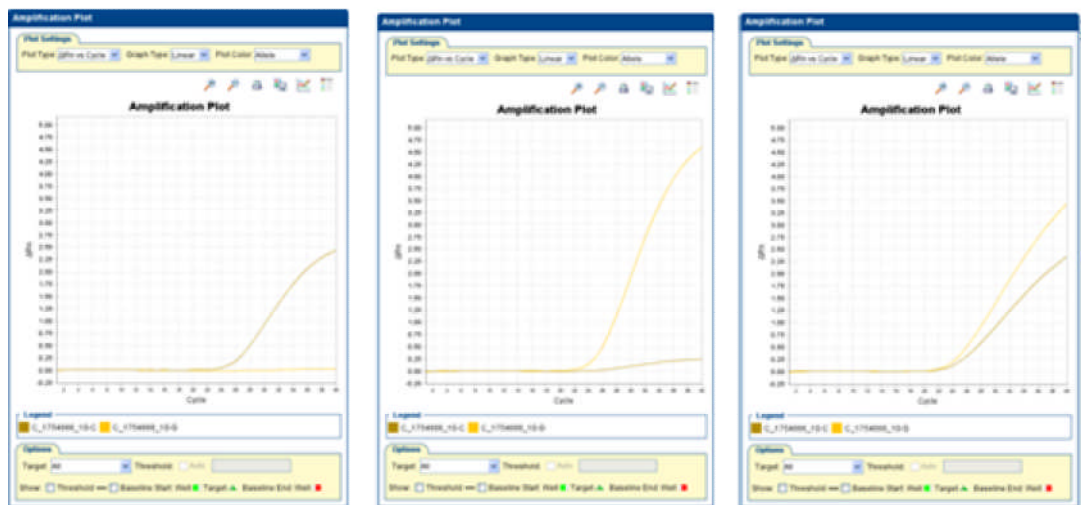


Fig.9. Plots di amplificazione esemplificativi di ciascun genotipo (da sinistra C/C, G/G, C/G).

4. Analisi statistiche

I dati ottenuti sono stati analizzati mediante il software SYSTAT 12. Le variabili continue sono presentate come media \pm D.S., e le variabili dicotomiche sono presentate come proporzioni.

L'equilibrio di Hardy-Weinberg dei genotipi è stato valutato mediante il test del χ^2 di Pearson con un grado di libertà. Per lo studio caso-controllo, la differenza nelle frequenze genotipiche è stata calcolata utilizzando il test del χ^2 di Pearson. Le differenze nelle caratteristiche demografiche della popolazione, nei fattori di rischio e nello stato clinico tra soggetti con genotipi rs738409 (GG, GC e CC) sono stati analizzati usando l'analisi della varianza e il test del χ^2 . Sono state analizzate le associazioni differenziali nei sottogruppi (interazioni gene x fattore di rischio) tramite l'inclusione di appropriati termini d'interazione. Tutti i p-value sono stati considerati significativi se $p < 0,05$.

5. Risultati

Sono stati valutati 1186 pazienti (maschi n=577 e femmine n=606, età compresa tra 18 anni e 91 anni) nell'ambito dello studio epidemiologico "Ventimiglia di Sicilia", nei quali si è ricercata la distribuzione dei genotipi CC (*wild type*), CG e GG del polimorfismo rs738409 del gene PNPLA3 (Tabella 7).

Genotipo PNPLA3	Totale soggetti (n=1186)	Frequenza
CC	n (M/F) = 580 (294/286)	48.8%
CG	n (M/F) = 483 (231/251)	40.6%
GG	n (M/F) = 123 (52/60)	10.2%

Tabella 7. Distribuzione dei genotipi rs738409 del gene PNPLA3 nella popolazione generale (studio epidemiologico Ventimiglia di Sicilia)

Tra tutti i soggetti analizzati in questo studio epidemiologico, la maggior parte (n=580, 48.8%) ha presentato il genotipo CC per il gene PNPLA3, con una distribuzione pressoché identica tra i due sessi (294 uomini e 286 donne). I soggetti portatori dell'eterozigosi CG sono risultati numerosi (n=483, 40.6%), con una distribuzione tra i sessi leggermente superiore nelle donne (231 uomini e 251 donne).

Il genotipo omozigote GG, come ci si attendeva, era presente soltanto in una minoranza della popolazione presa in esame (n=123, 10.2%). Anche in questo caso con una frequenza leggermente superiore nelle donne rispetto agli uomini (52 uomini e 69 donne).

Nei 342 pazienti affetti da sindrome metabolica (204 M;138 F; età media 57±10.9 anni) abbiamo valutato la distribuzione dei genotipi del polimorfismo rs738409 del gene PNPLA3 ed abbiamo analizzato la correlazione esistente tra l'allele raro G e il grado di steatosi epatica, valutato tramite esame ecografico(Tabella 8).

