



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

XXXII Ciclo di Dottorato in Scienze Endocrinologiche

TESI DI DOTTORATO

**Obesità severa e NAFLD in pazienti con e senza diabete tipo 2
prima e dopo chirurgia bariatrica: studio degli indici non
invasivi di steatosi e fibrosi e dei livelli plasmatici di acidi
biliari come predittori di severità dell'istologia epatica**

Relatrice

Prof.ssa Frida Leonetti

Candidata

Dott.ssa Federica Coccia

Correlatrice

Dott.ssa Danila Capoccia

Anno accademico: 2018/2019

A te che mi sei sempre vicino anche da lontano

INDICE

1. INTRODUZIONE	5
1.1 L'OBESITÀ	5
1.1.1 Definizione e classificazione	5
1.1.2 Epidemiologia	6
1.1.3 Terapia medica dell'obesità	9
1.2 IL DIABETE MELLITO TIPO 2.....	10
1.2.1 Diabesità	12
1.3 NONALCHOLIC FATTY LIVER DISEASE (NAFLD)	14
1.3.1 Metodiche non invasive di diagnosi di NAFLD	17
1.4 LA CHIRURGIA BARIATRICA	23
1.4.1 Le diverse tecniche di chirurgia bariatrica.....	25
1.4.2 Sleeve Gastrectomy Laparoscopica	29
1.4.3 Chirurgia bariatrica e diabete mellito di tipo 2.....	32
1.4.3 Chirurgia bariatrica e NAFLD	38
1.5 GLI ACIDI BILIARI	41
1.5.1 Sintesi e metabolismo	41
1.5.2 Effetti metabolici degli acidi biliari mediati dai recettori FXR e TGR5	44
1.5.3 Acidi biliari dopo chirurgia bariatrica	48
2. OBIETTIVI.....	50
3. SOGGETTI E METODI	52
3.1.SOGGETTI	52
3.2 VALUTAZIONE CLINICA ED ESAMI EFFETTUATI.....	53
3.2.1 Indici di insulino-resistenza	55
3.2.2 Indici di secrezione insulinica.....	55
3.2.3 Indici non invasivi di steatosi e fibrosi epatica	56
3.2.4 Analisi degli acidi biliari.....	57
3.2.5 Sleeve Gastrectomy Laparocopica	57
3.2.6 Biopsia epatica	57
3.3 TEST STATISTICI.....	58
4. RISULTATI	60

4.1 CARATTERISTICHE DEI SOGGETTI	60
4.1.1 <i>Caratteristiche cliniche, metaboliche e istologiche dei soggetti</i>	61
4.1.2 <i>Tolleranza glucidica dei soggetti studiata con OGTT e indici surrogati di sensibilità, resistenza e risposta insulinica</i>	64
4.2 CORRELAZIONI TRA VARIABILI METABOLICHE E ISTOLOGIA EPATICA	68
4.3 INDICI NON INVASIVI DI STEATOSI E FIBROSI EPATICA: PROPOSTA DI NUOVI CUTOFF PER LA NAFLD NEL PAZIENTE CON OBESITÀ PATOLOGICA	69
4.3.1 <i>Performance degli indici di steatosi per discriminare il grado di steatosi nel paziente con obesità patologica</i>	72
4.3.2 <i>Performance degli indici di fibrosi per discriminare il grado di fibrosi nel paziente con obesità patologica</i>	74
4.5 EFFETTO DELLA SGL SULLA NAFLD VALUTATO CON METODICHE NON INVASIVE.....	86
4.5.1 <i>Caratteristiche cliniche, tolleranza glucidica, indici non invasivi di steatosi e fibrosi epatica prima e dopo SGL</i>	87
4.5.2 <i>Livelli circolanti di acidi biliari, precursore C4, FGF19 prima e dopo SGL</i>	99
4.6 GRADO DI SEVERITÀ DELL'ISTOLOGIA EPATICA ED EFFETTO DELLA SGL SULLA NAFLD IN PAZIENTI CON DM2/IGT/NGT.....	105
5. DISCUSSIONE	112
6. CONCLUSIONI	126
7. BIBLIOGRAFIA.....	130

1. INTRODUZIONE

1.1 L'OBESITÀ

1.1.1 Definizione e classificazione

L'obesità è una patologia a genesi multifattoriale, secondaria ad uno squilibrio fra introito calorico e spesa energetica (1) ed è caratterizzata non tanto da un aumento eccessivo del peso corporeo complessivo quanto piuttosto da un aumento della massa grassa. Il tessuto adiposo normalmente costituisce il 12-20% della massa corporea negli uomini ed il 18-25% della massa corporea nelle donne. Quando la massa grassa supera il 30% della massa corporea si parla di obesità.

Dal momento che la valutazione della massa grassa non è di facile attuazione, il grado di obesità viene di norma misurato attraverso l'indice di massa corporea (Body Mass Index o BMI= Kg/m²) che ha consentito una classificazione del sovrappeso. Sono considerati normopeso quei soggetti con BMI compreso tra 18,5 e 25 Kg/m²; soggetti con BMI < 18,5 Kg/m² sono classificati sottopeso e soggetti con BMI ≥ 25 Kg/m² in sovrappeso; in questi ultimi soggetti è stata rilevata un'aumentata morbilità per malattie metaboliche e cardiovascolari. Infine, i soggetti con BMI ≥ 30 Kg/m² sono definiti obesi; all'interno di quest'ultimo gruppo si individuano dei sottogruppi in base al diverso grado di obesità:

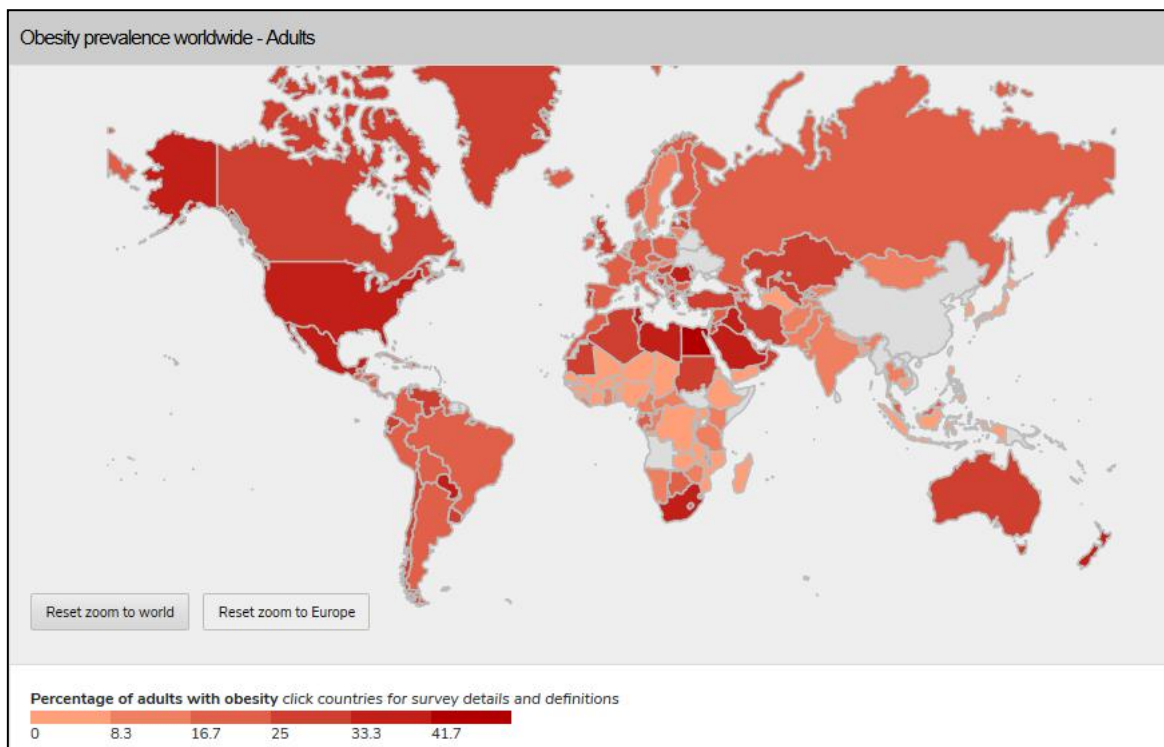
- **1° grado:** soggetti con BMI compreso tra 30 e 34,9 Kg/m²;
- **2° grado:** soggetti con BMI compreso tra 35 e 39,9 Kg/m²;
- **3° grado:** soggetti con BMI ≥ 40 Kg/m².
- **“Superobesità”:** soggetti con BMI ≥ 50 kg/m²
- **"Super-superobesità":** soggetti con BMI ≥ 60 kg/m²

Si parla, inoltre, di **obesità patologica** riferendosi ai soggetti che presentano una obesità di terzo grado e ai soggetti che, pur presentando una obesità di secondo grado, manifestano anche delle comorbidità.

1.1.2 Epidemiologia

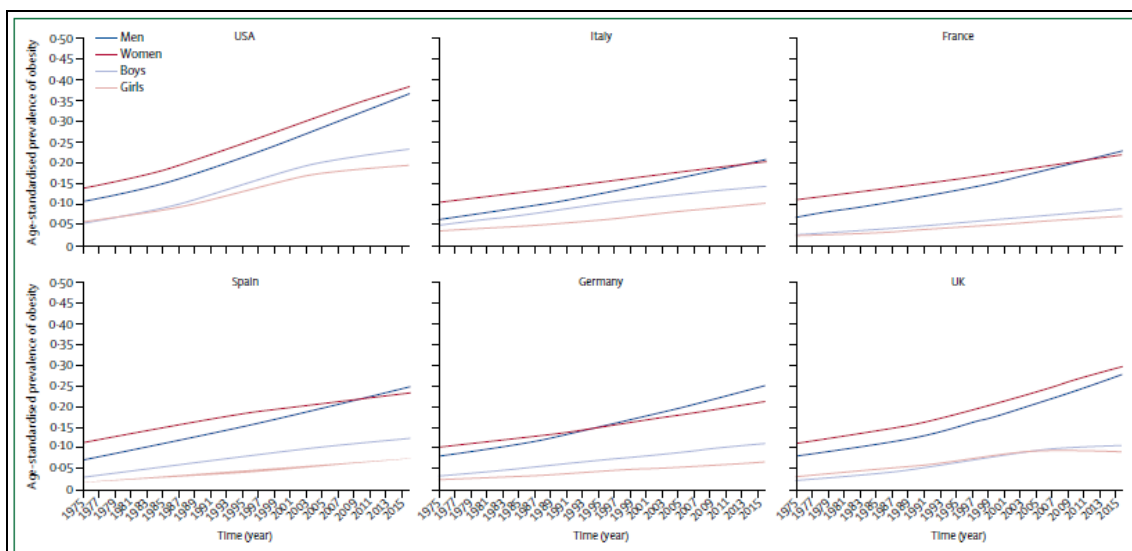
L'obesità è in progressivo aumento in tutto il mondo, in particolar modo nei paesi industrializzati. La sua prevalenza varia notevolmente da paese a paese e in relazione allo stile di vita, ai fattori socio-ambientali e culturali ed al patrimonio genetico. Negli Stati Uniti questo fenomeno è particolarmente evidente (2) e un aumento dell'obesità si verifica in tutti i gruppi etnici, con percentuali elevatissime negli afroamericani.

Figura 1 Prevalenza dell'obesità nel mondo (dati tratti da Global Obesity Observatory-2017)



Da uno studio recente, pubblicato su Lancet (3) si evince che dal 1980 al 2008 il BMI medio nel mondo ha subito un incremento di 0.4 Kg/m² negli uomini e di 0.5 Kg/m² nelle donne per decade di vita. Nel 2008 sono stati stimati 1,46 miliardi di adulti in sovrappeso (BMI > 25 Kg/m²); di questi 205 milioni di uomini e 297 milioni di donne erano francamente obesi. Per il futuro, si prevede che per il 2030 il 20-30% della popolazione mondiale sarà obesa, e il 40-50% sovrappeso.

Figura 2 Prevalenza dell'obesità nel corso degli anni (1975-2016) nei diversi Paesi occidentali, per ragazzi e ragazze (5-19 anni) e donne e uomini adulti. Dati aggiornati al 2017



In Italia la diffusione del sovrappeso e dell'obesità è molto evidente: dati derivanti dal rapporto Osservasalute 2016 (4), relativi al 2015, mostrano che più di un terzo della popolazione adulta (35,3%) è in sovrappeso, mentre una persona su dieci è obesa (9.8%), complessivamente il 45.1% dei soggetti di età ≥ 18 anni è in eccesso ponderale. Come negli anni precedenti, le differenze sul territorio confermano un gap Nord-Sud in cui le Regioni meridionali presentano la prevalenza più alta di persone obese (Puglia 12,3% e Molise 14.1%) e in sovrappeso (Basilicata 39,9% e Campania 39.3%, Sicilia 38.7%) rispetto a quelle settentrionali (obese: Lombardia 8.7% e PA di Bolzano 7,8%; sovrappeso: PA di Trento 27.1% e Valle d'Aosta 30.4%). Nei ragazzi e negli adolescenti il fenomeno è in continua crescita e ciò rende ragione delle preoccupazioni degli esperti e dei responsabili della salute pubblica che hanno recentemente emanato provvedimenti ad hoc nel Piano Sanitario.

Figura 3 Prevalenza sovrappeso e obesità in Italia: dati nelle diverse regioni

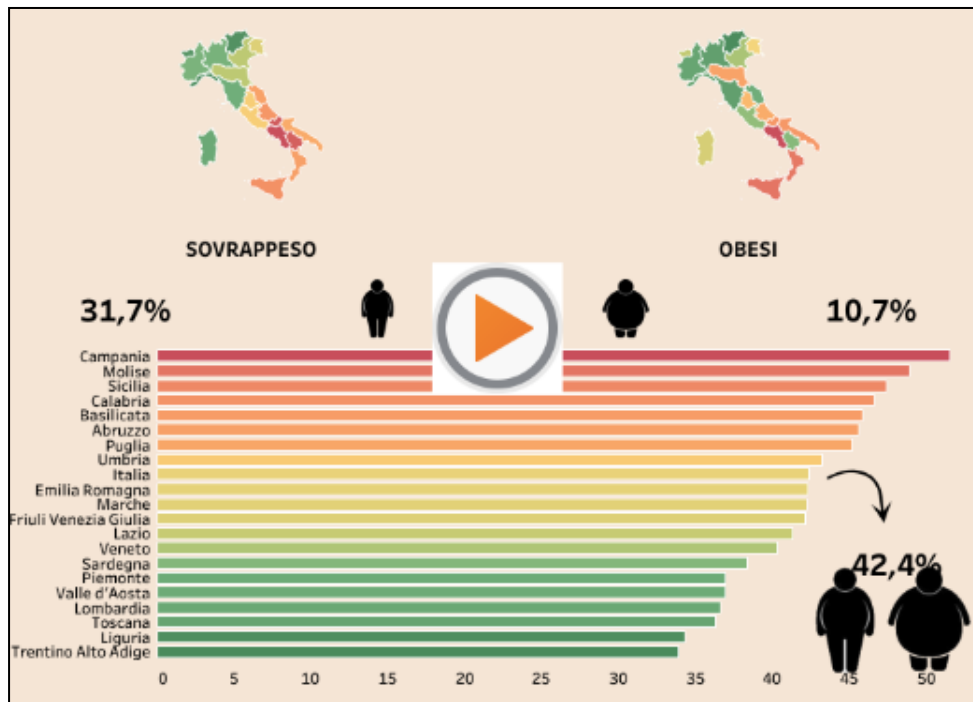
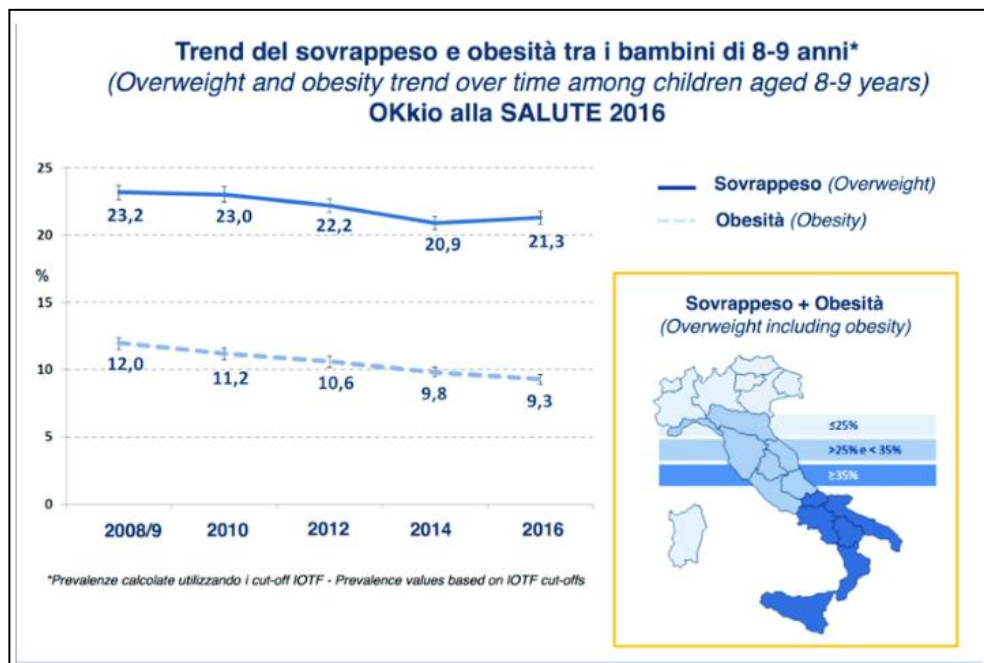


Figura 4 Prevalenza dell'obesità infantile in Italia con distribuzione regionale



1.1.3 Terapia medica dell'obesità

La terapia non farmacologica dell'Obesità e Sovrappeso va indirizzata alla correzione di abitudini alimentari errate ed alla ripresa di un'attività fisica compatibile con le condizioni cliniche attuali del paziente. Tale intervento integrato, se adeguato, non è solo correttivo ma potenzia l'efficacia delle singole componenti ed ottimizza l'impiego dei farmaci necessari per le eventuali associazioni morbose.

In merito alla terapia farmacologica dell'obesità, negli ultimi 25 anni sono stati studiati più di 120 farmaci. I farmaci attualmente approvati dall'AIFA in Italia per il trattamento a lungo termine dell'obesità sono tre: orlistat, noto da anni, liraglutide 3 mg e l'associazione naltrexone/bupropione, approdati sul mercato dopo il 2015. Gli altri farmaci studiati per un trattamento a lungo termine, sibutramina e rimonabant, sono stati sospesi dal mercato per problemi di sicurezza (5)

Orlistat, che si assume sotto forma di capsula con i pasti, è un inibitore selettivo della lipasi pancreatiche in grado di ridurre l'assorbimento dei grassi alimentari da parte del tratto digerente, con conseguente aumento della loro escrezione fecale. La riduzione dell'assorbimento lipidico è dose-dipendente. Al dosaggio massimo di 120 mg tre volte al giorno l'assorbimento dei grassi alimentari viene ridotto fino al 30% (5). Numerosi trial clinici dimostrano che il farmaco è in grado di indurre perdita di peso e un minore riguadagno del peso perso rispetto al placebo (6). Orlistat è di norma ben tollerato e la comparsa di effetti collaterali a livello del tratto gastro-intestinale, quali crampi, flatulenza con borborigmi, feci grasse e incontinenza fecale, è principalmente legata alla non aderenza del paziente alle indicazioni dietetiche (7).

Liraglutide 3 mg, da utilizzare una volta al giorno per via sottocutanea, è un analogo del GLP-1 (glucagon-like peptide-1) simile per il 97% al GLP-1 endogeno, un ormone che viene rilasciato in risposta all'assunzione di cibo. Come il GLP-1 umano, liraglutide 3 mg regola l'appetito e riduce il peso corporeo attraverso la riduzione dell'assunzione di cibo. Come per gli altri agonisti dei recettori del GLP-1, stimola la secrezione di insulina e riduce la secrezione di glucagone in maniera glucosio-dipendente. Questi effetti possono portare ad una riduzione della glicemia. E' indicato per soggetti con BMI > 30 Kg/m² oppure > 27 Kg/m² in presenza di comorbidità (5).

L'associazione naltrexone/bupropione combina il bupropione (un antidepressivo usato anche nella disassuefazione dal fumo) con il naltrexone (un antagonista dei recettori μ degli oppioidi, usato in clinica per il trattamento della dipendenza da oppiacei e da alcool. L'azione sinergica di queste molecole agisce a livello del nucleo arcuato dell'ipotalamo, determinando una riduzione dell'appetito e un aumento della spesa energetica. Il farmaco è disponibile sotto forma di

compresse a rilascio prolungato contenenti 7,2 mg di naltrexone e 78 mg di bupropione. Il trattamento inizia con l'assunzione di un'unica compressa al mattino. La dose è gradualmente incrementata nel corso di 4 settimane fino a raggiungere la dose raccomandata di due compresse due volte al giorno, prese preferibilmente con del cibo. La risposta al trattamento e la tollerabilità del medicinale devono essere monitorate periodicamente; nei pazienti che sviluppano taluni effetti indesiderati, come un aumento della pressione arteriosa, il trattamento deve essere interrotto. Come liraglutide 3 mg, anche questo farmaco è indicato per soggetti con BMI > 30 Kg/m² oppure > 27 Kg/m² in presenza di comorbidità (5).

Tra i farmaci approvati dall'FDA ma non dall'AIFA per il trattamento a breve termine dell'obesità sono presenti: la lorcaserina, che agisce aumentando il senso di sazietà, e l'associazione fentermina/topiramato che sopprime l'appetito e aumenta il consumo energetico. La loro indicazione è limitata ai soggetti con BMI > 30 Kg/m² oppure > 27 Kg/m² in presenza di comorbidità (5).

1.2 IL DIABETE MELLITO TIPO 2

Il diabete mellito è una patologia secondaria a una deficienza assoluta o relativa di insulina. Nel caso del diabete mellito tipo 1 si configura una deficienza assoluta di insulina, secondaria alla distruzione delle β cellule da parte di anticorpi. Il diabete mellito tipo 2 (DM2), invece, è un gruppo eterogeneo di disordini caratterizzati da gradi variabili di alterata secrezione insulinica, aumentata produzione epatica di glucosio e insulino-resistenza (8).

L'omeostasi glucidica è mantenuta dall'insulina e dal glucagone, prodotti rispettivamente dalle cellule β e α del pancreas. Il glucagone è secreto in condizioni di digiuno svolgendo un'azione catabolica promuovendo la glicogenolisi e la gluconeogenesi epatica e la mobilizzazione di lipidi e proteine per il loro utilizzo come fonte energetica; esplica i suoi effetti tramite un aumento dei livelli intracellulari di c-AMP.

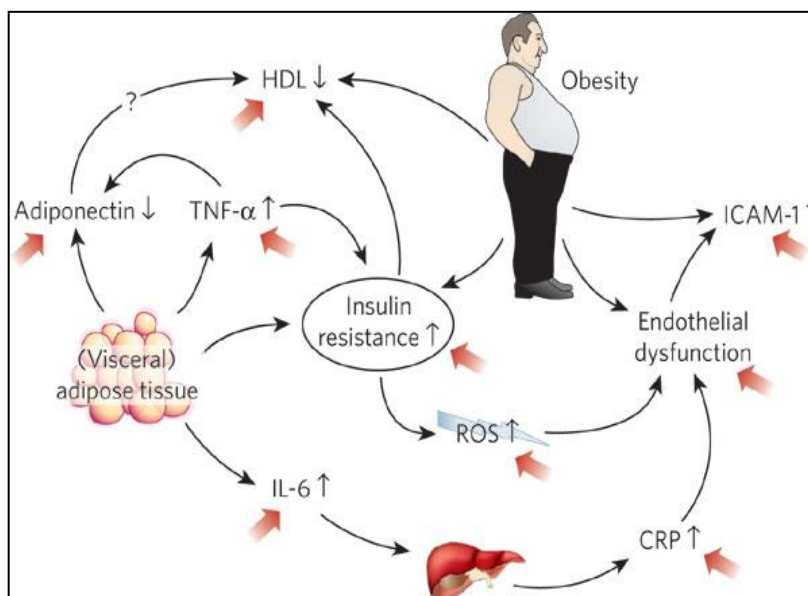
L'insulina è coinvolta nella regolazione del metabolismo glicemico, lipidico e proteico, è prodotta in seguito ad un rialzo della glicemia; è regolata in maniera bifasica dallo stato nutrizionale, dagli ormoni gastrointestinali, definiti incretine, rilasciati dopo il pasto (come il glucagone-like peptide-1, GLP1, e il glucose-dependentinsulintropic

peptide, GIP) e da fattori neuronali (9). La sua azione principale è quella di mantenere i valori di glicemia nel sangue nella norma, facilitando l'ingresso e l'utilizzo del glucosio all'interno delle cellule nei tessuti bersaglio, stimolando la gluconeogenesi e favorendo la sintesi e il deposito dei grassi nelle cellule del tessuto adiposo; inducendo, inoltre, la crescita e la proliferazione cellulare.

Ci sono due grandi modelli di secrezione insulinica: quella rapida, che ha una durata di 10-15 minuti, e quella pulsatile che ha un periodo di 1-2 ore. L'insulina è più efficace nel ridurre i livelli di glucosio nel sangue, se rilasciata in maniera pulsatile piuttosto che continua. Il glucosio induce la secrezione d'insulina in uno schema bifasico: una parte iniziale (prima fase), che si sviluppa rapidamente ma dura solo pochi minuti, seguita da una componente costante (seconda fase) che raggiunge un plateau in 2-3 ore; la perdita della prima fase di secrezione e la riduzione della seconda fase sono tratti caratteristici del DM2 (10).

L'insulina si lega a dei recettori specifici presenti su tutti i tessuti e attiva, attraverso secondi messaggeri, una cascata di reazioni di fosforilazione e de-fosforilazione che porta alla stimolazione del metabolismo glucidico intracellulare.

Figura 5 L'insulino-resistenza nel paziente obeso



Il soggetto obeso presenta tipicamente una condizione di insulino-resistenza. I fattori responsabili di questo stato sono sia di tipo genetico che ambientale, quali ad esempio la sedentarietà e una dieta ricca di grassi; esistono poi dei fattori esogeni (pubertà, gravidanza, invecchiamento; stress; alcune patologie, quali la cirrosi epatica, l'uremia, le malattie infiammatorie croniche, le neoplasie maligne, lo scompenso cardiaco; ipersecrezione di alcuni ormoni; farmaci) che possono aggravare tale condizione; infine, esistono delle sindromi monogeniche caratterizzate da insulino-resistenza.

Negli stati d'insulino-resistenza il segnale insulinico è ridotto a vari livelli che includono: il legame dell'insulina al recettore, la fosforilazione e l'attività tirosin-chinasica del recettore, l'attivazione a valle di proteine insulino-sensibili (AKT/PKB) attraverso PI3K e la sintesi e la traslocazione dei trasportatori GLUT4 sulle membrane cellulare (11, 12).

Almeno tre differenti meccanismi sono stati proposti per collegare l'obesità all'insulino resistenza:

- l'aumento della produzione di adipochine e citochine;
- la deposizione ectopica di lipidi in particolare a livello epatico e muscolare;
- la disfunzione mitocondriale (13, 14).

1.2.1 Diabesità

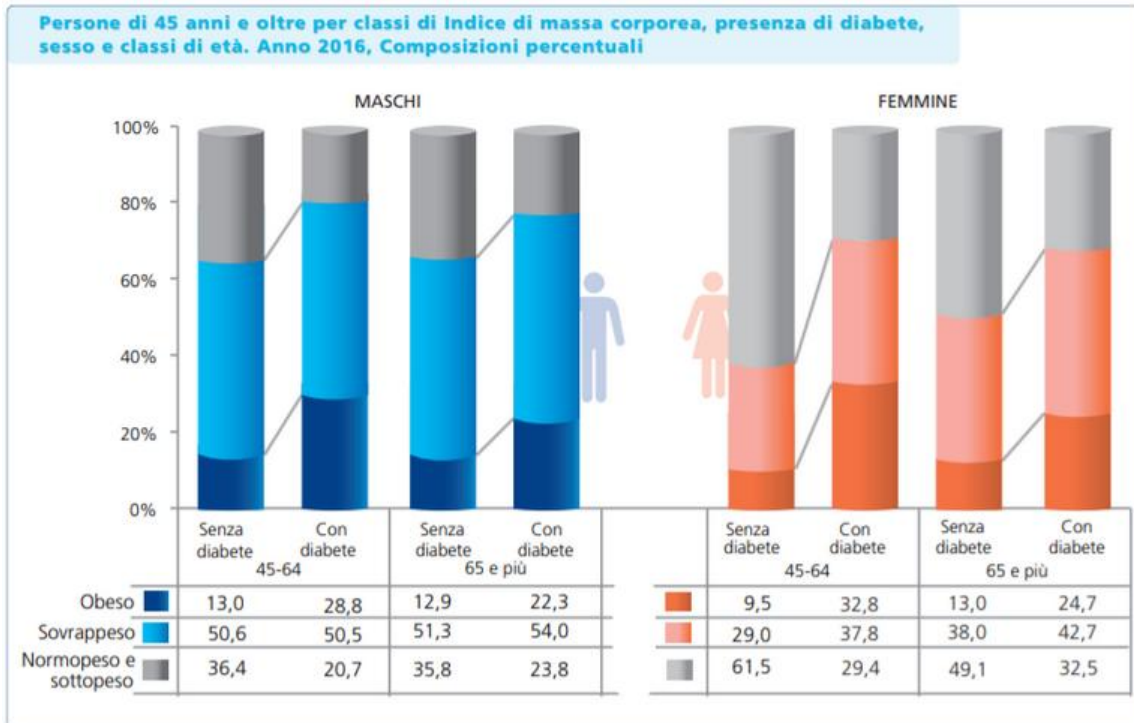
Oltre 3 milioni 200 mila in Italia nel 2016 sono le persone che hanno dichiarato di avere il diabete (pari al 5,3% dell'intera popolazione), e in particolare tra gli anziani di 65 anni e oltre il rapporto è di circa una persona su sei (15). Le alterazioni della sensibilità e della secrezione insulinica, che avvengono nel DM2 rappresentano un importante problema clinico, epidemiologico e terapeutico. L'associazione del DM2 con l'obesità rende le sue implicazioni ancora più rilevanti. Per la forte associazione tra DM2 e obesità, si parla anche "diabesità". Secondo l'undicesimo rapporto Italian Diabetes & Obesity Bbarometer Report (IBDO) 2017 (15), a parità di genere e fascia di età, tra le persone con diabete si riscontrano prevalenze di obesità più elevate. Tra i 45 e i 64 anni la percentuale di persone obese tra i diabetici maschi è pari al 28,9% contro il 13,0% di

obesi non diabetici. Per le donne le differenze sono ancora maggiori: 32,8% contro 9,5%.

La diabetività rappresenta una pandemia dei nostri tempi con una prevalenza e un impatto socio-economico-sanitario destinato a crescere. Nel 2010 si stimava che i diabetici nella popolazione adulta rappresentassero circa l'8,3%, dato che si proietta ad aumentare al 9,9% nel 2030. Inoltre, si stima che il 23% dei pazienti con obesità patologica sia anche affetto da DM2. La diabetività rappresenta un notevole carico economico considerato per esempio che nei soli Stati Uniti diabete e obesità consumano da soli rispettivamente 14 e 5,5% della spesa sanitaria globale. Se si includono anche i costi relativi al sovrappeso si passa dal 5,5 al 9,1% (16).

Diversi studi pubblicati negli ultimi anni (17, 18) dimostrano che nei “diabetesi” l'intervento di chirurgia bariatrica è in grado di controllare non soltanto l'obesità, ma anche il diabete e, quindi, migliorare il quadro di insulino-resistenza.

Figura 6 Prevalenza del diabete a seconda del BMI in Italia. Dati tratti da Italian Diabetes & Obesity Barometer Report (IBDO)



1.3 NONALCHOLIC FATTY LIVER DISEASE (NAFLD)

La NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease) è un disturbo caratterizzato da un accumulo trigliceridi nel fegato (>5%) (steatosi epatica), che non è causato da un consumo eccessivo di alcol (<20/30 g al giorno) e rappresenta il principale rischio di sviluppo di malattia epatica cronica. Si associa a molte comorbidità importanti come obesità, diabete, ipertensione arteriosa e alterazione dei lipidi plasmatici e viene oggi considerata la manifestazione epatica della sindrome metabolica. La prevalenza globale di NAFLD (approssimativamente il 25%) è in aumento soprattutto a causa dell'aumento dell'obesità, dove raggiunge una prevalenza di oltre il 70% (19). Anche l'incidenza della NAFLD è in rapida crescita, specialmente nei paesi occidentali. Tuttavia rimane non diagnosticata nella maggior parte dei soggetti, che quindi sono ignari di avere questa malattia metabolica. La NAFLD è causata da squilibri metabolici e, in associazione ad altre patologie o fattori di rischio, può peggiorare e portare ad una condizione di infiammazione cronica (NASH steato-epatite non alcolica) cirrosi epatica e/o epatocarcinoma (HCC, Hepatocellular Carcinoma) come mostrato in Figura 7, (20-23). E' stato stimato che il 15% -20% dei soggetti con NAFLD ha la NASH. Questo si traduce in una prevalenza della NASH nella popolazione generale del 3%-5% (24), ma probabilmente è una sottostima.

Elementi chiave della patogenesi della NAFLD sono caratterizzati dall'iperinsulinemia e dall'insulino-resistenza. In condizioni fisiologiche, infatti, l'insulina che viene prodotta dalle beta cellule pancreatiche in risposta ai valori di glicemia, agisce a livello di diversi tessuti, tra cui il tessuto adiposo e il fegato. A livello del tessuto adiposo, promuove la lipogenesi e inibisce la lipolisi. A livello del fegato, l'insulina svolge 3 azioni principali: aumenta la sintesi del glicogeno, inibisce la gluconeogenesi, promuove la lipogenesi. Nei pazienti con NAFLD, l'insulino resistenza determina:

1. Un aumento della lipolisi nel tessuto adiposo, con conseguente aumento dei livelli circolanti di acidi grassi liberi, che convogliano a livello epatico
2. Una riduzione della glicogeno sintesi e un aumento della gluconeogenesi a livello epatico

In risposta all'insulino-resistenza, l'organismo produce maggiori livelli di insulina, che aumentano ancora di più la lipogenesi a livello epatico, determinando un accumulo

intraepatico di lipidi e un'umentata secrezione epatica di trigliceridi nella forma di lipoproteine VLDL. Negli epatociti, l'infarcimento di lipidi determina una lipotossicità che peggiora ulteriormente l'insulino-resistenza, aumenta lo stress ossidativo e promuove l'infiammazione e la fibrosi attraverso diversi meccanismi (25).

Figura 7 Storia naturale della NAFLD e della sua progressione da semplice steatosi a steatoepatite non alcolica (NASH), cirrosi e tumore epatocellulare (HCC)

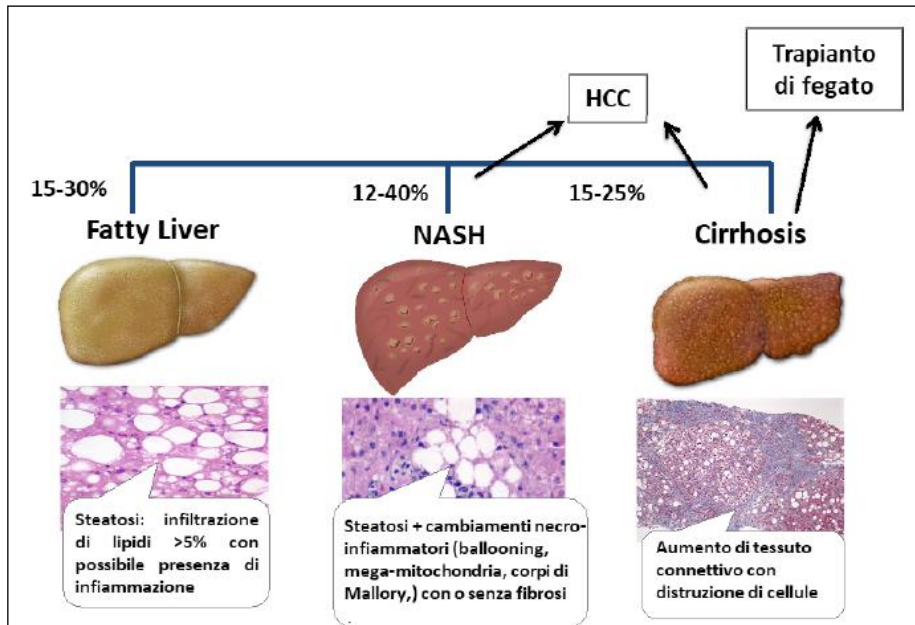
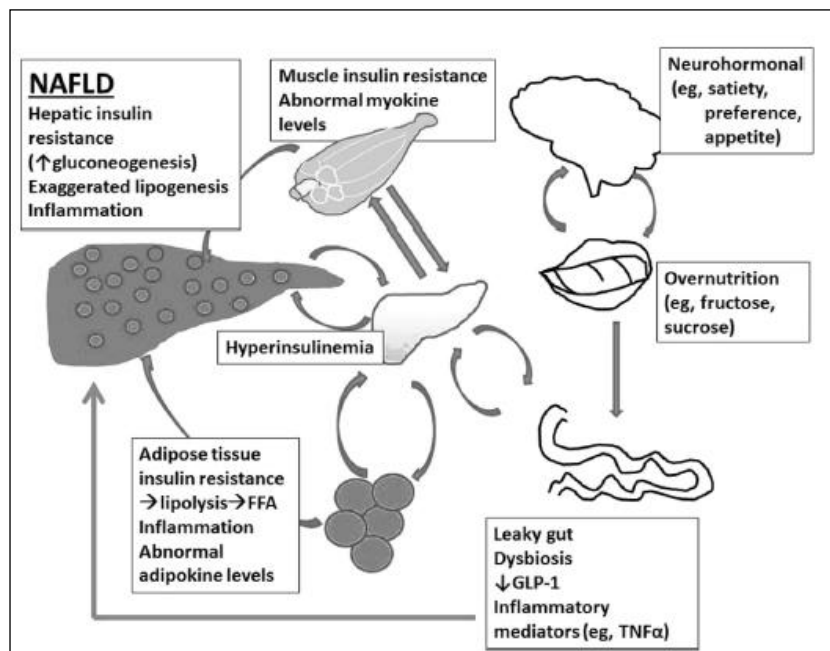


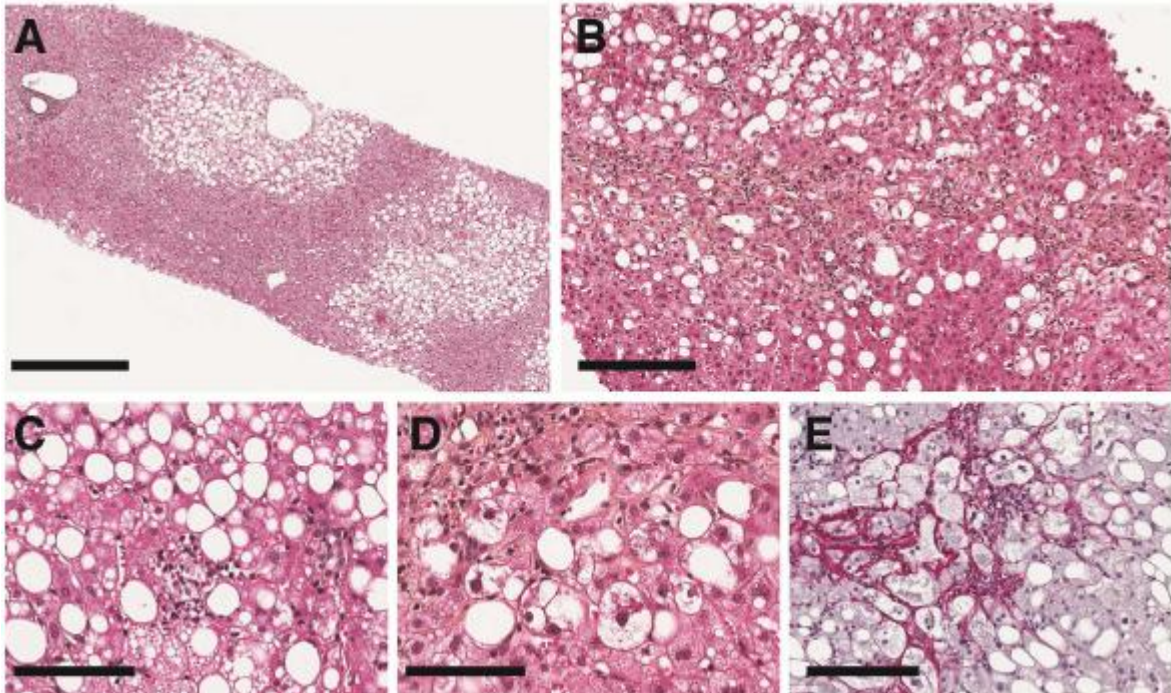
Figura 8 Patogenesi della NAFLD. (GLP-1 glucagon like peptide 1, FFA free fatty acids, TNFalpha tumor necrosis factor alpha)



Sia le linee guida americane (20, 26) che quelle europee (27), hanno stabilito che è importante diagnosticare e trattare la NAFLD nelle prime fasi di insorgenza in modo da evitare o rallentare la sua progressione. Infatti la NAFLD è spesso asintomatica e anche per questo è difficile stimare la sua reale prevalenza. La diagnosi di NAFLD si basa sulla combinazione di una serie di caratteristiche cliniche e radiologiche. Gli enzimi epatici non rappresentano un criterio diagnostico, poiché più del 60% dei pazienti con NAFLD e normali valori di GPT possono avere gradi avanzati di steatoepatite e il 53% dei pazienti con NAFLD e GPT aumentate non hanno la NASH. Nessuna delle tecniche radiologiche tradizionali, come l'ecografia semplice o la risonanza, è in grado di rilevare la presenza di steatoepatite o di fibrosi precoce.

L'esame gold standard per la diagnosi di NAFLD rimane la biopsia epatica, infatti la distinzione tra NAFLD e NASH può essere fatta solo istologicamente in quanto la diagnosi di NASH prevede la presenza contemporanea di steatosi, infiammazione e ballooning (visibili solo su campioni biotici), mentre la fibrosi può non essere presente (28, 29). La biopsia fornisce informazioni in merito al grado di danno epatico, in particolare definisce la gravità dell'attività necro-infiammatoria, della fibrosi e della steatosi. Purtroppo, la biopsia epatica oltre a essere invasiva e costosa, presenta anche un potenziale errore di campionamento dovuto all'accessibilità del tessuto. Per questo si stanno studiando test non invasivi, basati su biomarcatori sierici e/o parametri clinici, validati e facilmente applicabili, che possono essere quindi applicati su larga scala per la diagnosi e la stadiazione della NAFLD/NASH/Fibrosi

Figura 9 Quadri istologici di NAFLD: **A:** Steatosi Macrovescicolare tipicamente distribuita intorno alla vena centrale **B:** NASH, con cellule infiammatorie ed epatociti a mongolfiera e diversi gradi di fibrosi perisinusoidale; **C:** Infiammazione lobulare con piccoli gruppi di linfociti e macrofagi organizzati in aggregati disposti tra gli epatociti; **D:** epatociti a mongolfiera, con forma tondeggiante e taglia aumentata; **E:** fibrosi perisinusoidale con fibre di collagene che circondano gli epatociti a mongolfiera



La NAFLD costituisce una causa importante di morbidità e mortalità, associandosi ad un aumentato rischio cardiovascolare e oncologico, e rappresenta una condizione reversibile con il calo ponderale e il miglioramento del compenso metabolico; è fondamentale pertanto, giungere ad una diagnosi precoce e identificarla prima che evolva in stadi più avanzati.

1.3.1 Metodiche non invasive di diagnosi di NAFLD

Negli ultimi anni, sono stati sviluppati diversi metodi non invasivi per la diagnosi della NAFLD/NASH e la stadiazione della steatosi e fibrosi epatica. Queste metodiche si basano su 2 differenti approcci: la valutazione di biomarcatori ematici oppure metodiche radiologiche che stimano la rigidità del parenchima epatico (stiffness) basandosi su tecniche elastografiche in corso di ecografia o di risonanza magnetica (30).

BIOMARCATORI EMATICI

Esistono diversi score per la valutazione del danno epatico che consistono in test non invasivi, basati su biomarcatori sierici e/o parametri clinici, validati e facilmente applicabili, che possono essere applicati su larga scala per la diagnosi e la stadiazione della NAFLD/NASH/Fibrosi (27, 31), come mostrato in Tabella 1.

I vantaggi di questi indici consistono nella loro buona riproducibilità e alta applicabilità nella pratica clinica. Tuttavia, al momento attuale nessun biomarcatore è specifico per la NASH. Inoltre, alcuni possono essere inficiati dalla presenza di alcune comorbidità, come l'obesità o il diabete, condizioni nelle quali molti di questi indici necessitano di una validazione. Infatti, nel paziente con obesità patologica, alcune variabili necessarie per il calcolo di questi score, come il BMI, possono sovrastimare il risultato e dare un falso positivo.

Nelle tabelle seguenti, sono riportati i diversi indici non invasivi di NAFLD e steatosi o fibrosi nell'adulto, con le formule per il calcolo e il cutoff stabilito in letteratura per la popolazione generale (31).

Mentre alcuni indici necessitano per il loro calcolo di variabili cliniche e/o ematiche facilmente reperibili nella pratica clinica e negli esami di routine, altri indici di danno epatico utilizzano biomarcatori più specifici e costosi, come ad esempio la citocheratina 18 (CK-18) oppure l'indice ELF (Enhanced Liver Fibrosis), che combina le concentrazioni sieriche di tre biomarcatori: inibitore tissutale di metalloproteinasi 1 (TIMP-1), propeptide amminoterminale di tipo III procollagene (PIIINP) e acido ialuronico (HA) che mostrano buone correlazioni con gli stadi della fibrosi nella malattia epatica cronica (30, 31).

Nella Tabella 3 è riportata l'accuratezza diagnostica di questi score per la popolazione generale (31).

Tabella 1 Score per la diagnosi e la stadiazione della NAFLD negli adulti

Nome dello Score	Elementi	Formula	Cut-off
Fatty liver index (FLI).	WC, TG, BMI e GGT	$(e^{0.953 \cdot \log_e(TG)} + 0.139 \cdot \text{BMI} + 0.718 \cdot \log_e(\text{GGT}) + 0.053 \cdot \text{WC} - 15.745) / (1 + e^{0.953 \cdot \log_e(TG)} + 0.139 \cdot \text{BMI} + 0.718 \cdot \log_e(\text{GGT}) + 0.053 \cdot \text{WC} - 15.745) \cdot 100$	<30 assenza di steatosi ≥60 presenza di steatosi
Hepatic steatosis index (HSI)	ALT, AST e BMI, T2D	$8 \times (\text{ALT}/\text{AST ratio}) + \text{BMI} (+2, \text{ if F; } +2, \text{ se T2D}).$	>36 presenza di steatosi
Lipid Accumulation Product (LAP)	WC e TG	$M = (\text{WC [cm]} - 65) \times (\text{TG [mmol/L]})$ $F = (\text{WC [cm]} - 58) \times (\text{TG [mmol/L]})$	Presenza di steatosi: InLAP>4 (M) InLAP>4.4 (F)
NAFLD liver fat score (NAFLD-LFS)	AST, ALT, insulina, Presenza di: MS, T2D	$-2.89 - 1.18 \cdot \text{MS (yes=1/no=0)} + 0.45 \cdot \text{T2D (yes=2/no=0)} + 0.15 \cdot \text{insulina(mU/L)} + 0.04 \cdot \text{AST (U/L)} - 0.94 \cdot \text{AST/ALT}$	>-0.640 presenza di steatosi
SteatoTest	ALT, α2M, APOA1, Hp, bilirubina totale, GGT, Colesterolo, TG, età, sesso, BMI	Patent protected	>0.30
Index of NASH (ION Score)	WHR, TG, ALT, HOMA-IR	M: $1.33 \text{ rapporto vita-fianchi} + 0.03 \times \text{trigliceridi (mg/dL)} + 0.18 \times \text{ALT (U/L)} + 8.53 \times \text{HOMA} - 13.93;$ F: $0.02 \times \text{trigliceridi (mg/dL)} + 0.24 \times \text{ALT (U/L)} + 9.61 \times \text{HOMA} - 13.99$	<11 assenza di steatosi >22 presenza di steatosi

ALT= alanina aminotransferasi; APOA1= apolipoproteina A1; AST= aspartato aminotransferasi; BMI= indice di massa corporea (body mass index); F= femmine; GGT= gamma glutamil transferasi; HDL= lipoproteine ad alta densità; Hp= aptoglobulina; M= maschi; MS= sindrome metabolica; T2D= diabete di tipo 2; TG= concentrazione dei trigliceridi a digiuno; WC= circonferenza vita (waist circumference), WHR= rapporto circonferenza vita/fianchi; α2M= α 2 macroglobulina

Tabella 2 Score per la valutazione della presenza di fibrosi epatica nell'adulto

Nome dello Score	Elementi	Formula	Cut-off
NAFLD fibrosis score (NFS)	età, BMI, IFG/T2DM, AST/ALT, PLT, albumina	$1.675 + 0.037 \times \text{età (anni)} + 0.094 \times \text{BMI (kg/m}^2) + 1.13 \times \text{IFG/diabete (yes = 1, no = 0)} + 0.99 \times \text{AST/ALT} - 0.013 \times \text{PLT (10}^9/\text{l)} - 0.66 \times \text{albumina (gr/dl)}$	< - 1.455 permette di escludere la presenza di fibrosi avanzata >0.676 permette di diagnosticare con precisione la presenza di fibrosi
AST/ALT	AST, ALT	AST(U/L)/ ALT(U/L)	≥0.8 presenza di fibrosi
APRI	AST, PLT	$(\text{AST (U/L)} / \text{PLT (10}^9/\text{L)}) \times 100$	≤0.50 assenza di fibrosi >1.50 presenza di fibrosi significativa
Forns index	PLT, GGT, età, colesterolo	$7.811 - 3.131 \times \ln(\text{PLT}) + 0.781 \times \ln(\text{GGT}) + 3.467 \times \ln(\text{età}) - 0.014 \times (\text{colesterolo})$	<4.2 assenza di fibrosi (F0-F1)(96%) ≥6.9 presenza di fibrosi (F2-F4) (66%)
FIB4	età, PLT, AST, ALT	$[\text{età (anni)} \times \text{AST (U/L)}] / [\text{PLT (10}^9/\text{L)} \times \text{ALT (U/L)}]^{1/2}$	>2.67 presenza di fibrosi <1.30 assenza di fibrosi
Fibrotest	α2M, GGT, bilirubina totale, APOA1, Hp	https://www.biopredictive.com/it/products/fibrotest-actitest/	>0.30 presenza di fibrosi minima >0.70 presenza di fibrosi severa
BARD	BMI, AST/ALT, presenza di diabete (T2D)	BMI ≥ 28 kg/m ² = 1 punto, BMI <28 kg/m ² = 0 punti; AST/ALT ratio ≥ 0.8 = 2 punti e presenza di T2D = 1 punto	≥2 presenza di fibrosi
GGT 96.5 U/ L	GGT	/	≥96.5
Enhanced Liver Fibrosis (ELF)	HA, P3NP, TIMP-1	$2.494 + 0.846 \ln(\text{C}_{\text{HA}}) + 0.735 \ln(\text{C}_{\text{P3NP}}) + 0.391 \ln(\text{C}_{\text{TIMP-1}})$	≥0.3576
Fibrometer	età, peso, glucosio a digiuno, AST, ALT, ferritina, PLT	$0.4184 \text{ glucosio (mmol/l)} + 0.0701 \text{ AST (IU/l)} + 0.0008 \text{ ferritina (}\mu\text{g/l)} + 0.0102 \text{ PLT (G/l)} - 0.0260 \text{ ALT (UI/l)} + 0.0459 \text{ peso corporeo(kg)} + 0.0842 \text{ età (anni)} + 11.6226$	≥0.49
BAAT	BMI, età, ALT, TG	Età al momento della biopsia (≥ 50 anni=1; <50 anni=0), BMI (≥ 28 kg/m ² = 1; <28 kg/m ² = 0), TG (≥ 1.7 mmol/L = 1; <1.7 mmol/L = 0), ALT (≥ 2 volte rispetto al normale = 1; <2 volte rispetto al normale = 0)	0-1 assenza di fibrosi ≥2 presenza di fibrosi
HEPASCORE	α2M, HA, GGT, bilirubina totale	$y = \exp [-4.185818 - (0.0249 \times \text{età}) + (0.7464 \times \text{ sesso}) + (1.0039 \times \alpha 2\text{M}) + (0.0302 \times \text{HA}) + (0.0691 \times \text{bilirubina}) - (0.0012 \times \text{GGT})]$ HEPASCORE = $y/(1+y)$	≥0.50 presenza di fibrosi

ALT= alanina aminotransferasi; APOA1= apolipoproteina A1; AST= aspartato aminotransferasi; GGT= gamma glutamil transferasi; HA= acido ialuronico; Hp= aptoglobulina; IFG= alterata glicemia a digiuno (acronimo di impaired fasting glucose); P3NP= propeptide N-terminale del collagene di tipo 3; PLT= conta piastrinica; TIMP-1= inibitore tissutale della metalloproteinasi 1 (tissue inhibitor of metalloproteinases 1); α2M= α 2 macroglobulina

Tabella 3 Sensibilità e specificità degli indici non invasivi di NAFD, steatosi e fibrosi epatica negli adulti

Score	AUROC	Sensibilità (%)	Specificità (%)
FLI	0.85	87	64
HSI	0.81	45	93
LAP	0.79	93,3	96,7
NAFLD-LFS	0.86	86	71
SteatoTest	0.8	89	58
NFS	0.84	77 (con cutoff < -1.455)	71 (con cutoff < - 1.455)
		43 (con cutoff > 0.676)	96 (con cutoff > 0,676)
AST/ALT	0.83	52	90
APRI	0.79	72	80
Forns Index	0.81	94	51
FIB4	0.765	66.7 (con cutoff < 1.45)	71.2 (con cutoff < 1.45)
		23 (con cutoff > 3.25)	96,6 (con cutoff > 3.25)
Fibrotest	0.81 (con cutoff > 0.3)	77 (con cutoff > 0.3)	77 (con cutoff > 0.3)
	0.88 (con cutoff > 0.7)	15 (con cutoff > 0.7)	98 (con cutoff > 0.7)
BARD	0.81	89	44
GGT 96.5 U/L	0.74	83	69
ELF	0.90	80	90
FIBROMETER	0.94 (fibrosi severa)	78.5 (fibrosi severa)	95.9 (fibrosi severa)
BAAT	0.84	75.5	84.1
HEPASCORE	0.814 (fibrosi severa)	75.5	84.1

Un altro indice descritto in letteratura associato alla steatosi epatica è il Visceral Adiposity Tissue (VAI) index, calcolato con un algoritmo differenziato per genere:
 $VAI(\text{Maschi}) = [\text{circonferenza vita}/39,68 + (1,88 * \text{BMI})] * (\text{Trigliceridi}/1,03) * (1,31/\text{HDL});$
 $VAI(\text{Femmine}) = [\text{circonferenza vita}/36,58 + (1,89 * \text{BMI})] * (\text{Trigliceridi}/0,81) * (1,52/\text{HDL}).$
 Esso rappresenta un nuovo marker di disfunzione del tessuto adiposo,

indipendentemente associato sia con la steatosi che con l'attività necroinfiammatoria e direttamente correlato alla carica virale nei pazienti con epatite C (32).

Infine, il Triglycerides and Glycemia (Tyg) Index, calcolato come il logaritmo del prodotto tra glicemia e trigliceridemia a digiuno, è stato descritto da alcuni autori come un indice affidabile di insulino-resistenza ad un cutoff ottimale di 4,68 (sensibilità 96,5% e specificità 85%) e dunque un buon parametro per rilevare la presenza di NAFLD (33, 34).

METODICHE RADIOLOGICHE

La semplice ecografia epatica è l'esame strumentale più comune ed economico per la diagnosi di steatosi epatica e consiste nel confrontare l'ecogenicità del parenchima epatico con quella del rene e definisce la steatosi come lieve, moderata o assente. Ma tale metodica ha dei limiti: il fatto di essere operatore dipendente, soprattutto in quelle categorie di pazienti in cui l'esame può risultare più complicato (come il soggetto con grande obesità) e il fatto di rilevare la presenza di steatosi solo per un quantitativo di grasso epatico > 2.5-20%. Pertanto quei pazienti con una steatosi iniziale, inferiore al 20%, possono rimanere non diagnosticati (30). Per ovviare a tutto ciò, nel corso degli anni si sono sviluppate tecniche radiologiche più specifiche e mirate come quelle elastografiche. Ci sono 2 tipi di tecniche elastografiche: quelle basate sull'ecografia e quelle basate sulla risonanza magnetica. Le prime consistono nel valutare la velocità di spostamento di un'onda ultrasonora all'interno di una regione del fegato mentre le seconde in particolari sequenze ottenute alla risonanza. La velocità di spostamento dell'onda viene convertita in una misura di "durezza" del parenchima epatico, ovvero liver stiffness measurement (LSF), espressa in kilopascals (kPa) o in metri al secondo (m/s) (30).

Tra le tecniche elastografiche effettuate in corso di un normale esame ecografico c'è la metodica ARFI (Acoustic Radiation Force Impulse, impulso acustico ad ultrasuoni ad energia media) che permette la misurazione dell'elasticità epatica valutando la velocità di spostamento di un'onda ultrasonora (di potenza più elevata rispetto a quella necessaria per ottenere l'immagine) all'interno di una regione di interesse (ROI) del fegato, collocata tra i 2.5 e 6.5 cm al di sotto del piano cutaneo e mostra un'elevata precisione per il rilevamento della fibrosi epatica avanzata e la cirrosi. Lo sviluppo di un

trasduttore speciale per i pazienti obesi ha aumentato l'applicabilità del metodo in questi pazienti (35) che sono a rischio di stadi avanzati della NAFLD.

1.4 LA CHIRURGIA BARIATRICA

La terapia medica dell'obesità, consistente nell'associazione di dieta ipocalorica, attività fisica ed agenti farmacologici porta molto spesso ad una perdita di peso non maggiore del 10% che non si mantiene nel tempo. Gli studi clinici suggeriscono che la terapia chirurgica dell'obesità rappresenta l'opzione più efficace per ottenere un sostanziale e duraturo calo ponderale, con una conseguente riduzione della morbilità e della mortalità.

Criteri di selezione:

Le linee guida SICOB (Società Italiana di Chirurgia dell'Obesità e delle Malattie Metaboliche) 2016 (36), stabiliscono che i criteri di selezione per la chirurgia bariatrica sono:

1. BMI > 40 kg/m² (o BMI > 35 kg/m² se in presenza di comorbidità associata);
2. Età compresa tra 18 e 60 anni;
3. Obesità di durata superiore ai 5 anni;
4. Dimostrato fallimento di precedenti tentativi di perdere peso e/o di mantenere la perdita di peso con tecniche non chirurgiche;
5. Piena disponibilità ad un prolungato follow-up postoperatorio.

Criteri di selezione nel paziente di età superiore ai 60 anni:

Le linee guida NIH del 1991 non prevedevano la possibilità di utilizzare la terapia chirurgica nel paziente gravemente obeso di età superiore ai 60 anni (37). Tuttavia, sono presenti in letteratura alcune casistiche di pazienti obesi anziani sottoposti a chirurgia bariatrica, con risultati sostanzialmente buoni (38). In linea generale si tratta di studi su pazienti di età tra i 60 e i 70 anni in buono stato clinico e funzionale che riportano una maggior percentuale di complicanze postoperatorie e un minor calo di peso rispetto ai pazienti più giovani, evidenziando comunque vantaggi per quanto riguarda il miglioramento o la guarigione di alcune comorbidità e il miglioramento

dell'autonomia funzionale e della qualità di vita. In sostanza, la chirurgia bariatrica può essere considerata anche nel paziente con età superiore a 60 anni, con indicazioni sovrapponibili a quelle utilizzate nel paziente adulto, ma previa una attenta valutazione individuale dei rischi e benefici, del potenziale miglioramento della qualità della vita e del rischio di mortalità nel breve –medio termine (36).

Criteri di selezione nei pazienti con BMI inferiore a 35 kg/m²:

La superiorità della terapia chirurgica rispetto ad un programma di modificazione dello stile di vita nel produrre calo ponderale e miglioramento delle comorbidità è stata dimostrata anche nel paziente con obesità moderata (BMI 30-35 kg/m²), da diversi studi (39, 40).

La percentuale di remissione del diabete nel breve-medio termine è risultata buona nei pazienti con BMI 30-35 kg/m² e meno brillante nei pazienti con BMI 25-30 kg/m². Questa tendenza è stata recentemente confermata da Scopinaro et al. (41) in uno studio prospettico condotto con diversione bilio-pancreatica. Non vi sono comunque, al momento, dati a lungo termine sul rapporto rischio/beneficio della chirurgia bariatrica nel paziente con obesità moderata (con o senza diabete) ed in questo gruppo va considerato con maggiore cautela il rischio rappresentato dall'induzione di un livello eccessivo di calo ponderale.

Controindicazioni:

Le controindicazioni alla chirurgia bariatrica internazionalmente codificate ed accettate sono :

1. assenza di un periodo di trattamento medico verificabile;
2. scarsa compliance del paziente;
3. disordini psicotici, depressione severa, disturbi della personalità e del comportamento alimentare valutati da uno psichiatra o psicologo dedicato;
4. alcolismo e tossicodipendenza;
5. malattie correlate a ridotta spettanza di vita (scompenso cardiaco, patologie respiratorie croniche di tipo ostruttivo, ecc);

6. pazienti inabili a prendersi cura di se stessi e senza un adeguato supporto familiare e sociale (36).

La selezione dei soggetti candidati ad intervento di chirurgia bariatrica deve essere effettuata da un'equipe costituita da chirurghi, endocrinologi, nutrizionisti e psichiatri secondo le linee guida internazionali ASBS-SAGES-EAES-NIH (42). In Italia, tutti i pazienti candidati all'intervento sono tenuti a firmare un consenso informato stilato dalla Società Italiana di Chirurgia Bariatrica (SICOB).

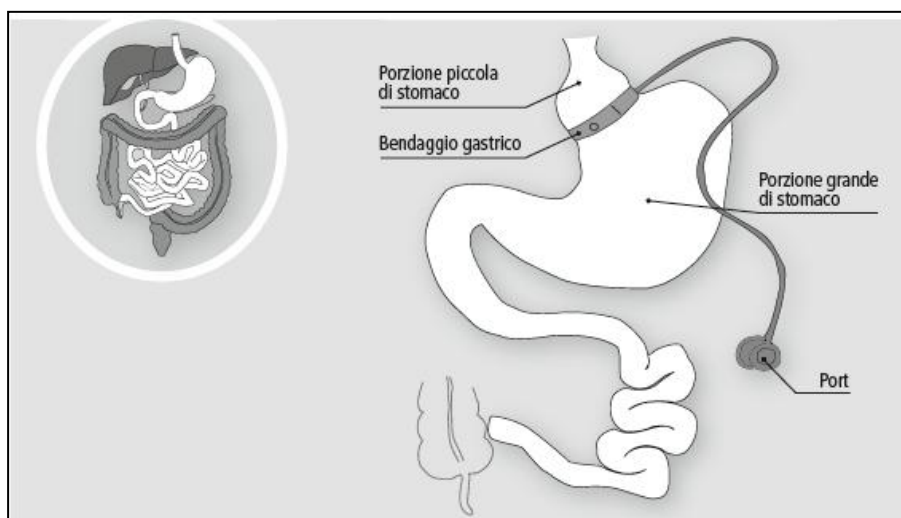
1.4.1 Le diverse tecniche di chirurgia bariatrica

Gli interventi chirurgici utilizzabili in chirurgia bariatrica possono essere raggruppati in macrocategorie, in relazione al loro meccanismo d'azione (36):

- Interventi restrittivi meccanici (ostacolo meccanico al transito del cibo): comprendenti il bendaggio gastrico regolabile e la plicatura gastrica
- interventi ad azione sia restrittiva (meccanica) sia funzionale (anoressizzante), comprendenti il Bypass Gastrico e la Sleeve Gastrectomy. Quest'ultima sarà trattata in un paragrafo a parte
- interventi ad azione malassorbitiva, comprendenti la Deviazione Bilio-Pancreatica (nella sua forma classica o con Duodenal Switch) e il Mini Gastric By-pass
- procedure endoscopiche, che comprendono il *pallone endogastrico confezionato in silicone* e l' *Endobarrier*

Il **Bendaggio Gastrico regolabile** rappresenta la procedura restrittiva meno invasiva. Viene eseguito per via laparoscopica e consiste nel posizionamento di un anello di silicone attorno al fondo dello stomaco, in prossimità dell'esofago, collegato ad un reservoir inserito nel tessuto sottocutaneo a livello dell'ipocondrio sinistro che ne permette la regolazione dall'esterno. Alla chiusura dell'anello, lo stomaco assume la forma di una "clessidra asimmetrica", con una piccola tasca gastrica superiore ed il rimanente corpo gastrico collocato al di sotto del bendaggio. I vantaggi di questa tecnica consistono nella sua *semplicità, mini-invasività e reversibilità* (la protesi può essere rimossa, qualora necessario, sempre per via laparoscopica, anche in caso di complicanze, senza alterare l'integrità anatomico-funzionale dell'esofago-stomaco (36) .

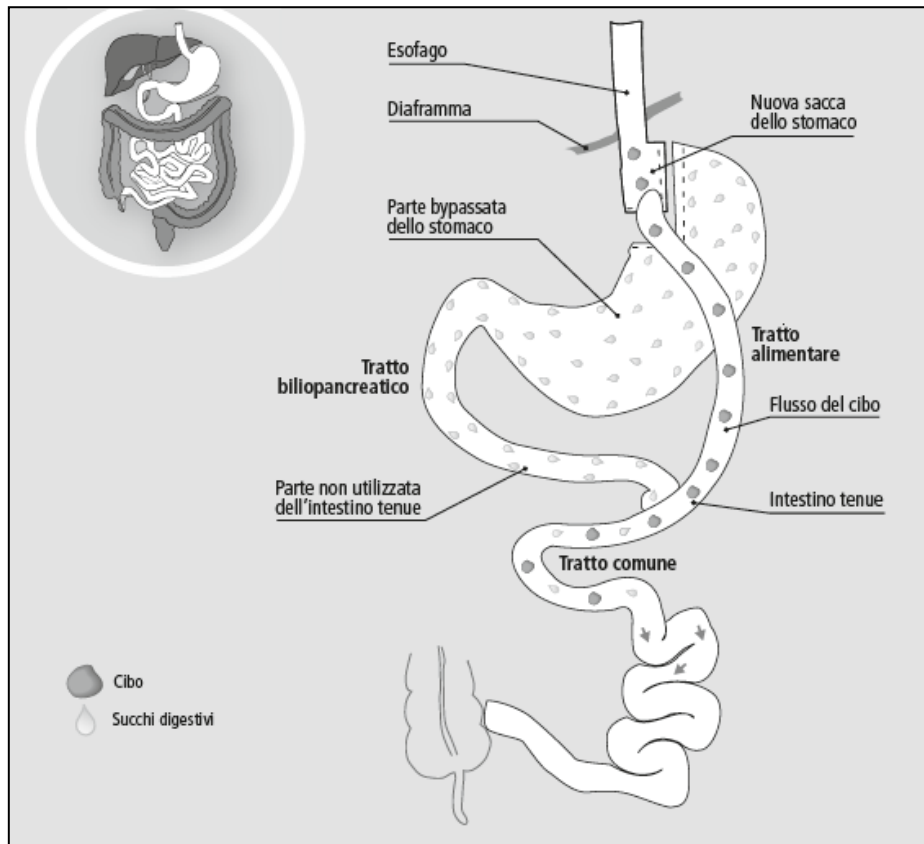
Figura 10 Bendaggio gastrico regolabile



La **Plicatura gastrica** – Consiste nella riduzione dell'80% circa della capacità dello stomaco attraverso invaginazioni (da una a tre) praticate in progressione a partire dalla grande curva dapprima a punti staccati e poi in sutura. Tale tecnica ha dato risultati contraddittori, è da considerarsi osservazionale e necessita di inserimento nel registro nazionale S.I.C.O.B., al fine di garantire la necessaria supervisione (36).

Il **Gastric By-Pass (GBP)** comprende due diverse fasi: dapprima viene creata una tasca gastrica < 30 ml, successivamente si effettua la resezione di un'ansa digiunale a 50 cm dal legamento del Treitz che viene anastomizzata al moncone gastrico residuo, bypassando il duodeno. Il moncone digiunale prossimale viene poi anastomizzato distalmente creando un'ansa alla Roux con conformazione ad Y (43). Le possibili complicanze del Gastric By-pass sono rappresentate da: cedimento e rottura dell'anastomosi; dilatazione gastrica acuta; ritardato svuotamento gastrico; vomito; ostruzione intestinale; dumping syndrome. Quest'ultima si presenta in seguito a pasti a base di zuccheri raffinati ed è caratterizzata da tachicardia, nausea, sudorazione e astenia (36).

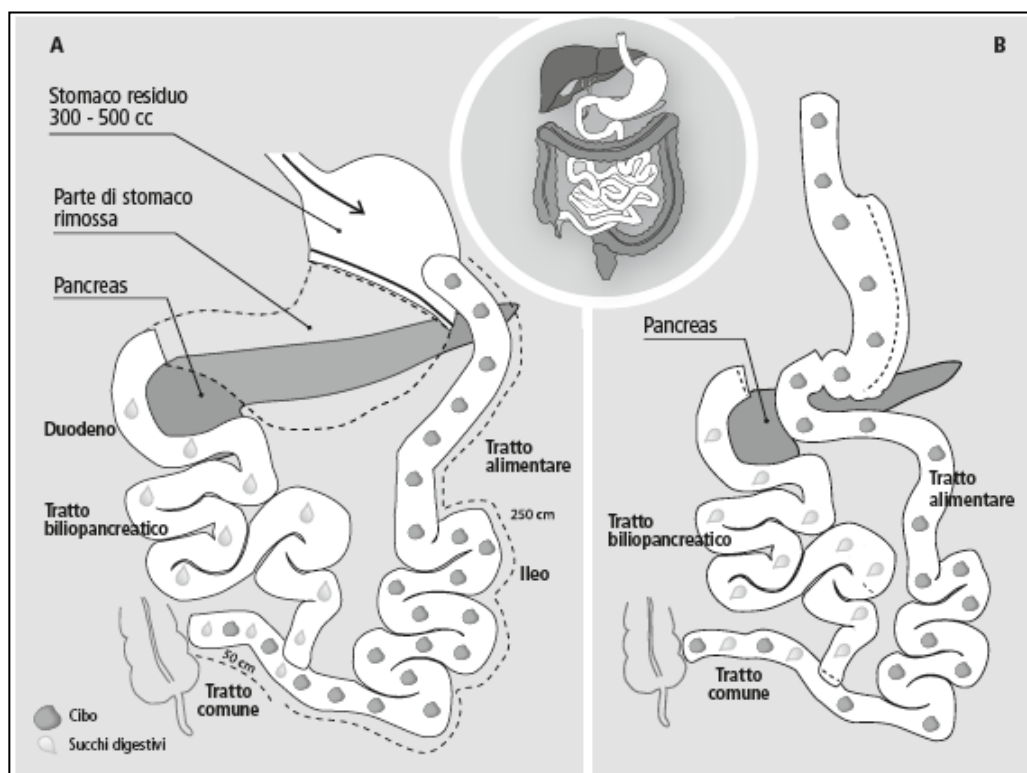
Figura 11 Gastric By-pass



La **Diversione Bilio-Pancreatica** e **Diversione Bilio- Pancreatica con Duodenal Switch** (DBP) consiste in una gastroresezione che può essere effettuata trasversalmente, intervento originale, o tubulizzando lo stomaco, variante chiamata “duodenal switch”. Il volume dello stomaco residuo è variabile (250-400 ml). Il piccolo intestino viene sezionato a 2,5 metri dalla valvola ileo-cecale e il suo moncone distale viene anastomizzato con la tasca gastrica. Il moncone prossimale, contenente la porzione ileale e la parte rimanente dell’intestino tenue con le vie biliari, viene esclusa dal transito del cibo ed è anastomizzata a 50 cm dalla valvola ileo-cecale. La lunghezza totale del tratto assorbente è quindi di 200 cm e gli ultimi 50 cm costituiscono il tratto comune, in cui il cibo e la bile si mescolano. In questo modo, nessuna parte dell’intestino viene asportata o rimane inutilizzata. La ricostruzione gastrointestinale è del tipo ad “Y”. In una branca della Y (“alimentare”) passa il cibo, nell’altra la bile (“biliare”). Nella branca “comune” cibo e bile possono mescolarsi. L’intervento originale descritto dall’autore prevedeva anche la colecistectomia profilattica. L’intervento non modifica l’assorbimento degli zuccheri semplici; si verifica pertanto un malassorbimento selettivo specialmente per i grassi e per gli amidi. Questa procedura malassorbitiva, confrontata con le altre tecniche, porta ad un calo ponderale di maggiore entità e più duraturo nel tempo (36,

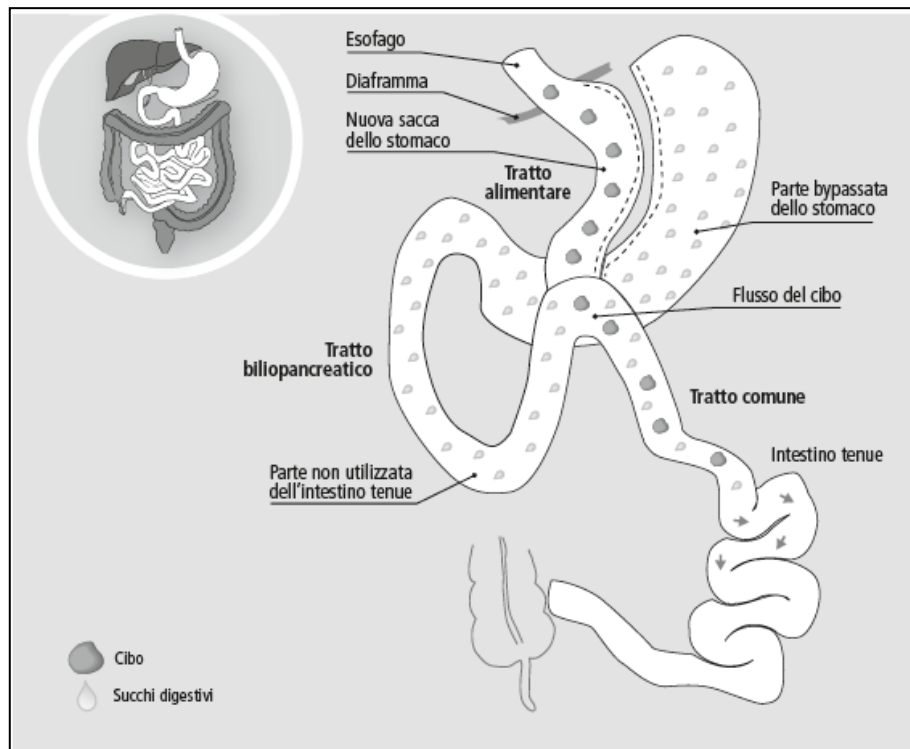
43). Le complicanze principali dell'intervento sono: un alto grado di morbilità perioperatoria e una mortalità del 2%; un cambiamento della consistenza delle feci e della frequenza dell'alvo; la formazione di ulcere anastomotiche (3-10%), la malnutrizione proteica (3-4%), l'ipoalbuminemia, la comparsa di edema, anemia, astenia (per ridotto assorbimento energetico) e alopecia (44).

Figura 12 Diversione bilio-pancreatica (A) e Duodenal Switch (B)



Il **Mini Gastric By-pass**, meglio definito come Gastric By-pass con anastomosi singola SAGB), con anastomosi unica (OAGB), consiste nella creazione di una piccola tasca gastrica di circa 60 ml esclusa dallo stomaco rimanente e collegata all'intestino tenue mediante anastomosi termino-laterale a una distanza dal duodeno, non del tutto standardizzata, che normalmente corrisponde a circa 200 cm. Si tratta di un elemento fondamentale, poiché in tal modo la distanza dell'anastomosi gastrica dalla valvola ileo-cecale può variare da 600 a 200 cm, dando all'intervento una connotazione malassorbitiva del tutto imprevedibile. Essendo procedura ancora sotto analisi, necessita d'obbligo di inserimento nel registro nazionale S.I.C.OB. al fine di osservarne i risultati (36)

Figura 13 Mini Gastric By-pass



Le *Procedure Endoscopiche* comprendono il *pallone endogastrico confezionato in silicone*, posizionato per via endoscopica ed eliminato per via naturale o rimosso al massimo entro 180 giorni sempre con metodica endoscopica e l' *Endobarrier* , un tubo impermeabile monouso impiantabile per via endoscopica posizionato nel bulbo duodenale così da escludere dal transito alimentare il duodeno e la prima parte del digiuno. L'Endobarrier è stato lasciato in sede sino a un massimo di 12 mesi e ha risultati contrastanti in letteratura e necessita di inserimento nel registro nazionale S.I.C.OB., al fine di garantire la necessaria supervisione (36).

1.4.2 Sleeve Gastrectomy Laparoscopica

L'intervento di Sleeve Gastrectomy Laparoscopica (SGL) è stato introdotto nel 1988 come variante della diversione bilio-pancreatica classica secondo Scopinaro ed è stato eseguito per la prima volta per via laparoscopica nel 2000 (45). Attualmente, costituisce il primo step della diversione bilio-pancreatica con duodenal switch o del Gastric By-Pass (46), soprattutto per pazienti superobesi ($BMI > 50 \text{ Kg/m}^2$) ad alto rischio operatorio (45). Tuttavia, molti pazienti sottoposti a SGL riescono a perdere l'eccesso di peso già al primo step e non necessitano di un ulteriore intervento. In questo modo

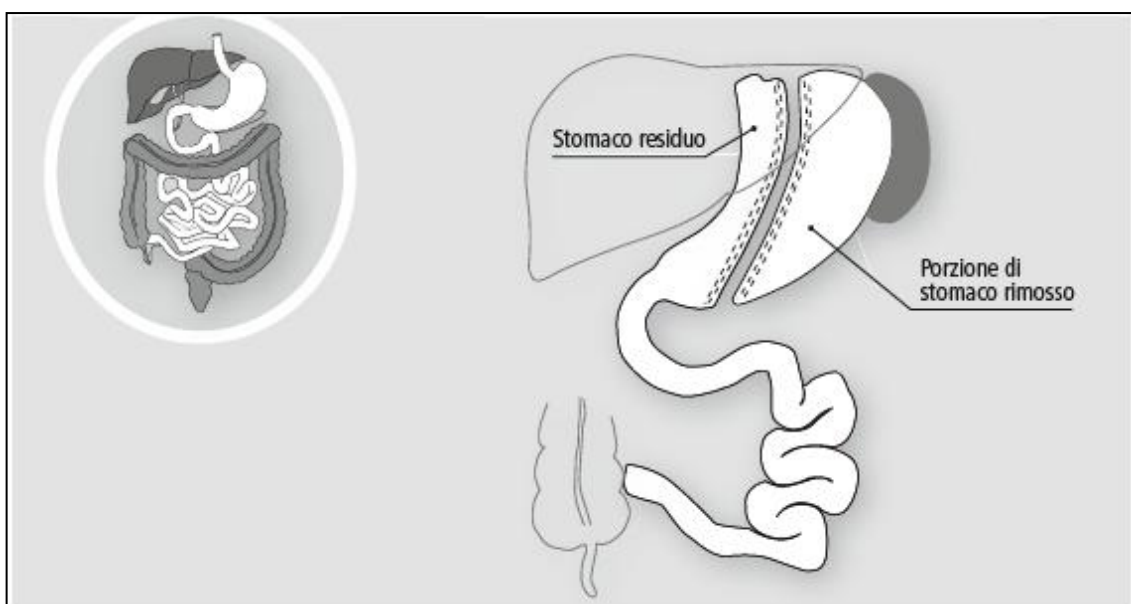
vengono evitate tutte le complicanze di un intervento malassorbitivo, quali la malnutrizione proteica e la carenza di oligoelementi (46).

La SGL consiste nell'asportazione, per via laparoscopica, di più del 75% dello stomaco: il volume residuo, assai scarso, è responsabile del precoce senso di sazietà e della riduzione dell'appetito (47). Si comporta dunque come un intervento restrittivo, ma a differenza del bendaggio gastrico regolabile, è irreversibile e non regolabile.

La SGL offre numerosi vantaggi se paragonata ad altre tecniche di chirurgia bariatrica: pur non trattandosi di un intervento di tipo malassorbitivo (poiché non interferisce con il transito e l'assorbimento dei nutrienti) porta ad una rapida e cospicua perdita di peso, similmente alle tecniche malassorbitive. L'asportazione del fondo gastrico, dove si trova la quota maggiore di cellule produttrici *ghrelina*, porta ad una riduzione dei livelli plasmatici di quest'ormone ad attività oressizzante, che è molto più marcata rispetto ad altri interventi restrittivi. Ciò potrebbe spiegare il maggiore calo ponderale rispetto alle altre tecniche restrittive (46).

La SGL viene eseguita per via laparoscopica tramite il posizionamento di 5 trocar sulla parete addominale.

Figura 14 Sleeve gastrectomy eseguita con tecnica laparoscopica



Dopo aver sezionato il grande omento dalla grande curvatura, viene eseguita una tubulizzazione gastrica mediante una gastrosezione parietale verticale con applicazioni multiple di suturatrici lineari laparoscopiche, previa devascularizzazione completa della grande curvatura (46). Il fondo e la maggior parte del corpo e dell'antro sono asportati, il piloro rimane intatto (48). Il volume residuo dello stomaco è di circa 100 ml (45).

Nella prima settimana dopo l'intervento, ai pazienti viene somministrata una dieta liquida, seguita nelle successive quattro settimane da un'alimentazione a base di cibi morbidi, per poi passare gradualmente all'introduzione di cibi solidi. Frequente è il vomito, soprattutto in seguito a pasti più abbondanti.

La terapia medica post-operatoria prevede l'assunzione di farmaci antiacidi, quali inibitori di pompa protonica, e di integratori multivitaminici, di ferro o di calcio a seconda delle esigenze del paziente (42).

Complicanze intra-operatorie

Durante l'intervento può eccezionalmente verificarsi la lesione endoaddominale, cui possono conseguire l'emorragia e/o la perforazione. Tale lesione può essere riparata o può richiedere anche l'asportazione di un organo (ad esempio, la milza). Altre complicanze sono rappresentate dalla perforazione della parete dello stomaco, o da lesioni accidentali del fegato con possibile sanguinamento. Complicanze specifiche della tecnica laparoscopica sono le emorragie, le lesioni di visceri cavi e quelle degli organi parenchimosi determinate dal posizionamento dei trocar. Anche se raramente, la posizione laparoscopica del paziente a gambe divaricate sul letto operatorio può causare fenomeni compressivi sulle strutture nervose degli arti inferiori.

Complicanze post-operatorie (entro i primi 30 giorni dall'intervento)

Trombo embolia venosa: ovvero la formazione di coaguli ematici nelle vene delle gambe e del bacino. Se i coaguli si distaccano dalla parete vasale possono giungere possono raggiungere i vasi del circolo polmonare e determinare embolia polmonare, che è la complicanza più temuta nella chirurgia dell'obesità in quanto costituisce la causa principale di decesso post-operatorio immediato.