Grado di steatosi	Totale soggetti (n=342)	N soggetti/genotipo	Genotipo PNPLA3	Frequenza
Assente	N= 38	3/38	CC	7%
		35/38	CG	93%
Lieve	N= 91	39/91	CC	42.8%
		52/91	CG	57.2%
Moderata	N=192	37/192	CC	19.3%
		155/192	CG	80.7%
Severa	N=20	12/20	CC	60%
		8/20	CG	40%

Tabella 8. Distribuzione dei genotipi del polimorfismo rs738409 del gene PNPLA3 in soggetti affetti da sindrome metabolica (definita secondo i criteri dell'ATPIII) e correlazione tra l'allele raro G e grado di steatosi

Come si può osservare dalla analisi delle due tabelle 7 ed 8 abbiamo quindi osservato che nella popolazione generale di riferimento la prevalenza dell'allele G era del 50.8 % (CG 40.6% - GG 10.2%); mentre nel campione di soggetti con sindrome metabolica + NAFLD tale prevalenza era del 70.9% (215 su 303 pazienti).

Tra i soggetti affetti da sindrome metabolica, in coloro che non presentavano steatosi (38 soggetti), contrariamente ai risultati attesi, abbiamo osservato una maggiore prevalenza del genotipo CG rispetto al genotipo CC, con una frequenza rispettivamente del 93% (35/38) e del 7% (3/38).

I soggetti con un grado lieve di steatosi (91 soggetti) mostravano una prevalenza del genotipo CG lievemente superiore rispetto al genotipo CC, con una frequenza rispettivamente del 57.2% (52/91) e del 42.8%(39/91).

I soggetti con steatosi moderata (192 soggetti) presentavano anch'essi una maggiore prevalenza del genotipo CG, con una frequenza del 80.7% (155/192), a differenza del genotipo CC presente nel 19.3% (37/192). Nei soggetti con steatosi severa (20 soggetti) abbiamo riscontrato invece una prevalenza del genotipo CC rispetto al genotipo CG, con una frequenza rispettivamente del 60% (12/20) e del 40% (8/20).

Nessuno dei pazienti di questo gruppo ha presentato il genotipo GG. Successivamente abbiamo voluto verificare se esistesse una correlazione tra i genotipi CC, CG e GG del polimorfismo rs738409 del gene PNPLA3 e i principali parametri metabolici nei 1186 soggetti della popolazione generale considerata, (Tabella 9).

Genotipo	CT mg/dl	HDL- C mg/dl	TG mg/dl	Insulinemia uU/ml	Glicemia mg/dl	ApoB mg/dl
CC	212.8 ± 58.4*	35.8 ± 8.2*§	252.8 ± 179.1*§	13.6 ± 6.5§	97.7 ± 20.3	120.4 ± 47.2
CG	186.2 ± 47.5*	47.1 ± 15.4*	146.4 ± 110.8*	17.3 ± 5.5#	102.4 ± 23.8	103.3 ± 40.1
GG	185.5 ± 26.5	53.3 ± 10.6§	78.8 ± 30.3§	6.4 ± 3.3 §#	88.4 ± 16.3	100.2 ± 38.5

* p value CC vs CG (CT p=0.041; HDL-C p< 0.001; TG p=0.004)
§ p value CC vs GG (HDL-C p<0.001; TG p= 0.014; Insulinemia p=0.007)
p value CG vs GG (Insulinemia p<0.001)

Tabella 9. Correlazione tra polimorfismo rs738409 del gene PNPLA3 e principali parametri metabolici (media ± DS) nei 1186 soggetti della popolazione generale .

Abbiamo osservato che i soggetti con genotipo CC (wild type) hanno presentato dei livelli di colesterolo totale (218 ± 58.4 mg/dl) e trigliceridi (252 ± 179.1) superiori rispetto ai soggetti con genotipo CG (CT 186 ± 47.5 mg/dl e TG 146 ± 110.8 mg/dl) mentre i livelli di HDL-colesterolo risultavano essere inferiori (35.8 ± 8.2 mg/dl vs 47 ± 15.4 mg/dl) con p value CC vs CG (CT p=0.041; HDL-C p<0.001; TG p=0.004).

Rispetto ai soggetti con genotipo GG, i soggetti con genotipo CC hanno presentato dei livelli di colesterolo totale superiori (218 ± 58.4 mg/dl vs 185.5 ± 26.5 mg/dl), dei livelli di HDL-colesterolo nettamente inferiori (35.8 ± 8.2 mg/dl vs 53.3 ± 10.6 mg/dl; p<0.001), dei livelli di trigliceridi nettamente superiori (252 ± 179.1 mg/dl vs 78.8 ± 30.3 mg/dl; p= 0.014) e dei livelli di insulinemia praticamente raddoppiati (13.6 ± 6.5 µU/ml vs 6.4 ± 3.3 µU/ml).

I soggetti con genotipo CG mostravano invece, rispetto ai soggetti con genotipo GG, livelli di superiori di trigliceridi (146 ± 110.8 mg/dl vs 78.8 ± 30.3 mg/dl), insulinemia (17.3 ± 5.5 µU/ml vs 6.4 ± 3.3 µU/ml; p< 0.001) e di glicemia (102.4 ± 23.8 mg/dl vs 88.4 ± 16.3 mg/dl).

In seguito, nei pazienti con sindrome metabolica che avevano steatosi assente o severa, in cui abbiamo rilevato una prevalenza dell'allele G in direzione opposta rispetto alla ipotesi iniziale, abbiamo confrontato i principali parametri metabolici, espressi in media \pm deviazione standard (Tabella 10).

Grado di steatosi	CT mg/dl	TG mg/dl	HDL-C mg/dl	Glicemia mg/dl	Insulinemia mU/ml
ASSENTE (n=38)	209.0 \pm 44.8	173.5 \pm 69.5	44.9 \pm 14.9	95.1 \pm 20.9	9.95 \pm 4.63
SEVERA (n=20)	191.9 \pm 37.4	320.9 \pm 227.3	37.1 \pm 13.1	126.9 \pm 55.4	21.04 \pm 8.9
P value	0.180	0.000758 *	0.0720	0.00425*	< 0.0001 *

Tabella 10. Confronto dei due sottogruppi di pazienti con sindrome metabolica e steatosi rispettivamente assente e severa in relazione ai principali parametri metabolici (media \pm DS).

In particolare possiamo rilevare un significativo incremento dei principali parametri metabolici in soggetti con genotipo wild-type e all'opposto notiamo una correlazione inversa tra questi stessi valori e gravità di steatosi (quest'ultima associata alla presenza dell'allele G). I soggetti con steatosi assente (nei quali il genotipo prevalente era CG), a differenza dei soggetti con steatosi severa (nei quali il genotipo prevalente era CC) presentavano livelli inferiori di trigliceridi (173.5 \pm 69.5 mg/dl vs 320.9 \pm 227.3; p= 0.000758), livelli inferiori di glicemia (95.1 \pm 20.9 mg/dl vs 126 \pm 55.4 mg/dl; p= 0.00425) e livelli inferiori di insulinemia (9.95 μ U/ml vs 21.04 \pm 8.9 μ U/ml; p< 0.0001). Per ciò che concerne invece i livelli di colesterolo totale e di HDL-colesterolo, non sembrano esserci differenze significative tra il gruppo di pazienti con steatosi assente e steatosi severa: il

colesterolo totale nei pazienti con steatosi assente è 209.0 ± 44.8 mg/dl e nei pazienti con steatosi severa è 191.9 ± 37.4 mg/dl, con p value= 0.180; l'HDL-colesterolo nei pazienti con steatosi assente è 44.9 ± 14.9 mg/dl e nei pazienti con steatosi severa è 37.1 ± 13.1 mg/dl, con p value= 0.0720. Entrambi i dati risultano essere poco significativi.

Queste osservazioni possono indicare che i parametri metabolici hanno maggiore influenza del genotipo sullo sviluppo della NAFLD in questi due sottogruppi di pazienti con sindrome metabolica rispettivamente con steatosi assente e severa, ove però dobbiamo sempre considerare il BIAS della poca numerosità del campione.

Il proseguio dello studio di Ventimiglia di Sicilia attualmente in corso, durante il quale sarà eseguita anche ecografia addominale, ci consentirà di aumentare il campione con sindrome metabolica e NAFLD e quindi di eliminare il BIAS, permettendo inoltre un'analisi multivariata dei risultati e valutare una eventuale correlazione indipendente tra grado di steatosi e polimorfismo rs738409 del gene PNPLA3.

6. Discussione

I dati emersi da questo studio confermano, almeno in parte, i dati presenti in letteratura. Abbiamo infatti rilevato delle associazioni che sono state già oggetto di indagine di recenti studi presenti in letteratura, che a nostro parere risultano interessanti per eventuali studi futuri e che meritano un ulteriore approfondimento. Per quanto riguarda la distribuzione dei tre genotipi del gene PNPLA3 presi in esame (CC, CG e GG) nei pazienti (n=1186) rappresentanti la popolazione generale di riferimento abbiamo riscontrato le seguenti caratteristiche (tabella 6):

- I soggetti con il genotipo CC (*wild type*) come ci attendevamo rappresentano la maggior parte, essendo questo il genotipo più diffuso.
- I soggetti con il genotipo CG sono molto numerosi, molti di più rispetto ai soggetti con genotipo omozigote rispetto all'allele raro G. Questo a conferma della rarità del genotipo omozigote.

Successivamente confrontando la frequenza dei genotipi nei soggetti con sindrome metabolica (n=342) in relazione allo grado di steatosi (tabella 7), abbiamo riscontrato le seguenti caratteristiche:

- Nei soggetti con assenza di steatosi epatica, dove ci saremmo aspettati una maggiore presenza del genotipo *wild type*, ritroviamo una netta prevalenza del genotipo CG rispetto al genotipo CC (93% vs 7%). Analogamente nei soggetti con steatosi epatica severa laddove ci saremmo aspettati una maggiore prevalenza del genotipo CG, troviamo una prevalenza maggiore del genotipo CC (60% vs 40%). Questi dati, che sono contraddittori rispetto all'ipotesi iniziale secondo la quale la presenza dell'allele G condiziona una maggiore gravità della steatosi, meritano ulteriori approfondimenti e valutazioni, considerando che in queste due sottoclassi di pazienti la scarsa numerosità del campione rappresenta probabilmente un bias.