Insufficienza respiratoria.

Fistola gastrica e/o intestinale: conseguente ad una perforazione di piccole dimensioni dello stomaco o dell'intestino, la fistola gastrica o intestinale che può causare una peritonite. Questa complicanza può richiedere un nuovo intervento chirurgico o altri trattamenti terapeutici. Anche

se in casi eccezionali, in presenza di una fistola gastrica o intestinale può rendersi necessaria l'asportazione dell'organo colpito, in modo specifico lo stomaco e/o una parte dell'intestino.

Infezione delle ferite chirurgiche: più frequentemente osservabili nei casi di intervento effettuati con tecnica tradizionale che prevedono l'apertura della cavità addominale.

Emorragie talora gravi che possono richiedere un nuovo intervento chirurgico o altri trattamenti terapeutici.

Occlusione intestinale. Questa complicanza può richiedere una terapia chirurgica (36).

Tutte le complicanze post-operatorie precoci possono richiedere terapie mediche intensive che possono allungare il periodo di degenza anche per numerose settimane ed eventualmente richiedere il ricovero in terapia intensiva o rianimazione. In certi casi può essere necessario un nuovo intervento chirurgico. In base alle casistiche più attuali il rischio di mortalità postoperatoria precoce varia tra 0.1 e 1%. Occorre tenere presente che in ogni caso il rischio di mortalità e di complicanze aumenta all'aumentare del peso corporeo del paziente e della sua età, se superiore ai 60 anni.

Tutti i tipi di chirurgia bariatrica conducono ad un importante decremento della quantità di calorie ingerite, che si aggirano intorno a 700-900 Kcal/die, specialmente durante i primi 6 mesi dopo la procedura chirurgica (49). La carenza dei micronutrienti è una complicanza importante della chirurgia bariatrica, interessando circa il 50% dei pazienti operati alla fine del primo anno post operatorio, ed è dovuta principalmente al malassorbimento conseguente al riarrangiamento anatomico che la chirurgia stessa comporta (50).

La Sleeve Gastrectomy, da questo punto di vista, essendo una procedura restrittiva, in cui l'intestino non viene né bypassato né rimosso, minimizza le carenze nutrizionali che si tipicamente si osservano dopo le procedure malassorbitive (51-53).

1.4.3 Chirurgia bariatrica e diabete mellito di tipo 2

Secondo le linee guida nazionali della Società Italiana di Diabetologia (54), il ricorso alla chirurgia bariatrica è raccomandato nei pazienti con DM2 adulti (età 18-65 anni) con indice di massa corporea $>40 \text{ Kg/m}^2$ indipendentemente dal grado di compenso glicemico e dal tipo di terapia ipoglicemizzante effettuata, o compreso tra 35 e 40 Kg/m^2 , qualora vi sia scompenso glicemico nonostante un'appropriata terapia medica.

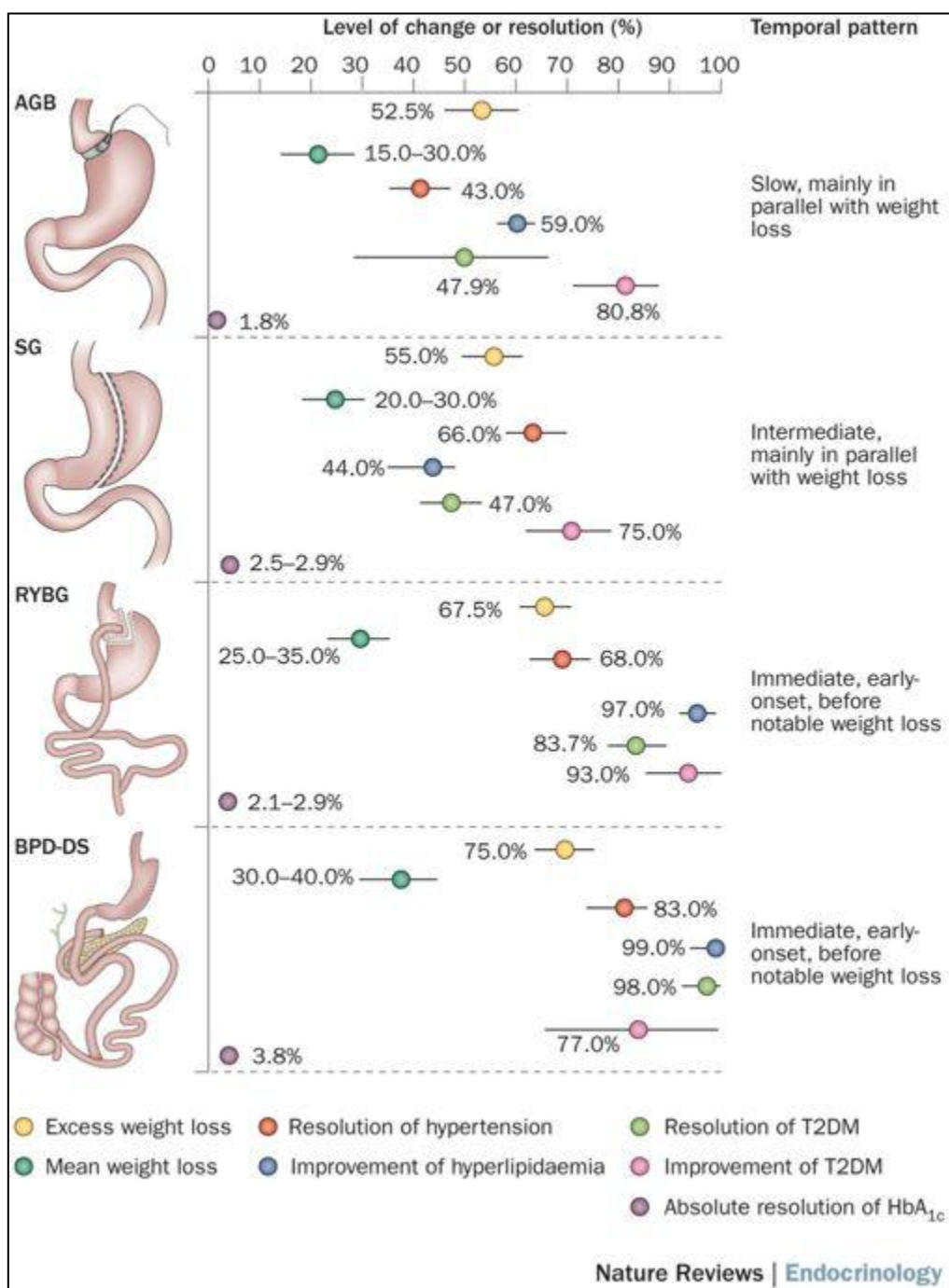
Inoltre, la chirurgia bariatrica può essere presa in considerazione nei pazienti con DM2 adulti con indice di massa corporea tra 35 e 40 kg/m² in buon controllo glicemico, o compreso tra 30 e 35 Kg/m² con scompenso glicemico nonostante un'appropriata terapia medica.

Gli effetti metabolici della chirurgia bariatrica sull'obesità e le patologie ad essa associate, come DM2, ipertensione arteriosa e dislipidemia, sono diversi a seconda della procedura bariatrica utilizzata (Figura 15) (55) e, se nelle procedure puramente restrittive sono legate prevalentemente al calo ponderale, nelle procedure miste (restrittive/malassorbitive) dipendono anche da altri meccanismi che sopraggiungono prima di un significativo calo ponderale, come la diversa secrezione di ormoni gastroenterici registrata dopo la chirurgia.

L'efficacia della chirurgia bariatrica nel migliorare e spesso normalizzare i livelli di glicemia in pazienti obesi con DM2 è stata confermata da un largo numero di studi osservazionali (56).

In un recentissimo lavoro, Buchwald descrive la chirurgia bariatrica come una chirurgia metabolica in grado di curare o migliorare il diabete con meccanismi che vanno al di là del calo ponderale e che coinvolgono gli ormoni prodotti dall'intestino (57). Sempre lo stesso autore, in una metanalisi che includeva 135,246 pazienti, ha messo in evidenza che il 86,6% dei pazienti diabetici mostrava un netto miglioramento del compenso glico-metabolico e che il 78,1% andava incontro a completa risoluzione del DM2 (58). In una recente review che ha analizzato gli effetti a lungo termine della chirurgia bariatrica sul DM2, Sheng (59) conclude che la chirurgia bariatrica non solo determina un'aumentata remissione del DM2 rispetto alla terapia medica, ma anche una riduzione delle complicanze micro e macrovascolari e della mortalità dovute al diabete, con un follow up di almeno 5 anni. In uno studio pubblicato nel 2008, Capoccia (60) ha riportato una remissione del DM2 dopo sleeve gastrectomy laparoscopica del 66%, 57% e 52% rispettivamente a breve (< 2 anni), medio (2-5 anni) e lungo termine di follow up.

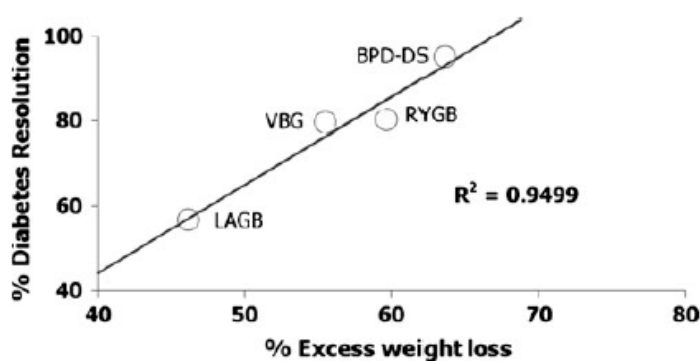
Figura 15 Effetti metabolici della chirurgia bariatrica a seconda del tipo di intervento



La metanalisi di Buchwald sopra descritta ha mostrato sostanziali differenze nell'efficacia delle diverse procedure sul controllo metabolico. La risoluzione del DM2 era maggiore nei pazienti sottoposti a diversione bilio-pancreatica/duodenal switch (95.1% di risoluzione), seguita dal gruppo di pazienti trattati con Gastric By-Pass

(80,3%), Gastroplastica Verticale (79,7%) ed infine Bendaggio Gastrico Regolabile (56,7%). Queste differenze sull'efficacia metabolica erano strettamente correlate alla perdita di peso (58).

Figura 16 Risoluzione del diabete e calo ponderale

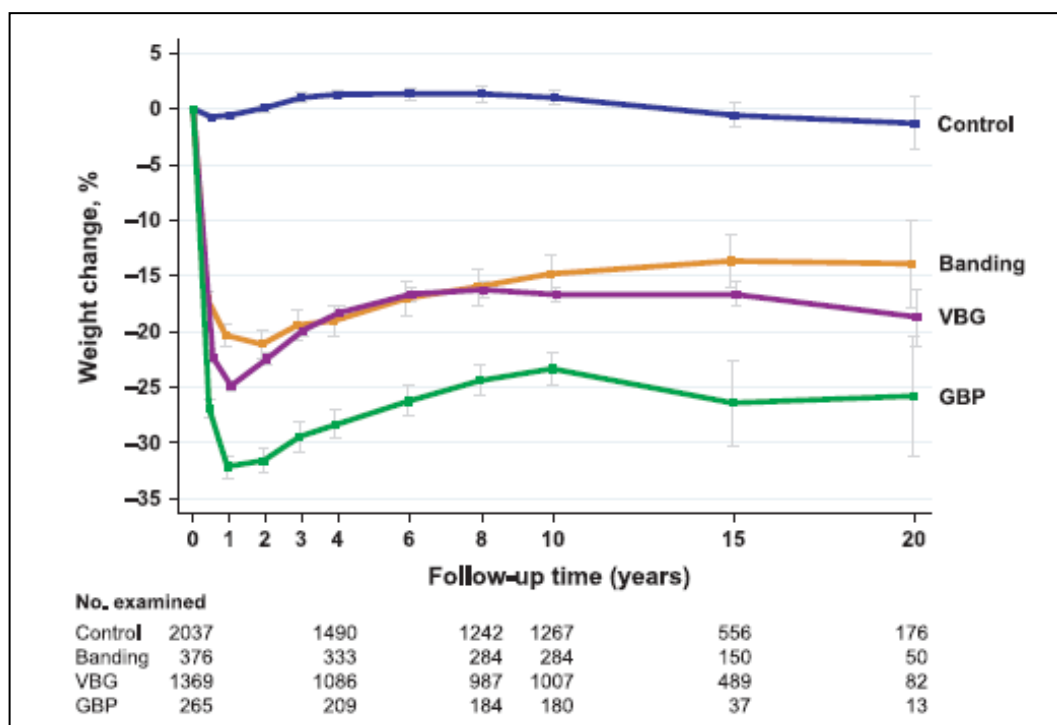


Le discordanze tra gli autori riguardo la remissione del diabete dopo chirurgia bariatrica derivano spesso da una diversa definizione di remissione nei diversi studi. Secondo linee guida, si parla di remissione del DM2 dopo chirurgia bariatrica in presenza di glicemia a digiuno < 100 mg/dl, HbA1c < 6% in assenza di terapia ipoglicemizzante (compresa metformina) dopo almeno 12 mesi di follow up (54, 61).

Il primo studio prospettico, randomizzato e controllato, che ha confrontato la chirurgia bariatrica con terapia medica convenzionale per la remissione del diabete è costituito dallo studio svedese SOS (Swedish Obese Subjects), che è partito agli inizi degli anni 90 e ha raggiunto ormai un follow up di 20 anni (62). Lo studio ha coinvolto 2010 soggetti obesi, sottoposti a diverse procedure bariatriche (13% Gastric By-pass, 19% bendaggio gastrico, 68% gastroplastica verticale) e 2037 soggetti obesi di controllo, con caratteristiche demografiche, antropometriche e cliniche sovrapponibili, trattati con terapia medica convenzionale. L'autore riportava una remissione del diabete del 72% a 2 anni e 35% a 10 anni, con 50% di recidiva del diabete nel follow up a lungo termine. Inoltre, nel gruppo chirurgico si osservava una riduzione dell'incidenza del diabete, un minor numero di eventi cardiovascolari fatali (infarto miocardico acuto e stroke) e una ridotta incidenza di cancro nelle donne.

Dopo lo studio SOS, il primo trial clinico randomizzato che ha confrontato la chirurgia bariatrica con la terapia convenzionale nel trattamento dei pazienti obesi con DM2 è stato pubblicato nel 2008 (63). Dixon e collaboratori hanno randomizzato 60 pazienti con BMI compreso tra 30 e 40 Kg/m² e diagnosi recente di DM2 e indirizzati a trattamento con bendaggio gastrico regolabile o ad un programma convenzionale di terapia medica. Dopo 2 anni di follow up la remissione del DM2 è stata raggiunta nel 73% dei pazienti del gruppo chirurgico e nel 13% del gruppo in terapia medica.

Figura 17 Andamento del peso corporeo nei pazienti dello studio svedese SOS, con follow up a 20 anni



Si sono poi succeduti altri studi di confronto, come quello pubblicato da Mingrone sul New England Journal of Medicine del 26 Aprile 2012 (17). Lo studio includeva 60 pz di età compresa tra i 30 e i 60 anni, diabetici da almeno 5 anni, con valori di HbA1c \geq 7% e BMI \geq 35 kg/m², che venivano indirizzati in modalità random alla terapia medica, all'intervento di Gastric By-pass o a quello di Diversione Biliopancreatica. Dopo 2 anni dall'inizio del trattamento si è registrata la remissione del diabete nel 75% dei pazienti sottoposti a Gastric By-Pass, nel 95 % dei pazienti sottoposti a diversione biliopancreatica e in nessun paziente trattato con terapia medica convenzionale. La

riduzione dei livelli di HbA1c è stata evidenziata in tutti i gruppi, ma con un decremento maggiore in quelli chirurgici: i valori medi erano pari a $7.69\pm 0.57\%$ nel gruppo in terapia medica, a $6.35\pm 1.42\%$ nel gruppo del Gastric By-Pass e a $4.95\pm 0.49\%$ in quello della diversione bilio-pancreatica.

Lo stesso numero del New England Journal of Medicine pubblicava lo studio di Shauer et al. (64) sul confronto tra terapia medica e chirurgica, in 150 pazienti obesi e diabetici in fase di scompenso glico-metabolico (con valori medi di HbA1c $\geq 9,2\%$). I pazienti venivano assegnati casualmente al trattamento medico convenzionale, all'intervento chirurgico di Gastric By-pass e a quello di sleeve gastrectomy. Dopo 12 mesi, il 93% dei pazienti aveva completato il follow up. In questi pazienti veniva quindi valutata la riduzione dell' HbA1c a livelli pari o inferiori al 6%, evento che si verificava nel 12 % dei pazienti trattati conservativamente, nel 42 % dei pazienti indirizzati all'intervento di Gastric By-Pass e nel 37 % dei quelli sottoposti a sleeve gastrectomy. Lo studio mostrava inoltre che i pazienti inclusi nei gruppi chirurgici richiedevano, a 12 mesi di follow-up, una quantità minore di farmaci ipoglicemizzanti, antipertensivi e ipolipemizzanti, mentre un trend inverso si osservava nei pazienti trattati con terapia medica. I soggetti sottoposti ad intervento di chirurgia bariatrica, infine, beneficiavano di un miglioramento dell'insulino-resistenza, espressa attraverso la riduzione dell'indice HOMA-IR.

L'esistenza di fattori in grado di migliorare il compenso glico-metabolico nella malattia diabetica in maniera indipendente dal calo ponderale è supportata da almeno tre linee di evidenza:

- Il miglioramento del controllo glicemico spesso si verifica pochi giorni dopo l'intervento chirurgico, prima che si sia ottenuto un significativo calo ponderale (55, 65-66),
- Il miglioramento del controllo glicemico dopo Gastric By-Pass è più sostanziale rispetto a quello ottenuto con calo ponderale dopo dieta o procedure bariatriche restrittive (67, 68),
- L'esistenza di casi di ipoglicemia iperinsulinemica correlata a iperplasia delle isole pancreatiche o

nesidioblastosi a distanza di tempo da Gastric By-Pass e non dopo procedure puramente restrittive.

Sono state formulate diverse ipotesi per spiegare gli effetti metabolici peso-indipendenti delle procedure bariatriche (64). Le due teorie più conosciute sono entrambe correlate a modifiche della secrezione di peptidi intestinali coinvolti nell'omeostasi glucidica (69). L'ipotesi "dell'intestino distale" o "hindgut" ipotesi suggerisce che controllo glicemico dopo chirurgia bariatrica derivi dal passaggio rapido dei nutrienti verso l'intestino distale, rinforzando la secrezione di mediatori intestinali fisiologici in grado di migliorare il metabolismo glucidico. I potenziali candidati sono il glucagon-like peptide 1 (GLP-1) e il peptide YY (PYY), che risultano entrambi notevolmente aumentati dopo Gastric By-Pass, ma non dopo bendaggio gastrico. Secondo la "foregut" ipotesi o "ipotesi dell'intestino prossimale", l'effetto di alcune procedure bariatriche sul metabolismo glucidico dipende dall'esclusione del duodeno e del digiuno prossimale dal transito dei nutrienti. Oltre alle "hindgut" e "foregut" ipotesi, numerosi altri meccanismi coinvolgenti l'intestino sono stati presi in considerazione: la soppressione della secrezione della ghrelina (70), alterazioni della sensibilità intestinale ai nutrienti, la diversa composizione degli acidi biliari e del microbiota intestinale dopo chirurgia bariatrica (71). Inoltre, altre possibili fattori responsabili sono stati trovati al di fuori del tratto gastroenterico: nella diversione bilio-pancreatica, il malassorbimento dei grassi è tipicamente associato ad una riduzione dei trigliceridi plasmatici sia a digiuno che dopo i pasti. Questo si traduce in una riduzione della disposizione del grasso a livello intramiocellulare nel muscolo scheletrico e in un miglioramento della sensibilità insulinica, poiché questa si associa più strettamente alla riduzione del grasso muscolare che alla perdita della massa grassa (72). In conclusione, numerose ipotesi hanno preso campo negli ultimi anni e probabilmente altre ancora appariranno nel futuro. Nessuna di queste ipotesi è attualmente mutualmente esclusiva con le altre.

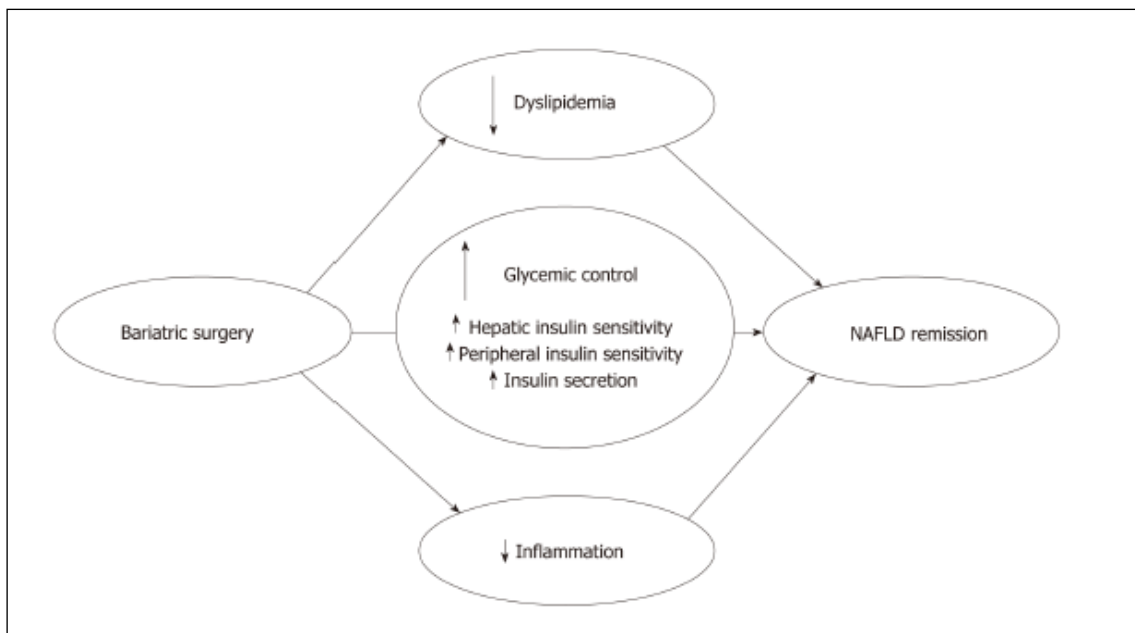
1.4.3 Chirurgia bariatrica e NAFLD

La NAFLD è strettamente associata all'obesità e al DM2, pertanto i meccanismi implicati nel miglioramento dell'obesità e del diabete dopo chirurgia bariatrica, giocano un importante ruolo anche nella risoluzione/miglioramento della NAFLD. Come descritto sopra, diversi fattori indipendenti dal calo ponderale, sono stati descritti come possibili mediatori degli effetti metabolici della chirurgia bariatrica: la ghrelina (72),

l'adiponectina (73), gli aumentati livelli di acidi biliari (74); associati al cambiamento del microbiota intestinale (75).

Pertanto la chirurgia bariatrica determina un miglioramento della NAFLD agendo su più fronti oltre il calo ponderale: migliora l'omeostasi glicemica, migliora il metabolismo lipidico e riduce l'attività infiammatoria. Tutto questo ha un effetto sull'istologia epatica, descritto ormai da numerosi studi (76). Una metanalisi del 2008 ha riportato gli effetti istologici della chirurgia bariatrica sulla NAFLD, concludendo che la steatosi, la setatoepatite e la fibrosi migliorano nella maggior parte dei pazienti in seguito al calo ponderale raggiunto dopo l'intervento (77).

Figura 18 Principali effetti metabolici della chirurgia bariatrica sulla NAFLD



Non ci sono, tuttavia, studi randomizzati e controllati che hanno valutato gli effetti istologici della chirurgia bariatrica sulla NAFLD: nella tabella 4 sono riportati 13 studi, di cui 8 prospettici, 2 retrospettivi e 3 non meglio specificati, comprendenti diversi tipi di procedure bariatriche (gastric bypass, bendaggio gastrico, sleeve gastrectomy) con una numerosità variabile da 9 soggetti a circa 600. Quasi tutti gli studi hanno descritto, alla biopsia epatica post-operatoria, una risoluzione/miglioramento della steatosi, infiammazione e fibrosi epatiche che si accompagnava al calo ponderale e al miglioramento delle comorbidità (diabete, sindrome metabolica, ipertensione arteriosa e sindrome delle apnee ostruttive del sonno) (77).

Altri studi invece hanno valutato l'effetto della chirurgia bariatrica sulla NAFLD, utilizzando gli indici non invasivi di NAFLD/NASH e fibrosi o i livelli circolanti di transaminasi, mostrando la riduzione di questi score e degli enzimi epatici dopo l'intervento (78, 79).

Tabella 4 Studi recenti che hanno valutato l'effetto della chirurgia bariatrica sull' istologia epatica

Table 1 Recent studies (2010-) with histological assessment of liver biopsies at follow-up								
Ref.	Design	Patients with follow-up	Surgical intervention	Steatosis	Inflammation	Fibrosis	Any cases of worsening	Mean/median follow-up in months
Weiner <i>et al</i> ^[73] , 2010	Missing	116	RYGB, AGB, BPD-D5	Improved, 70% complete resolution	Improved, 86% complete resolution	Improved	No	19.4 (± 8.3)
Moretto <i>et al</i> ^[77] , 2012	Retrospective	78	Gastric bypass	Improved	Improved ballooning, 55% complete resolution of NASH	Trend for improvement	Yes	Unknown
Vargas <i>et al</i> ^[78] , 2012	Prospective	26	RYGB	Improved	Improved, 84% complete resolution of NASH	Improved	No	16 (± 3)
Tai <i>et al</i> ^[79] , 2012	Prospective	21	RYGB	Improved, 95% complete resolution	Improved, 100% complete resolution of NASH	Improved	Yes	12
Caiazzo <i>et al</i> ^[74] , 2014	Prospective	578 (1 yr), 413 (5 yr)	RYGB, AGB	Improved	Improved	Improved	NA	12 and 60
Lassailly <i>et al</i> ^[10] , 2015	Prospective	82	Gastric bypass, AGB, SG, BPD-D5	Improved	Improved, 85% complete resolution of NASH	Improved	NA	12
Praveen <i>et al</i> ^[80] , 2015	Prospective	30	RYGB, SG	Improved in 97%	Improved in 46%	Improved in 46%	No	6
Taitano <i>et al</i> ^[75] , 2015	Missing	160	RYGB, AGB	Improved, complete resolution in 73%	Improved, 88% complete resolution of NASH	Improved, 53% complete resolution	Yes	31 (± 26)
Schneck <i>et al</i> ^[81] , 2016	Missing	9	RYGB	Improved in all patients	Improved in all patients	Improved	Yes	55 (44-75)
Froylich <i>et al</i> ^[82] , 2016	Retrospective	25	RYGB, SG	Improved	Improved	Trend for improvement	NA	18
Aldoheyan <i>et al</i> ^[83] , 2017	Prospective	27	SG	Improved	Improved	Improved	NA	3
Manco <i>et al</i> ^[84] , 2017	Prospective	20	SG (n = 20) vs IGWLD, NSWL	Improved	Improved, 100% complete resolution of NASH	Improved	NA	12
Garg <i>et al</i> ^[85] , 2018	Prospective	32	RYGB, AGB, SG	Improved	Improved	Improved	NA	12

RYGB: Roux-en-Y gastric bypass; AGB: Adjustable gastric banding; BPD-D5: Biliopancreatic diversion with duodenal switch; SG: Sleeve gastrectomy; IGWLD: Intra-gastric weight loss device; NSWL: Nonsurgical weight loss; NA: Not assessed.

In conclusione, la chirurgia bariatrica inducendo un significativo calo ponderale e migliorando il DM2 e la sindrome metabolica, determina un miglioramento della NAFLD, mediato anche dall'effetto sul GLP-1, le incretine e le citochine pro infiammatorie coinvolte nella patogenesi della NAFLD (80). La maggior parte degli

studi dimostrano un miglioramento dell'istologia epatica, pochissimi descrivono un peggioramento dell'infiammazione e della fibrosi, nessuno riporta una riduzione della mortalità fegato correlata (81).

Tuttavia, mancano studi randomizzati e controllati su casistiche ampie e con follow up a lungo termine, che identifichino un ruolo diretto della chirurgia bariatrica sull'istologia epatica.

1.5 GLI ACIDI BILIARI

1.5.1 Sintesi e metabolismo

Gli acidi biliari sono molecole anfipatiche sintetizzate nel fegato a partire dal colesterolo, responsabili dell'assorbimento dei grassi e delle vitamine liposolubili, del metabolismo del colesterolo e dell'eliminazione degli xenobiotici. Recentemente è stato dimostrato che, oltre a svolgere queste funzioni, siano importanti regolatori del metabolismo glucidico, lipidico ed energetico (82).

La sintesi degli acidi biliari è un processo complesso che avviene nel fegato e coinvolge almeno 17 enzimi diversi secondo 2 diverse vie, la via classica e la via alternativa, come mostrato in Figura 9. La via classica è quella dominante, responsabile di circa il 75% della produzione di acidi biliari in condizioni fisiologiche, ed è avviata dall'enzima CYP7A1 (colesterolo 7-alfa-idrossilasi). La via alternativa, invece, è iniziata dall'enzima CYP27A1 (colesterolo 27- idrossilasi). È stato dimostrato come il microbiota intestinale regoli l'espressione di molti degli enzimi coinvolti nella sintesi degli acidi biliari, influenzandone quindi la produzione e la composizione (83). La via classica conduce alla sintesi dell'acido colico (CA) e del chenodesossicolico (CDCA), che costituiscono i 2 acidi biliari primari dell'essere umano. La via alternativa, invece, è responsabile per la maggior parte, della sintesi del CDCA. Nel fegato poi, gli acidi biliari primari CA e CDCA sono coniugati con la glicina o con la taurina e successivamente escreti nella bile tramite trasportatori attivi (BSEP) e raccolti nella colecisti, da dove verranno rilasciati nel duodeno in seguito all'ingestione del pasto. Il 95% degli acidi biliari primari secreti nell'intestino vengono poi riassorbiti a livello dell'ileo distale, soprattutto nella forma coniugata, da trasportatori specifici (ASBT, anche conosciuto come IBAT) e ricondotti al fegato, tramite il circolo portale. Questo

processo prende il nome di ricircolo enteroepatico degli acidi biliari e avviene almeno 6 volte al giorno. Anche l'espressione del trasportatore ASBT è influenzata dal microbiota intestinale che, pertanto, contribuisce a regolare non solo la sintesi degli acidi biliari ma anche il riassorbimento. Inoltre, il processo di deconiugazione degli acidi biliari primari nel piccolo intestino, ad opera dei batteri, ne previene il riassorbimento e ne favorisce il passaggio nel colon. Il 5% circa degli acidi biliari sintetizzati dal fegato, dunque, non viene riassorbito e riciclato, ma prosegue lungo l'intestino fino al colon, dove viene convertito dai batteri intestinali in acidi biliari secondari, come il desossicolico (DCA), il litocolico (LCA), l'ursodesossicolico (UDCA), l'iso-ursodesossicolico (iso-UDCA), lo iocolico (HCA), lo iodesossicolico (HDCA). Il LCA e il DCA derivano dalla deidrossilazione rispettivamente del CDCA e del CA. L'UDCA deriva dall'isomerizzazione del CDCA, l'iso-UDCA dall'epimerizzazione del'UDCA. L'HCA e l'HDCA derivano da altri processi che avvengono sempre a carico dei batteri intestinali. Il metabolismo degli acidi biliari ad opera del microbiota, in sintesi, ne aumenta la diversità e ne favorisce l'escrezione fecale, che ammonta a circa il 5% della quota totale di acidi biliari prodotti.

Nella Figura 19 viene schematizzato il processo di sintesi degli acidi biliari, sia primari che secondari; nella Tabella 5 invece viene descritta la classificazione degli acidi biliari in primari e secondari, specificando il meccanismo biochimico che conduce alla formazione dell'acido biliare in questione.

Figura 19 Sintesi e metabolismo degli acidi biliari

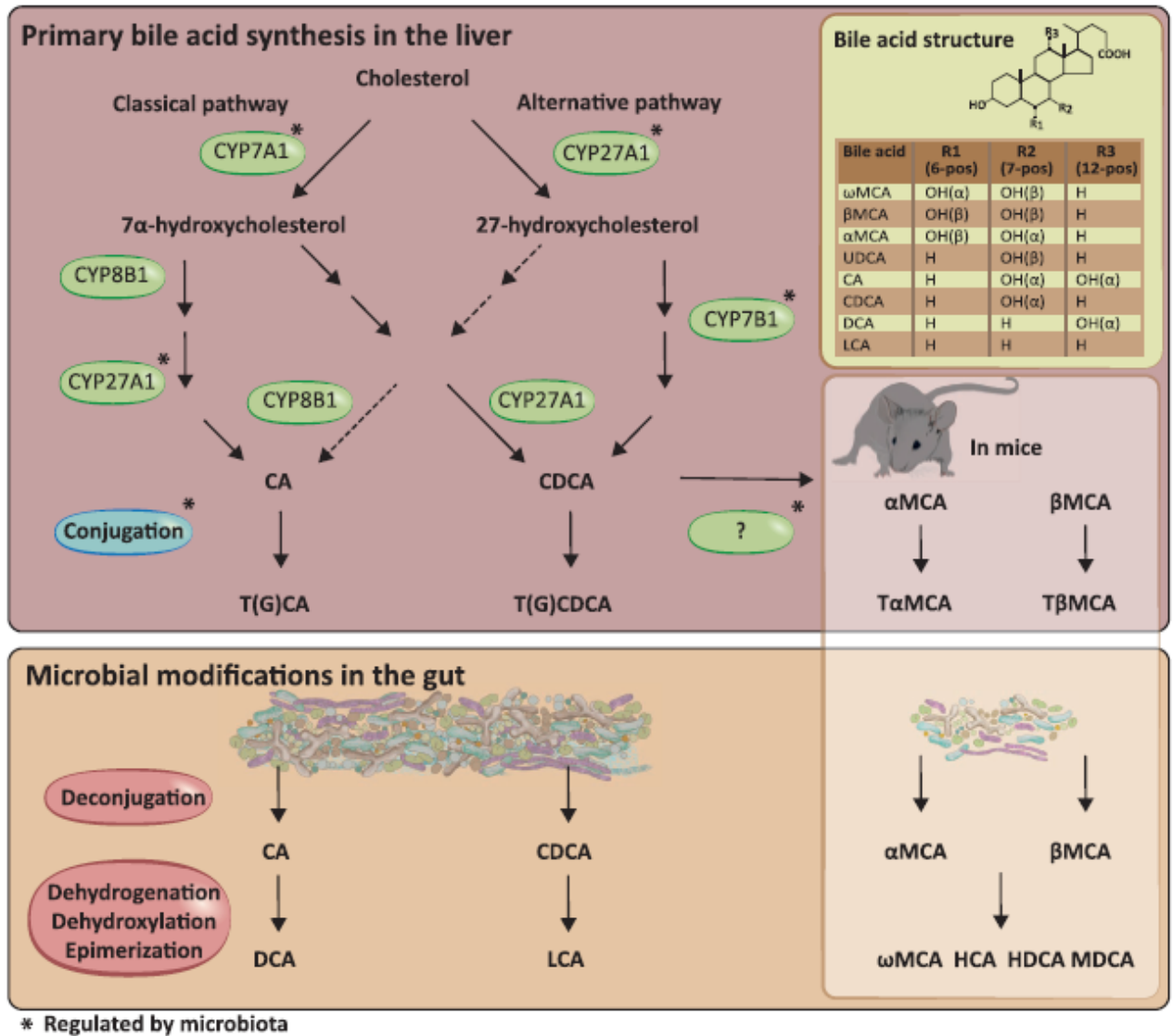


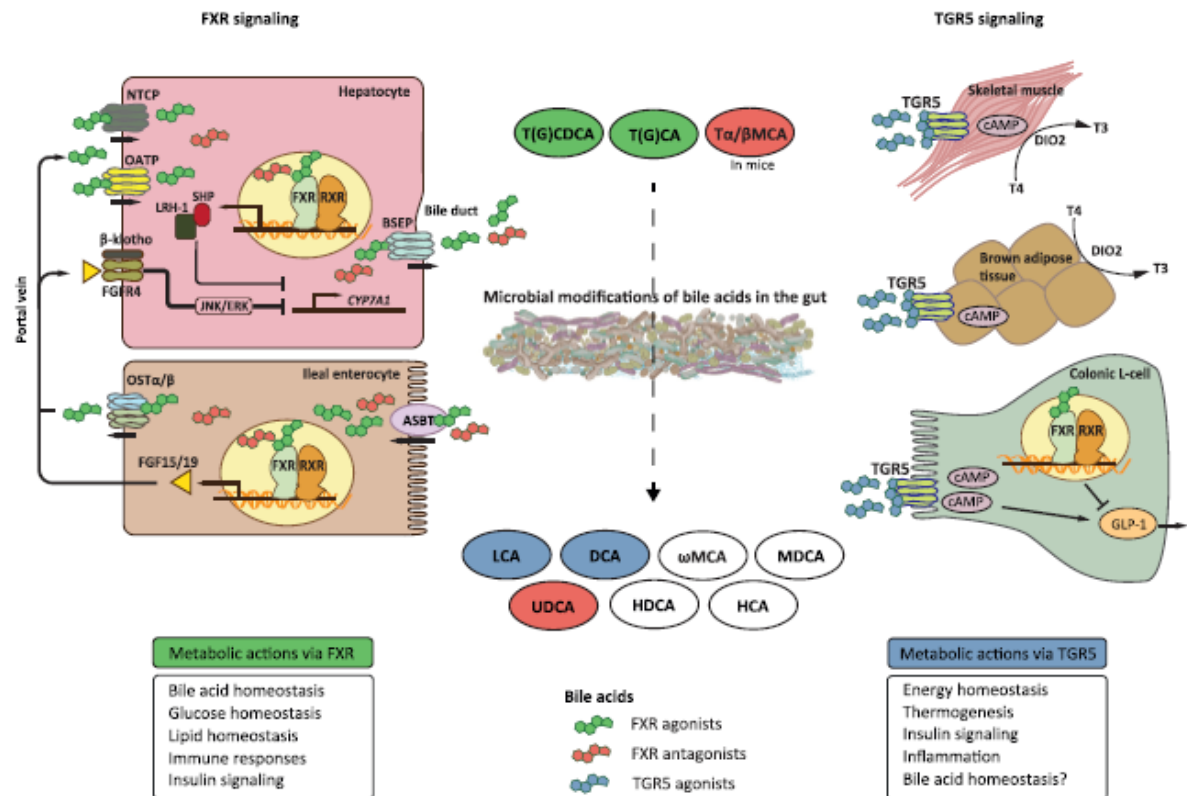
Tabella 1 Classificazione degli acidi biliari

Table 1. Classification of Common Bile Acid Species		
Class	Metabolic Conversions	Bile Acids
Primary bile acids		
	from cholesterol by hepatic classical (neutral) or alternative (acidic) pathways involving >17 enzymes	CA, CDCA in humans CA, CDCA, UDCA, α MCA, β MCA in mice
Secondary bile acids		
	from primary bile acids	
	through gut microbial 7-dehydroxylation	DCA, LCA MDCA in mice
	from primary or secondary bile acids	
	through gut microbial 7 α / β -epimerization	UDCA in humans ω MCA in mice
	through gut microbial 3 α / β -epimerization	iso-bile acids
	through gut microbial 5 β / α -epimerization	allo-bile acids
	through gut microbial oxidation	oxo- (keto-) bile acids

1.5.2 Effetti metabolici degli acidi biliari mediati dai recettori FXR e TGR5

Tra i principali recettori degli acidi biliari vi sono il recettore nucleare Farnesoid X receptor (FXR) e il recettore di membrana G-protein coupled TGR5 (84). Nella Tabella 2 sono descritti i recettori degli acidi biliari, i loro maggiori attivatori e le funzioni da essi regolate.

Figura 20 Metabolismo degli acidi biliari e loro effetti mediati dai recettori FXR e TGR5



FXR e FGF19

FXR è un recettore nucleare espresso in diversi organi, tra i quali quelli in cui più è stato studiato sono rappresentati dal fegato e dall'ileo. Nel fegato, una volta attivato dagli acidi biliari, FXR innesca una serie di reazioni che comportano una **riduzione della sintesi degli acidi biliari**, poiché inibisce l'espressione del gene per l'enzima CYP7A1 che dà l'avvio alla via classica di sintesi. A livello ileale, invece, una volta attivato dagli acidi biliari, FXR comporta l'espressione del Fibroblast Growth Factor 19 (FGF19) che, tramite il circolo portale, raggiunge il fegato e si lega a dei recettori che inibiscono l'espressione di CYP7A1, limitando anche per questa via, la sintesi degli acidi biliari.

Il più importante ligando del recettore FXR è rappresentato dal CDCA, seguito dal CA, LCA e DCA. L'UDCA, invece, è un antagonista di FXR e ne inibisce l'attivazione.

FXR svolge un ruolo fondamentale anche nel metabolismo glucidico: studi hanno dimostrato come topi knock out per il gene FXR sono intolleranti al glucosio e insulino resistenti (85). L'attivazione di FXR, d'altro canto, aumenta la secrezione insulinica nelle cellule pancreatiche e riduce la gluconeogenesi nel fegato (86).

FXR ha anche un ruolo importante nel *regolare il metabolismo glucidico* dopo chirurgia bariatrica: è stato dimostrato come, in seguito a sleeve gastrectomy laparoscopica, topi wild type per FXR mostrino una significativa riduzione della glicemia a digiuno e dell'escursione glicemica in seguito a somministrazione intraperitoneale di destrosio; questo stesso effetto, invece, non si osserva nei topi knock out per lo stesso gene e ugualmente sottoposti a sleeve gastrectomy laparoscopica (71).