Considerando invece i soggetti affetti da steatosi lieve e moderata esiste al contrario una significativa associazione tra steatosi e allele G come predetto. Sarà necessario pertanto estendere lo studio ad una coorte più numerosa di pazienti affetti da sindrome metabolica nell'ambito della popolazione generale per ottenere

dati più esaustivi e non influenzati da fattori di confondimento legati al campionamento.

- Sia nei soggetti con steatosi lieve (n=91) sia nei soggetti con steatosi moderata (n=192) abbiamo trovato una prevalenza del genotipo CG rispetto al genotipo CC. Ciò è evidenziabile maggiormente nel sottogruppo di soggetti con steatosi moderata, laddove a fronte di un numero cospicuo di soggetti, più della metà (80.7%) presentava il genotipo CG e solamente una piccola porzione (19.3%) presentava il genotipo CC. Rispetto ai soggetti con steatosi assente o steatosi severa, la presenza di un campione cospicuo per i gruppi con steatosi lieve e steatosi moderata rende sicuramente più attendibile tale dato, e rafforza l'ipotesi circa l'influenza esercitata dalla presenza dell'allele raro G sui processi determinanti l'accumulo di grassi a livello epatico.

Confrontando invece i tre genotipi (CC, CG e GG) tra i soggetti della popolazione generale di riferimento con i parametri metabolici principali (tabella 8), abbiamo riscontrato le seguenti differenze statisticamente significative:

- Abbiamo osservato che le alterazioni principali di alcuni parametri come il colesterolo totale, l'HDL-colesterolo, i trigliceridi e l'insulinemia sono appannaggio dei soggetti con genotipo CC rispetto ai genotipi CG e GG, nei quali tali valori, fatta eccezione per l'insulinemia nei soggetti con genotipo CG, rientrano nel range di normalità o comunque si attestavano a valori inferiori. In soggetti nei quali è presente l'allele raro G, in singola o in duplice copia, l'assetto lipidico risulta essere pressoché nella norma, anche se il metabolismo glucidico appare leggermente meno efficiente nel gruppo con genotipo CG, con livelli di insulinemia e glicemia più elevati, ma non nel gruppo con genotipo GG. Questi dati ci suggeriscono che la presenza del polimorfismo CG e GG non si correla in modo univoco con la gravità della sindrome metabolica e che la steatosi epatica, eventualmente presente in questi soggetti, probabilmente si inserisce in un quadro dismetabolico sistemico.

Infine, confrontando invece i due sottogruppi di pazienti, quelli con steatosi assente e quelli con steatosi severa, per i principali parametri metabolici della

sindrome metabolica, abbiamo riscontrato le seguenti differenze statisticamente significative:

- I pazienti con assenza di steatosi presentano un profilo lipidico nettamente migliore rispetto ai pazienti con steatosi severa, nonostante presentassero una prevalenza maggiore del genotipo CG; tuttavia, come già detto, l'esiguità del campione di soggetti con assenza di steatosi (n=38) rispetto al totale di soggetti a disposizione (n=342) rende necessario uno studio più approfondito con un campione più vasto a disposizione.

- I pazienti con steatosi severa invece presentano un profilo lipidico alterato con un'ipertrigliceridemia importante e un basso livello di HDL-colesterolo, associati ad elevati valori di glicemia ed insulinemia in confronto al sottogruppo con assenza di steatosi: nel campione a nostra disposizione, anche in questo caso l'esiguità del numero (n=20) porterebbe ad un bias, tuttavia in questo sottogruppo si è vista una distribuzione più equa tra i soggetti con genotipo CC e con genotipo CG (60% vs 40%); nonostante ciò, anche questo risultato va valutato attentamente, con studi più approfonditi e numericamente più adeguati dal punto di vista statistico.

7. Conclusioni

L'analisi del polimorfismo rs738409 del gene PNPLA3 ha evidenziato che l'allele raro G nel campione di soggetti con sindrome metabolica e NAFLD oggetto di questo studio ha una maggiore prevalenza rispetto alla popolazione generale di riferimento, il che riprodurrebbe il ruolo di primo piano attribuito a questo polimorfismo da diversi studi negli ultimi anni.

I dati non univoci emersi in questo studio sulla correlazione tra polimorfismo di suscettibilità alla NAFLD del gene PNPLA3 (allele G) e severità della stessa sono sicuramente condizionati da un bias legato alla numerosità esigua del campione.

Il proseguio dello studio di Ventimiglia di Sicilia attualmente in corso, durante il quale sarà eseguita anche un esame di ecografia addominale, ci consentirà di aumentare il campione con sindrome metabolica e documentata NAFLD e quindi di eliminare il bias, permettendo inoltre un'analisi multivariata dei risultati per valutare una eventuale correlazione indipendente tra grado di steatosi e polimorfismo rs738409 del gene PNPLA3.

BIBLIOGRAFIA

1. Alba LM, Lindor K. Review article: non alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17, 977-986.
2. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology*. 2003; 37:1202-1219.
3. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 2005; 42: 44-52.
4. Charlton MR, Burns JM, Pedersen RA, et al. Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology*. 2011;141:1249–1253.
5. Suzuki A, Angulo P, Lymp J, et al. Chronological development of elevated aminotransferases in a nonalcoholic population. *Hepatology*. 2005;41:64–71.
6. Tsuneto A, Hida A, Sera N, et al. Fatty liver incidence and predictive variables. *Hyper Res*. 2010;33:638–643.
7. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment. Pharm. Ther*. 2011;34:274–285.
8. Marcos A, Fisher RA, Ham JM, et al. Selection and outcome of living donors for adult to adult right lobe transplantation. *Transplantation*. 2000;69:2410–2415.
9. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*. 2004;40:1387–1395.
10. Michael Wayne Fleischman, Matthew Budoff, Ifran Zeb, Dong Li, and Temitope Foster. NAFLD prevalence differs among hispanic subgroups: The multi-ethnic study of atherosclerosis. *World J Gastroenterol*. May 7, 2014; 20(17): 4987–4993.
11. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*. 2004;40:1387–1395.
12. Gutierrez-Grobe Y, Ponciano-Rodriguez G, Ramos MH, et al. Prevalence of non alcoholic fatty liver disease in premenopausal, postmenopausal and polycystic ovary syndrome women. The role of estrogens. *Ann. Hepatol*. 2010;9:402–409.
13. Kato H, Isaji S, Azumi Y, et al. Development of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH) after pancreaticoduodenectomy:

- proposal of a postoperative NAFLD scoring system. *J. Hepato-biliary-pancreatic sciences.* 2010;17:296–304
14. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ: Nonalcoholic fatty liver disease. A spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116, 1413-1419. McCullough AJ. Update on nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol.* 2002; 34(3):255-62.
 15. Argo CK, Northup PG, Al-Osaimi AM, Caldwell SH. Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis.
 16. Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology.* 2005;129:113–121.
 17. Petrides AS, Stanley T, Matthews DE, Vogt C, Bush AJ, Lambeth H. Insulin resistance in cirrhosis: prolonged reduction of hyperinsulinemia normalizes insulin sensitivity. *Hepatology.* 1998; 28:141-149.
 18. Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL, et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology.* 2006;44:865–873.
 19. 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.*2011;43:617–649
 20. Bhala N, Angulo P, van der Poorten D, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease with advanced fibrosis or cirrhosis: an international collaborative study. *Hepatology.* 2011;54:1208–1216.
 21. Petta S, Muratore C, Craxì A. Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: The present and the future. *Dig Liv Dis* 2009.
 22. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004; 114: 147-52.
 23. Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med* 2004; 10: 1-7.
 24. Schattenberg JM, Wang Y, Singh R, Rigoli RM, Czaja MJ. Hepatocyte CYP2E1 overexpression and steatohepatitis lead to impaired hepatic insulin signaling. *J Biol Chem* 2005; 280: 9887-94
 25. Foretz M, Guichard C, Ferre P, Foufelle F. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 12737-42.

26. Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr* 2001; 21: 193-230
27. deAlmeida IT, Cortez-Pinto H, Fidalgo G, Rodrigues D, Camilo ME. Plasma total and free fatty acids composition in human non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Nutr* 2002; 2: 219-23.
28. Ibrahim SH, Kohli R, Gores GJ. Mechanisms of lipotoxicity in NAFLD and clinical implications. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2011;53:131–140.
29. Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Tanai M, Burgart LJ, Lindor KD, et al. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* (2003) 125:437–4310.1016/S0016-5085(03)00907-7.
30. Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int.* 2006 Dec; 26(10):1175-86.
31. R. Meli, G. Mattace Raso, and A. Calignano. Role of Innate Immune Response in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Metabolic Complications and Therapeutic Tools. *Front Immunol.* 2014; 5: 177.
32. Marra F, Gastaldelli A, Svegliati Baroni G, Tell G, Tiribelli C. Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Trends Mol Med* (2008) 14:72–8110.1016/j.molmed.2007.12.003.
33. Manco M, Marcellini M, Giannone G, Nobili V. Correlation of serum TNF-alpha levels and histologic liver injury scores in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Pathol* (2007) 127:954–6010.1309/6VJ4DWGYDU0XYJ8Q
34. Jarrar MH, Baranova A, Collantes R, Ranard B, Stepanova M, Bennett C, et al. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* (2008) 27:412–2110.1111/j.1365-2036.2007.03586.x
35. Ramesh Kumar, Shyam Prakash, [...], and Subrat K. Acharya. Association of pro-inflammatory cytokines, adipokines & oxidative stress with insulin resistance & non-alcoholic fatty liver disease. *Indian J Med Res.* Aug 2012; 136(2): 229–236.
36. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43 (2 Suppl 1): S99-S112.
37. Antonio La Cava & Giuseppe Matarese. The weight of leptin in immunity. *Nature Reviews Immunology* 4, 371-379 (May 2004)
38. Deepak Kumar Singh, Puja Sakhuja, [...], and Shiv Kumar Sarin. Serum leptin levels correlate with body mass index but not with histologic disease severity in Indian