FXR è anche un importante *regolatore del metabolismo lipidico*: nei topi, è stato dimostrato come l'acido colico diminuisca i livelli di trigliceridi, tramite la via FXR (87). Pertanto l'aumento degli acidi biliari totali dopo chirurgia bariatrica può migliorare il metabolismo lipidico con un meccanismo mediato dal recettore FXR, indipendente dal calo ponderale e dall'ingestione dei lipidi (74).

In aggiunta agli effetti metabolici, FXR svolge un'importante funzione nel *mantenimento del calo ponderale* e di un corretto comportamento alimentare dopo SGL, con un meccanismo mediato dal FGF19. Nel topo, infatti, sono stati dimostrati dei recettori ipotalamici per il FGF19, la cui stimolazione con somministrazione di FGF19 all'interno dei ventricoli cerebrali, comporta una riduzione dell'apporto calorico e calo ponderale (88).

L'interesse attuale della letteratura nei confronti di FXR e FGF19 deriva dall'osservazione che, in seguito ad interventi bariatrici come il GBP, il FGF19 sembra aumentare ed essere tra i meccanismi responsabili dei miglioramenti metabolici osservati dopo l'intervento. Gerhard ed altri hanno mostrato come, nei pazienti diabetici, il segnale FXR/FGF19 sia meno attivo e il FGF19 è più basso, se confrontato con pazienti non diabetici. Gli stessi autori hanno osservato come, in seguito a GBP, i livelli di FGF19 aumentino rispetto ai valori preoperatori, sia nei diabetici che nei non diabetici, e tale incremento è più evidente nei pazienti, diabetici prima della chirurgia, che vanno incontro a remissione del diabete nel post intervento (89).

Tabella 2 Recettori degli acidi biliari

Receptor	Receptor binding affinity for BA ligand	Receptor location	Function
FXR	CDCA>DCA>LCA>>CA	Liver	<ul style="list-style-type: none"> •Regulation of hepatic BA transporters •BA homeostasis •Lipoprotein metabolism •Glucose metabolism •Liver regeneration
		Ileum	<ul style="list-style-type: none"> •FGF15/19 production •Regulation of intestinal BA transporters
		Kidney	<ul style="list-style-type: none"> •BA resorption
TGR5	LCA>DCA>CDCA>CA	Intestine	<ul style="list-style-type: none"> •GLP-1 production
		Gall bladder	<ul style="list-style-type: none"> •Relaxation of smooth muscle •Stimulating fluid/chloride secretion
		Liver (sinusoidal endothelial cell)	<ul style="list-style-type: none"> •NO production
		Adipocytes, muscle	<ul style="list-style-type: none"> •Increase energy expenditure
Pregnane X receptor (PXR)	LCA and 3-keto-LCA	Macrophages	<ul style="list-style-type: none"> •Reduce inflammatory cytokines
		Intestine	<ul style="list-style-type: none"> •FGF15 production
		Liver	<ul style="list-style-type: none"> •Regulation of BA synthesis •Detoxification of xenobiotics including toxic BA
Vitamin D receptor (VDR)	3-oxo-LCA>LCA>6-keto-LCA	Small intestine	<ul style="list-style-type: none"> •Increase expression of CYP 3A •Regulation of intestinal BA transporters
Sphingosine-1-phosphate receptor 2 (S1PR2)	Conjugated BAs	Liver	<ul style="list-style-type: none"> •Lipid metabolism
Muscarinic receptor	Taurine-conjugated BAs	Various tissues Stomach, colon cancer	<ul style="list-style-type: none"> •Stimulation of pepsinogen

TGR5

TGR5 è un recettore di membrana accoppiato ad una proteina G che viene espresso in diversi tessuti, come l'intestino, la colecisti, il fegato, la milza, il muscolo e il tessuto adiposo bruno.

Nell'intestino, a livello delle cellule enteroendocrine L, gli acidi biliari si legano al recettore TGR5 e *stimolano la produzione di GLP-1*, il quale, aumentando la secrezione insulinica e promuovendo la sazietà, migliora il metabolismo glucidico (90). Dal momento che gli acidi biliari aumentano in seguito a chirurgia bariatrica, l'aumento dei livelli di GLP-1 mediato dagli acidi biliari potrebbe essere uno dei meccanismi che spiegano i miglioramenti glico- metabolici osservati dopo l'intervento.

A livello del muscolo scheletrico e del tessuto adiposo bruno, una volta attivato dagli acidi biliari, il TGR5 stimola l'attività della desiodasi 2, favorendo la **conversione di T4 in T3**, aumentando quindi il metabolismo energetico. Alcuni autori hanno dimostrato come l'aumento dei livelli di acidi biliari dopo l'intervento di GBP si associasse ad una riduzione dei livelli di TSH, come risposta ad un'aumentata conversione del T4 in T3 attivo (74, 91).

1.5.3 Acidi biliari dopo chirurgia bariatrica

Molti studi in letteratura hanno investigato il cambiamento degli acidi biliari in seguito a chirurgia bariatrica, concentrandosi soprattutto sull'intervento di GBP. I vari autori sono sostanzialmente concordi nell'affermare che, in seguito ad interventi come GBP e DBP (74, 92-93) la concentrazione totale degli acidi biliari aumenti. Nella maggior parte degli studi, ma non in tutti, risultano aumentati sia i primari che i secondari (84). Diversamente dal GBP, pochi dati in letteratura sono presenti riguardo ai livelli di acidi biliari dopo SGL e i dati esistenti sono molto in disaccordo. In due studi prospettici, la concentrazione totale di acidi biliari non si modificava dopo 6 e 24 mesi dall'intervento di SGL (94, 95); tuttavia, in uno dei 2 studi, si notava una composizione diversa di acidi biliari nel follow up a 6 mesi, con una riduzione dei livelli coniugati di CA e DCA e un aumento dei livelli di GUDCA (95).

Escalona et al, invece, in uno studio in cui sono stati valutati 19 pazienti obesi sottoposti a SGL, hanno dimostrato che dopo l'intervento aumenta la concentrazione di acidi biliari, in particolare di quelli secondari, mentre diminuiscono i livelli del precursore degli acidi biliari C4 (7-idrossi-4-colestene-3-1) ad indicarne una ridotta sintesi, verosimilmente dovuta all'aumento dei livelli di FGF19 riscontrato negli stessi pazienti dopo l'intervento (96). Nella Tabella 7 sono mostrati i risultati dei diversi studi in merito all'andamento degli acidi biliari dopo chirurgia bariatrica.

Tabella 3 Cambiamento degli acidi biliari dopo chirurgia bariatrica

Type of surgery	Type of study*	Human/animal (Participant number)	Final assessment time point	Changes in fasting BA	Changes in postprandial BA	Changes in conjugated BA	Changes in BA composition
RYGB	Prospective	Human (7)	1 year	Increased	Increased		PP CA ↑ PP CDCA ↑ PP DCA ↑
RYGB	Prospective	Human (5)	40 weeks	Unchanged	Increased	Conjugated BA ↑	
RYGB	Prospective	Human (8)	20 % weight loss	2.5-fold ↑	2.5-fold ↑	Conjugated BA ↑	Primary and secondary BA ↑
RYGB	Prospective	Human (63)	15 months	Increased	Increased	Unconjugated and glycine-conjugated BA ↑	F/PP DCA ↑ F/PP GDCA ↑ F GLCA ↓ PP GLCA ↑ PP GDCA ↑ PP GUDCA ↑ CA ↑ CDCA ↑ DCA ↑
RYGB	Prospective	Human** (36)	201 ± 124 days	Increased			
RYGB	Prospective	Human (12)	42 days	Increased			
RYGB	Prospective	Human (30)	1 year	2-fold ↑		Ratio of Taurine to glycine-conjugated BA ↓	Secondary BA ↑ DCA ↑ GLCA ↑ TCA ↓
RYGB	Prospective	Human (35)	3 months	Increased			
RYGB	Prospective	Human (13)	2 years	Increased	Increased		Ratio of 12 α -hydroxylated to non-12 α -hydroxylated BA ↑
RYGB	Prospective	Human (21)	2 years	Increased		Glycine-conjugated DCA	CA ↑, CDCA ↑, DCA ↑, GDCA ↑, HCA ↑
RYGB	Cross-sectional vs. control	Human (11 vs. 11)	33.8 ± 16.4 months	Increased	Increased	Increased	
RYGB	Cross-sectional vs. control subjects	Human (33 vs. 8)	>1 year	Increased	Increased insignificantly		
RYGB	Cross-sectional vs. morbid obese or overweight subjects	Human (9 vs. 15)	2–4 years	2.3–2.5 fold ↑		Conjugated BA ↑	GCA ↑ GDCA ↑ GDCA ↑ TDCA ↑ PP Primary BA ↑ PP DCA ↑
RYGB	Cross-sectional vs. gastric banding	Human (30 vs. 28)	≥8 % weight loss		Increased	Glycine-conjugated BA ↑	
LSG	Prospective	Human (17)	24 months	Unchanged			GCA ↓ TCA ↓ DCA ↓ GUDCA ↑
LSG	Prospective	Human (18)	6 months	Unchanged			No change in PP CA, CDCA, DCA Primary BA ↑
LSG	Prospective	Human (7)	1 year	Increased	Unchanged		
RYGB or LSG/ DJB	Prospective	Human (13/6)	3 months	Increased			
LSG or LAGB	Prospective	Human (9/6)	3 months	Increased			Primary BA ↑ Secondary BA ↑
LAGB	Prospective	Human (10)	20 % weight loss	Decreased	Unchanged	Fasting conjugated BA ↓, no change in PP conjugated BA	
LAGB	Prospective	Human (6)	42 days	Unchanged			
RYGB	Cross-sectional vs. sham	Normoglycemic rats (6)	28 days	Increased			Ratio of CA derivatives to CDCA derivatives ↓
RYGB	Cross-sectional vs. sham	Rats (13)	8 weeks	Increased		GCA ↑, GDCA ↑	
RYGB	Cross-sectional vs. obese mice	Mice (5)	8 weeks	Unchanged			
VSG	Cross-sectional vs. ad libitum fed and weight matched sham	Rats (13)	5 months	Increased		Taurine-conjugated BA ↑	CA ↑ MCA ↑ CDCA ↑ DCA ↑ HDCA ↑ CA ↑ TUDCA ↑
VSG	Cross-sectional vs. Naïve, Sham, Sham-pair feeding	Mice (6)	60 days	Increased at 14 and 28 days post-surgery	Increased	Taurine-conjugated BA ↑	
VSG	Cross-sectional vs. sham	Rats	50 days	Increased			

2. OBIETTIVI

Questo lavoro è rivolto allo studio del paziente con obesità patologica, con e senza diabete, candidato ad intervento di sleeve gastrectomy laparoscopica (SGL) con biopsia epatica intraoperatoria, con la possibilità di indagare, anche dopo importante calo ponderale nel follow up postoperatorio, i seguenti aspetti:

STUDIO A

Correlare i dati istologici delle biopsie epatiche con le seguenti variabili:

- caratteristiche antropometriche, cliniche e metaboliche
- tolleranza glucidica valutata con OGTT (OGTT solo nei soggetti non diabetici) e indici surrogati di resistenza, sensibilità e secrezione insulinica (HOMA IR, OGIS, Matsuda Index, Disposition Index, Hepatic IR, Insulogenic Index)
- enzimi epatici
- indici non invasivi di steatosi epatica (FLI, HSI, NAFLD-LFS, LAP, VAI, Tyg)
- indici non invasivi di fibrosi epatica (FIB-4, NFS, APRI, BAAT, BARD)
- liver stiffness measurement (LSM) rilevata con tecnica elastografica ARFI (Acoustic Radiation Force Impulse)
- livelli plasmatici di acidi biliari e FGF19, misurati a digiuno e dopo pasto misto

al fine di individuare potenziali marcatori non invasivi in grado di predire la severità dell'istologia epatica nel paziente con obesità patologica, con e senza diabete tipo 2.

STUDIO B

Valutare l'effetto della SGL sulla NAFLD e sulla NASH dopo 12 mesi dall'intervento, utilizzando i marcatori non invasivi predittivi di severità dell'istologia epatica che nello studio A hanno mostrato maggiore accuratezza nel confronto con il gold standard della biopsia epatica.

Tali valutazioni verranno effettuate anche considerando separatamente i soggetti con diabete e senza diabete al fine di indagare se la presenza del diabete prima della SGL e

la sua eventuale remissione dopo l'intervento chirurgico possano influire sulla risoluzione/miglioramento della NAFLD e dell NASH.

3. SOGGETTI E METODI

3.1.SOGGETTI

Lo studio riporta i dati di 90 pazienti con obesità patologica (73 donne e 17 uomini), di età compresa tra 18 e 65 anni (40.3 ± 11.6) con un peso compreso tra 87 e 176 Kg (118.1 ± 17.8) ed un BMI compreso tra 32.9 e 59.6 kg/m^2 (43.2 ± 5.9), che sono stati reclutati consecutivamente da ottobre 2017 e aprile 2018 e sottoposti a sleeve gastrectomy laparoscopica (SGL) e a biopsia epatica intraoperatoria presso il Dipartimento di Scienze e Biotecnologie Medico – Chirurgiche, Università Sapienza, Polo Pontino di Latina. Questa coorte comprendeva 21 soggetti con ridotta tolleranza ai carboidrati (IGT) e 13 soggetti diabetici, con una prevalenza del DM2 nell'intera casistica del 14%, che risulta inferiore a quella notoriamente descritta in letteratura che è di circa il 20% (55).

Il comitato etico ha approvato il presente studio clinico e tutti i soggetti studiati hanno firmato un consenso informato.

Tabella 4 Caratteristiche basali dei soggetti inclusi nello studio

	Intera Coorte
Numero	90
NGT/IGT/DM2	56/21/13
Età (anni)	40.3 ± 11.7 (18-65)
Gender (M/F)	17/73
Peso (Kg)	118.1 ± 17.8 (87-176)
BMI (Kg/m^2)	43.2 ± 5.9 (32.9-59.6)

I **criteri di inclusione** allo studio erano i seguenti:

- età superiore compresa tra 18 e 65 anni;

- eleggibilità alla chirurgia bariatrica (SGL), in accordo alle linee guida internazionali (36, 97)

I criteri di esclusione dallo studio erano i seguenti:

- malattia epatica differente da NAFLD;
- necessità di trapianto epatico o malattia epatica avanzata con complicanze (sanguinamento da varici esofago-gastriche o ascite);
- uso di farmaci capaci di peggiorare una steatoepatite, di antibiotici e/o di pre-probiotici nei precedenti 3 mesi;
- apporto etilico > 20 gr di etanolo/die;
- uso di vitamina E o olio di pesce nei precedenti 2 mesi;
- positività per Helycobacter Pylori;
- malattie croniche gastrointestinali compresa la stipsi (meno di 2 evacuazioni alla settimana);
- precedente chirurgia sul tratto gastrointestinale (che possa averne modificato l'anatomia).

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a biopsia epatica intraoperatoria durante SGL e, in accordo alla presenza o meno di NAFLD definita secondo linee guida EASL-EASD-EASO (27), sono stati suddivisi in 3 gruppi così come segue:

- gruppo A, con presenza di grasso in meno del 5% degli epatoociti e pertanto definito NO-NAFLD
- gruppo B, con steatosi semplice o associata ad infiammazione lobulare o portale in assenza di degenerazione balloniforme (ballooning) oppure steatosi associata a degenerazione balloniforme in assenza di infiammazione, definito STEATOSI SEMPLICE (SS)
- gruppo C, caratterizzato dalla presenza congiunta di steatosi, degenerazione balloniforme e infiammazione lobulare, definito NASH

3.2 VALUTAZIONE CLINICA ED ESAMI EFFETTUATI

Tutti i pazienti operati sono stati valutati prima e dopo 12 mesi dall'intervento di SGL con:

- **anamnesi ed esame clinico** con rilevazione dei parametri antropometrici
- **esami ematochimici** per lo studio del metabolismo glucidico, lipidico ed epatico
- curva da carico orale con 75 grammi di glucosio (**OGTT**) e rilevazione della glicemia e dell'insulinemia ai tempi 0, 30, 60, 90 e 120 minuti dalla somministrazione del glucosio. Questo esame è stato effettuato in tutti i soggetti senza diabete noto, con una glicemia a digiuno inferiore a 126 mg/dl. Per ogni OGTT effettuato, è stata poi calcolata l'area sotto la curva (AUC) delle glicemie e insulinemie effettuate a 0, 30, 60, 90 e 120 minuti dall'assunzione del glucosio.
- **test del pasto misto**, effettuato in un giorno diverso rispetto all'OGTT, con 250 ml di Oxepa con l'esecuzione di ulteriori prelievi ematici a 90 e 120 minuti dall'assunzione del pasto liquido. La quantità totale di calorie somministrate era 375 Kcal (55.5% di grassi, 28% di carboidrati, 16.5% di proteine). Questo test aveva lo scopo di misurare la concentrazione degli acidi biliari circolanti, del loro precursore C4 e del FGF19 non solo a digiuno ma anche dopo lo stimolo del pasto. La concentrazione degli acidi biliari, precursore C4 e FGF19 dopo pasto misto è stata calcolata ed espressa come area sotto la curva (AUC) delle misurazioni effettuate a 0, 90 e 120 minuti dall'assunzione del pasto.
- ecografia epatica con tecnica elastografica **ARFI** (Acoustic Radiation Force Impulse), integrata direttamente nell'ecografo Siemens Acuson SD2000 (Siemens Healthcare, Germany), che è una misura della rigidità (stiffness) del tessuto epatico. L'ARFI valuta la velocità di spostamento di un'onda ultrasonora (di potenza più elevata rispetto a quella necessaria per ottenere l'immagine) all'interno di una regione di interesse (ROI) del fegato, collocata tra i 2.5 e 6.5 cm al di sotto del piano cutaneo. L'esame è stato effettuato nel corso di un'ecografia epatica. I risultati sono stati espressi in Kilopascals (kPa)
- valutazione degli indici di insulino-resistenza e secrezione insulinica sotto elencati. Nei soggetti con diabete noto nei quali non era prevista l'esecuzione dell'OGTT, sono stati calcolati gli indici di insulino resistenza derivati dai valori basali di glicemia e insulinemia
- valutazione degli indici non invasivi di steatosi e fibrosi epatica sotto descritti

La diagnosi di DM2 è stata effettuata in accordo ai criteri internazionali ADA o all'assunzione di ipoglicemizzanti orali (98). L'ipertensione arteriosa, la dislipidemia e la sindrome metabolica sono stati definiti in accordo ai criteri internazionali International Diabetes Federation (IDF) (99).

3.2.1 Indici di insulino-resistenza

Sulla base delle glicemie e insulinemie misurate a digiuno o durante OGTT, sono stati calcolati per tutti i pazienti i seguenti indici:

- **HOMA-IR** (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) calcolato come $(\text{insulinemia a digiuno (mU/L)} \times \text{glicemia a digiuno (mmol/L)})/22.5$ (100, 101)
- **Matsuda Index** calcolato sulla base delle glicemie e insulinemie registrate durante OGTT in accordo alla letteratura (102).
- **OGIS** (Oral Glucose Insulin Sensitivity index) indice dinamico di insulino sensibilità che misura la clearance periferica del glucosio durante OGTT e riflette la sensibilità periferica all'insulina, calcolato secondo specifici algoritmi (101, 103)
- **Hepatic IR index**: calcolato come il prodotto dell'area sotto la curva (AUC) delle glicemie e insulinemie dei primi 30 minuti dell'OGTT ($\text{glicemia 0-30[AUC]} \times \text{insulinemia 0-30[AUC]}$) (104).

3.2.2 Indici di secrezione insulinica

La secrezione insulinica è stata valutata sulla base delle glicemie e insulinemie misurate durante OGTT, con i seguenti indici:

- **Insulino-Genic Index** (IGI) calcolato come il rapporto tra le concentrazioni di insulina e di glicemia dei primi 30 minuti dell'OGTT, ovvero $\text{IGI} = (I_{30} - I_0)/(G_{30} - G_0)$. E' una misura della funzione beta cellulare.
- **Disposition Index** che rappresenta il prodotto della sensibilità insulinica per la secrezione insulinica, dopo lo stimolo del glucosio (105).
- **Insulin Response** ottenuto dal rapporto tra le aree incrementali sotto la curva di insulinemia e glicemia durante OGTT, da 0 a 120 minuti, dAUC-I/dAUC-G

3.2.3 Indici non invasivi di steatosi e fibrosi epatica

In accordo a quanto descritto in letteratura (31-33, 106, 107), per ogni paziente sono stati calcolati i seguenti score non invasivi di steatosi e fibrosi epatica:

INDICI DI STEATOSI

•**Fatty Liver Index (FLI)** = $(e^{0.953 \cdot \log(\text{trigliceridi})} + 0.139 \cdot \text{BMI} + 0.718 \cdot \log(\text{GGT}) + 0.053 \cdot \text{circonferenza vita [cm]} - 15.745) / (1 + e^{0.953 \cdot \log(\text{trigliceridi})} + 0.139 \cdot \text{BMI} + 0.718 \cdot \log(\text{GGT}) + 0.053 \cdot \text{circonferenza vita [cm]} - 15.745) \times 100$;

•**NAFLD Liver Fat Score (NAFLD-LFS)** = $-2.89 + 1.18 \times \text{Sindrome Metabolica (Si: 1, No: 0)} + 0.45 \times \text{Diabete tipo 2 (Yes: 2, No: 0)} + 0.15 \times \text{Insulinemia in mU/L} + 0.04 \times \text{AST in U/L} - 0.94 \times \text{AST/ALT}$;

•**Hepatic Steatosis Index (HSI)** = $8 \times \text{ALT/AST} + \text{BMI} (+2 \text{ in presenza di diabete, } +2 \text{ per genere femminile})$;

•**Lipid Accumulation Product (LAP)** differente a seconda del genere e calcolato come: Maschi = $(\text{circonferenza vita [cm]} - 65) \times (\text{Trigliceridi [mmol/L]})$, Femmine = $(\text{circonferenza vita [cm]} - 58) \times (\text{Trigliceridi [mmol/L]})$

•**Triglycerides and glucose (TyG) index**: $\text{Ln}(\text{trigliceridi (mg/dl)}) \times \text{glicemia a digiuno (mg/dl)}/2$;

•**Visceral Adiposity Index (VAI)**: differente a seconda del genere e calcolato come:

$\text{VAI(Maschi)} = [\text{circonferenza vita}/39,68 + (1,88 \cdot \text{BMI})] \cdot (\text{Trigliceridi}/1,03) \cdot (1,31/\text{HDL})$;

$\text{VAI(Femmine)} = [\text{circonferenza vita}/36,58 + (1,89 \cdot \text{BMI})] \cdot (\text{Trigliceridi}/0,81) \cdot (1,52/\text{HDL})$;

INDICI DI FIBROSI

•**Fibrosis 4 Calculator (FIB4)** = $(\text{Età} \times \text{AST}) / (\text{piastrine} \times 10^9/\text{L} \times \sqrt{\text{ALT}})$

•**NAFLD Fibrosis Score (NFS)** = $-1.675 + 0.037 \times \text{Età (anni)} + 0.094 \times \text{BMI (kg/m}^2) + 1.13 \times \text{alterata glicemia a digiuno/diabete (si = 1, no = 0)} + 0.99 \times \text{AST/ALT ratio} - 0.013 \times \text{Piastrine} (\times 10^9/\text{L}) - 0.66 \times \text{Albumina (g/dL)}$

•**AST to platelet ratio index (APRI)** = $\text{AST (IU/L)} / \text{AST al limite massimo di normalità (IU/L)} / \text{Piastrine} (10^9/\text{L}) \times 100$

•**BARD (Body mass index, AST/ALT Ratio, Diabetes)** = $\text{BMI} \geq 28 \text{ kg/m}^2$ (si = 1, no = 0); $\text{AST/ALT ratio} \geq 0.8$ (yes = 2, no = 0); diabete (si = 1 , no = 0)

•**BAAT (BMI, ALT, AST, Trigliceridi)**= età ≥ 50 (si = 1, no = 0); BMI ≥ 28 kg/m² (yes = 1, no = 0); trigliceridi (≥ 150 mg/dl = 1, no = 0); ALT ≥ 2 volte il limite di normalità (si = 1, no = 0)

3.2.4 Analisi degli acidi biliari

Gli acidi biliari e il FGF19 sono stati dosati sia a digiuno sia dopo stimolo grasso, ai tempi 60 e 90 minuti dalla somministrazione del pasto liquido. Le concentrazioni degli acidi biliari e del FGF19 misurate dopo stimolo grasso, sono state espresse come area sotto la curva (AUC) dei valori rilevati a 0, 90 e 120 minuti dalla somministrazione del pasto.

L'estrazione e l'analisi degli acidi biliari si è basata su un metodo che ha utilizzato una ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLCMS)⁴². Gli acidi biliari sierici sono stati estratti attraverso una precipitazione di proteine con 10 ml di metanolo. I campioni sono stati vorticati a 20000 rpm per 10 minuti. Il supernatante ottenuto è stato diluito 10 volte in metanolo:acqua (1:1). Gli standard degli acidi biliari sono stati ottenuti da Sigma-Aldrich (Sweden), CDN isotopes (Quebec, Canada) e Toronto Research Chemicals (Downsview, Ontario, Canada).

La concentrazione di FGF19 è stata misurata usando un Kit ELISA (Human FGF19 Quantikine, ELISA kit, R&D Systems e Human GLP1 Quantikine ELISA kit, R&D Systems). I campioni sono stati diluiti (1:1.2) usando Calibrator diluent RD5P (1X) fornito dal Kit. Il dosaggio è stato effettuato usando 100 μ l di ogni campione seguendo le istruzioni del kit.

3.2.5 Sleeve Gastrectomy Laparoscopica

L'intervento di SGL, eseguito sempre secondo la tecnica di Gagner con volume gastrico residuo di 80 ml, è stato effettuato per tutti i pazienti in laparoscopia, presso Dipartimento di Scienze e Biotecnologie Medico – Chirurgiche, Università Sapienza, Polo Pontino di Latina dal Prof. Gianfranco Silecchia e la sua equipe (Centro di Eccellenza europeo per la Chirurgia Bariatrica) (108).

3.2.6 Biopsia epatica

Durante l'intervento di SGL, i pazienti venivano sottoposti ad una **biopsia epatica** (1.5 cm x 1.5 cm) sul terzo segmento e i campioni raccolti venivano trasferiti in azoto

liquido e successivamente congelati a -80°C . Tutte le biopsie sono state revisionate da un singolo anatomo patologo. Le caratteristiche istologiche della NAFLD, ovvero la steatosi, l'infiammazione e la degenerazione balloniforme, così come la fibrosi sono state definite e quantificate in accordo alla classificazione di Kleiner et al. (109).

La diagnosi di NASH è stata definita come la presenza congiunta di steatosi, degenerazione balloniforme e infiammazione lobulare, in presenza o meno di fibrosi (27).

Il grado di steatosi è stato definito in accordo alla percentuale di epatociti coinvolti: S0 se gli epatociti coinvolti erano meno del 5%, S1 per 5-33% degli epatociti, definita lieve; S2 per il 33-66% degli epatociti, definita moderata; S3 per una percentuale maggiore del 66%, definita severa. Relativamente alla fibrosi epatica, invece, lo stadio 1 si riferisce alla fibrosi perisinusoidale o periportale; lo stadio 2 è caratterizzato da fibrosi perisinusoidale e portale/periportale; lo stadio 3 dalla fibrosi a ponte e lo stadio 4 dalla cirrosi (109).

3.3 TEST STATISTICI

Le variabili quantitative sono espresse come media \pm DS per i valori parametrici, a distribuzione normale, e come mediana (valore minimo – valore massimo) per i valori non parametrici, a distribuzione non normale.

Per l'analisi statistica dei dati è stato utilizzato il software SPSS 22.0, versione italiana. In particolare, per confrontare le medie o le percentuali sono stati applicati i seguenti test:

- Il test T - student (per campioni appaiati o indipendenti) per 2 gruppi di variabili parametriche;
- il test di Anova per più gruppi di variabili parametriche;
- il test di Wilcoxon per più gruppi di variabili non parametriche;
- Il test del χ^2 tra variabili qualitative;

Per valutare l'associazione tra indici di resistenza e secrezione insulinica e le caratteristiche dell'istologia epatica (steatosi, fibrosi, infiammazione) è stata utilizzata la correlazione bivariata di Pearson.

Per analizzare l'accuratezza diagnostica dei vari indici non invasivi di steatosi e fibrosi epatica sono state effettuate le analisi di curva ROC, con determinazione dell'area sotto la curva (AUROC) per identificare i cutoff con le migliori sensibilità e specificità.

Un valore di p inferiore a 0.05 (2 code) è stato considerato come statisticamente significativo.

4. RISULTATI

4.1 CARATTERISTICHE DEI SOGGETTI

Le caratteristiche basali dei 90 pazienti con obesità patologica inclusi nello studio sono mostrate nella Tabella 9. La maggior parte dei pazienti era di genere femminile (73/17 F/M) e il BMI medio era di 43,2 Kg/m². Il 14% era affetto da diabete tipo 2, il 28% da ipertensione arteriosa, il 49% da dislipidemia e il 43% da sindrome metabolica, definite secondo i criteri internazionali (99).

La prevalenza della NAFLD nell'intera coorte era del 77%. In base ai risultati dell'istologia epatica abbiamo distinto 3 gruppi di pazienti: gruppo A, senza NAFLD e dunque con fegato istologicamente sano, composto da 21 soggetti (23%); gruppo B con steatosi semplice, composto da 47 soggetti (53%) e gruppo C con NASH o steatoepatite composto da 22 soggetti (24%).

Al fine di individuare possibili variabili predittive di severità dell'istologia epatica nel grande obeso, abbiamo confrontato dapprima i soggetti senza NAFLD (gruppo A) con quelli con NAFLD (gruppo B+C) e successivamente i pazienti con steatosi semplice (gruppo B) con quelli con steatoepatite (gruppo C), per quanto riguarda:

- caratteristiche demografiche, antropometriche, cliniche, metaboliche e istologiche e assetto ematico epatico (Tabella 9)
- tolleranza glucidica studiata, nei pazienti senza diabete noto, con OGTT e con le aree sotto la curva (AUC) delle glicemie e insulinemie registrate a 0, 30, 60, 90 e 120 minuti dopo curva da carico, con indici surrogati di sensibilità insulinica (Matsuda Index, OGIS) resistenza insulinica (HOMA-IR, Hepatic Insulin Resistance index) e secrezione insulinica (Insulinogenic Index (IGI), Disposition Index e Insulin Response) (Tabella 10)
- indici non invasivi di steatosi (FLI, HSI, LAP, NAFLD-LFS, Tyg, VAI) e fibrosi epatica (FIB-4, NFS, APRI) e indice ARFI rilevato all'ecografia epatica (Tabella 11)

- livelli circolanti di acidi biliari, del loro precursore C4 e del FGF19 dosati a digiuno e dopo pasto misto e misurati con AUC dei valori rilevati a 0', 90' e 120 minuti dopo stimolo (risultati mostrati successivamente in un capitolo dedicato).

4.1.1 Caratteristiche cliniche, metaboliche e istologiche dei soggetti

Non si osservavano differenze significative tra i gruppi per quanto riguarda età, genere, BMI e le altre caratteristiche antropometriche Tabella 9.

La prevalenza del DM2 e delle altre comorbidità dell'obesità patologica (ipertensione arteriosa, dislipidemia e sindrome metabolica) era più alta nei pazienti con NAFLD, come atteso, sebbene questo risultato fosse statisticamente significativo solo per il DM2 e la sindrome metabolica. D'altro canto, non si osservavano differenze statisticamente significative tra pazienti con steatosi semplice e pazienti con steatoepatite, sebbene il numero dei pazienti con diabete tendesse ad aumentare con la severità del danno epatico (NASH > steatosi semplice > NO NAFLD) come mostrato in Tabella 9. Va sottolineato, infatti, che nel gruppo di pazienti con fegato sano all'istologia (gruppo A) non c'era neanche un soggetto diabetico. Di tutti i soggetti diabetici inclusi nello studio (n=13), 6 pazienti sono stati diagnosticati nel corso del work up preoperatorio, 4 avevano una durata di malattia inferiore a 5 anni e 3 una durata compresa tra 5 e 10 anni.

Relativamente ai dati della biopsia epatica, il grado di steatosi, infiammazione lobulare e degenerazione balloniforme (ballooning) era significativamente differente tra tutti i gruppi (NASH > steatosi semplice > NO NAFLD), come atteso, mentre il grado di fibrosi mostrava differenze significative solo tra pazienti senza NAFLD (gruppo A) e pazienti con NAFLD (gruppo B e C), mentre i pazienti con steatosi semplice (gruppo B) e quelli con steatoepatite (gruppo C) apparivano simili tra loro (Tabella 9). La maggior parte dei pazienti dello studio mostrava uno stadio di fibrosi lieve (F1) e solo 13 pazienti un quadro di fibrosi \geq F2, mentre nessuno aveva fibrosi F4. Nei soggetti diabetici, si osservava una prevalenza maggiore di fibrosi epatica, come sarà descritto successivamente nel capitolo 4.6.

Le transaminasi e GGT, così come i trigliceridi, l'uricemia, la glicemia a digiuno e l'emoglobina glicata erano significativamente maggiori nei pazienti con NAFLD, ma nessuna di queste variabili mostrava differenza significativa nel confronto tra soggetti

con steatosi semplice e NASH. Solo l'HDL mostrava valori significativamente più bassi nei pazienti con steatoepatite rispetto a quelli con steatosi semplice.

Figura 21 Enzimi epatici nei 3 gruppi di pazienti (NO-NAFLD in verde, steatosi semplice in arancione, NASH in rosso) *p < 0.05 NAFLD vs NO-NAFLD

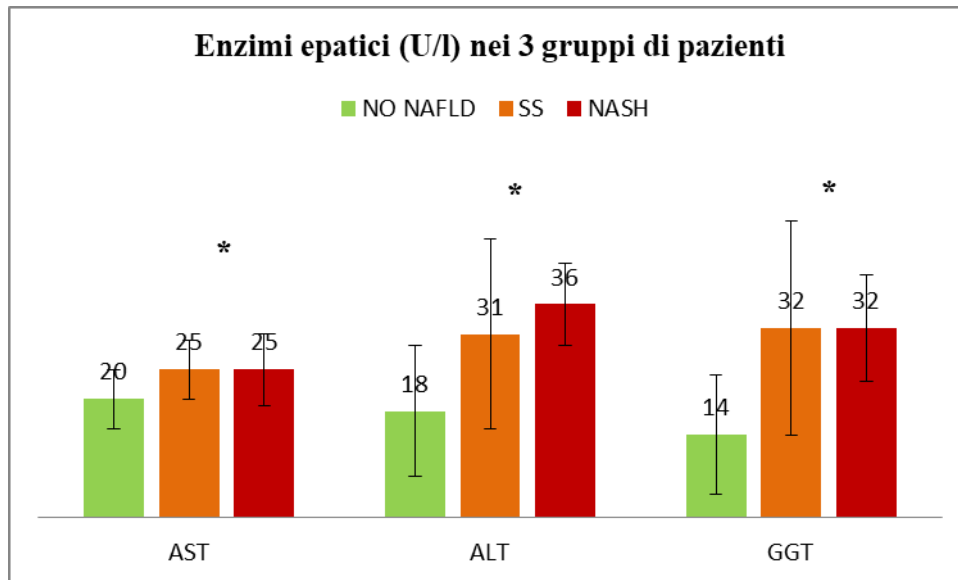


Tabella 9 Caratteristiche basali dei pazienti: confronto tra pazienti senza NAFLD alla biopsia (gruppo A), pazienti con steatosi semplice (gruppo B) e pazienti con steatoepatite o NASH (gruppo C). Le significatività statistiche sono state effettuate nel confronto tra pazienti NO NAFLD (gruppo A) verso pazienti con NAFLD (gruppo B e C) e poi tra pazienti con steatosi semplice (gruppo B) vs pazienti con NASH (gruppo C)

	Intera coorte (n=90)	A NO NAFLD (n=21)	B SS (n=47)	C NASH (n=22)	P A vs B/C	P B vs C
Caratteristiche demografiche						
Età (anni)	40.3 ± 11.7	41.1 ± 12.5	39.1 ± 11.3	42.5 ± 11.9	ns	ns
Genere (F/M)	73/17	19/2	35/12	19/3	ns	ns
Caratteristiche Cliniche						
NGT/IGT/DM2 (%)	62/24/14	78/22/0	59/26/15	47/18/35	0.05	ns
Ipertensione arteriosa (%)	28	19	30	32	ns	ns
Dislipidemia (%)	49	43	51	50	ns	ns
Sindrome Metabolica (%)	43	24	51	45	0.05	ns
Biopsia epatica						
Steatosi S0, S1/S2, S3 (%)	24/46/32	100/0/0	0/68/36	0/41/59	<0.0001	0,009
Infiammazione(%)	58	43	45	100	0.008	<0,0001
Balloning (%)	34	0	17	100	0.001	<0,0001
Fibrosi F0, F1, F2/F3,F4 (%)	9/77/14/0	19/81/0/0	8.5/70/21.5/0	0/86/14/0	0.05	ns
Caratteristiche Antropometriche						
Peso corporeo (Kg)	118.1 ± 17.8	113.7 ± 15.8	121.4 ± 16.6	114.8 ± 21.3	ns	ns
Circonferenza vita	126.8 ± 13.3	119.9 ± 14.1	128.2 ± 12.9	120.4 ± 9.9	ns	ns

(cm)						
BMI (Kg/m²)	43,18±5.92	41.82±5.30	44.02±5.94	42,43± 6,36	ns	ns
Indici ematici epatici						
ALT (U/L)	29.6 ± 16.2	18.1 ± 5.0	31.5 ± 16.3	36.1 ± 17.6	<0.001	ns
AST (U/L)	23.8 ± 10.1	20.3 ± 4.9	24.6 ± 11.4	25.1 ± 10	0.02	ns
GGT (U/L)	27.2 ± 21.9	14.3 ± 5.6	32.0 ± 26.9	31.7 ± 7.8	0.03	ns
Fibrinogeno (g/L)	362.8 ± 55.7	377.4 ± 24.5	375 ± 51.8	286.3 ± 43.9	ns	0.02
Piastrine (x10⁹/L)	281.3 ± 59.9	279.9 ± 53.1	274.4 ± 60.6	300.5 ± 63.9	ns	ns
Variabili ematiche metaboliche						
Colesterolo totale (mg/dl)	192.0 ± 30.9	192.5 ± 33.4	193.3 ± 32.7	188.5 ± 24.8	ns	ns
HDL (mg/dl)	49.4 ± 11.5	50.7 ± 11.7	51.2 ± 12.2	43.7 ± 7.6	ns	0.02
LDL (mg/dl)	114.7 ± 27.8	119.9 ± 31.2	112.9 ± 29.01	114.2 ± 21.1	ns	ns
Trigliceridi (mg/dl)	137.5 ± 56.0	108 ± 49.7	142.1 ± 59.4	153.1 ± 44.1	0.01	ns
Acido urico (mg/dl)	5.5 ± 1.4	5.1 ± 0.8	5.5 ± 1.6	6.0 ± 1.4	0.05	ns
Glicemia a digiuno (mg/dl)	101.4 ± 31.1	89.0 ± 6.6	105.5 ± 38.8	103.4 ± 18.4	0.02	ns
Insulinemia a digiuno (mg/dl)	17.8 ± 12.7	13.7 ± 11.6	18.9 ± 13.2	19.8 ± 11.9	ns	ns
HbA1c (%)	5.6 ± 1.0	5.2 ± 0.2	5.7 ± 1,3	5.6 ± 0.6	0.04	ns

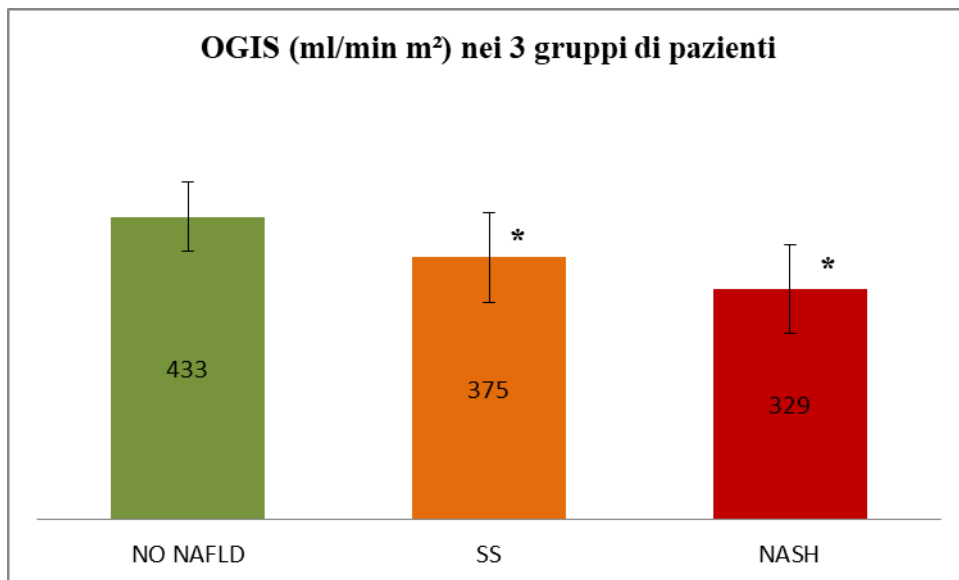
4.1.2 Tolleranza glucidica dei soggetti studiata con OGTT e indici surrogati di sensibilità, resistenza e risposta insulinica

In tutti i soggetti non diabetici (n=77) la tolleranza glucidica è stata studiata con curva da carico orale di glucosio (75 g) e determinazione di glicemia e insulinemia ai tempi 0, 30, 60, 90 e 120 minuti. Le AUC di glicemia e insulinemia sono state calcolate. Le

concentrazioni di glicemia e insulinemia durante OGTT nei 3 gruppi di pazienti sono mostrate nella Figura 23.