- patients with non-alcoholic steatohepatitis: A pilot study. *Indian J Med Res.* May 2013; 137(5): 986–987.
39. Miele L, Valenza V, La Torre G, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2009; 49: 1877-87.
 40. Tsuneto A, Hida A, Sera N, et al. Fatty liver incidence and predictive variables. *Hyper Res.*2010;33:638–643.
 41. Targher G, Marra F, Marchesini G. Increased risk of cardiovascular disease in non-alcoholic fatty liver disease: causal effect or epiphenomenon? *Diabetologia* 2008; 51: 1947-53
 42. McCullough AJ. The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 521-33.
 43. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 1999;30:1356–1362.
 44. Pantsari MW, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease presenting with an isolated elevated alkaline phosphatase. *J. Clin Gastroenterol.* 2006;40:633–635.
 45. Adams LA, Sanderson S, Lindor KD, Angulo P. The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. *J. Hepatol.* 2005;42:132–138
 46. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A, Tiribelli C. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol.* 2006;6:33.
 47. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology.* 2007;45:846–854.
 48. Qureshi K, Clements RH, Abrams GA. The utility of the “NAFLD fibrosis score” in morbidly obese subjects with NAFLD. *Obes Surg.*2008;18:264–270.
 49. Wong VW, Vergniol J, Wong GL, Foucher J, Chan HL, Le Bail B, Choi PC, Kowo M, Chan AW, Merrouche W, et al. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2010;51:454–462.
 50. Calès P, Lainé F, Boursier J, Deugnier Y, Moal V, Oberti F, Hunault G, Rousselet MC, Hubert I, Laafi J, et al. Comparison of blood tests for liver fibrosis specific or not to NAFLD. *J Hepatol.* 2009;50:165–173.

51. M. Gori, M. Arciello, C. Balsano. MicroRNAs in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Novel Biomarkers and Prognostic Tools during the Transition from Steatosis to Hepatocarcinoma. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 741465
52. Adams LA, Talwalkar JA. Diagnostic evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40 (Suppl 1): S34-S38.
53. Rubio A, Guruceaga E, Vázquez-Chantada M, et al. Identification of a gene-pathway associated with nonalcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2007; 46: 708-18.
54. Tomas Fernández Gianotti, Adriana Burgueño, et al. Fatty Liver Is Associated with Transcriptional Downregulation of Stearoyl-CoA Desaturase and Impaired Protein Dimerization *PLoS One*. 2013 Sep 30;8(9):e76912
55. Vasseuz F, Helbecque N, Dina C, et al. Single nucleotide polymorphism haplotypes in both proximal promoter and exon 3 of AMP1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 2607-14
56. Hongyun Lu, Jiazhong Sun, Liao Sun, Xiaochun Shu, Yancheng Xu, Danhong Xie. Polymorphism of human leptin receptor gene is associated with type 2 diabetic patients complicated with non-alcoholic fatty liver disease in China. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 173-5.
57. Zain SM, Mohamed Z, Mahadeva S, Cheah PL, Rampal S, Chin KF, Mahfudz AS, Basu RC, Tan HL, Mohamed R. Impact of leptin receptor gene variants on risk of non-alcoholic fatty liver disease and its interaction with adiponutrin gene. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013 May;28(5):873-9
58. Aller R, De Luis DA, Izaola O, González Sagrado M, Conde R, Pacheco D, Velasco MC, Ovalle HF. Lys656Asn polymorphism of leptin receptor, leptin levels and insulin resistance in patients with non alcoholic fatty liver disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2012 Mar;16(3):335-41
59. Nozaki Y, Saibara T, Nemoto Y, Ono M, Akiwa N. Polymorphisms of interleukin-1 beta and beta 3-adrenergic receptor in Japanese patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 2004; 28: 106S-110S
60. Charlton M, Sreekumar R, Rasmussen D, Lindor K, Nair KS. Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2002 Apr;35(4):898-904.
61. Sazci A, Akpınar G, Aygun C, Ergul E, Senturk O, Hulagu S. Association of apolipoprotein E polymorphisms in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 3218-24.

62. Namikawa C, Shu-Ping Z, Vyselaar JR, Nozaki Y, Nemoto Y, Ono M, Akisawa N, Saibara T, Hiroi M, Enzan H, Onishi S. Polymorphisms of microsomal triglyceride transfer protein gene and manganese superoxide dismutase gene in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* 2004 May;40(5):781-6.
63. Salvatore Petta, Luca Miele, [...], and Antonio Craxì. Glucokinase Regulatory Protein Gene Polymorphism Affects Liver Fibrosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS One.* 2014; 9(2): e87523.
64. Song J, da Costa KA, Fischer LM, Kohlmeier M, Kwock L, Wang S, Zeisel SH. Polymorphism of the PEMT gene and susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *FASEB J* 2005; 19: 1266-71.
65. Fan CY, Pan J, Usuda N, Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK. Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Implication for peroxisome proliferator-activated receptor alpha natural ligand metabolism. *J Biol Chem* 1998; 273: 15639-45.
66. Domenici FA, Brochado MJ, Martinelli Ade L, Zucoloto S, da Cunha SF, Vannucchi H. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma2 polymorphisms in nonalcoholic fatty liver disease: a study in Brazilian patients. *Gene.* 2013 Oct 25;529(2):326-31
67. Brun P, Castagliuolo I, Floreani AR, Buda A, Blasone L, Palù G. Increased risk of NASH in patients carrying the C(-159)T polymorphisms in the CD14 gene promoter region. *Gut* 2006; 55: 1212
68. Wong VW, Wong GL, Tsang SW, Hui AY. Genetic polymorphisms of adiponectin and tumor necrosis factor- alpha and nonalcoholic fatty liver disease in Chinese people. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 914- 21
69. Costanzo BV, Trischitta V, Di Paola R, et al. The Q allele variant (GLN121) of membrane glycoprotein PC-1 interacts with the insulin receptor and inhibits insulin signaling more effectively than the common K allele variant (LYS121). *Diabetes* 2001; 50: 831-6.
70. Feldstein AE, Alkhouri N, De Vito R, Alisi A, Lopez R, Nobili V. Serum cytokeratin-18 fragment levels are useful biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis in children. *Am J Gastroenterol.* 2013 Sep;108(9):1526-31
71. Lebensztejn DM, Wierzbicka A, Socha P, Pronicki M, Skiba E, Werpachowska I, Kaczmarek M. Cytokeratin-18 and hyaluronic acid levels predict liver fibrosis in children with non-alcoholic fatty liver disease. *Acta Biochim Pol.* 2011;58(4):563-6

72. Ku NO, Darling JM, Krams SM, et al. Keratin 8 and 18 mutations are risk factors for developing liver disease of multiple etiologies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 6063-8
73. Miele L, Beale G, Patman G, et al. The Kruppel-like factor 6 genotype is associated with fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2008; 135: 282-91.
74. Yoneda M, Hotta K, Nozaki Y, et al. Association between angiotensin II type 1 receptor polymorphisms and the occurrence of nonalcoholic fatty liver disease. *Liv Int* 2009; 29: 1078-85.
75. Valenti L1, Motta BM, Alisi A, Sartorelli R, Buonaiuto G LPIN1 rs13412852 polymorphism in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012 May;54(5):588-93.
76. Shamsul Mohd Zain, Rosmawati Mohamed, David N. Cooper, Rozaimi Razali, Sanjay Rampal, Sanjiv Mahadeva, Wah-Kheong Chan, Arif Anwar. Genome-Wide Analysis of Copy Number Variation Identifies Candidate Gene Loci Associated with the Progression of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS One.* 2014; 9(4): e95604.
77. Bloomfield RS, Graham BG, Schiffman SS, Killenberg PG (1999) Alterations of chemosensory function in end-stage liver disease. *Physiol Behav* 66: 203–207.
78. Ashla AA, Hoshikawa Y, Tsuchiya H, Hashiguchi K, Enjoji M, et al. (2010) Genetic analysis of expression profile involved in retinoid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepato Res* 40: 594–604
79. . Peters U, North KE, Sethupathy P, Buyske S, Haessler J, et al. (2013) A systematic mapping approach of 16q12.2/FTO and BMI in more than 20,000 African Americans narrows in on the underlying functional variation: results from the Population Architecture using Genomics and Epidemiology (PAGE) Study. *PLoS Genet* 9: e1003171.
80. Chang ML, Yeh CT, Chen JC, Huang CC, Lin SM, et al. (2008) Altered expression patterns of lipid metabolism genes in an animal model of HCV core-related, nonobese, modest hepatic steatosis. *BMC Genomics* 9: 109
81. Zender L, Xue W, Zuber J, Semighini CP, Krasnitz A, et al. (2008) An oncogenomics-based in vivo RNAi screen identifies tumor suppressors in liver cancer. *Cell* 135: 852–864
82. Zhang H, Wei S, Ning S, Jie Y, Ru Y, et al. (2013) Evaluation of TGFbeta, XPO4, eIF5A2 and ANGPTL4 as biomarkers in HCC. *Exp Ther Med* 5: 119–127.