I pazienti con NAFLD, seppure avessero un grado di obesità sovrapponibile a quelli senza NAFLD, mostravano un grado maggiore di insulino-resistenza, espresso da maggiori valori di HOMA-IR e di concentrazioni insuliniche durante OGTT. Anche la glicemia a digiuno era significativamente più alta nel gruppo con NAFLD (Tabella 10), ma non le concentrazioni glicemiche durante OGTT. Parallelamente, la sensibilità insulinica diminuiva in modo significativo nei pazienti con NAFLD (gruppo B + C), come espresso dal Matsuda Index, così come la clearance periferica del glucosio dopo carico orale misurata dall'indice OGIS (Tabella 10). L'OGIS, in particolare, diminuiva significativamente con la severità dell'istologia epatica, dal gruppo A al gruppo C (433 vs 375 vs 329), raggiungendo i valori più bassi nel gruppo con NASH, apparendo dunque un valido predittore di severità del danno epatico nel paziente con obesità patologica.

Figura 22 OGIS nei 3 gruppi di pazienti (NO-NAFLD in verde, steatosi semplice in arancione, NASH in rosso) *p < 0.05 NAFLD vs NO-NAFLD e NASH vs steatosi semplice



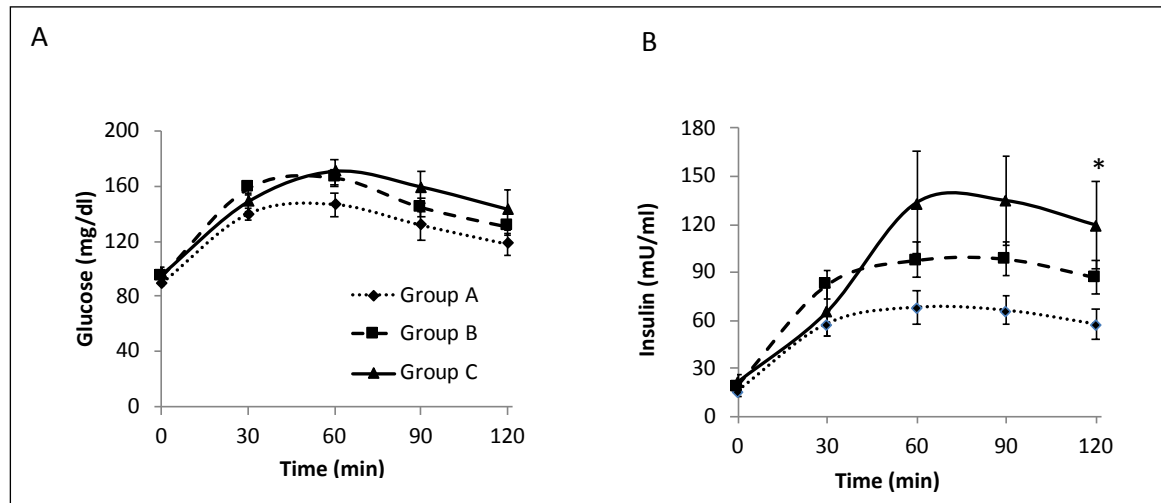
Anche il Disposition Index, prodotto della sensibilità e secrezione insulinica, diminuiva significativamente nei soggetti con NASH rispetto a quelli con steatosi semplice. (Tabella 10).

D'altro canto, la risposta insulinica durante OGTT, sia quella precoce dei primi 30 minuti (IGI, 0-30 minuti) sia quella valutata in 120 minuti durante OGTT (dAUC-I/dAUC-G) non mostrava variazioni significative tra i gruppi, così come l'Hepatic Insulin Resistance Index.

Tabella 10 Confronto delle variabili calcolate mediante OGTT nei 3 gruppi di pazienti: pazienti senza NAFLD (gruppo A), pazienti con steatosi semplice (gruppo B) e pazienti con NASH (gruppo C). Le significatività sono state effettuate nel confronto tra pazienti senza NAFLD (gruppo A) verso pazienti con NAFLD (gruppo B e C) e poi tra pazienti con steatosi semplice (gruppo B) vs pazienti con NASH (gruppo C). I dati mostrati sono relativi solo ai pazienti che hanno effettuato OGTT (n=77)

	A NO NAFLD (n=21)	B SS (n=40)	C NASH (n=16)	P A vs B/C	P B vs C
NGT/IGT	17/4	28/12	13/3	0.05	ns
AUC glicemia OGTT (g/dl x 120min)	15384 ± 2971	17124 ± 4219	16690 ± 5458	ns	ns
AUC insulinemia OGTT (mU/l x 120min)	6191 ± 3195	9665 ± 5950.59	11530 ± 6642	0.003	ns
OGIS (ml/min m2)	432.6 ± 49.8	374.9 ± 64.3	329.4 ± 53.0	0.001	0.05
HOMA IR	3.03 ± 2.64	4.5 ± 3.3	4.8 ± 2.8	0.05	ns
Matsuda Index	6.7 ± 8.4	3.1 ± 2.7	2.4 ± 1.5	0.02	ns
Disposition Index	3.2 ± 1.9	3.1 ± 3	1.7 ± 1.2	ns	0.03
Insulinogenic Index (IGI)	0.86 ± 0.55	1.30 ± 1.38	0.75 ± 0.43	ns	ns
dAUC-I/dAUC- G	1.16 ± 0.68	1.61 ± 1.28	1.66 ± 1.12	ns	ns
Hepatic IR index (mg/ml x mU/ml)	21 ± 15	46 ± 44	48 ± 27	ns	ns

Figura 23 OGTT nei soggetti senza diabete noto (n=77) nei 3 differenti gruppi. Nella Figura 23a, sono mostrate le concentrazioni di glicemia durante OGTT nel gruppo A (senza NAFLD), B (con steatosi semplice) e C (con NASH), nella figura 23b le concentrazioni di insulina negli stessi gruppi. La linea punteggiata rappresenta il gruppo A, la linea tratteggiata il gruppo B, la linea continua il gruppo C. * $p < 0,05$ NAFLD vs NO NAFLD



4.2 CORRELAZIONI TRA VARIABILI METABOLICHE E

ISTOLOGIA EPATICA

In tutta la coorte l'emoglobina glicata si associava, all'istologia epatica, ad un peggior grado di steatosi epatica ($r = 0.48$, $p < 0.0001$), di infiammazione lobulare ($r = 0.32$, $p < 0.006$) e di fibrosi ($r = 0.34$, $p = 0.004$). Anche la glicemia a digiuno si associava ad una steatosi più severa ($r = 0.33$, $p < 0.005$), ma non all'infiammazione lobulare ($r = 0.11$, $p = 0.35$) né alla fibrosi ($r = 0.21$, $p = 0.08$).

L'HOMA IR e l'OGIS, ma non l'Hepatic IR, si associavano ad un grado peggiore di steatosi epatica ($r = 0.31$ e $r = -0.34$ rispettivamente, $p < 0.01$), mentre non si osservavano associazioni statisticamente significative con l'infiammazione lobulare. L'associazione con la fibrosi epatica, invece, raggiungeva la significatività statistica solo per l'HOMA IR ($r = 0.41$, $p = 0.02$) ma non per l'OGIS.

L'insulinemia a digiuno si associava ad un peggior grado di steatosi ($r = 0.3$, $p < 0.02$) e fibrosi ($r = 0.46$, $p < 0.0002$) ma non all'infiammazione lobulare. La risposta insulinica totale durante OGTT (AUC insulinemie OGTT) ma non quella precoce (insulinogenic

index), né quella normalizzata per carico di glucosio (dAUC-I/d-AUC-G), si associava alla steatosi epatica ($r = 0.35$, $p < 0.005$), ma non all'infiammazione lobulare, né alla fibrosi.

4.3 INDICI NON INVASIVI DI STEATOSI E FIBROSI EPATICA: PROPOSTA DI NUOVI CUTOFF PER LA NAFLD NEL PAZIENTE CON OBESITÀ PATOLOGICA

Nella Tabella 11 sono mostrati i più comuni indici non invasivi di steatosi epatica (NAFLD-LFS, FLI, LAP, Tyg, VAI) e di fibrosi epatica (FIB-4, NFS, APRI, BAAT) usati in letteratura (31) e l'indice ARFI, espressione di rigidità epatica e misurato nel corso di un'ecografia epatica, nell'intera coorte e nei singoli gruppi.

Come atteso, tutti gli indici di steatosi analizzati erano significativamente più alti nei pazienti con NAFLD (gruppo B+C) rispetto al gruppo senza NAFLD (gruppo A) ma nessuno di questi mostrava differenze significative tra pazienti con steatosi semplice (gruppo B) e pazienti con steatoepatite (gruppo C) ad eccezione del VAI index che aumentava significativamente con la severità dell'istologia epatica, raggiungendo i valori più alti nel gruppo con NASH (Tabella 11), con buona accuratezza diagnostica alla curva ROC (Figura 24).

Tuttavia, tutti gli indici di steatosi analizzati mostravano nella nostra coorte un ampio numero di falsi positivi con i valori soglia descritti in letteratura (31) per il rilevamento della NAFLD nella popolazione generale, mostrando valori al di sopra della soglia di positività anche nei soggetti senza NAFLD (gruppo A). Pertanto, sulla base di analisi delle curve ROC di tutti questi indici, abbiamo proposto nuovi valori soglia da applicare nei soggetti con obesità patologica, come mostrato in Tabella 12 e in Figura 25.

Diversamente dagli indici di steatosi epatica, tutti gli indici non invasivi di fibrosi calcolati non mostravano differenze significative tra i gruppi (Tabella 11), e si mostravano in tutti i gruppi al di sotto dei valori soglia descritti in letteratura per la presenza di fibrosi (31), in quanto inferiori a 2 per BAAT (0-1: assenza di fibrosi, ≥ 2 fibrosi), inferiori a 0.5 per APRI (≤ 0.5 assenza di fibrosi), inferiori a 0.67 per NFS ($< -$

1.455 esclude fibrosi avanzata; > 0.676 diagnostica con precisione la presenza di fibrosi), inferiori a 1.3 per FIB-4 (< 1.3 fibrosi assente; > 2.67 fibrosi presente). Nella nostra coorte, infatti, la maggior parte dei pazienti mostrava fibrosi assente (F0 9%) o solo iniziale (F1 77%).

L'indice ARFI non mostrava differenze significative tra pazienti senza NAFLD, pazienti con steatosi semplice e quelli con steatoepatite.

Tabella 11 Confronto degli indici di steatosi e fibrosi epatica: pazienti senza NAFLD (gruppo A), pazienti con Steatosi Semplice (gruppo B) e pazienti con NASH (gruppo C). Le significatività sono state effettuate nel confronto tra pazienti senza NAFLD (gruppo A) verso pazienti con NAFLD (gruppo B e C) e poi tra pazienti con steatosi semplice (gruppo B) vs pazienti con NASH (gruppo C)

	Intera coorte (n=90)	A NO NAFLD (n=21)	B SS (n=47)	C NASH (n=22)	P A vs B/C	P B vs C
HSI	54.9 ± 6.5	50.8 ± 5.3	55.9 ± 6.2	56.2 ± 6.8	0.002	ns
NAFLD-LFS	2.22 ± 2.24	1.19 ± 1.77	2.66 ± 2.36	2.14 ± 2.11	0.01	ns
FLI	94.2 ± 8.3	87.3 ± 12.1	96.2 ± 4.9	97.8 ± 2.3	0.001	ns
LAP	4.57 ± 0.46	4.23 ± 0.51	4.63 ± 0.39	4.86 ± 0.3	0.005	ns
Tyg	8.7 ± 0.5	8.4 ± 0.4	8.8 ± 0.5	8.9 ± 0.4	0.001	ns
VAI	5.55 ± 2.92	4.38 ± 2.93	5.52 ± 2.77	7.54 ± 2.46	0.05	0.04
BAAT	1.7 ± 0.76	1.52 ± 0.79	1.83 ± 0.82	1.6 ± 0.5	ns	ns
APRI	0.22 ± 0.11	0.19 ± 0.07	0.24 ± 0.15	0.22 ± 0.09	ns	ns
NFS	-0.89 ± 1.33	-0.66 ± 0.69	-0.92 ± 1.27	-1.05 ± 2.3	ns	ns
FIB-4	0.66 ± 0.31	0.75 ± 0.39	0.63 ± 0.28	0.66 ± 0.32	ns	ns
Arfi (KPa)	7.06 ± 10.40	5.96 ± 8.1	8.03 ± 11.78	3.32 ± 1.71	ns	ns

Figura 24 CURVA ROC per VAI index per discriminare pazienti con NASH da quelli con steatosi semplice (AUROC 0.77±0.07, IC 95% 0.64-0.91, p 0.008)

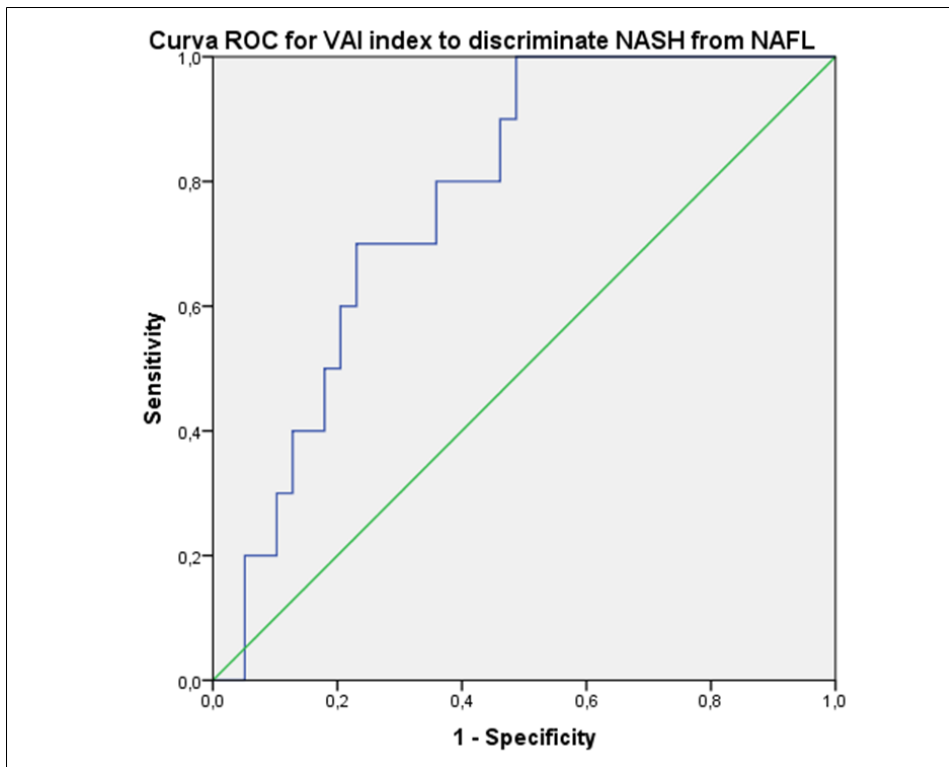


Figura 25 Curve ROC dei vari indici non invasivi di steatosi per individuare presenza o assenza di NAFLD nel paziente con obesità patologica

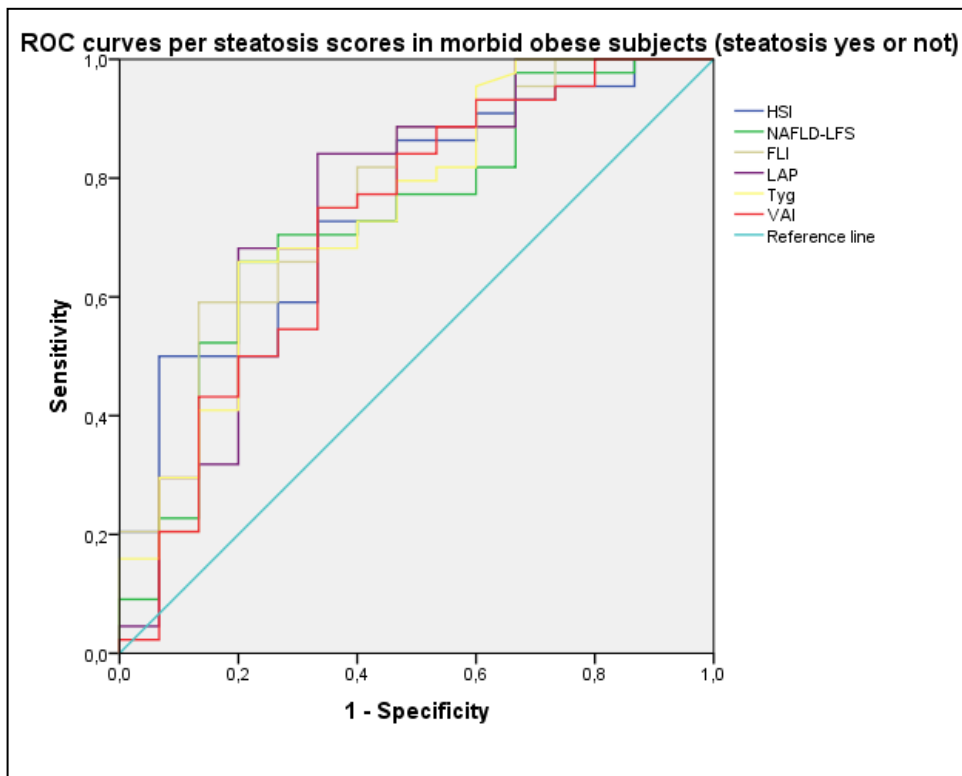


Tabella 12 Nuovi valori soglia proposti per individuare la steatosi nel paziente con obesità patologica, sulla base delle curve ROC, confrontati con quelli della letteratura

Indice di steatosi	AUROC nella nostra coorte	p	IC 95%	Valore soglia in letteratura per la presenza di steatosi	Nuovo valore soglia proposto	Sensibilità/ specificità (%)
NAFLD-LFS	0.74	0.004	0.60-0.89	>-0.64 steatosi presente	>1.46	70/69
HSI	0.76	0.002	0.62-0.89	>36 steatosi presente	>52	69/69
LAP	0.77	0.001	0.61-0.92	>4 (M) e >4.4 (F) steatosi presente	>4.5 for both M and F	70/69
Tyg	0.75	0.003	0.61-0.89	>4.68 steatosi presente	8.6	71/67
VAI	0.72	0.01	0.56-0.88	>1.3 steatosi presente con attività necroinfiammatoria	4.6	69/69
FLI	0.76	0.003	0.62-0.90	<30 steatosi assente 30-60 indeterminato ≥ 60 steatosi presente	>95 steatosi presente	75/60

4.3.1 Performance degli indici di steatosi per discriminare il grado di steatosi nel paziente con obesità patologica

Al fine di valutare con maggiore accuratezza se la maggior parte degli indici di steatosi epatica utilizzati fossero in grado di discriminare la steatosi avanzata ($\geq S2$) nella nostra coorte di pazienti con obesità patologica, abbiamo diviso i pazienti in 2 gruppi sulla base delle biopsie epatiche: S0/S1 con steatosi assente o lieve (S1 lieve: 5-33% degli epatociti), S2/S3 con steatosi moderata/severa (S2 moderata: 33-66% epatociti, S3 severa: > 66% degli epatociti), come mostrato in Tabella 13.

La prevalenza della steatosi moderata severa nel nostro gruppo era del 50%. Il gruppo con steatosi S2/S3 mostrava un grado di obesità non diverso dal gruppo S0/S1, come espresso dal BMI che non mostrava differenze significative, ma un maggior grado di insulino resistenza e compromissione metabolica. Infatti, nel gruppo S2/S3, si osservava maggiore prevalenza di DM2 e sindrome metabolica, valori più alti di trigliceridi, ALT e GGT e HOMA IR significativamente più alto e una ridotta clearance periferica del glucosio espressa dall'indice OGIS (Tabella 13).

Tabella 13 Confronto tra pazienti con steatosi di grado S0/S1 e pazienti con steatosi S2/S3

	S0-S1 (n=45)	S2-S3 (n=45)	p
NGT/IGT/T2D (%)	67.5/27.5/5	53.7/19.5/26.8	0.03
BMI (Kg/m²)	42.5 ± 5.9	43.8 ± 5.9	ns
Circonferenza vita (cm)	124 ± 13,6	130 ± 12	ns
Trigliceridi (mg/dl)	124.7±48.9	149.3 ± 60.1	0.04
AST (U/L)	21.9 ± 7.4	25.5 ± 11.9	ns
ALT (U/L)	24.3 ± 12.6	34.6 ± 17.6	0.02
GGT (U/L)	21.6 ± 20.9	32.3 ± 21.9	0.03
HOMA IR	3.3 ± 2.4	5.3 ± 3.5	0.03
OGIS (ml/min m2)	407.8 ± 64.6	355.3 ± 60.4	0.002
HSI	53.0 ±6.7	56.6±5.8	0.01
NAFLD-LFS	1.7 ±1.9	2.7±2.4	0.03
FLI	91.7 ± 10	96.9 ± 4.8	0.003
LAP	4.4 ± 0.5	4.7 ±0.4	0.02
TyG	8.6 ± 0.4	8.9 ± 0.5	0.006
VAI	4.9 ± 2.5	6.2 ± 3.2	0.05

Tutti gli indici non invasivi di steatosi analizzati aumentavano significativamente con il grado di steatosi epatica (Tabella 13).

La migliore variabile per discriminare la steatosi moderata/severa nella nostra coorte di soggetti con obesità patologica appariva l'HOMA IR (AUROC 0.74 ± 0.07 $p=0.002$) con un valore soglia ottimale ≥ 3.5 (sensibilità e specificità 70%). GGT (AUROC 0.7 ± 0.07 , $p=0.01$) e ALT (AUROC 0.69 ± 0.06 , $p=0.02$) erano meno accurate. D'altro canto, tutti gli indici di steatosi utilizzati non erano molto accurati nel discriminare un grado di steatosi $\geq S2$ nel paziente con obesità patologica, poiché alle analisi di curve ROC mostravano un AUROC ≤ 0.7

4.3.2 Performance degli indici di fibrosi per discriminare il grado di fibrosi nel paziente con obesità patologica

Come per la steatosi, anche per la fibrosi abbiamo distinto sulla base delle biopsie epatiche 2 gruppi di pazienti, F0/F1 per fibrosi assente o lieve (F1 fibrosi perisinusoidale o portale), F2/F3 per fibrosi significativa (F2 fibrosi perisinusoidale e portale, F3 fibrosi a ponte), come mostrato in Tabella 14.

Nella nostra coorte, la maggior parte dei pazienti mostrava fibrosi assente o lieve (F0 9% e F1 77%), mentre solo il 14% dei soggetti aveva una fibrosi $\geq F2$, con un solo paziente F3. Nessuno mostrava fibrosi F4.

Non si osservava nessuna differenza significativa tra i 2 gruppi per quanto riguarda il BMI, mentre trigliceridi, ALT e GGT erano significativamente più alte nel gruppo con fibrosi F2/F3.

Non una maggior prevalenza di diabete ma una maggiore insulino resistenza, espressa dall'HOMA IR, si osservava inoltre nel gruppo F2/F3.

Di tutti gli indici di fibrosi misurati, solo l'APRI era significativamente più alto nel gruppo F2/F3, mentre tutti gli altri non mostravano differenze statisticamente significative, come mostrato in Tabella 14.

L'indice ARFI misurato durante l'ecografia epatica ed espressione della rigidità del parenchima epatico (liver stiffness measurement), era maggiore nel gruppo F2/F3, ma

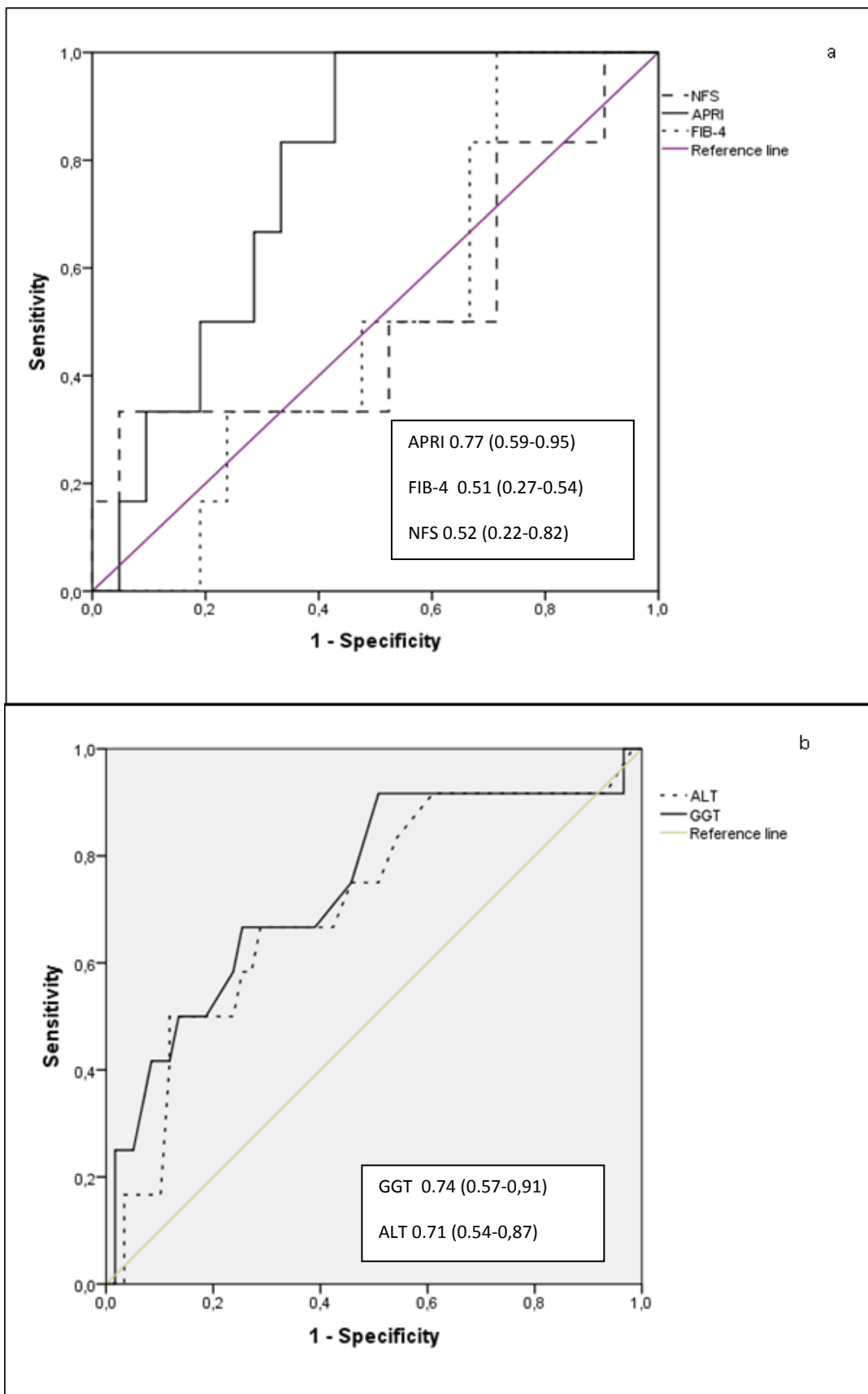
tale differenza non raggiungeva la significatività statistica, verosimilmente per la non omogeneità numerica dei 2 gruppi F0/F1 e F2/F3 (77 vs 13 rispettivamente).

La variabile migliore per discriminare un grado di fibrosi \geq F2 nel paziente con obesità patologica appariva l'indice APRI con un valore soglia ottimale di 0.21 (sensibilità e specificità $>$ 65%), come mostrato in Figura 26. GGT e ALT mostravano scarsa accuratezza nel discriminare il grado di fibrosi nella nostra casistica.

Tabella 14 Confronto tra pazienti con fibrosi di grado F0/F1 e pazienti con fibrosi F2/F3

	F0-F1 (n=77)	F2/F3 (n=13)	p
BMI	42.9 \pm 5.8	44.6 \pm 6.6	ns
NGT/IGT/T2D (%)	60.3/26.5/13.2	61.5/30.8/7.7	ns
Trigliceridi (mg/dl)	132.4 \pm 50.4	164.6 \pm 76.7	0.04
AST (U/L)	22.6 \pm 8.9	29.8 \pm 13.5	ns
ALT (U/L)	27.8 \pm 15.5	39.5 \pm 16.3	0.03
GGT (U/L)	23.9 \pm 18.2	43 \pm 31.2	0.008
HOMA IR	3.9 \pm 2.8	5.7 \pm 4.7	0.05
OGIS (ml/min m2)	385.6 \pm 69.9	372.0 \pm 48.5	ns
BARD	2.4 \pm 0.9	2.1 \pm 1.03	ns
BAAT	1.7 \pm 0.8	1.9 \pm 0.8	ns
AST/ALT	0.9 \pm 0.3	0.8 \pm 0.4	ns
FIB-4	0.65 \pm 0.31	0.70 \pm 0.29	ns
NAFLD Fibrosis Score	-0.95 \pm 1.3	-0.69 \pm 1.61	ns
APRI	0.2 \pm 0.1	0.3 \pm 0.2	0.04
ARFI (KPa)	5.8 \pm 9.1	11.4 \pm 13.9	ns

Figura 26 Curve ROC per discriminare Fibrosi \geq F2 nella nostra casistica con gli indici di fibrosi NFS, FIB-4 e APRI (a) oppure ALT e GGT (b)



4.4 LIVELLI CIRCOLANTI DI ACIDI BILIARI, PRECURSORE C4, FGF19 A DIGIUNO E DOPO PASTO MISTO

In un sottogruppo di 43 soggetti dell'intera coorte, sono stati dosati i livelli circolanti di acidi biliari, precursore C4 e FGF19, sia a digiuno che dopo pasto misto, esprimendo le concentrazioni dopo stimolo come AUC delle misurazioni effettuate a 0', 90' e 120 minuti dopo stimolo.

In questo sottogruppo di 43 pazienti, analogamente a quanto fatto in precedenza, abbiamo distinto 3 gruppi sulla base delle biopsie epatiche

- Gruppo A, senza NAFLD alla biopsia epatica e quindi definito NO NAFLD, costituito da 11 soggetti (26%)
- Gruppo B, con steatosi semplice, composto da 28 soggetti (65%)
- Gruppo C, con steatoepatite o NASH, composto da 4 soggetti (9%)

In questo sottogruppo la prevalenza di NASH era inferiore a quella osservata nell'intera coorte (9 vs 24%).

Le caratteristiche basali dei 43 pazienti sono mostrate nella Tabella 15.

Tabella 15 Caratteristiche basali nei 3 gruppi (NO NAFLD, steatosi semplice e NASH) I confronti sono stati effettuati tra tutti gruppi col test Anova

	Intera coorte (n=43)	A NO NAFLD (n=11)	B SS (n=28)	C NASH (n=4)	P A vs B vs C
Età (anni)	37.2 ± 12.7	37 ± 13	37 ± 12	39 ± 18	ns
Genere (F/M)	35/8	9/2	23/5	3/1	ns
NGT/IGT/T2D (%)	58/26/16	73/27/0	57/25/18	25/25/50	ns
Ipertensione arteriosa (%)	35	27	39	25	ns
Dislipidemia (%)	40	18	46	50	ns
Sindrome Metabolica (%)	51	27	39	75	ns
Steatosi S0, S1/S2, S3 (%)	26/42/32	100/0/0	0/57/43	0/50/50	0.0001
Infiammazione (%)	58	36	61	100	0.0001
Balloning (%)	14	0	7	100	0.0001
Fibrosi F0, F1, F2/F3, F4 (%)	0/81/19/0	0/100/0/0	0/71/29/0	0/100/0/0	ns
Peso corporeo (Kg)	121.6 ± 20.3	113.3 ± 18.1	122.9 ± 17.8	135.3 ± 36.6	ns
Circonferenza vita (cm)	126.1 ± 14.2	120.9 ± 15.6	126.2 ± 13.5	139.8 ± 4.3	ns
BMI (Kg/m²)	43.6 ± 6.7	40.3 ± 5.6	44.4 ± 6.1	46.8 ± 10.8	ns
ALT (U/L)	29.1 ± 16	17.5 ± 5.1	32.4 ± 16.9	38 ± 14.6	0.02
AST (U/L)	23.9 ± 10.2	19.7 ± 4.8	25.5 ± 11.8	24.8 ± 6.3	ns
GGT (U/L)	29.8 ± 26.8	14.5 ± 6.4	35.3 ± 31.1	33.5 ± 10.1	0.05

Fibrinogeno (g/L)	385.3 ± 56.1	388 ± 35.5	384.8 ± 61,5	381.6 ±24.2	ns
Piastrine (x10⁹/L)	276.1 ± 62.7	269 ± 52.6	274.6 ± 66.9	305.8 ± 64.9	ns
Colesterolo totale (mg/dl)	184.9 ± 31.2	178.4 ± 24.6	186.9 ± 34.5	188.8 ± 26	ns
HDL (mg/dl)	50 ± 12.6	51.1 ± 13.7	50.4 ± 12.6	44.3 ± 10	ns
LDL (mg/dl)	106.3 ± 27.1	104.3 ±22.3	105.9 ±30.2	114.5 ±16.7	ns
Trigliceridi (mg/dl)	141.1 ± 66.1	113.5 ± 59.5	151.1 ±69.7	147.3 ± 44.0	0.05
Acido urico (mg/dl)	5.4 ± 1.6	5.2 ± 1.1	5.5 ± 1.7	5.9 ± 1.7	ns
Glicemia a digiuno (mg/dl)	102.3 ± 40.2	87.9 ± 7.3	107.7 ±48.1	103.8 ± 23.8	0,03
Insulinemia a digiuno (mg/dl)	22.2 ± 14.5	17.9 ± 12.3	22.7 ± 15	33.8 ± 15	ns
HbA1c (%)	5.7 ± 1.3	5.1 ± 0.2	5.9 ± 1.6	6 ± 0.8	ns

Al fine di individuare possibili variabili predittive di severità del danno epatico in grado di discriminare i soggetti con NAFLD da quelli senza NAFLD, e quelli con NASH da quelli con steatosi semplice, come mostrato nelle Tabelle 16-19, abbiamo confrontato i 3 gruppi di pazienti per:

- acidi biliari, misurati sia nella loro totalità ed espressi come **SUM** (acidi biliari totali), sia raggruppati in **primari** (acido colico (CA) e chenodesossicolico (CDCA) e le loro forme coniugate con glicina, glicolico (GCA) e glicochenodesossicolico (GCDCA), e taurina, taurocolico (TCA) e taurochenodesossicolico (TCDCA) e **secondari** (acido desossicolico (DCA), litocolico (LCA) e ursodesossicolico (UDCA) le loro forme coniugate con glicina, glicodesossicolico (GDCA), glicolitocolico (GLCA) e glicoursodesossicolico (GUDCA), e taurina, taurodesossicolico (TDCA), taurolitocolico (TLCA) e taoursodesossicolico (TUDCA), isoursidesossicolico (isoUDCA), iocolico (HCA) e iodesossicolico (HDCA), sia come **singoli acidi** nella forma semplice o coniugata con glicina e taurina

- precursore degli acidi biliari C4

- FGF19

I confronti tra i gruppi sono stati effettuati sia per le concentrazioni plasmatiche a digiuno sia per le quelle dopo pasto misto (Tabelle 16-19).

Come si può notare nelle Tabelle 16-19 e nella Figura 27, nei pazienti con NAFLD rispetto ai pazienti senza NAFLD si osservava:

- Valori significativamente più bassi di acidi biliari totali (SUM), sia a digiuno che dopo pasto misto, soprattutto per quanto riguarda la quota di acidi biliari primari
- Una concentrazione maggiore, dopo pasto misto, di precursore degli acidi biliari C4 ad indicare una minore inibizione della sintesi epatica degli acidi biliari da parte dell'asse FXR/FGF19 meno attivo in questi pazienti. Nonostante l'aumento del precursore C4 nei pazienti con NAFLD rifletta indirettamente una minore attivazione del segnale FXR/FGF19, le concentrazioni di FGF19 a digiuno e dopo pasto non mostravano differenze significative tra i gruppi.
- Una riduzione della maggior parte dei singoli acidi biliari, che raggiungeva i livelli di significatività statistica per: GCA, GCDCA, TCDCA, TLCA, TDCA, TUDCA e HCA

Nei pazienti con NASH, rispetto ai pazienti con steatosi semplice non si osservavano differenze significative nella concentrazione a digiuno e dopo pasto degli acidi biliari se misurati nella loro totalità. Tuttavia si osservava una riduzione fortemente significativa di alcuni singoli acidi, che erano: LCA e la sua forma glicoconiugata GLCA, DCA e GCDCA.

Tabella 16 Livelli circolanti di acidi biliari (AB), loro precursore C4 e FGF19 a digiuno nei 3 gruppi (NO NAFLD, steatosi semplice e NASH) I confronti sono stati effettuati tra tutti gruppi col test Anova e con t test per campioni indipendenti tra NO NAFLD (gruppo A) vs NAFLD (B+C) e tra steatosi semplice (B) vs steatoepatite (C)

	A NO NAFLD (n=11)	B SS (n=28)	C NASH (n=4)	<i>p</i> A vs B vs C	<i>p</i> A vs B/C	<i>p</i> B vs C
AB Primari (nmol/l)	1287.4±1210.4	760.2±510.4	840.8±546.8	ns	0.02	ns
AB Secondari (nmol/l)	645.2±544.8	662.4±697.4	458.3±151.5	ns	ns	ns
SUM (nmol/l)	1932.6±1656	1289.4±633.6	1299.2±671.6	ns	0.01	ns
C4 (nmol/l)	57.5±46.1	73.8±65.3	85.3±45.4	ns	ns	ns
FGF19 (pg/ml)	0.07±0.06	0.08±0.05	0.09±0.005	ns	ns	ns

Sum= acidi biliari totali C4= 7 α -idrossi-4-colestene-3-1

Tabella 17 Concentrazioni plasmatiche di acidi biliari (AB), loro precursore C4 e FGF19 dopo pasto misto ed espresse come AUC nei 3 gruppi (NO NAFLD, steatosi semplice e NASH) I confronti sono stati effettuati tra tutti gruppi col test Anova e con t test per campioni indipendenti tra NO NAFLD (gruppo A) vs NAFLD (B+C) e tra steatosi semplice (B) vs steatoepatite (C)

	A NO NAFLD (n=11)	B SS (n=28)	C NASH (n=4)	<i>p</i> A vs B vs C	<i>p</i> A vs B/C	<i>p</i> B vs C
AUC AB Primari	113164±5480 5	118018±36773	111531±25350	ns	ns	ns
AUC AB Secondari	81743±64113	84595±42032	72154±15020	ns	ns	ns
AUC SUM	315709±2666 35	222046±97030	213705±55048	ns	0.001	ns
AUC C4	7031±3658	10200±7120	11087±4177	ns	0.05	ns
AUC FGF19	10.4±6.4	13.1±7.8	13.2±1.2	ns	ns	ns

Tabella 18 Livelli circolanti dei singoli acidi biliari (nmol/l) misurati a digiuno nei 3 gruppi di pazienti (NO NAFLD, steatosi semplice e NASH) I confronti sono stati effettuati tra tutti gruppi col test Anova e con t test per campioni indipendenti tra NO NAFLD (gruppo A) vs NAFLD (B+C) e tra steatosi semplice (B) vs steatoepatite (C)

	A NO NAFLD (n=11)	B SS (n=28)	C NASH (n=4)	p A vs B vs C	p A vs B/C	p B vs C
CA	187.3±232.8	130.3±158.6	60.4±53.4	ns	ns	ns
GCA	203.1±404	120.8±109.1	106±69.8	ns	0.03	ns
TCA	34.1±44	24.2±27	26.9±26	ns	ns	ns
CDCA	299.3±300	216.8±233.8	240.3±195.4	ns	ns	ns
GCDCA	486.5±635.9	265.0±153.9	359.5±236.5	ns	0.009	0.01
TCDC	77.0±92	31.3±25	47.7±33.5	0.05	0.004	ns
DCA	187.7±173.9	174.1±136.7	62.0±64.8	ns	ns	0.03
GDCA	159.2±286.7	115.5±111.6	44.9±29.8	ns	ns	ns
TDCA	28.3±44.6	16±16.6	11.4±11.8	ns	0,04	ns
LCA	7.8±4.8	6.8±4.1	3.7±0.9	ns	ns	0.006
GLCA	5.8±4.9	6.3±8.9	2.1±2.1	ns	ns	0.05
TLCA	1.7±1.9	1.2±1.2	0.8±0.7	ns	0.05	ns
UDCA	53.8±83.1	55.2±84.3	47.8±56.3	ns	ns	ns
GUDCA	73.9±85.4	67.3±73.1	73.2±77.4	ns	ns	ns
TUDCA	3.3±2.6	1.7±1.7	2.1±1.2	ns	0.03	ns

Iso UDCA	114.6±208.8	261.4±245.5	206.0±125.7	ns	ns	ns
HCA	7.3±5.3	5.2±3.7	4.3±1.4	ns	0.02	ns
HDCA	3.2±2.8	3.6±3.3	4.6±1.7	ns	ns	ns

CA=acido colico, GCA=acido glicocolico, TCA=acido taurocolico, CDCA= acido chenodesossicolico, GCDCA= acido glicochenodesossicolico, TCDCa= acido taurochenodesossicolico. DCA=acido desossicolico, GDCA=acidoglicodesossicolico, TDCA=acido taurodesossicolico LCA=acido litocolico, GLCA=acido glicolitocolico, TLCA=acido taurolitocolico UDCA= acido ursodesossicolico, GUDCA= acido glicoursodesossicolico, TUDCA=acido tauroursodesossicolico, iso-UDCA acido isoursodesossicolico HCA= acido iocolico, HDCA= acido iodesossicolico

Tabella 19 Confronto delle concentrazioni plasmatiche di acidi biliari dopo pasto (nmol/l) ed espresse come AUC nei 3 gruppi di pazienti (NO NAFLD, steatosi semplice e NASH) I confronti sono stati effettuati tra tutti gruppi col test Anova e con t test per campioni indipendenti tra NO NAFLD (gruppo A) vs NAFLD (B+C) e tra steatosi semplice (B) vs steatoepatite (C)

	A NO NAFLD (n=11)	B SS (n=28)	C NASH (n=4)	p A vs B vs C	p A vs B/C	p B vs C
AUC CA	15686±16736	13015±14072	6719±5859	ns	ns	ns
AUC GCA	20698±16560	21349±10521	18656.7±11784	ns	ns	ns
AUC TCA	5874±5654	5196±5039	4431±3061	ns	ns	ns
AUC CDCA	27529±22577	23299±17222	26593±12851	ns	ns	ns
AUC GCDCA	51121±22586	56895±19117	60376±20960	ns	ns	ns
AUC TCDCa	14773±12649	8219±6058	9846±5891	ns	0.04	ns

AUC DCA	18797±14953	22933±19320	13277±12879	ns	ns	ns
AUC GDCA	24347±27605	22091±18290	12754±10327	ns	ns	ns
AUC TDCA	7999.8±11636	4747±7934	3257±4012	ns	ns	ns
AUC LCA	955.3±524.5	905.3±616.9	492.7±270.7	ns	ns	ns
AUC GLCA	2103.3±1923.5	2050.2±2959.5	596.9±374.5	ns	ns	0.03
AUC TLCA	366.9±316	294.4±275.6	310.2±29.2	ns	ns	ns
AUC UDCA	7211.7±9507.5	6153.3±8843.1	5634.3±4615.7	ns	ns	ns
AUC GUDCA	13842±19025	11479±7087	11475±5412	ns	ns	ns
AUC TUDCA	3154.2±8044.1	447.6±611.3	363.4±153.1	ns	0.0001	ns
AUC Iso UDCA	13515.6±23730.4	15985.5±14327.1	23564.7±13757	ns	ns	ns
AUC HCA	789.8±513.6	518.7±354.8	467.7±177.5	ns	0.02	ns
AUC HDCA	378.4±305.9	469.8±401.7	553.4±83.1	ns	ns	ns

Figura 27 Concentrazioni plasmatiche di acidi biliari (AB) totali (SUM) e di precursore C4 dopo pasto misto nei 3 gruppi di pazienti: A NO NAFLD, B steatosi semplice, C NASH.* p < 0,05 A vs B+C

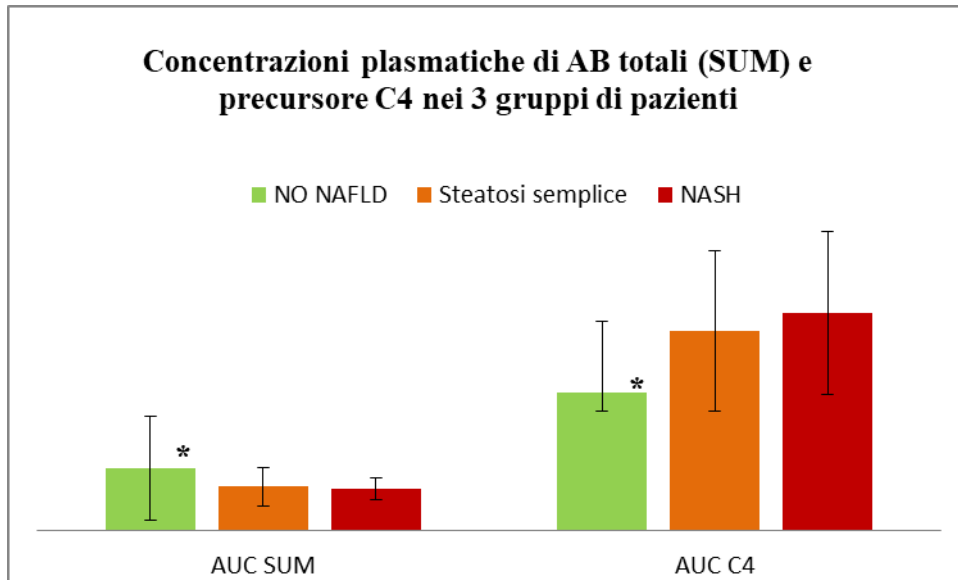
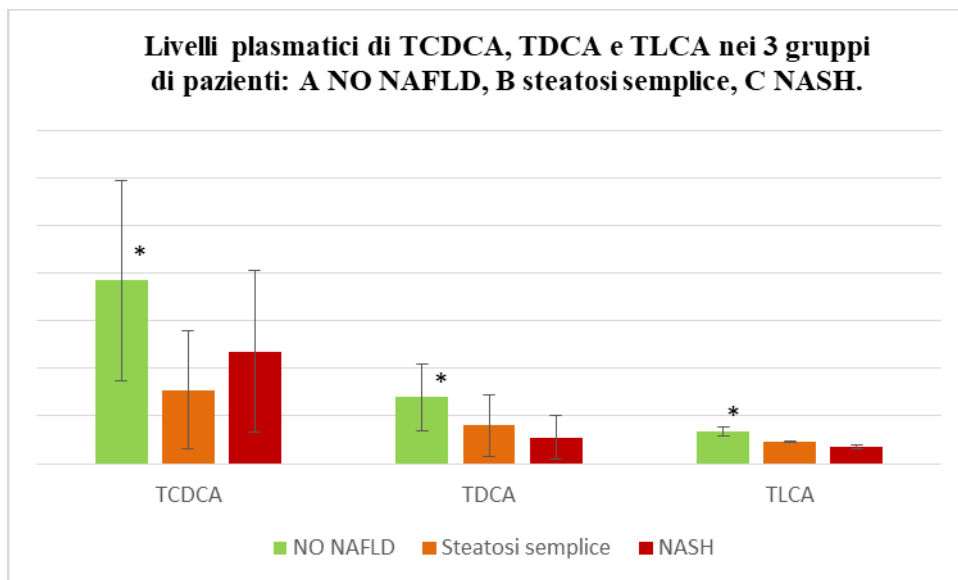


Figura 28 Livelli plasmatici di TCDCA, TDCA e TLCA nei 3 gruppi di pazienti: A NO NAFLD, B steatosi semplice, C NASH. * p < 0,05 A vs B+C



Per valutare se gli acidi biliari fossero diversi, non solo tra NAFLD e NO NAFLD e tra NASH e steatosi semplice, ma anche per grado di steatosi e per grado di fibrosi, abbiamo diviso i pazienti in 2 gruppi in base ai risultati delle biopsie epatiche:

- S0/S1 per steatosi assente o lieve e S2/S3 per steatosi moderata/severa: 20 pazienti (46,5%) mostravano steatosi S0/S1 e 23 (53,5%) steatosi S2/S3
- F1 per fibrosi lieve e fibrosi F2 per fibrosi più significativa: 35 pazienti mostravano fibrosi F1 (81%) e 8 fibrosi F2 (19%). Tutti i pazienti di questa coorte, anche quelli senza NAFLD, mostravano una fibrosi, anche se lieve. Nessun paziente di questa coorte mostrava invece fibrosi F3.

Nei pazienti con steatosi di grado moderato-severo (S2/S3), si osservavano concentrazioni più basse, dopo pasto misto, di acidi biliari misurati nella loro totalità (SUM), soprattutto della quota dei primari, ma tale risultato non raggiungeva la significatività statistica (AUC SUM S0/S1 273758 ± 211288 vs AUC SUM S2/S3 23318 ± 98568 , p 0.08)

Tra i singoli acidi biliari, invece, si osservava una riduzione statisticamente significativa della concentrazione di acido CDCA dopo pasto misto (AUC CDCA S0/S1 60830 ± 23682 vs AUC CDCA S2/S3 52928 ± 15972 , p 0.006).

Nei pazienti con fibrosi F2 non si osservavano differenze significative per quanto riguarda la concentrazione totale di acidi biliari a digiuno e dopo pasto misto, nè per la quota dei primari nè per i secondari, né per i singoli acidi.

4.5 EFFETTO DELLA SGL SULLA NAFLD VALUTATO CON METODICHE NON INVASIVE

Avendo dimostrato, nel precedente capitolo, come alcune variabili cliniche, ematiche e radiologiche siano correlate alla severità del danno epatico e riflettano la presenza di NAFLD nel soggetto obeso, per valutare l'effetto della SGL sulla NAFLD, senza ripetere la biopsia epatica, abbiamo considerato tutti i pazienti che alla biopsia epatica intraoperatoria avessero diagnosi di NAFLD (77%) e abbiamo confrontato i dati rilevati a 12 mesi dall'intervento con quelli presenti al reclutamento, per quanto riguarda:

- variabili antropometriche
- prevalenza del diabete e delle altre comorbidità dell'obesità patologica

- assetto ematico epatico (AST, ALT, GGT) e lipidico
- tolleranza glucidica studiata nei pazienti senza diabete noto (n = 77) con OGTT e valutata con AUC delle glicemie e insulinemie rilevate durante OGTT e indici surrogati di insulino-sensibilità, insulino-resistenza e secrezione insulinica (OGIS, Matsuda Index, HOMA-IR, Insulinogenic Index, Disposition Index)
- indici di steatosi epatica (HSI, NAFLD-LFS, Tyg) e fibrosi epatica (FIB-4, NFS, APRI)
- liver stiffness measurement (LSM) con metodica ARFI
- livelli circolanti di acidi biliari, loro precursore C4 e FGF19, misurati a digiuno e dopo pasto misto (saranno mostrati in un paragrafo a parte)

4.5.1 Caratteristiche cliniche, tolleranza glucidica, indici non invasivi di steatosi e fibrosi epatica prima e dopo SGL

Come mostrato nella Tabella 20, dopo l'intervento, i pazienti con diagnosi di NAFLD alla biopsia epatica intraoperatoria, mostravano, come atteso, una riduzione fortemente significativa del BMI, della prevalenza di tutte le comorbidità dell'obesità (DM2, ipertensione arteriosa, dislipidemia e sindrome metabolica) e un miglioramento del profilo lipidico (riduzione significativa dei trigliceridi e dell'uricemia e aumento significativo di HDL). Il DM2 si risolveva nell'85% dei casi e, nei soggetti non diabetici, si registrava un miglioramento significativo della tolleranza glucidica, come mostrato dalla riduzione delle AUC di glicemia e insulinemia mostrate all'OGTT post operatorio, un aumento significativo degli indici di insulino sensibilità (OGIS, Matsuda Index) e della funzione beta cellulare (aumento significativo del Disposition Index) e una riduzione significativa della resistenza insulinica (HOMA IR)

Il miglioramento della NAFLD era indirettamente mostrato da:

- Riduzione fortemente significativa di transaminasi e GGT
- Aumento fortemente significativo di OGIS e riduzione significativa di HOMA-IR, entrambe associate alla steatosi epatica
- Riduzione significativa di tutti gli score validati di NAFLD e di steatosi epatica (HSI, NAFLD-LFS, Tyg) a valori inferiori al cutoff arbitrariamente proposto in

questo studio per il rilevamento della steatosi nel paziente con obesità patologica (Tabella 12), come a suggerire assenza di steatosi dopo chirurgia bariatrica

- Riduzione significativa di tutti gli indici di fibrosi epatica valutati (NFS, APRI, BAAT) ad eccezione del FIB-4 che non mostrava variazioni, probabilmente in quanto associato a gradi di fibrosi > F2, non presenti in questo studio.

Gli stessi risultati si registravano considerando separatamente i pazienti con diagnosi di steatosi semplice (Tabella 21) e NASH (Tabella 22) alla biopsia epatica intraoperatoria, a dimostrazione del fatto che anche gradi di epatopatia maggiori (NASH) migliorassero comunque dopo chirurgia bariatrica.

Tabella 20 Pazienti con diagnosi di NAFLD alla biopsia epatica intraoperatoria: caratteristiche cliniche, tolleranza glucidica, indici di steatosi e fibrosi epatica, ARFI prima e dopo SGL

	Basale	dopo SGL	P
BMI (Kg/m²)	44.7 ± 6,8	32.5 ± 5,4	<0.0001
Peso corporeo (Kg)	121.3 ± 20,9	90.1 ± 13,9	<0.0001
NGT/IGT/T2D (%)	57/25/19	91/8/1	0.001
Ipertensione arteriosa (%)	30	9	0.007
Dislipidemia (%)	49	19	0.007
Sindrome metabolica (%)	69	3	<0.0001
ALT (U/L)	33.5 ± 16,6	15.2 ± 7,2	<0.0001
AST (U/L)	25.7 ± 11,2	17.0 ± 5.2	<0.0001
GGT (U/L)	35.6 ± 29.5	13.8 ± 8.7	<0.0001
Colesterolo tot (mg/dl)	188.4 ± 33.0	189.2 ± 32.6	ns
HDL (mg/dl)	50 ± 12.4	55 ± 13.2	0.02
LDL (mg/dl)	107.6 ± 29	115.2 ± 26.8	ns
Trigliceridi (mg/dl)	152.1 ± 67.1	89.9 ± 22.4	<0.0001
Acido urico (mg/dl)	5.6 ± 1.7	4.9 ± 1	0.02
Glicemia a digiuno (mg/dl)	104.8 ± 47	85 ± 22.7	0.001
Insulinemia a digiuno (mU/l)	19.4 ± 12.0	10.4 ± 15.,0	ns

AUC glicemia OGTT (mg/ml x 120min)	17447.9 ± 3907	13632.,1 ± 3482	<0.0001
AUC insulinemia OGTT (mU/l x 120min)	10202. 2 ± 6370	7497.3 ± 5783.3	ns
OGIS (ml/min m2)	375.4 ± 66.4	503.1 ± 74.7	<0.0001
HOMA IR	4.4 ± 2.7	1.96 ± 2.7	0.02
Matsuda Index	3.0 ± 2.1	7.3 ± 5.1	0.001
Disposition Index	2.7 ± 3.0	10.1 ± 11.8	0.008
Insulinogenic Index	0.9 ± 0.9	1.4 ± 1.4	ns
HSI	56.0 ± 6.7	41.2 ± 5.5	<0.0001
NAFLD-LFS	2.6 ± 2.6	-2.1 ± 2.0	<0.0001
Tyg	8.8 ± 0.6	8.2 ± 0.4	<0.0001
BAAT	1.8 ± 0.7	1.0 ± 0.6	<0.0001
APRI	0.24 ± 0.2	0.19 ± 0.1	0.04
NFS	-0.9 ± 1.3	-1.6 ± 0.7	0.02
FIB-4	0.67 ± 0.3	0.73 ± 0.3	ns
Arfi (KPa)	7.5 ± 11.5	5.0 ± 6.8	ns

Tabella 21 Pazienti con diagnosi di steatosi semplice alla biopsia epatica intraoperatoria: caratteristiche cliniche, tolleranza glucidica, indici di steatosi e fibrosi epatica, ARFI prima e dopo SGL

	Basale	dopo SGL	P
BMI (Kg/m²)	44.02 ± 5.9	32.4 ± 5.3	<0.0001
Peso corporeo (Kg)	121.4 ± 16.6	89.3 ± 13.1	<0.0001
NGT/IGT/T2D (%)	59/26/15	90/8/2	0.006
Ipertensione arteriosa (%)	30	9	0.01
Dislipidemia (%)	51	18	0.01
Sindrome metabolica (%)	51	4	0.0001

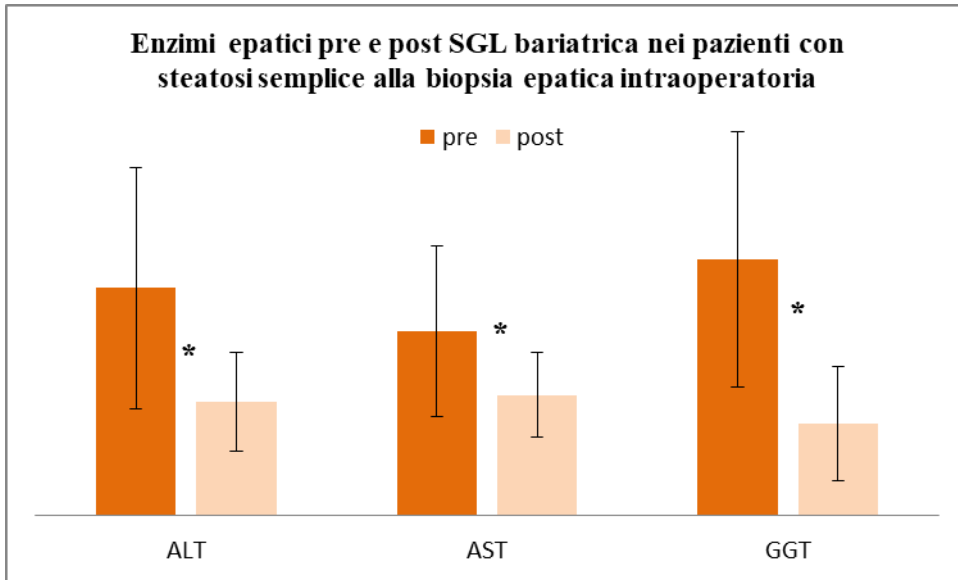
ALT (U/L)	31.5 ± 16.3	15.5 ± 7.6	<0.0001
AST (U/L)	24.6 ± 11.4	17.3 ± 5.5	<0.002
GGT (U/L)	32 ± 26.9	13.2 ± 8.4	<0.0001
Colesterolo tot (mg/dl)	193.3 ± 32.7	189.9 ± 33.4	ns
HDL (mg/dl)	51.2 ± 12.2	54.8 ± 12.6	0.05
LDL (mg/dl)	112.9 ± 29.1	116.,1 ± 28,4	ns
Trigliceridi (mg/dl)	142.1 ± 59.4	90.1 ± 23.5	<0.0001
Acido urico (mg/dl)	5.5 ± 1.6	4.8 ± 0.9	0.04
Glicemia a digiuno (mg/dl)	105.5 ± 39.8	86.,3 ± 23.9	<0.0001
Insulinemia a digiuno (mU/l)	18.9 ± 13.2	10.6 ± 15.4	ns
AUC glicemia OGTT (mg/ml x 120min)	17124.0 ± 4219.0	13445.3 ± 3462.8	<0.0001
AUC insulinemia OGTT (mU/l x 120min)	9665.2 ± 5950.6	7691.9 ± 5900.2	ns
OGIS (ml/min m2)	374.9 ± 64.3	501.8 ± 76.5	<0.0001
HOMA IR	4.5 ± 3.3	2.0 ± 2.7	0.02
Matsuda Index	3.1 ± 2.7	7.4 ± 5.2	0.001
Disposition Index	3.1 ± 3.0	10.5 ± 12.0	0.009
Insulinogenic Index	1.3 ± 1.4	1.5 ± 1.4	ns
HSI	55.9 ± 6.2	41.2 ± 5.4	<0.0001
NAFLD-LFS	2.66 ± 2.36	-2.03 ± 2.2	<0.0001
Tyg	8.8 ± 0.5	8.2 ± 0.4	<0.0001
BAAT	1.8 ± 0.8	1.0 ± 0.6	0.001
APRI	0.24 ± 0.15	0.19 ± 0.08	0.05
NFS	-0.92 ± 1.27	-1.6 ± 0.7	0.02
FIB-4	0.63 ± 0.28	0.7 ± 0.3	ns
Arfi (KPa)	8.03 ± 11.78	5.3 ± 7.3	ns

Tabella 22 Pazienti con diagnosi di NASH alla biopsia epatica intraoperatoria: caratteristiche cliniche, tolleranza glucidica, indici di steatosi e fibrosi epatica, ARFI prima e dopo SGL

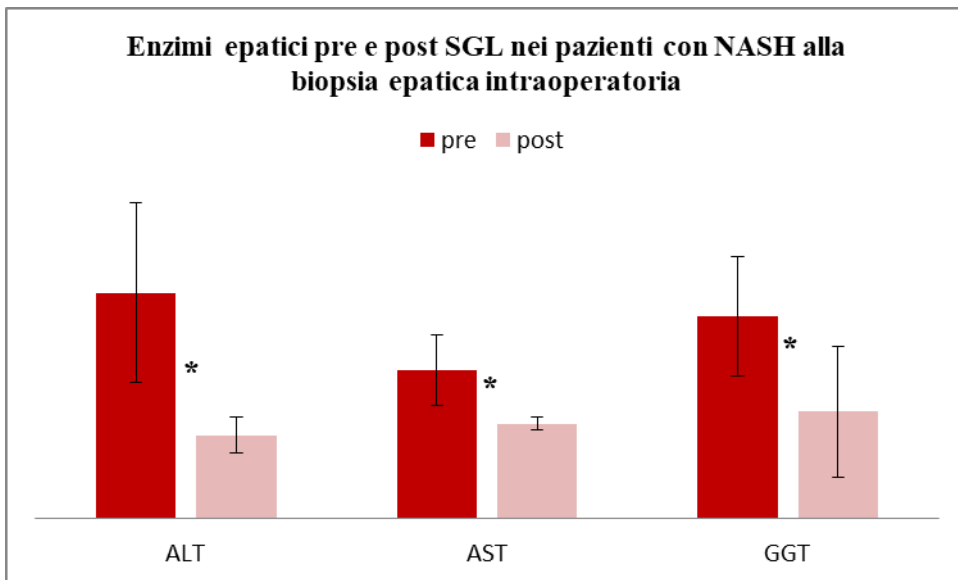
	Basale	dopo SGL	P
BMI (Kg/m²)	42.4 ± 6.3	33 ± 6.3	<0.0001
Peso corporeo (Kg)	114.8 ± 21.3	95.6 ± 20.2	<0.0001
NGT/IGT/T2D (%)	47/18/35	75/25/0	0.001
Ipertensione arteriosa (%)	32%	10%	0.01
Dislipidemia (%)	50%	25%	0.01
Sindrome metabolica (%)	45%	25	0.0001
ALT (U/L)	36.1 ± 17.6	13.5 ± 2.5	0.04
AST (U/L)	25.1 ± 10	15.5 ± 1.3	0.04
GGT (U/L)	31.7 ± 7.8	17.8 ± 11.1	0.03
Colesterolo tot (mg/dl)	188.5 ± 24.8	184.8 ± 30.2	ns
HDL (mg/dl)	43.7 ± 7.6	57.8 ± 18.6	0.05
LDL (mg/dl)	114.2 ± 21.1	109.3 ± 11.6	ns
Trigliceridi (mg/dl)	153.1 ± 44.1	88.8 ± 15.3	0.01
Acido urico (mg/dl)	6.0 ± 1.4	5.3 ± 1.3	ns
Glicemia a digiuno (mg/dl)	103.4 ± 18.4	76.0 ± 9.4	0.01
Insulinemia a digiuno (mU/l)	19.8 ± 11.9	10.6 ± 15.4	ns
AUC glicemia OGTT (mg/ml x 120min)	16690 ± 5458	12445.3 ± 3462.8	<0.0001
AUC insulinemia OGTT (mU/l x 120min)	11530 ± 6642	9613 ± 2013	ns
OGIS (ml/min m2)	329.4 ± 53.0	493.8 ± 44.8	<0.0001
HOMA IR	4.8 ± 2.8	1.6 ± 0.7	0.02
Matsuda Index	2.4 ± 1.5	4.5 ± 1.7	0.001
Disposition Index	1.7 ± 1.2	2.5 ± 1.8	ns
Insulinogenic Index	0.75 ± 0.43	0.8 ± 0.3	ns

HSI	56.2 ± 6.8	41.5 ± 6.7	0.002
NAFLD-LFS	2.14 ± 2.11	-2.8 ± 0.6	0.02
Tyg	8.9 ± 0.4	8.1 ± 0.3	0.05
BAAT	1.6 ± 0.5	1.3 ± 0.5	0.05
APRI	0.22 ± 0.1	0.13 ± 0.04	0.05
NFS	-1.05 ± 2.3	-1.8 ± 0.6	0.02
FIB-4	0.66 ± 0.32	0.7 ± 0.5	ns
Arfi (KPa)	3.3 ± 1.7	2.9 ± 1.4	ns

Figura 29 Enzimi epatici prima e dopo SGL nei pazienti che alla biopsia epatica intraoperatoria avevano diagnosi di steatosi semplice (a) o steatoepatite (b). *p < 0.05



a



b

Figura 30 OGIS prima e dopo SGL nei pazienti che alla biopsia epatica intraoperatoria avevano diagnosi di steatosi semplice (a) o steatoepatite (b). *p < 0.05

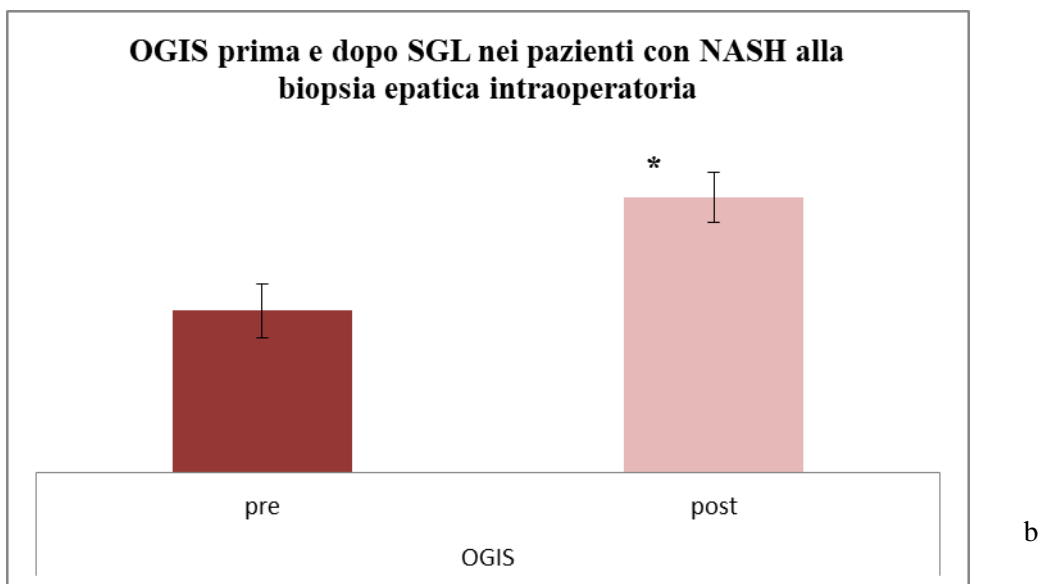
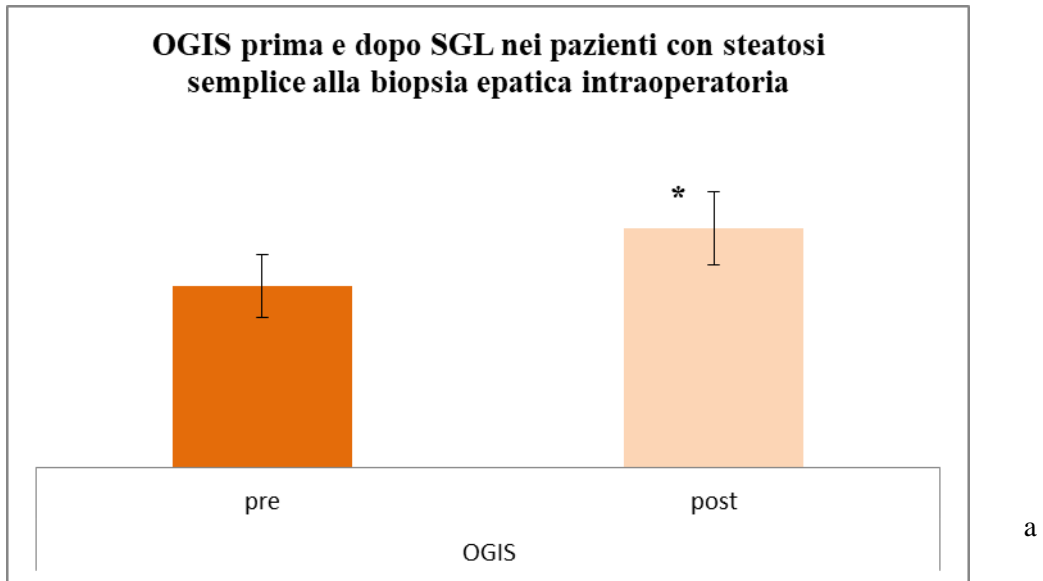
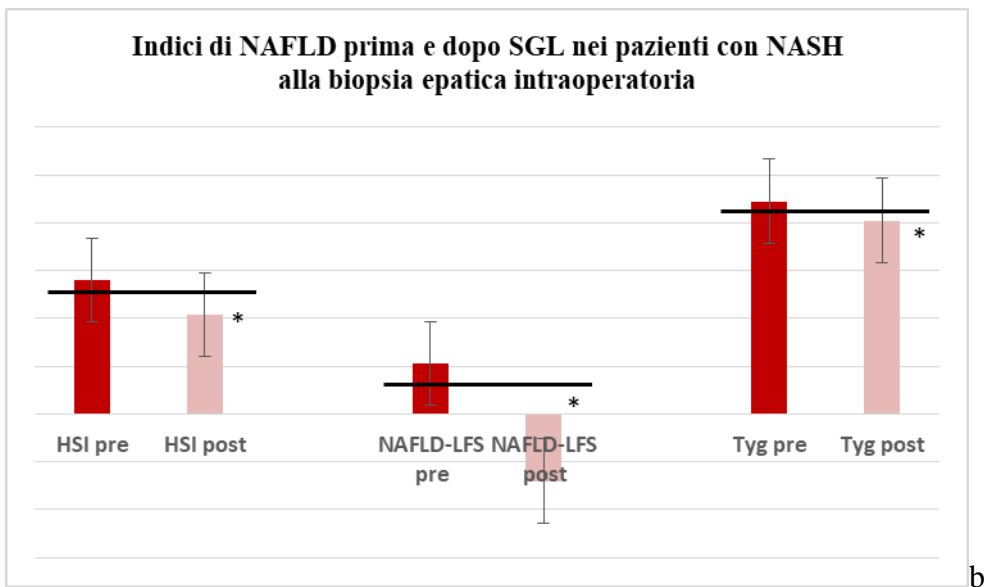
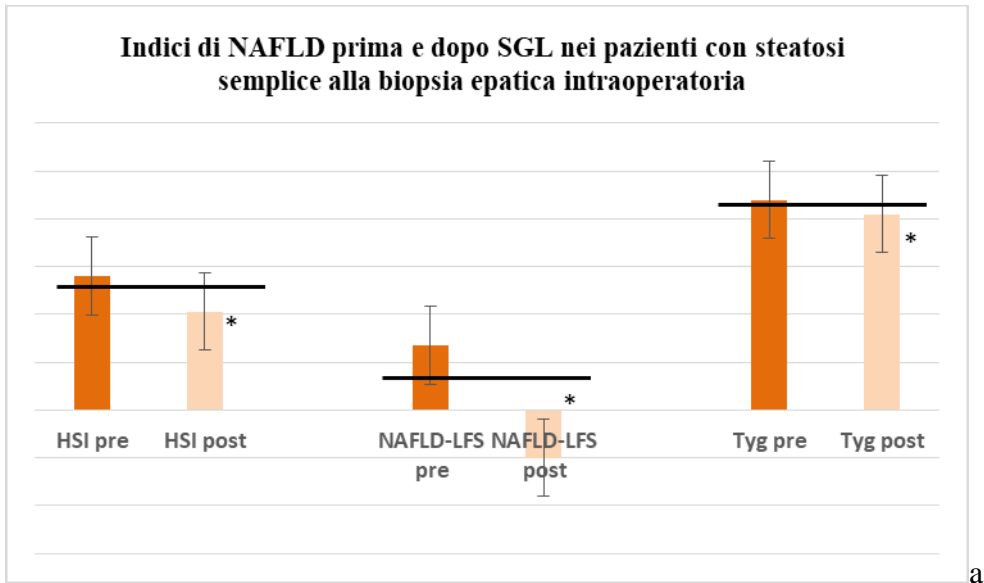


Figura 31 Indici di NAFLD prima e dopo SGL nei pazienti che alla biopsia epatica intraoperatoria avevano diagnosi di steatosi semplice (a) o steatoepatite (b). Le linee nere sopra gli istogrammi rappresentano la soglia di positività proposta in questo studio per il paziente obeso. *p < 0.05



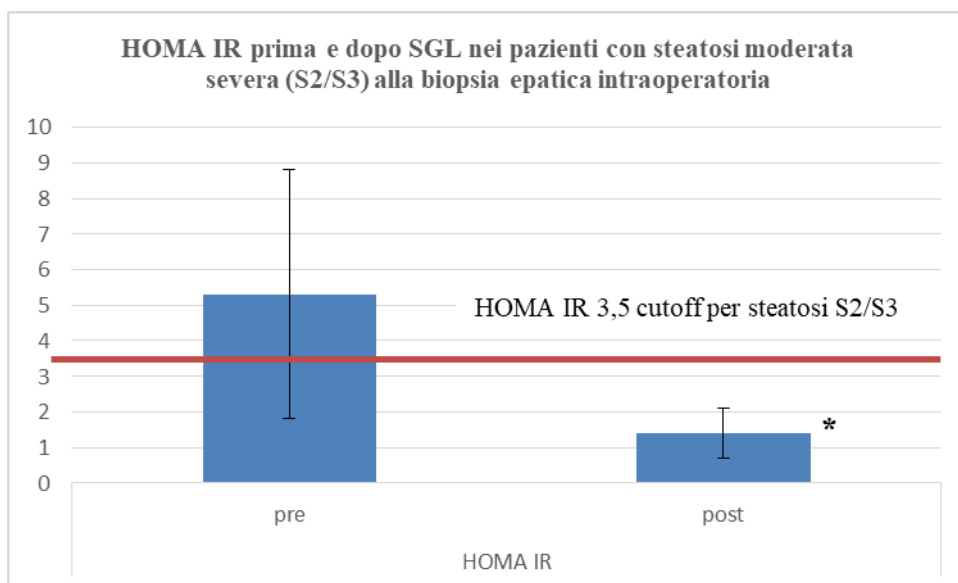
Per valutare se l'effetto benefico della SGL sulla steatosi epatica si osservasse anche nei pazienti con steatosi moderata/severa (S2-S3), abbiamo considerato, di tutta la coorte, solo i pazienti che alla biopsia epatica intraoperatoria mostrassero steatosi S2/S3 (50% di tutta la coorte) e abbiamo confrontato gli indici di steatosi epatica rilevati 12 mesi con quelle presenti al reclutamento (Tabella 23).

Il miglioramento fortemente significativo di tutte le variabili associate alla steatosi (transaminasi, GGT, OGIS e HOMA IR) e di tutti gli indici di steatosi mostrava indirettamente una risoluzione/miglioramento della NAFLD anche in questi pazienti con steatosi più severa. Inoltre, come mostrato in Figura 32, l'HOMA IR si riduceva al di sotto di 3.5, cutoff arbitrariamente proposto in questo studio per discriminare la steatosi moderata/severa da quella lieve nel paziente con obesità patologica.

Tabella 23 Pazienti con diagnosi di steatosi moderata/severa (S2/S3) alla biopsia epatica intraoperatoria (50% dell'intera coorte): enzimi epatici, tolleranza glucidica e indici di steatosi epatica prima e dopo chirurgia bariatrica

	Basale	dopo SGL	P
AST (U/L)	25.5 ± 11.9	16.5 ± 3.9	0.002
ALT (U/L)	34.6 ± 17.6	15.0 ± 6.1	0.001
GGT (U/L)	32.3 ± 21.9	13.8 ± 8.5	0.0001
HOMA IR	5.3 ± 3.5	1.4 ± 0.7	0.005
OGIS (ml/min m2)	355.3 ± 60.4	516.7 ± 53.1	0.0001
HSI	56.6 ± 5.8	41.0 ± 5.2	0.001
NAFLD-LFS	2.7 ± 2.4	- 2.5 ± 0.8	0.0001
TyG	8.9 ± 0.5	8.2 ± 0.4	0.0001

Figura 32 Pazienti con diagnosi di steatosi moderata/severa (S2/S3) alla biopsia epatica intraoperatoria: HOMA IR medio prima e dopo SGL (la linea continua indica il cutoff per la steatosi moderata/severa HOMA IR 3.5 proposto in questo studio nel soggetto con obesità patologica). *p < 0.05



Analogamente, per valutare se l'effetto benefico della SGL si osservasse anche nei pazienti con un quadro di fibrosi più significativa (fibrosi \geq F2), abbiamo considerato, di tutta la coorte, solo i pazienti che alla biopsia epatica intraoperatoria mostrassero fibrosi F2 (14% di tutta la coorte) e abbiamo confrontato gli indici di fibrosi epatica rilevati a 12 mesi con quelli presenti al reclutamento (Tabella 24). Anche in questi pazienti si osservava un miglioramento significativo delle transaminasi, della sensibilità insulinica e una riduzione degli indici di fibrosi, ad eccezione di FIB4 che mostrava valori sovrapponibili al basale, verosimilmente poiché associato a gradi di fibrosi > F2 come già spiegato in precedenza. In particolare, l'indice APRI si riduceva a valori inferiori a 0.2, cutoff arbitrariamente proposto in questo studio per discriminare gradi di fibrosi più significativi (fibrosi > F1) nel paziente con obesità patologica (Figura 33), a suggerire indirettamente un miglioramento/risoluzione della fibrosi dopo chirurgia bariatrica.

Tabella 24 Pazienti con diagnosi di fibrosi F2 alla biopsia epatica intraoperatoria (14% dell'intera coorte): enzimi epatici, tolleranza glucidica e indici di fibrosi epatica prima e dopo chirurgia bariatrica

	Basale	Dopo SGL	p
AST (U/L)	29.8 ± 13.5	18.3 ± 6.2	ns
ALT (U/L)	39.5 ± 16.3	17.9 ± 8.6	0.02
GGT (U/L)	43 ± 31.2	14.8 ± 10.3	0.02
HOMA IR	5.7 ± 4.7	1.4 ± 0.2	ns
OGIS (ml/min m2)	372.0 ± 48.5	528.5 ± 39.8	0,03
BAAT	1.9 ± 0.8	0.99 ± 0.3	0,03
FIB-4	0.70 ± 0.3	0.68 ± 0.23	ns
NAFLD Fibrosis Score	-0.69 ± 1.6	-1.3 ± 0.7	ns
APRI	0.3 ± 0.2	0.20 ± 0.9	0.05
ARFI (KPa)	11.4 ± 13.9	5.9 ± 8.0	ns

Figura 33 Pazienti con diagnosi di fibrosi F2 alla biopsia epatica intraoperatoria: APRI index medio prima e dopo SGL (la linea continua indica il cutoff per fibrosi ≥ F2 0,21 proposto in questo studio nel soggetto obeso). *p < 0.05

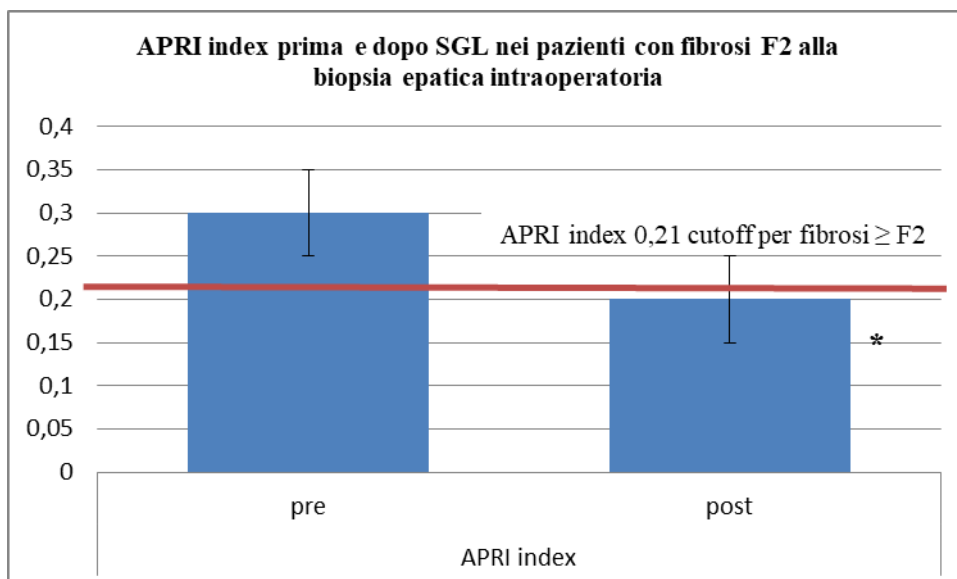
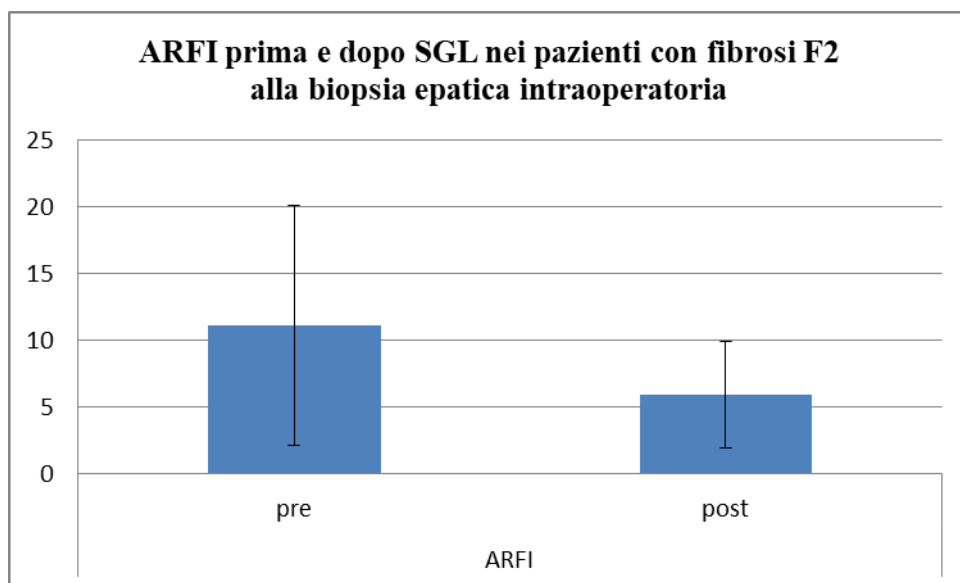


Figura 34 Pazienti con diagnosi di fibrosi F2 alla biopsia epatica intraoperatoria: ARFI prima e dopo SGL



Anche l'indice ARFI, rilevato durante ecografia epatica ed espressione della rigidità epatica e quindi della fibrosi, si riduceva in questi pazienti dopo chirurgia bariatrica (da 11,1 a 5,9 kPa), ma questi risultati non raggiungevano la significatività statistica, verosimilmente per l'ampia variabilità dei valori di ARFI nei pazienti, dovute alle difficoltà tecniche dell'esame nel paziente obeso.