83. Herzog H (2003) Neuropeptide Y and energy homeostasis: insights from Y receptor knockout models. *Eur J Pharmacol* 480: 21–29.
84. Nobili V, Donati B, Panera N, Vongsakulyanon A, Alisi A, Dallapiccola B, Valenti L. A Four-Polymorphisms Risk Score Predicts Steatohepatitis In Children With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013 Dec 16.
85. Rydel TJ, et al. The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a ser-asp catalytic dyad. *Biochemistry.*2003;42:6696–6708.
86. Baulande S., F. Lasnier, M. Lucas, and J. Pairault. 2001. Adiponutrin, a transmembrane protein corresponding to a novel dietary- and obesity-linked mRNA specifically expressed in the adipose lineage. *J. Biol. Chem.* 276:33336–33344.
87. Kershaw E. E., J. K. Hamm, L. A. Verhagen, O. Peroni, M. Katic, and J. S. Flier. 2006. Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. *Diabetes.* 55 148–157
88. Lake A. C., Y. Sun, J. L. Li, J. E. Kim, J. W. Johnson, D. Li, T. Revett, H. H. Shih, W. Liu, J. E. Paulsen, et al. 2005. Expression, regulation, and triglyceride hydrolase activity of Adiponutrin family members. *J. Lipid Res.*46 2477–2487.
89. Pirazzi C, Valenti L, Motta BM, et. al. PNPLA3 has retinyl-palmitate lipase activity in human hepatic stellate cells. *Hum Mol Genet.* 2014 Mar 30.
90. Calvo RM, Obregon MJ (2009) Tri-iodothyronine upregulates adiponutrin mRNA expression in rat and human adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 311: 39–46.
91. Huang Y, He S, Li JZ, Seo YK, Osborne TF, Cohen JC, Hobbs HH. A feed-forward loop amplifies nutritional regulation of PNPLA3. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107:7892–7897.
92. Sookoian S, Pirola CJ. Meta-analysis of the influence of variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease *Hepatology.* 2011 Jun;53(6):1883-94.
93. Paola Dongiovanni, Benedetta Donati, [...], and Luca Valenti. PNPLA3 I148M polymorphism and progressive liver disease. *World J Gastroenterol.* Nov 7, 2013; 19(41): 6969–6978.
94. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet.* 2008;40:1461–1465.

95. Giudice EM, Grandone A, Cirillo G, Santoro N, Amato A, Brienza C, Savarese P, Marzuillo P, Perrone L. The association of PNPLA3 variants with liver enzymes in childhood obesity is driven by the interaction with abdominal fat. *PLoS One*.2011;6:e27933
96. Valenti L, Alisi A, Nobili V. Unraveling the genetics of fatty liver in obese children: additive effect of P446L GCKR and I148M PNPLA3 polymorphisms. *Hepatology*.2012;55:661–663.
97. Sevastianova K, Santos A, Kotronen A, Hakkarainen A, Makkonen J, Silander K, Peltonen M, Romeo S, Lundbom J, Lundbom N, et al. Effect of short-term carbohydrate overfeeding and long-term weight loss on liver fat in overweight humans. *Am J Clin Nutr*.2012;96:727–734.
98. He S, McPhaul C, Li JZ, Garuti R, Kinch L, Grishin NV, Cohen JC, Hobbs HH. A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem*. 2010;285:6706–6715.
99. Kumari M, Schoiswohl G, Chitraju C, Paar M, Cornaciu I, Rangrez AY, Wongsiriroj N, Nagy HM, Ivanova PT, Scott SA, et al. Adiponutrin functions as a nutritionally regulated lysophosphatidic acid acyltransferase. *Cell Metab*. 2012;15:691–702.
100. Nicola Santoro, Romy Kursawe, [...], and Sonia Caprio. A Common Variant in the Patatin-Like Phospholipase 3 Gene (PNPLA3) Is Associated with Fatty Liver Disease in Obese Children and Adolescents. *Hepatology*. Oct 2010; 52(4): 1281–1290.
101. Lynne E. Wagenknecht, Nicholette D. Palmer, [...], and Carl D. Langefeld. Association ofPNPLA3 with non-alcoholic fatty liver disease in a minority cohort: the Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study. *Liver Int*. Mar 2011; 31(3): 412–416
102. Yaron Rotman, Christopher Koh, [...], and T. Jake Liang. The Association of Genetic Variability in PNPLA3 with Histological Severity of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology*. Sep 2010; 52(3): 894–903.
103. Burza MA, Pirazzi C, Maglio C, et al. PNPLA3 I148M (rs738409) genetic variant is associated with hepatocellular carcinoma in obese individuals. *Dig Liver Dis*.2012;44:1037–41
104. Xian-E Peng, Yun-Li Wu, [...], and Xu Lin. Genetic Variants in PNPLA3 and Risk of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in a Han Chinese Population. *PLoS One*. 2012; 7(11): e50256.
105. Petta S, Valenti L, Marchesini G, Di Marco V, Licata A, Cammà C, Barcellona MR, Cabibi D, Donati B, Fracanzani A, Grimaudo S, Parrinello G, Pipitone RM,

Torres D, Fargion S, Licata G, Craxì A. PNPLA3 GG genotype and carotid atherosclerosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. PLoS One. 2013 Sep 17;8(9):e74089