4.5.2 Livelli circolanti di acidi biliari, precursore C4, FGF19 prima e dopo SGL

Nel sottogruppo dell'intera coorte di 43 pazienti in cui sono stati dosati gli acidi biliari, il loro precursore C4 e il FGF19, abbiamo considerato solo i pazienti con diagnosi di NAFLD (32 pazienti, 74%) e abbiamo confrontato le concentrazioni a digiuno e dopo stimolo di acidi biliari, precursore C4 e FGF19 presenti dopo chirurgia bariatrica con quelle rilevate al basale, come mostrato nelle Tabelle 25-27 e nelle Figura 35 .

La misurazione degli acidi biliari dopo chirurgia bariatrica ha mostrato indirettamente un miglioramento della NAFLD. Infatti, nei pazienti in cui alla biopsia epatica intraoperatoria si osservava NAFLD, dopo chirurgia bariatrica, si osservava:

- Aumento significativo della concentrazione degli acidi biliari totali (SUM) sia a digiuno che dopo stimolo, dovuto all'aumento degli acidi secondari (poiché i primari diminuivano)

- Diminuzione significativa a digiuno e dopo stimolo del precursore degli acidi biliari C4 che, essendo inversamente correlato all'attività dell'asse FXR/FGF19, suggeriva indirettamente un'aumentata attività del segnale FXR/FGF19 dopo chirurgia bariatrica
- Aumento significativo delle concentrazioni a digiuno e dopo stimolo del FGF19

Poiché nel capitolo precedente abbiamo dimostrato che nei pazienti affetti da NAFLD si osservavano, rispetto a quelli senza NAFLD, livelli più bassi di acidi biliari e più alti di precursore C4 (segno indiretto di una minore attività del segnale FXR/FGF19), i risultati sopra elencati suggeriscono indirettamente un miglioramento della NAFLD dopo chirurgia bariatrica.

Inoltre, l'analisi dei singoli acidi biliari dopo chirurgia bariatrica ha mostrato un aumento significativo della concentrazione plasmatica della maggior parte degli acidi biliari secondari. In particolare, si segnala l'aumento significativo dei seguenti acidi: TLCA, TUDCA, HCA (che in condizioni basali si mostravano ridotti nei pazienti con NAFLD rispetto a quelli senza NAFLD) e LCA e GLCA (ulteriormente diminuiti in condizioni basali nei pazienti con NASH).

L'aumentata concentrazione plasmatica di questi acidi biliari dopo SGL, che in condizioni basali si mostravano ridotti nei pazienti con steatosi semplice e con NASH rispetto ai pazienti con fegato istologicamente sano, suggeriva indirettamente un miglioramento dell'istologia epatica

Tabella 25 Pazienti con diagnosi di NAFLD alla biopsia epatica intraoperatoria: concentrazione plasmatica di acidi biliari (AB), loro precursore C4 e FGF19 a digiuno e dopo pasto misto (espressa come AUC) prima e dopo SGL

	Basale	Dopo SGL	p
AB Primari (nmol/l)	765.3 ± 523.4	487.8 ± 308.9	0.01
AUC AB primari	120339.7 ± 36545	95279 ± 42658	0.02
AB Secondari (nmol/l)	630.2 ± 709.9	1398.8 ± 1293.5	0.006
AUC AB secondari	81035.9 ± 39846.5	154380.7 ± 100310.2	0.003
SUM (nmol/l)	1217.3 ± 615.5	1758.2 ± 1384.6	0.05
AUC SUM	197163.4 ± 54400	362146.8 ± 187989	0.001
C4 (nmol/l)	69.6 ± 58.8	31.3 ± 40.6	0.0001
AUC C4	9475.1 ± 6432.2	4690.0 ± 4922.1	0.0001
FGF19 (pg/ml)	0.08 ± 0.05	0.2 ± 0.2	0.05
AUC FGF19	13.1 ± 6.9	22.9 ± 16.1	0.05

Tabella 26 Pazienti con diagnosi di NAFLD alla biopsia epatica intraoperatoria: concentrazione plasmatica (nmol/l) dei singoli acidi biliari a digiuno prima e dopo chirurgia bariatrica

	Basale	Dopo SGL	p
CA	129.8 ± 159.5	52.6 ± 63.2	0.01
GCA	109.3 ± 92.9	59.3 ± 32.4	0.009
TCA	21.9 ± 24.9	9.2 ± 7.2	0.02
CDCA	203.1 ± 231.6	91.6 ± 88.6	0.003
GCDCA	272.9 ± 159.2	251.6 ± 168.7	ns
TCDCa	31.7 ± 24.9	26.6 ± 17.9	ns
DCA	159.9 ± 119.2	162.4 ± 113.9	ns
GDCA	109.8 ± 107.7	146.3 ± 166.3	ns
TDCA	14.4 ± 13.5	15.4 ± 15.3	ns
LCA	6.65 ± 3.9	13.7 ± 13.1	0.004
GLCA	5,9 ± 8,7	11,7 ± 21,2	0,05
TLCA	1.04 ± 0.9	2.3 ± 2.5	0.01
UDCA	54.5 ± 86.2	138.2 ± 167.7	0.02
GUDCA	71.5 ± 76.6	403.1 ± 597.4	0.009
TUDCA	1.8 ± 1.8	10.2 ± 15.8	0.01
Iso UDCA	249.3 ± 643.1	395.3 ± 585.7	ns
HCA	5.2 ± 3.7	9.3 ± 5.9	0.001
HDCA	3.4 ± 3.2	42.7 ± 137.0	ns

CA=acido colico, GCA=acido glicocolico, TCA=acido taurocolico, CDCA= acido chenodesossicolico, GCDCA= acido glicochenodesossicolico, TCDCa= acido taurochenodesossicolico. DCA=acido desossicolico, GDCA=acidoglicodesossicolico, TDCA=acido taurodesossicolico LCA=acido litocolico, GLCA=acido glicolitocolico, TLCA=acido taurolitocolico UDCA= acido ursodesossicolico, GUDCA= acido glicoursodesossicolico, TUDCA=acido tauroursodesossicolico, iso-UDCA acido isoursodesossicolico HCA= acido iocolico, HDCA= acido iodesossicolico

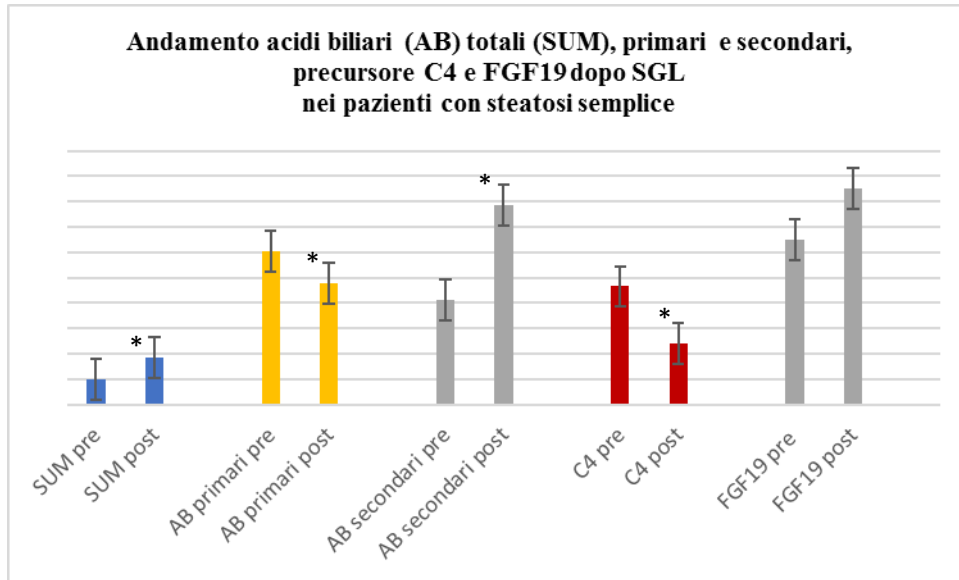
Tabella 27 Pazienti con diagnosi di NAFLD alla biopsia epatica intraoperatoria: concentrazione plasmatica (nmol/l) dei singoli acidi biliari (AB) dopo pasto misto (espressa come AUC) prima e dopo SGL

	Basale	Dopo SGL	p
AUC CA	13321 ± 14382	5505.8 ± 5165.6	0,007
AUC GCA	20456.5 ± 10488.8	20477.0 ± 12544.6	ns
AUC TCA	4197.85 ± 3324.7	3664.5 ± 2927.3	ns
AUC CDCA	7521.14 ± 5020,6	11722.7 ± 8663.5	ns
AUC GCDCA	56678.6 ± 18462.3	65815 ± 23402.7	ns
AUC TCDCA	21668.8 ± 16993	17043 ± 14808	0.02
AUC DCA	21120 ± 17191	27785 ± 19030	ns
AUC GDCA	20532.6 ± 16020.5	38379.4 ± 20606.4	0.001
AUC TDCA	3270.2 ± 2981.0	7746.2 ± 13569	ns
AUC LCA	839.9 ± 560.4	1942.7 ± 1587.5	0.005
AUC GLCA	1224.9 ± 888.3	4898.6 ± 3776	0.000
AUC TLCA	282.7 ± 247.8	975.7 ± 1329.0	0.02
AUC UDCA	5927.6 ± 9205.2	20740 ± 25918	0.01
AUC GUDCA	12206.3 ± 7256.8	13659 ± 12862	ns
AUC TUDCA	459.2 ± 622.8	2979.9 ± 3860.5	0.006
AUC Iso UDCA	13797.5 ± 9628.9	38430 ± 59184	0.05
AUC HCA	510.9 ± 367.6	1048.9 ± 723.6	0.001
AUC HDCA	395.9 ± 371.6	3836.9 ± 7686.6	ns

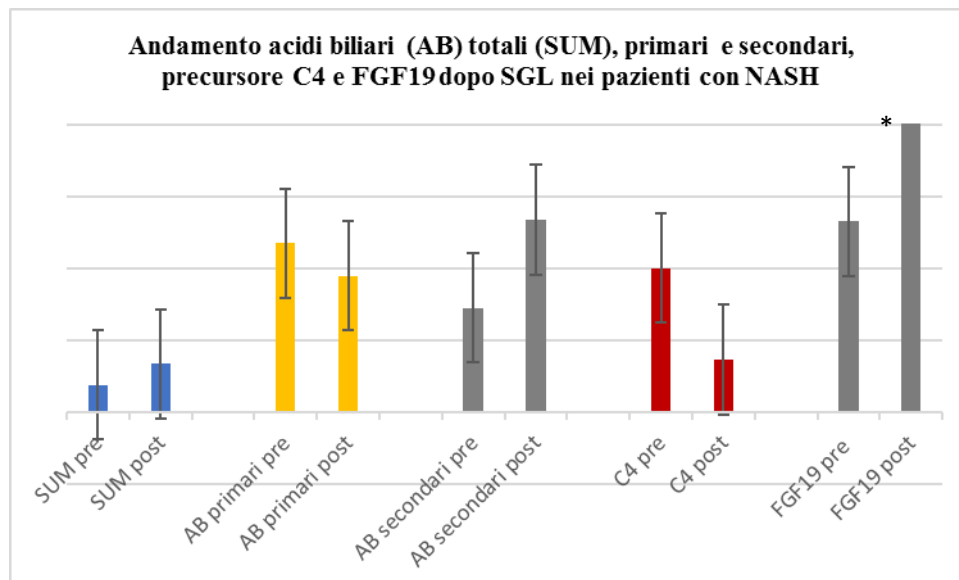
Quanto affermato sopra per i pazienti con diagnosi intraoperatoria di NAFLD, si confermava anche analizzando separatamente i pazienti affetti da steatosi semplice (28 soggetti) e quelli con steatoepatite (4 soggetti). In particolare, in quelli con NASH

l'aumento della concentrazione di FGF19 dopo chirurgia bariatrica era ancora più marcato rispetto ai pazienti con steatosi semplice, come si può vedere nella Figura 35b.

Figura 35 Andamento dei livelli plasmatici di acidi biliari (AB) totali (SUM), primari e secondari, precursore C4 e FGF19 prima e dopo chirurgia bariatrica nei pazienti con steatosi semplice (a) e NASH (b). * $p < 0.05$



a



b

4.6 GRADO DI SEVERITÀ DELL'ISTOLOGIA EPATICA ED EFFETTO DELLA SGL SULLA NAFLD IN PAZIENTI CON DM2/IGT/NGT

Per analizzare se la presenza del DM2 o della ridotta tolleranza ai carboidrati (IGT) potesse influire sulla severità dell'istologia epatica e se potesse limitare l'effetto benefico del calo ponderale ottenuto dopo chirurgia bariatrica sulla NAFLD, i pazienti dell'intera coorte sono stati suddivisi in 3 gruppi:

- NGT (con normale tolleranza glucidica): 56 pazienti (62%)
- IGT (con ridotta tolleranza ai carboidrati): 21 pazienti (24%)
- DM2 (con diabete tipo 2): 13 pazienti (14%)

e sono stati confrontati per caratteristiche dell'istologia epatica, assetto epatico ematico e indici non invasivi di steatosi e fibrosi. Nel sottogruppo di pazienti (n=43) in cui sono stati dosati i livelli plasmatici di acidi biliari, loro precursore C4 e FGF19 a digiuno e dopo pasto misto, i 3 gruppi sono stati confrontati anche per queste variabili.

Nel gruppo dei diabetici, tutti i soggetti erano affetti da NAFLD, con una prevalenza di NASH del 46%, significativamente maggiore rispetto ai non diabetici e quelli con IGT, in cui era del 14% in entrambi i gruppi. La prevalenza di NAFLD nel gruppo NGT e IGT era rispettivamente del 68% e 76% (Figura 36).

Per quanto riguarda l'istologia epatica, come si vede in Tabella 28 e nella Figura 36b, la prevalenza dell'infiammazione lobulare era marcatamente più alta nel gruppo dei diabetici, dove tutti i soggetti mostravano infiammazione lobulare e questo risultato appariva fortemente significativo. Anche la steatosi epatica e la fibrosi epatica avevano una prevalenza maggiore nei diabetici, ma tale risultato non raggiungeva la significatività statistica.

Non si osservavano differenze significative tra i gruppi per quanto riguarda le variabili antropometriche e gli enzimi epatici. Gli indici non invasivi di steatosi e fibrosi, analogamente, erano simili tra i gruppi, ad eccezione del Tyg index e del NFS, significativamente maggiori nei diabetici. Il Tyg index infatti deriva dal prodotto della glicemia a digiuno con i trigliceridi, quindi è un risultato atteso. L'aumento del NFS

score nei diabetici, invece, è un risultato concorde con l'aumentata prevalenza della fibrosi epatica nel gruppo dei diabetici.

Nel sottogruppo di 43 pazienti in cui sono stati dosati i livelli plasmatici di acidi biliari, precursore C4 e FGF19, queste variabili non mostravano differenze significative tra i gruppi.

Tabella 28 Confronto tra soggetti NGT, IGT e DM2 per quanto riguarda caratteristiche antropometriche, istologia epatica, assetto ematico epatico, indici non invasivi di steatosi e fibrosi.

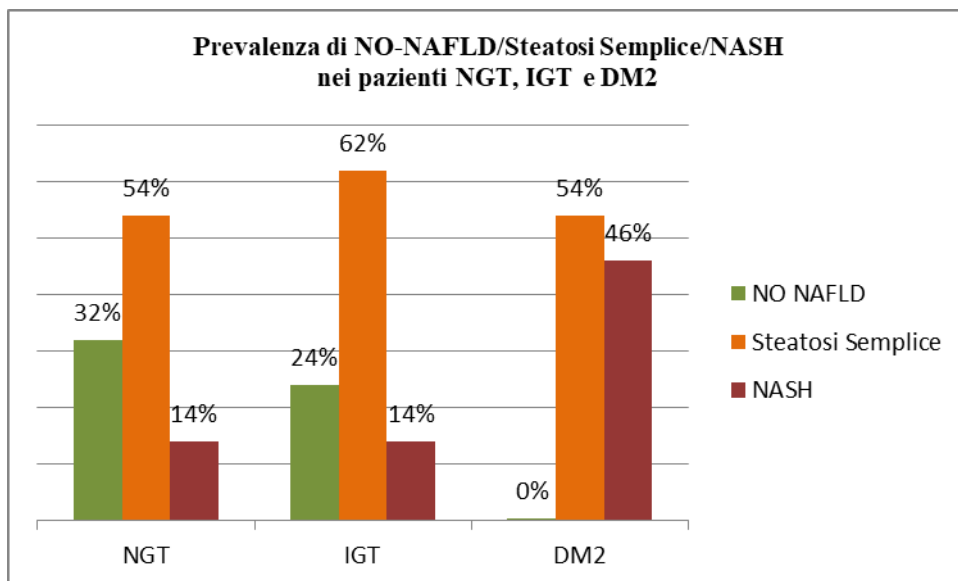
	NGT (n=56)	IGT (n=21)	DM2 (n=13)	P A vs B vs C
Antropometriche				
Peso corporeo (Kg)	118.1 ± 16.6	114.9 ± 16.4	122.8 ± 20.9	ns
BMI (Kg/m²)	43.1 ± 6	43.3 ± 5.5	44.9 ± 5.8	ns
Istologiche				
NO NAFLD/SS/NASH (%)	32/54/14	24/62/14	0/54/46	0.05
Steatosi S0, S1/S2, S3/S4 (n)	29/45/27	24/48/29	0/46/54	ns
Infiammazione (%)	43	67	100	0.008
Balloning (%)	32	19	85	ns
Fibrosi F0, F1, F2/F3,F4 (%)	12/71/18/0	9.5/86/4.5/0	0/69/31/0	ns
Indici ematici epatici				
ALT (U/L)	27.2 ± 15.2	35.1 ± 12.4	29.3 ± 19.7	ns
AST (U/L)	23.8 ± 11.4	23.8 ± 6.1	24.3 ± 10.3	ns
GGT (U/L)	25.3 ± 25.9	49.8 ± 35.6	27.3 ± 17.4	ns
Indici non invasivi di steatosi e fibrosi				
HSI	53.7 ± 7.8	56.2 ± 6.2	57.4 ± 6.3	ns
NAFLD-LFS	2.8 ± 2.5	1.5 ± 1.1	4.2 ± 2.6	ns

FLI	91.0 ± 11.3	95.7 ± 5.6	97.5 ± 4.5	ns
LAP	4.4 ± 0.5	4.7 ± 0.6	4.7 ± 0.5	ns
Tyg	8.5 ± 0.4	9.4 ± 0.7	8.9 ± 0.5	0.01
VAI	4.9 ± 2.8	7.1 ± 3.8	6.1 ± 3.4	ns
BAAT	1.8 ± 0.8	1.7 ± 0.9	2 ± 0.4	ns
APRI	0.23 ± 0.2	0.23 ± 0.1	0.24 ± 0.1	ns
NFS	-1.7 ± 0.6	0.01 ± 1.4	0.08 ± 1.3	0,03
FIB-4	0.65 ± 0.4	0.78 ± 0.3	0.6 ± 0.3	ns
Arfi (KPa)	5.5 ± 7.1	12.2 ± 17.2	7.8 ± 12.6	ns

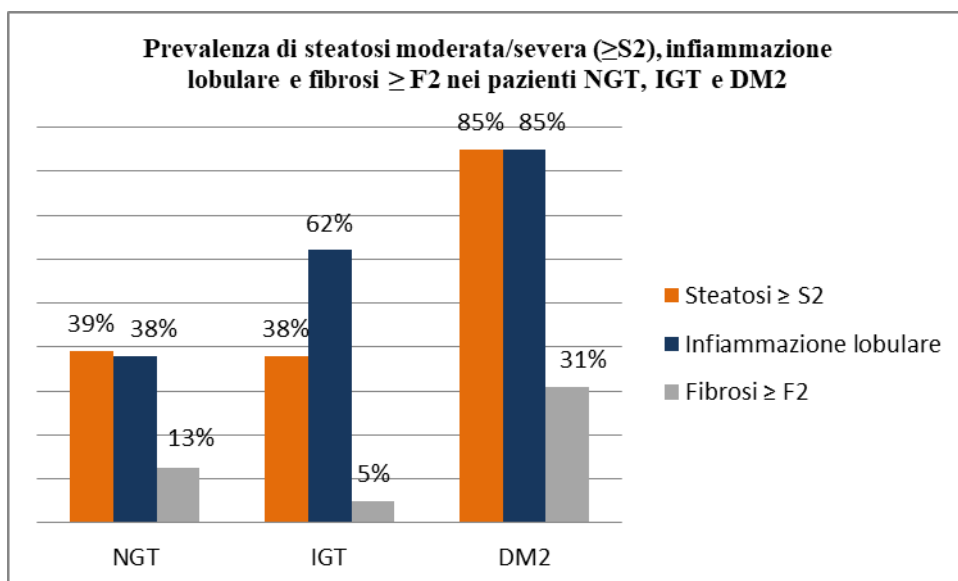
Per valutare se anche nei pazienti diabetici il calo ponderale ottenuto con chirurgia bariatrica migliorasse la NAFLD, abbiamo considerato di tutta la coorte solo i pazienti diabetici al reclutamento (n=13), tutti con biopsia epatica intraoperatoria diagnostica per NAFLD, e abbiamo confrontato i dati rilevati a 12 mesi dall'intervento con quelli presenti al reclutamento, per quanto riguarda:

- Assetto ematico epatico
- Indici non invasivi di steatosi e fibrosi epatica
- Livelli plasmatici di acidi biliari, precursore C4 e FGF19 a digiuno e dopo pasto misto.

Figura 36 Severità dell'istologia epatica nei pazienti NGT vs IGT vs DM2: nella figura a è mostrata la prevalenza dei soggetti NO NAFLD, steatosi semplice e steatoepatite nei 3 gruppi; nella figura b è mostrata la prevalenza di soggetti con steatosi \geq S2, infiammazione lobulare e fibrosi \geq F2 nei 3 gruppi



a



b

Tabella 29 Pazienti diabetici al reclutamento con diagnosi di NAFLD alla biopsia epatica intraoperatoria: assetto ematico epatico, indici di steatosi e fibrosi epatica, ARFI prima e dopo SGL

	Basale	dopo SGL	P
BMI (Kg/m²)	41.5 ± 6.9	31.6 ± 6.6	0.0001
Peso corporeo (Kg)	118.5 ± 19.9	88.6 ± 13.2	0.0001
Prevalenza DM2 (n)	13/13	1/13	0.0001
Glicemia a digiuno (mg/dl)	162.1 ± 75.6	101.6 ± 43.6	0.008
HbA1c (%)	8.1 ± 2,4	5.8 ± 1.0	0.003
ALT (U/L)	35.1 ± 12.4	14.7 ± 8.2	0.002
AST (U/L)	23.9 ± 6.1	16 ± 3.9	0.01
GGT (U/L)	49.9 ± 35.6	16.6 ± 10.3	0.04
HSI	56.2 ± 6.2	40 ± 6.2	0.0001
NAFLD-LFS	1.55 ± 1	-2.37 ± 0.5	0.0001
Tyg	9.4 ± 0.7	8.5 ± 0.4	0.02
BAAT	1.7 ± 0.9	1.4 ± 0.8	ns
APRI	0.24 ± 0.1	0.16 ± 0.04	0.04
NFS	0.01 ± 1.4	-1.03 ± 0.4	ns
FIB-4	0.78 ± 0.3	0.84 ± 0.3	ns
Arfi (KPa)	12.2 ± 17.2	3.7 ± 1.3	ns

Tabella 30 Pazienti diabetici al reclutamento con diagnosi di NAFLD alla biopsia epatica intraoperatoria: concentrazione di acidi biliari (AB), loro precursore C4 e FGF19 a digiuno e dopo pasto misto (espressa come AUC) prima e dopo SGL

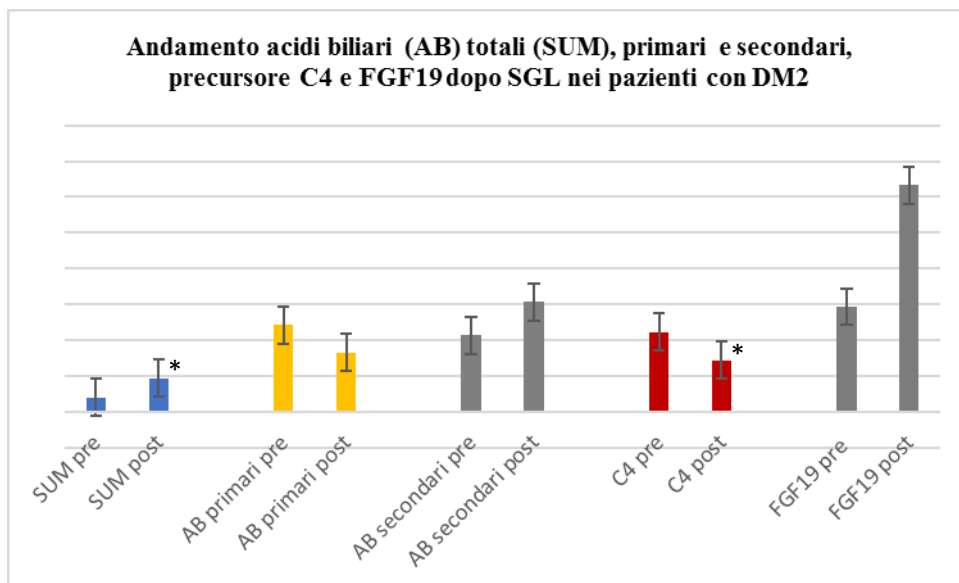
	Basale	Dopo SGL	p
AB Primari (nmol/l)	1004.7 ± 484.4	464.6 ± 373.9	ns
AUC AB primari	121007.7 ± 34449.5	82999.7 ± 50969.2	ns
AB Secondari (nmol/l)	711.4 ± 300.3	1869.7 ± 1491.2	ns
AUC AB secondari	106876.5 ± 48492.2	153568.9 ± 85958.3	ns
SUM (nmol/l)	1560.2 ± 703.3	2480.9 ± 1692.6	ns
AUC SUM	202808.3 ± 43164.9	473203.6 ± 69208.9	0.05
C4 (nmol/l)	96.7 ± 64.6	46.2 ± 62.4	0.03
AUC C4	11138.1 ± 6906.4	7206.2 ± 7878.4	0.01
FGF19 (pg/ml)	0.12 ± 0.04	0.17 ± 0.05	ns
AUC FGF19	14.7 ± 0.19	31.6 ± 21.9	ns

Dopo SGL, si osservava una risoluzione del DM2 nell'85% dei casi (un solo soggetto rimaneva diabetico). Anche nei soggetti con DM2 al reclutamento, si confermava quanto visto nell'intera coorte, ovvero un miglioramento della NAFLD che era indirettamente mostrato da:

- Riduzione fortemente significativa di transaminasi e GGT
- Riduzione significativa di tutti gli score validati di NAFLD e di steatosi epatica (HSI, NAFLD-LFS, Tyg) a valori inferiori al cutoff arbitrariamente proposto in questo studio per il rilevamento della steatosi nel paziente con obesità patologica (Tabella 12), come a suggerire assenza di steatosi dopo chirurgia bariatrica
- Riduzione di quasi tutti gli indici di fibrosi epatica valutati (NFS, APRI, BAAT) ad eccezione del FIB4 che tuttavia raggiungeva la significatività statistica solo per l'indice APRI.
- Riduzione marcata dell'indice ARFI seppure questo risultato non appariva statisticamente significativo, probabilmente a causa della grande variabilità di questo valore nei pazienti studiati date le difficoltà di esecuzione di questo esame nel soggetto obeso.

- Aumento significativo della concentrazione degli acidi biliari totali (SUM) dopo stimolo e aumento della maggior parte degli acidi biliari secondari, in modo significativo soprattutto per l'acido LCA e le sue forme coniugate GLCA e TLCA
- Diminuzione significativa a digiuno e dopo stimolo del precursore degli acidi biliari C4 che, essendo inversamente correlato all'attività dell'asse FXR/FGF19, suggeriva indirettamente un'aumentata attività del segnale FXR/FGF19 dopo SGL.
- Aumento delle concentrazioni a digiuno e dopo stimolo del FGF19, che tuttavia non raggiungeva la significatività statistica.

Figura 37 Andamento dei livelli plasmatici di acidi biliari (AB) totali (SUM), primari e secondari, precursore C4 e FGF19 prima e dopo chirurgia bariatrica nei pazienti DM2. *p < 0.05



5. DISCUSSIONE

Come è noto, l'obesità è spesso gravata da varie complicanze fra le quali una delle più frequenti è costituita dall'accumulo di trigliceridi nel fegato, che determina l'origine della NAFLD. La NAFLD, che rappresenta oggi la principale causa di epatopatia cronica nei paesi occidentali, comprende infatti quadri di gravità diversa che vanno dalla semplice steatosi alla presenza di infiammazione cronica (NASH o steatoepatite) o nei casi più gravi alla cirrosi (19). La prevalenza della NAFLD è in aumento di pari passo alla prevalenza dell'obesità, tuttavia, pur associandosi ad un'aumentata comorbidità e ad un alto rischio cardiovascolare, rimane non diagnosticata nella maggior parte dei soggetti. Il grado di eccedenza ponderale, infatti, anche laddove sia di grave entità, non è sempre correlato alla gravità della compromissione epatica e molti soggetti con quadri già avanzati di NAFLD possono presentarsi asintomatici o con enzimi epatici nella norma (19, 31). Dal momento che l'esame gold standard per la diagnosi di NAFLD rimane la biopsia epatica, esame troppo invasivo e costoso per essere applicato su così ampia scala, risulta di fondamentale importanza ricercare marcatori predittivi di danno epatico in grado di identificare precocemente i soggetti più a rischio. Da questa esigenza nasce il presente studio, che ha preso in considerazione pazienti con obesità severa, con e senza diabete, candidati a sleeve gastrectomy laparoscopica (SGL) che in sede intraoperatoria sono stati sottoposti a biopsia epatica.

In particolare, 90 soggetti con obesità patologica, di cui 13 diabetici e 21 IGT, sono stati studiati e i dati dell'istologia epatica sono stati correlati, allo stesso tempo, con i vari indici surrogati di sensibilità/resistenza e secrezione insulinica (HOMA IR, OGIS, Matsuda Index, Disposition Index, Hepatic IR, Insulogenic Index), con gli score non invasivi di steatosi (FLI, HSI, NAFLD-LFS, LAP, Tyg, VAI INDEX) e fibrosi epatica (NFS, FIB-4, APRI, BAAT) e con i livelli plasmatici di acidi biliari e di FGF19 misurati sia a digiuno che dopo pasto. Tali correlazioni hanno permesso di identificare variabili predittive di danno epatico, con cui è stato possibile valutare indirettamente l'effetto del calo ponderale ottenuto con SGL sulla NAFLD, a 12 mesi dall'intervento, in assenza di una seconda biopsia epatica.

In base ai risultati della biopsia epatica, i soggetti sono stati definiti come NO-NAFLD (gruppo A), steatosi semplice (gruppo B) e steatoepatite o NASH (gruppo C), in

accordo alle linee guida europee (27). Nella nostra coorte esclusiva di pazienti con BMI > 40 Kg/m², la prevalenza di NAFLD era del 77% , con un 53% con steatosi semplice e 24% con NASH, mentre il 23% di pazienti non mostrava NAFLD all'istologia. Sebbene la prevalenza di NAFLD e NASH nella popolazione generale sia stata stimata intorno al 25% e 6% rispettivamente (110), la prevalenza nell'obesità severa è molto più alta ma anche molto imprecisa, in parte per le difficoltà tecniche di esecuzione di alcune indagini strumentali nel paziente obeso in parte perché la biopsia epatica viene effettuata solo nel sospetto di epatopatia severa. In una recente review, Machado e altri (111) hanno studiato una vasta coorte di 1600 pazienti con obesità patologica, riportando una prevalenza di NAFLD del 91% (85-98%), con un'ampia variabilità di NASH (24-98%, media 37%). Anche altri autori hanno riportato una prevalenza simile di NASH, Bedossa il 35% (112) e Petrick il 32% (113), mentre Lassailly una prevalenza molto più bassa (7,7%) (114). La prevalenza di NASH del nostro studio è del 24%, dunque poco più bassa di quella riportata da Bedossa (112) e Petrick (113), ma simile a quella di Machado (111). Come atteso, il grado di steatosi, infiammazione lobulare e ballooning dei soggetti studiati aumentava significativamente dal gruppo A al gruppo C, mentre non si osservavano differenze significative di fibrosi tra pazienti con steatosi semplice e pazienti con steatoepatite.

La NAFLD si associa non solo ad una aumentata mortalità fegato correlata ma anche ad un aumentato rischio cardiovascolare. In una interessante review (115) di 27 diversi lavori, Oni ed altri autori hanno mostrato un'associazione tra NAFLD e aumentato spessore medio intimale carotideo, calcificazioni dell'arteria coronarica, disfunzione endoteliale e rigidità della parete arteriosa. D'altro canto, il grado di fibrosi epatica è stato descritto in alcuni recenti lavori come il parametro istologico più importante nel determinare la morbilità fegato-correlata e il rischio di trapianto epatico (116). Angulo ha dimostrato che anche un grado di fibrosi F1 è associato ad un hazard ratio (HR) per morte e trapianto di fegato di 1.88 e che questo valore aumenta all'aumentare del grado di fibrosi (117). Questo dato è confermato anche da Ekstedt (116), che nel suo lavoro afferma che una fibrosi avanzata F3 o F4 predice la mortalità per tutte le cause, indipendentemente dalla presenza di infiammazione e di NASH. Va sottolineato, tuttavia, che in tutti questi studi il BMI medio era molto più basso di quello della casistica di questo studio (range 26.4-34.5 Kg/m²).

I dati di questo studio dimostrano che i tre gruppi di pazienti (NO NAFLD vs steatosi semplice vs NASH) erano simili tra loro per età, genere e BMI, mentre, in accordo con quanto riportato in letteratura (118), i livelli sierici di transaminasi, GGT, glicemia a digiuno e uricemia erano significativamente più alti nei pazienti con NAFLD, sebbene nessuna differenza significativa si osservasse tra il gruppo con steatosi semplice e quello con NASH. La prevalenza del diabete aumentava con la severità del danno epatico, passando da zero nel gruppo NO-NAFLD al 15% nel gruppo con steatosi semplice al 35% in quello con NASH. Nei soggetti non diabetici, i livelli di insulina resistenza espressi dall'indice HOMA IR e dalle AUC delle insulinemie misurate durante OGTT aumentavano nei pazienti con NAFLD ma solo l'indice OGIS, misura della clearance periferica del glucosio durante OGTT e dunque espressione della sensibilità insulinica periferica, diminuiva significativamente dai pazienti NO-NAFLD a quelli con steatosi semplice a quelli con NASH, raggiungendo i valori più bassi in questo gruppo.

Sebbene diversi studi abbiano valutato l'associazione tra insulina resistenza a digiuno, steatosi e steatoepatite (111, 114) pochi hanno valutato così tanti indici OGTT derivati in relazione al danno epatico in una coorte esclusiva di pazienti con obesità grave. Inoltre la progressiva riduzione dell'OGIS dai NO-NAFLD vs steatosi semplice vs NASH, appare un risultato molto interessante perché attualmente non esiste nessun biomarcatore di NASH (31). Inoltre, l'OGIS diminuiva significativamente col grado di steatosi epatica (S2/S3 vs S0-S1), rivelandosi dunque un valido indice metabolico, OGTT derivato, molto più utile degli indici di insulina resistenza basati sui valori a digiuno, inversamente correlato alla severità del danno epatico nel paziente con obesità patologica. Tuttavia, non si osservava nessuna associazione tra OGIS e grado di fibrosi epatica, a differenza di quanto riportato da Rosso (101) e Svegliati (119), che nei loro lavori hanno trovato un'associazione tra OGIS e fibrosi epatica avanzata (F3/4). Questa discordanza può essere spiegata dal fatto che nella nostra coorte la maggior parte dei pazienti (77%) mostrava una fibrosi lieve (\leq F1) mentre solo il 14% riportava una fibrosi F2, con un unico paziente con fibrosi F3. Inoltre nei lavori di Rosso e Svegliati, i pazienti mostravano un grado di obesità minore di quello del presente studio.

I risultati di questo studio dimostrano che i pazienti con obesità severa affetti da NAFLD hanno un'alterata clearance del glucosio durante OGTT, che peggiora col grado di epatopatia. D'altra parte la presenza di diabete si associava ad un'istologia epatica più severa, come mostrato dal fatto che tutti i soggetti diabetici fossero affetti da NAFLD e che l'emoglobina glicata si associasse ad un aumentato grado di steatosi epatica, infiammazione lobulare e fibrosi. Tale risultato indica come nel soggetto con obesità grave la severità dell'istologia epatica si associ molto di più al grado di compromissione glico-metabolica che al grado di obesità (BMI), suggerendo l'importanza di effettuare l'OGTT non solo per indagare la tolleranza glucidica ma anche la severità della NAFLD. L'associazione tra fibrosi epatica e alterata tolleranza glucidica sembra mediata dalle escursioni glicemiche post prandiali, indipendentemente dal grado di steatosi e dal BMI. Questo risultato è confermato da diversi autori: Rosso (101) ha dimostrato che nei pazienti non diabetici con NAFLD, sottoposti ad OGTT, le escursioni glicemiche più alte si avevano nei soggetti con più alti gradi di fibrosi epatica (F3/F4); Strey invece ha studiato soggetti diabetici, descrivendo il diabete tipo 2 come un fattore di rischio indipendente per la fibrosi avanzata (120); infine Souto (121) ha analizzato le biopsie epatiche di 521 pazienti obesi, riportando che i gradi più alti di fibrosi epatica si osservavano maggiormente nei diabetici (56,4%), rispetto agli IGT (29%) e ai normoglicemici. In accordo con Souto, anche in questo studio la fibrosi epatica F2 aveva una prevalenza più alta nei diabetici rispetto ai soggetti IGT e NGT (fibrosi F2 31% in DM2 vs 5% in soggetti IGT vs 13% in soggetti NGT).

E'interessante notare che, nella casistica di questo studio, i soggetti senza NAFLD, quelli con steatosi semplice o con NASH, avevano dati sovrapponibili per quanto riguarda BMI, genere ed età. Questo risultato conferma quanto detto sopra, ovvero che la severità del danno epatico non dipende dal grado di obesità come suggerito da Bedossa (112), ma dal grado di compromissione metabolica e dalla presenza di comorbidità. Infatti, così come per il DM2, anche la prevalenza di ipertensione arteriosa, dislipidemia e sindrome metabolica aumentava nei pazienti con steatosi semplice e con NASH ma tale risultato raggiungeva la significatività statistica solo per la sindrome metabolica. Anche Machado (111), in accordo ai dati di questo studio, ha riportato che la NASH non correla né col genere né col BMI, ma ha trovato un'associazione tra il genere maschile e la presenza di NASH e fibrosi epatica. La

casistica di questo studio, tuttavia, è costituita prevalentemente da soggetti di genere femminile (F/M 73/17) pertanto non è stato possibile valutare il ruolo del genere sulla NAFLD nella grande obesità.

Un altro indice metabolico che in questo studio appariva abile nel differenziare la NASH dalla steatosi semplice, era il VAI index, calcolato con un algoritmo differenziato per genere che utilizza le seguenti variabili: BMI, circonferenza vita, trigliceridi e HDL. Nei soggetti di questo studio, il VAI index aumentava in modo significativo ($p < 0,04$) con l'aumentare della severità dell'istologia epatica (NASH > steatosi semplice > NO- NAFLD), raggiungendo i valori più alti nella steatoepatite. Esso è stato descritto come un nuovo marker di disfunzione del tessuto adiposo, indipendentemente associato sia con la steatosi che con l'attività necroinfiammatoria e direttamente correlato alla carica virale nei pazienti con epatite C (32). Probabilmente il VAI index è in grado di rispecchiare la capacità del tessuto adiposo di generare mediatori proinfiammatori non solo nel quadro infettivo dell'epatopatia HCV relata ma anche in quello infiammatorio dell'obesità patologica complicata da NAFLD.

Pertanto, in questo lavoro, sia l'OGIS che il VAI index, due indici facilmente calcolabili con esami di routine non costosi, appaiono validi surrogati da utilizzare nella pratica clinica del paziente con obesità patologica per predire la severità dell'istologia epatica e identificare i soggetti più a rischio da indirizzare ad esami più invasivi, come la biopsia epatica. Infatti, solo il 24% dei pazienti era affetto da NASH e solo il 14% aveva un grado di fibrosi >F1.

Un altro risultato importante di questo lavoro consiste nell'aver analizzato l'accuratezza diagnostica della maggior parte degli indici non invasivi di steatosi e di fibrosi descritti in letteratura (31), in una popolazione speciale di pazienti con obesità grave, proponendo nuovi valori soglia da adottare in questi soggetti per alcuni di questi indici. Infatti, gli score di steatosi e fibrosi comunemente usati mostrano spesso scarsa accuratezza negli obesi, come è stato descritto da Blond (122) che ha applicato le recenti raccomandazioni suggerite dalle linee guida EASL-EASD-EASO (27), utilizzando il NFS score e la sua combinazione con tecniche di elastografia epatica in una coorte di 385 soggetti con obesità patologica, riportando un'alta percentuale di individui falsi positivi da indirizzare erroneamente ad esami più approfonditi. Anche in

questo studio, tutti gli indici non invasivi di steatosi analizzati (HSI, FLI, NAFLD-LFS, LAP and Tyg) mostravano un'altissima percentuale di falsi positivi con i cutoff descritti in letteratura (31) probabilmente poiché la maggior parte di questi score includono il BMI e la circonferenza vita nel loro algoritmo. Questo studio è il primo ad aver analizzato contemporaneamente la maggior parte degli indici non invasivi di steatosi e fibrosi in una coorte esclusiva di pazienti con obesità grave e ad aver proposto, sulla base di curve ROC, nuovi valori soglia da adottare in questa popolazione per i più frequenti indici di steatosi (HSI, FLI, NAFLD-LFS, LAP and Tyg). Lassailly e altri autori hanno validato, in una coorte di 288 pazienti con obesità patologica, alcuni biomarcatori non invasivi di danno epatico quali il FibroTest, lo SteatoTest e l'ActiTest, riportando una buona accuratezza anche in questi soggetti (123). Tuttavia, questi score utilizzano esami molto più costosi di quelli utilizzati in questo lavoro, basati semplicemente su variabili antropometriche e semplici esami di routine.

D'altro canto, in un recentissimo lavoro, alcuni autori hanno sviluppato uno score non invasivo per predire la NASH nel paziente con obesità patologica candidato a chirurgia bariatrica, ma tale algoritmo si basava non solo su variabili di laboratorio (HbA1c, AST, ALT, trigliceridi) ma anche su parametri rilevati all'ecografia epatica, che è un esame operatore dipendente spesso di difficile esecuzione in questi pazienti (124).

Nessuno degli indici non invasivi analizzati in questo studio, ad eccezione del VAI sopra descritto, era in grado di discriminare la NASH dalla steatosi semplice. Tuttavia, tutti gli indici di steatosi aumentavano significativamente col grado di steatosi (S2/S3 vs S0/S1), in associazione ad ALT, GGT e trigliceridi, mentre l'indice OGIS diminuiva, a conferma ulteriore dell'associazione tra severità di steatosi e sensibilità periferica all'insulina. D'altra parte, l'HOMA IR appariva la variabile migliore per discriminare la steatosi moderata-severa (grado di steatosi \geq S2, ovvero presenza di steatosi in più del 33% degli epatociti), con un cutoff ottimale \geq 3.5 ed una sensibilità e specificità del 70%. Anche Isokuortti (100) ha recentemente studiato l'associazione tra HOMA IR e steatosi epatica valutata con Risonanza Magnetica, considerandola positiva per un contenuto di grasso epatico $>$ 5,6% degli epatociti e ha riportato un valore soglia ottimale di HOMA IR di 1.9, con sensibilità 87% e specificità 79% per identificare la presenza di NAFLD, ma i pazienti considerati non erano affetti da obesità patologica.

Tutti gli altri indici di steatosi analizzati in questo studio non mostravano grande accuratezza nel discriminare il grado di steatosi nei pazienti con obesità patologica e tale risultato è in accordo con altri precedenti studi (125, 126) ed è spiegato probabilmente dal grande peso del BMI e della circonferenza vita nell'algoritmo di queste formule, che può sovrastimare lo score quando applicato ad una popolazione obesa.

Nessuno degli indici di fibrosi analizzati in questo studio (NFS, FIB4, BAAT, APRI) era in grado di predire la severità dell'istologia epatica e discriminare NASH dalla steatosi semplice. Solo l'indice APRI era in grado di discriminare una fibrosi \geq F2 con una modesta accuratezza all'analisi della curva ROC (AUROC 0.77 con p 0.005) maggiore di quella degli enzimi epatici ALT e GGT, che pure aumentavano significativamente col grado di fibrosi.

Già altri autori (127) hanno riportato che l'indice APRI e non il FIB-4 né il NFS, è in grado di distinguere una fibrosi epatica \geq F2 nei pazienti con NAFLD, ma i soggetti inclusi in questo studio avevano un BMI più basso del nostro (BMI $<$ 35 Kg/m² vs BMI $>$ 40 Kg/m² rispettivamente). Il fatto che né l'indice NFS, né il FIB-4, indici validati di fibrosi avanzata \geq F3, non risultassero efficienti nella coorte di questo studio è dovuto probabilmente al fatto che solo uno dei nostri pazienti avesse fibrosi F3 e tutti gli altri sono stati classificati in 2 gruppi a seconda di un grado di fibrosi maggiore o minore di F2 (gruppo F0/F1 vs gruppo F2/F3). Pertanto, dal momento che sia FIB-4 che NFS sono più abili nel discriminare F0/1/2 vs F3/4, questo potrebbe spiegare la scarsa efficienza di questi score nel nostro lavoro. D'altra parte, l'indice APRI è facilmente calcolabile con una formula che richiede ALT e piastrine e potrebbe quindi rappresentare uno score economico e molto maneggevole nella pratica clinica per predire il grado di fibrosi epatica nel paziente obeso. Inoltre, è stato identificato un cutoff di 0,21 che sembra abile nel discriminare una fibrosi di grado \geq F2 in questa tipologia di pazienti, con una sensibilità e specificità del 65%. Sebbene questi valori di sensibilità e specificità possano sembrare bassi, bisogna sottolineare che si tratta di una popolazione speciale in cui gran parte degli indici validati in letteratura risultano alterati.

I pazienti inclusi in questo studio sono stati valutati anche con tecnica elastografica ARFI, che consiste nel misurare la rigidità del parenchima epatico (liver stiffness measurement) tramite la velocità di spostamento di un'onda ultrasonora all'interno di una regione del fegato e viene effettuata nel corso di un normale esame ecografico. E' stata descritta spesso come una tecnica di scarso successo nel paziente obeso, sebbene alcuni autori abbiano mostrato come possa essere efficace anche in presenza di obesità (128). I nostri dati mostrano che l'ARFI non mostra differenze tra soggetti con steatosi semplice e soggetti con NASH, ma aumenta col grado di fibrosi, seppure questi risultati non raggiungano la significatività statistica, probabilmente per il fatto che la maggior parte dei pazienti aveva una fibrosi F1 e il gruppo con fibrosi \geq F2 era numericamente molto più piccolo dell'altro. Questi risultati appaiono in linea con quelli di Attia (128), che nella sua coorte di pazienti in sovrappeso e obesi ha mostrato una correlazione tra indice ARFI e grado di fibrosi ($r = 0.85$, $p < 0.0001$) sebbene nessuna correlazione si osservasse con la presenza di steatosi e di steatoepatite o con il BMI.

Oltre ad essere stati confrontati i diversi gradi istologici di epatopatia per quanto riguarda gli indici non invasivi di steatosi e fibrosi e per tutte le variabili metaboliche, inclusi gli indici surrogati di tolleranza glucidica, in un sottogruppo di pazienti dell'intera coorte sono stati misurati i livelli plasmatici di acidi biliari, del loro precursore C4 e del FGF19, sia a digiuno che dopo pasto misto. Negli ultimi anni, è emerso sempre di più il ruolo degli acidi biliari come molecole responsabili non solo dell'assorbimento intestinale dei lipidi, ma anche della regolazione dell'omeostasi glucidica e lipidica e dunque in grado di modulare la sensibilità insulinica e la patogenesi della NAFLD a diversi livelli (129). Gli effetti degli acidi biliari sono mediati dai loro recettori, tra i quali i più studiati il recettore nucleare FXR (Farnesoid X receptor), espresso soprattutto a livello ileale, e il recettore di membrana TGR5. Una volta attivato a livello ileale dagli acidi biliari, FXR determina il rilascio nel flusso sanguigno di FGF19 (fibroblast growth factor 19) che ha una duplice funzione a livello epatico: regolatoria del metabolismo glucidico e lipidico e inibitoria della sintesi degli acidi biliari. Il marcatore plasmatico della sintesi degli acidi biliari è rappresentato dal loro precursore C4 (7alfa-idrossi-4-colestene-3-uno). In condizioni fisiologiche, dunque, le cellule intestinali percepiscono alti livelli di acidi biliari nel lume; ciò determina l'attivazione di FXR e il rilascio nel circolo sanguigno di FGF19 che

raggiunge il fegato e inibisce la sintesi degli acidi biliari, riducendo i livelli sierici di C4. Pertanto, tanto più è attivo FXR e tanto maggiori sono i livelli di FGF19, tanto minori saranno quelli di C4 (82).

I dati di questo studio dimostrano che i pazienti obesi affetti da NAFLD presentano concentrazioni plasmatiche minori di acidi biliari rispetto ai pazienti senza NAFLD e maggiori di precursore C4. Poiché i livelli plasmatici di C4 sono inversamente correlati all'attività del segnale FXR/FGF19, si può indirettamente affermare che nei pazienti con NAFLD questo segnale sia meno attivo. Le concentrazioni plasmatiche di FGF19 tuttavia non mostravano differenze significative tra i gruppi e questo potrebbe apparire in disaccordo con quanto sopra riportato, ma tale apparente contraddizione potrebbe essere spiegata dalla scarsa numerosità del campione che potrebbe influenzare la significatività dei risultati. Inoltre, più che i livelli plasmatici del FGF19 *per se*, è rilevante la concentrazione del precursore C4 poiché questa riflette l'attività del segnale a livello recettoriale e dunque la funzione attiva del FGF19 che va oltre la sua concentrazione plasmatica.

Sui livelli di acidi biliari nei pazienti affetti da NAFLD non ci sono pareri concordi. In un lavoro che ha incluso 53 soggetti, Mouzaki (130) ha esaminato la concentrazione fecale di acidi biliari in pazienti con diagnosi istologica di steatosi semplice o steatoepatite, in confronto con soggetti con fegato istologicamente sano, dimostrando che nei pazienti con NAFLD, soprattutto in quelli con NASH, le concentrazioni fecali di acidi biliari erano maggiori e correlavano con una disbiosi intestinale. La reciproca interazione tra microbioma intestinale e composizione degli acidi biliari è nota in molti studi: il microbiota intestinale, tramite diverse attività enzimatiche modula il pool degli acidi biliari, d'altra parte gli acidi biliari attraverso l'attivazione del recettore FXR producono fattori antimicrobici in grado di modulare la composizione della flora batterica intestinale (131-133). La discordanza con quanto riportato da Mouzaki potrebbe essere spiegata sia dal fatto che gli acidi biliari sono stati misurati nelle feci e non in circolo, sia dal fatto che si trattava di pazienti con un grado di obesità minore del nostro, in quanto il BMI medio era $< 35 \text{ Kg/m}^2$. Tuttavia, in accordo ai dati di questo studio, anche Mouzaki ha riportato un'augmentata sintesi degli acidi biliari nei pazienti con NAFLD, espressa indirettamente dagli aumentati livelli di precursore C4.

Anche altri studi hanno riportato che in soggetti con NASH la concentrazione plasmatica di acidi biliari e di precursore C4 è aumentata (134). Tuttavia, la composizione qualitativa degli acidi biliari differisce tra i vari autori. Inoltre, le diverse tecniche e modalità (solo a digiuno o anche dopo stimolo) di misurazione degli acidi biliari potrebbero spiegare le differenze presenti in letteratura.

La composizione qualitativa degli acidi biliari riveste un ruolo importante: infatti non tutti gli acidi biliari stimolano il recettore FXR con la stessa intensità, tra i maggiori agonisti del recettore FXR si hanno l'acido chenodesossicolico (CDCA), l'acido desossicolico (DCA), l'acido litocolico (LCA) e l'acido colico (CA), con la seguente affinità di legame $CDCA > DCA > LCA > CA$ (82). In questo lavoro, nei pazienti con NAFLD si osservava una riduzione delle concentrazioni della maggior parte di questi acidi maggiormente agonisti di FXR, sia nei diabetici che nei non diabetici. In particolare nei pazienti con NASH si osservava una riduzione significativa del LCA, DCA e della forma glicoconiugata del CDCA, ovvero GCDCA. Questi risultati appaiono interessanti se si pensa che, tra i possibili trattamenti terapeutici per la NAFLD in fase di studio, vi sono gli agonisti del recettore FXR. Alcuni autori hanno riportato benefici in modelli preclinici di NAFLD/NASH con l'utilizzo di agonisti naturali di FXR, come CA e CDCA o sintetici, suggerendo che l'utilizzo di queste molecole possa ridurre la steatosi e l'infiammazione epatica (129).

L'aumento degli acidi biliari e il cambiamento della loro composizione dopo chirurgia bariatrica, riportato da diversi autori (74, 92, 135) suggerisce come la concentrazione di queste molecole possa modulare l'omeostasi glico-metabolica e, più o meno direttamente, la progressione della NAFLD. Patti e colleghi (74) hanno riportato che la concentrazione plasmatica a digiuno degli acidi biliari aumentava significativamente dopo il gastric bypass (GBP) e i pazienti obesi sottoposti a GBP mostravano livelli di acidi biliari 2-4 volte più alti rispetto agli obesi non sottoposti a chirurgia bariatrica. Anche Nakatani (92) e Pounaras (135) hanno riportato un aumento degli acidi biliari in seguito a GBP come meccanismo promotore del calo ponderale e del miglioramento glicemico. Steinert (136) ha analizzato l'andamento degli acidi biliari a digiuno e dopo pasto misto in 14 obesi non diabetici, 7 sottoposti a GBP e 7 a SGL, con misurazioni effettuate dopo 1 settimana, 3 mesi e 12 mesi dall'intervento e hanno trovato che, in

entrambi i gruppi, la concentrazione a digiuno e stimolata di acidi biliari aumentava lentamente dopo l'intervento, parallelamente al calo ponderale e ai miglioramenti glicometabolici, mostrando differenze statisticamente significative solo ad un anno di follow up.

Anche in questo lavoro, le concentrazioni plasmatiche di acidi biliari aumentavano dopo SGL in tutti i soggetti, con e senza diabete. In particolare, è stato dimostrato che i soggetti con diagnosi istologica di steatosi semplice o NASH alla biopsia epatica intraoperatoria mostravano a un anno di follow up un aumento della concentrazione totale degli acidi biliari rispetto al basale, una diminuzione del precursore C4, che rifletteva una maggior attività del segnale FXR/FGF19, e un aumento della concentrazione di FGF19. Poiché gli acidi biliari rivestono un ruolo fondamentale nell'omeostasi glicemica e lipidica, così come l'attività del segnale FXR/FGF19, questi cambiamenti osservati dopo chirurgia bariatrica suggeriscono indirettamente un miglioramento della NAFLD dopo l'intervento chirurgico. Tra i singoli acidi biliari, inoltre, si osservava un aumento significativo dell'acido LCA, che rappresenta un agonista di FXR e questo risultato si osservava soprattutto nei pazienti con NASH. Date le ultime novità, sopra descritte, in merito all'utilizzo di agonisti FXR come possibili trattamenti per la NAFLD/NASH, questi risultati appaiono molto interessanti.

Il miglioramento della NAFLD dopo chirurgia bariatrica è noto (137) ed è un effetto dovuto non solo al calo ponderale, ma anche al miglioramento dell'omeostasi glicemica e lipidica e alla riduzione dei mediatori pro-infiammatori tipici dell'obesità (138) registrati dopo l'intervento e talvolta prima di un significativo calo ponderale (66).

In questo studio, l'aumento degli acidi biliari e del segnale FXR/FGF19 registrato dopo chirurgia bariatrica suggeriva un miglioramento della NAFLD dopo SGL, come sopra descritto. Ma l'effetto della SGL sulla NAFLD, in questo lavoro, è stato valutato anche con altre metodiche non invasive, senza ripetere la biopsia epatica nel follow up: in particolare, i pazienti con biopsia epatica intraoperatoria diagnostica per steatosi semplice e steatoepatite, sono stati rivalutati a un anno dall'intervento con gli indici non invasivi di steatosi e fibrosi e con tutte le variabili metaboliche dimostrate in questo studio maggiormente predittive di severità dell'istologia epatica. In particolare, l'aumento significativo dell'OGIS, indice inversamente correlato al danno epatico, e la

riduzione significativa delle transaminasi e GGT suggerivano indirettamente un miglioramento dell'istologia epatica. Analogamente, la risoluzione della steatosi era suggerita da una riduzione marcatamente significativa di tutti gli indici non invasivi di steatosi analizzati (HSI, NAFLD-LFS, Tyg) ad un valore inferiore a quello proposto in questo studio come soglia di positività da adottare nel paziente con obesità patologica. D'altra parte la riduzione degli indici di fibrosi (NFS, APRI, BAAT) e dell'indice ARFI suggeriva un miglioramento anche della fibrosi.

Questi risultati si osservavano in tutti i soggetti, diabetici e non, e indifferentemente sia in quelli con biopsia intraoperatoria diagnostica per steatosi semplice sia in quelli con NASH, a suggerire come anche un'istologia epatica più severa come quella della steatoepatite migliorasse dopo chirurgia bariatrica. Un altro risultato da sottolineare consiste nella riduzione dell'HOMA IR nel follow up a valori inferiori a 3.5 e dell'indice APRI a valori inferiori a 0.21, che erano rispettivamente i valori soglia proposti in questo studio per discriminare gradi maggiori di steatosi (\geq S2) nel primo caso e fibrosi (\geq F2) nel secondo caso, nel paziente con obesità patologica.

Questi dati appaiono sufficientemente forti da poter asserire, anche in assenza di una biopsia epatica nel follow up, che i pazienti studiati mostravano un miglioramento/risoluzione della NAFLD dopo SGL, con riduzione del grado di steatosi e di fibrosi.

I risultati di questo studio sono in accordo con quanto riportato in una metanalisi del 2008 (77), che ha analizzato gli effetti della chirurgia bariatrica sulla NAFLD con biopsia epatica pre e post intervento, concludendo che la steatosi, la steatoepatite e la fibrosi si risolvevano o miglioravano nella maggior parte dei pazienti in seguito al calo ponderale raggiunto con la chirurgia. Lassailly ha analizzato gli effetti della chirurgia bariatrica sulla NASH in 109 pazienti con obesità patologica, dopo un anno dall'intervento, con dati istologici, clinici e metabolici e ha riportato una risoluzione della NASH nell'85% dei soggetti studiati. Anche nello studio di Lassailly, come in questo, si osservava rispetto al basale una riduzione degli enzimi epatici e GGT e dell'HOMA-IR. Inoltre, i soggetti in cui la NASH non si risolveva erano quelli che mostravano minor calo ponderale e maggiore insulino-resistenza (114). Infatti, in tutti gli studi descritti, così come in questo, i cambiamenti dell'istologia epatica sono sempre

accompagnati dal miglioramento metabolico complessivo. Nella casistica considerata in questo studio, dopo SGL si osservava una risoluzione del diabete nell'85% dei soggetti studiati e nei soggetti non diabetici un miglioramento della tolleranza glucidica come mostrato dalla riduzione delle AUC di glicemia e insulinemia mostrate all'OGTT post operatorio, un aumento significativo degli indici di insulino sensibilità (OGIS, Matsuda Index) e della funzione beta cellulare (aumento significativo del Disposition Index) e una riduzione significativa della resistenza insulinica (HOMA IR).

La risoluzione quasi completa del diabete dopo SGL che si osservava in questo studio spiega come, anche nei soggetti con diabete al baseline, si ottenesse la risoluzione/miglioramento della NAFLD dopo SGL analogamente a tutti gli altri soggetti della casistica. Molti autori infatti, come descritto in precedenza, hanno dimostrato come la presenza di diabete correli con un'istologia epatica più severa (120, 121) e anche in questo studio i pazienti diabetici mostravano un maggior grado di infiammazione e fibrosi all'istologia epatica.

L'utilizzo di metodi non invasivi per valutare l'effetto della chirurgia bariatrica sulla NAFLD è stato attuato anche da altri autori. Nickel e altri hanno dimostrato, in accordo con i dati di questo studio, la riduzione degli indici di fibrosi NFS, BARD, AST/ALT ratio e APRI un anno dopo la chirurgia. Ma nel lavoro di Nickel la biopsia epatica non veniva effettuata neanche al tempo zero e gli autori hanno utilizzato per la diagnosi di NAFLD solo gli indici non invasivi (139).

La riduzione dell'indice ARFI registrata in questo studio dopo SGL, espressione di un ridotta rigidità del parenchima epatico, seppur notevole non raggiungeva i livelli di significatività statistica. Questo potrebbe essere spiegato dall'ampia variabilità di questo esame tra i soggetti per le difficoltà tecniche di esecuzione nel paziente obeso. Infatti, sebbene alcuni autori (128) abbiano descritto la tecnica elastografica ARFI efficace anche nel soggetto obeso, altri hanno dimostrato che la tecnica elastografica ARFI abbia una scarsa efficacia diagnostica nel paziente obeso candidato a chirurgia bariatrica e non migliori dopo calo ponderale (140).

Questo lavoro rappresenta il primo in letteratura ad aver correlato, in una popolazione esclusiva di pazienti con obesità severa, diabetici e non, i dati istologici provenienti

dalle biopsie epatiche allo stesso tempo con: variabili metaboliche, incluse la maggior parte degli indici di insulino resistenza e sensibilità OGTT derivati, score non invasivi di steatosi e fibrosi epatica e livelli circolanti di acidi biliari e FGF19 sia a digiuno che dopo stimolo. Non esistono, infatti, studi focalizzati sul soggetto con grande obesità, diabetico e non, che abbiano valutato allo stesso tempo tanti indici non invasivi di NAFLD, proponendo e validando nuovi valori soglia.

I principali limiti di questo studio sono rappresentati dal fatto che i tre gruppi di pazienti (NO NAFLD, steatosi semplice e NASH) non sono numericamente omogenei e la maggior parte dei pazienti mostra un quadro di fibrosi lieve ed è prevalentemente di genere femminile.

Riassumendo, in questo studio è stato dimostrato come, nel soggetto con obesità patologica diabetico e non, la severità dell'istologia epatica dipenda dal grado di compromissione glico-metabolica più che dal BMI e la presenza del diabete si associ ad un'istologia più severa. Sono stati identificati marcatori predittivi di danno epatico, come l'OGIS e il VAI index, facilmente calcolabili nella pratica clinica. Sono stati inoltre proposti nuovi valori soglia da adottare nel paziente obeso per la maggior parte degli indici non invasivi di steatosi descritti in letteratura. Inoltre è stato dimostrato come i livelli circolanti di acidi biliari e l'attività del segnale FXR/FGF19 siano più bassi nei pazienti con NAFLD così come la concentrazione di alcuni acidi biliari maggiormente agonisti di FXR. Infine, è stato dimostrato come la chirurgia bariatrica, generando un significativo calo ponderale e un marcato miglioramento del compenso glico-metabolico, migliori anche la NAFLD, sia nei diabetici che nei non diabetici.

Data l'altissima prevalenza di NAFLD nell'obesità e nel DM2, sempre più in crescita, e dato il rischio cardiovascolare a cui essa si associa, i risultati di questo studio suggeriscono come questi marcatori non invasivi di danno epatico dovrebbero essere applicati nella pratica clinica di tutti i pazienti obesi, al fine di identificare precocemente i soggetti più a rischio da indirizzare ad una gestione più intensiva, prima dello sviluppo di forme più severe di epatopatia.

6. CONCLUSIONI

Questo studio ha permesso di identificare dei marcatori non invasivi predittivi di danno epatico in pazienti con obesità patologica, con e senza diabete tipo 2 (DM2), grazie al confronto di vari indici surrogati con il gold standard rappresentato dalla biopsia epatica.

A tal fine, 90 pazienti con obesità patologica (13 DM2, 21 IGT, 56 NGT), sottoposti ad intervento di sleeve gastrectomy con biopsia epatica intraoperatoria, sono stati studiati e i dati ottenuti dall'istologia epatica sono stati correlati, allo stesso tempo, con i vari indici surrogati di sensibilità/resistenza e secrezione insulinica, con gli score non invasivi di steatosi e fibrosi epatica e con i livelli plasmatici di acidi biliari.

Tali correlazioni hanno permesso di identificare variabili predittive di danno epatico, con cui è stato possibile valutare indirettamente l'effetto del calo ponderale ottenuto con SGL sulla NAFLD, a 12 mesi dall'intervento, in assenza di una seconda biopsia epatica.

In particolare possiamo concludere che:

1. NAFLD/NASH NEL PAZIENTE CON OBESITA' PATOLOGICA:

- La prevalenza della NAFLD nell'obesità patologica è molto alta, raggiungendo il 77% dell'intera casistica, con 53% di steatosi semplice e 24% di NASH (141);
- I pazienti obesi con NAFLD mostrano, rispetto a quelli senza NAFLD, livelli sovrapponibili di BMI ma gradi diversi di compromissione metabolica, espressi da una maggiore prevalenza di DM2 e sindrome metabolica, da valori più alti di enzimi epatici e GGT, trigliceridi e glicemia a digiuno (141);
- La presenza di DM2, nel soggetto obeso affetto da NAFLD, si associa ad un maggiore severità dell'istologia epatica. Nei soggetti diabetici, infatti, si osserva una prevalenza più alta di NASH e gradi maggiori di steatosi, fibrosi e infiammazione all'istologia epatica;
- La clearance periferica del glucosio espressa dall'OGIS, indice surrogato di sensibilità periferica all'insulina calcolato sulla base dell'OGTT, rappresenta un marcatore di severità dell'istologia epatica, mostrando una correlazione inversa

con l'aumentare del danno epatico (NASH < steatosi semplice < NO-NAFLD) (141);

- Il Visceral Adipose Tissue (VAI) index, un marcatore di disfunzione del tessuto adiposo calcolato con un algoritmo differenziato per genere che utilizza le variabili BMI, circonferenza vita, trigliceridi e HDL, aumenta con l'aumento del danno istologico epatico (NASH > steatosi semplice > NO-NAFLD);
- La maggior parte degli indici non invasivi di steatosi usati in letteratura (HSI, NAFLD-LFS, FLI, LAP, Tyg, VAI) mostra un alto numero di falsi positivi nel soggetto con obesità patologica, diabetici e non, con i cutoff utilizzati per la popolazione generale e nuovi valori soglia da adottare sono stati proposti in questo studio;
- La resistenza insulinica espressa dall'indice HOMA IR correla con la steatosi e la fibrosi epatica. In particolare, un valore di HOMA-IR > 3.5, nei soggetti con obesità patologica, appare in grado di discriminare i soggetti con gradi maggiori di steatosi;
- Nessuno degli indici non invasivi di fibrosi è in grado di predire la presenza di NASH nel soggetto con obesità patologica. Solo l'indice APRI aumenta significativamente all'aumentare della fibrosi epatica ed è in grado di discriminare soggetti con gradi maggiori di fibrosi, con un cutoff di 0.21;
- Nei pazienti obesi con NAFLD, con e senza DM2, si osservano livelli plasmatici più bassi di acidi biliari sia a digiuno che dopo pasto e maggiori concentrazioni di precursore C4, a suggerire una maggiore sintesi epatica di acidi biliari e dunque una minore attività del segnale FXR/FGF19. Uno degli effetti dell'attivazione di FXR da parte degli acidi biliari è infatti la produzione di FGF19 che, oltre a regolare l'omeostasi glicemica, riduce la sintesi epatica degli acidi biliari con un meccanismo di feedback. Pertanto, tanto maggiori sono i livelli di C4 tanto minore l'attività del segnale FXR/FGF19. Tra gli acidi biliari maggiormente ridotti nei soggetti con NAFLD e ancor più in quelli con NASH, si osservano quelli maggiormente agonisti del recettore FXR;

2. EFFETTO DELLA SLEEVE GASTRECTOMY LAPAROSCOPICA SULLA NAFLD

Il calo ponderale e il miglioramento glico-metabolico ottenuti dopo SGL determinano una risoluzione/miglioramento della NAFLD in tutti i soggetti obesi studiati, diabetici e non: il miglioramento significativo di tutte le variabili predittive di severità dell'istologia epatica, dimostrate in questo studio, suggeriscono indirettamente un miglioramento dell'istologia epatica. In particolare, nei soggetti con biopsia epatica intraoperatoria diagnostica per NAFLD/NASH a 1 anno dall'intervento si osserva:

- una riduzione fortemente significativa di transaminasi e GGT;
- un aumento significativo della sensibilità insulinica e della clearance periferica del glucosio misurata dall'indice OGIS e una riduzione della resistenza insulinica espressa dall'HOMA IR e dalle concentrazioni di insulina durante OGTT;
- una riduzione marcatamente significativa di tutti gli indici non invasivi di steatosi analizzati (HSI, NAFLD-LFS, Tyg), ad un valore inferiore a quello proposto in questo studio come soglia di positività da adottare nel paziente con obesità patologica, come a suggerire indirettamente assenza di steatosi;
- una riduzione di quasi tutti gli indici di fibrosi epatica valutati (NFS, APRI, BAAT) ad eccezione del FIB-4. In particolare l'indice APRI si riduceva a valori inferiori a 0.21 che è il cutoff stabilito in questo studio per evidenziare gradi maggiori di fibrosi epatica nel soggetto obeso;
- una riduzione dell'indice ARFI e della liver stiffness measurement da esso rilevata;
- un aumento significativo della concentrazione plasmatica degli acidi biliari totali (SUM) sia a digiuno che dopo stimolo, dovuto all'aumento degli acidi biliari secondari;

- una diminuzione significativa dei livelli plasmatici a digiuno e dopo stimolo del precursore degli acidi biliari C4 che, essendo inversamente correlato all'attività dell'asse FXR/FGF19, suggeriva indirettamente un'aumentata attività del segnale FXR/FGF19 dopo chirurgia bariatrica;
- un aumento significativo delle concentrazioni plasmatiche a digiuno e dopo stimolo del FGF19;
- un miglioramento/risoluzione della NAFLD indifferentemente sia nei pazienti con biopsia intraoperatoria diagnostica per steatosi semplice, sia in quelli con NASH, a suggerire che anche gradi più severi di epatopatia regredivano dopo calo ponderale e miglioramento glico-metabolico ottenuti con SGL;
- un miglioramento/risoluzione della NAFLD anche nei soggetti con DM2 al reclutamento, verosimilmente secondario alla risoluzione del diabete, che si osservava nell'85% dei soggetti studiati dopo SGL.

In conclusione, dato il continuo aumento della prevalenza dell'obesità, dell'entità dell'eccedenza ponderale e delle complicanze ad essa associate, come la NAFLD, l'efficacia di questi indici non invasivi e facilmente calcolabili nel predire la severità del danno epatico costituisce la premessa fondamentale al loro impiego nella pratica clinica. Questi biomarcatori, pertanto, dovrebbero essere applicati a tutti i pazienti obesi, diabetici e non, al fine di identificare precocemente i soggetti a rischio di forme più avanzate di epatopatia da indirizzare ad una gestione più specialistica ed un monitoraggio più intensivo.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Friedman I.M.; Obesity in the new millennium. *Nature* 2000 404,632-634.
2. Swinburn BA, Kraak VI, Allender S, Atkins VJ, Baker PI, Bogard JR. The Global Syndemic of Obesity, Undernutrition, and Climate Change: The Lancet Commission report. *Lancet*. 2019 Feb 23;393(10173):791-846
3. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet* 2011, 377:557-67
4. Dati epicentro: rapporto Osservasalute 2016
5. SIO (Società Italiana Obesità): Standard Italiani per la cura dell'obesità SIO-ADI 2016-2017
6. Zhi J, Melia AT, Guerciolini R, Chung J, Kinberg J, Hauptman JB. Retrospective population-based analysis of the dose-response (fecal fat excretion) relationship of orlistat in normal and obese volunteers. *Clin Pharmacol Ther*. 1994;56(1):82-85
7. Padwal R et al. Long-term pharmacotherapy for obesity and overweight. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004(3):CD004094
8. Faglia G. Disordini del ricambio glicidico, Malattie del Sistema Endocrino e del Metabolismo 2002 3° edizione, McGraw-Hill, 407-462
9. Muoio DM, Newgard CB. Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *NatRev Mol Cell Biol*. 2008 Mar;9(3):193-205. Review
10. Cerasi E, Luft R. The plasma insulin response to glucose infusion in healthy subjects and in diabetes mellitus. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1967;55(2):278-304

11. Del Prato S: Terapia del diabete tipo 2: dallo stato dell'arte alle terapie del futuro. 2008
12. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106:473-81
13. Ferranini E. Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulindependentdiabetes mellitus: problems and prospects. *Endocr Rev* 19:477-490, 1998
14. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. β -Cell deficit and increased cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52:102-110, 2003
15. 11th Italian Diabetes & Obesity Bbarometer Report, Aprile 2018
16. Pappachan JM, Viswanath AK. Medical Management of Diabetes: Do We Have Realistic Targets? *Curr Diab Rep.* 2017 Jan;17(1):4. doi: 10.1007/s11892-017-0828-9
17. Mingrone G, Panunzi S, De Gaetano A, Guidone C, Iaconelli A, Leccesi L et al., Bariatric Surgery versus conventional medical therapy for type 2 diabetes. *New Engl J of Med.* 2012 Apr 26;366 (17): 1577-85
18. Leonetti F, Capoccia D, Coccia F, Casella G, Baglio G, Paradiso F. Obesity, type 2 diabetes mellitus, and other comorbidities: a prospective cohort study of laparoscopic sleeve gastrectomy vs medical treatment. *Arch Surg.* 2012 Aug;147(8):694-700
19. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M: Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology.* 2016;64:73-84
20. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K et al. American Gastroenterological A, American Association for the Study of Liver D, American College of G: The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological

- Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology*. 2012;142:1592-1609
21. Petta S, Valenti L, Bugianesi E, Targher G, Bellentani S, Bonino F, Special Interest Group on Personalised Hepatology of the Italian Association for the Study of the L, Special Interest Group on Personalised Hepatology of Italian Association for Study of Liver A: A "systems medicine" approach to the study of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis*. 2016;48:333-342
 22. Marchesini G, Roden M, Vettor R: Response to: Comment to "EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease". *J Hepatol*. 2017;66:466-467
 23. Gastaldelli A: Insulin resistance and reduced metabolic flexibility: cause or consequence of NAFLD? *Clin Sci (Lond)*. 2017;131:2701-2704
 24. McCullough AJ: Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2006;40 Suppl 1:S17-29
 25. Gao B, Tsukamoto H. Inflammation in alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease: friend or foe? *Gastroenterology* 2016;150:1704–9
 26. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, Harrison SA, Brunt EM, Sanyal AJ: The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018;67:328-357
 27. European Association for the Study of the Liver, European Association for the Study of Diabetes, European Association for the Study of Obesity. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2016;64:1388-1402
 28. Brunt EM, Kleiner DE, Wilson LA, Belt P, Neuschwander-Tetri BA, Network NCR: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology*. 2011;53:810-820

29. Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, Bouillot JL, Basdevant A, Paradis V, Tordjman J, Clement K: Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology*. 2012;56:1751-1759
30. Castera L, Friedrich-Rust, Loomba R. Noninvasive Assessment of Liver Disease in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2019;156:1264–1281
31. Della Latta V, Gaggini M, Gastaldelli A. Score per la valutazione del danno epatico (NAFLD/NASH/FIBROSI). Guida all'uso clinic. Gruppo per lo studio del rischio cardiometabolico. Istituto di Fisiologia Clinica CNR Pisa
32. Petta S, Amato M, Cabibi D, Camma` C, Di Marco V, Giordano C, Galluzzo A, Craxi` A. Visceral Adiposity Index Is Associated with Histological Findings and High Viral Load in Patients with Chronic Hepatitis C Due to Genotype 1. *Hepatology*, Vol. 52, No. 5, 2010
33. Guerrero-Romero F, Simental-Mendía L.E, Gonza´lez-Ortiz M, Martínez-Abundis E, Ramos-Zavala M.G, O. Herna´ndez-Gonza ´lez S, Jacques-Camarena O, Rodríguez-Mora M. The Product of Triglycerides and Glucose, a Simple Measure of Insulin Sensitivity. Comparison with the Euglycemic-Hyperinsulinemic Clamp. *J Clin Endocrinol Metab*, July 2010. 95(7):3347–3351
34. Gastaldelli A, Folli F, DeFronzo R. Comments on Guerrero-Romero et al The product of triglycerides and glucose as index of insulin resistance: validation in the SAM study. *J Clin Endocrinol Metab*, Originally published online on Jul 28 2010
35. Myers RP, Pomier-Layrargues G, Kirsch R, Pollett A, Duarte-Rojo A, Wong D et al. Feasibility and diagnostic performance of the FibroScan XL probe for liver stiffness measurement in overweight and obese patients. *Hepatology*. 2012 Jan;55(1):199-208. doi: 10.1002/hep.24624. Epub 2011 Nov 18
36. Linee guida SICOB (Società Italiana di Chirurgia dell'Obesità e delle Malattie Metaboliche) 2016

37. Bae J, Shade J, Abraham A, Abraham B, Peterson L, Schneider EB et al. Effect of mandatory center of excellence designation on demographic characteristics of patients who undergo bariatric surgery. *JAMA Surg* 2015;150:644-8
38. Sugerman HJ, DeMaria EJ, Kellum JM, Sugerman EL, Meador JG, Wolfe LG. Effects of bariatric surgery in older patients. *Ann Surg* 2004;240:243-7
39. O'Brien PE, Dixon JB, Laurie C, Skinner S, Proietto J, McNeil J, et al. Treatment of mild to moderate obesity with laparoscopic adjustable gastric banding or an intensive medical program. A randomized trial. *Ann Intern Med* 2006;144:625-33
40. Abbatini F, Capoccia D, Casella G, Coccia F, Leonetti F, Basso N. Type 2 diabetes in obese patients with body mass index of 30-35 kg/m²: sleeve gastrectomy versus medical treatment. *Surg Obes Relat Dis*. 2012 Jan-Feb;8(1):20-4
41. Scopinaro N, Adami GF, Papadia FS, Camerini G, Carlini F, Briatore L et al. The effects of biliopancreatic diversion on type 2 diabetes mellitus in patients with mild obesity (BMI 30–35 kg/m²) and simple overweight (BMI 25–30 kg/m²): A prospective controlled study. *Obes Surg* 2011;21:880-8
42. Mechanick JI, Youdim A, Jones DB, Garvey WT, Hurley DL, McMahon MM et al. Clinical practice guidelines for the perioperative nutritional, metabolic, and nonsurgical support of the bariatric surgery patient--2013 update: cosponsored by American Association of Clinical Endocrinologists, The Obesity Society, and American Society for Metabolic & Bariatric Surgery. *Obesity (Silver Spring)*. 2013 Mar;21 Suppl 1:S1-27
43. Colquitt JL, Picot J, Loveman E, Clegg AJ. Surgery for obesity. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009 Apr 15;(2):CD003641
44. Vetter ML, Cardillo S, Rickels MR, Iqbal N. Narrative Review: Effect of Bariatric Surgery on type 2 Diabetes Mellitus. *Ann Intern Med*. 2009; 150: 94-103

45. Ele Ferranini, Geltrude Mingrone. Impact of Different Bariatric Surgical Procedures on Insulin Action and β -Cell-Function in Type 2 Diabetes. *Diab Care* 2009, volume 32 n° 3
46. Silecchia G, Rizzello M, Casella G, Fioriti M, Soricelli E, Basso N. Two stage laparoscopic biliopancreatic diversion with duodenal switch as treatment of high risk super-obese patients: analysis of complications. *SurgEndosc* 2009, 23: 1032-1037
47. Kueper MA, Kramer KM, Kirschniak A, Königsrainer A, Pointner R, Granderath FA. Laparoscopic Sleeve Gastrectomy: Standardized Technique of a Potential Stand-alone Bariatric Procedure in Morbidly Obese Patients. *World J Surg* (2008), 32: 1462-1465
48. Wong SK, Kong AP, Mui WL, So WY, Tsung BY, Yau PY et al. Laparoscopic bariatric surgery: a five-year review. *Hong Kong Med J* 2009, 15: 100-9.
49. Givon-Madhala O, Spector R, Wasserberg N, Beglaibter N, Lustigman H, Stein M et al. Technical Aspects of Laparoscopic Sleeve Gastrectomy in 25 Morbidly Obese Patients. *Obes Surg* 2007 Jun;17(6):722-7
50. Bavaresco M, Paganini S, Lima TP, Salgado W Jr, Ceneviva R, Dos Santos JE et al. Nutritional course of patients submitted to bariatric surgery. *Obes Surg*, vol. 20, no. 6, pp. 716–721, 2010
51. Donadelli SP, Junqueira-Franco MV, de Mattos Donadelli CA, Salgado W Jr, Ceneviva R, Marchini JS. et al. Daily vitamin supplementation and hypovitaminosis after obesity surgery. *Nutrition*, vol. 28, no. 4, pp.391–396, 2012
52. Baltasar A, Serra C, Pérez N, Bou R, Bengochea M, Ferri L. Laparoscopic gastric sleeve: a multi purpose bariatric operation. *Obes Surg*, vol. 15, pp. 1124–1128, 2005

53. Capoccia D, Coccia F, Paradiso F, Abbatini F, Casella G, Basso N. Laparoscopic gastric sleeve and micronutrients supplementation: our experience. *J Obes.* 2012;2012:672162
54. Standard Italiani per la Cura del Diabete Mellito 2018 – Linee guida Società Italiana di Diabetologia
55. Frühbeck G. Bariatric and metabolic surgery: a shift in eligibility and success criteria. *Nat Rev Endocrinol.* 2015 Aug;11(8):465-77
56. Capoccia D, Coccia F, Guida A, Rizzello M, De Angelis F, Silecchia G. Is type 2 diabetes really resolved after laparoscopic sleeve gastrectomy? Glucose variability studied by continuous glucose monitoring. *J Diabetes Res.* 2015;2015:674268
57. Buchwald H, Buchwald JN Metabolic (Bariatric and Nonbariatric) Surgery for Type 2 Diabetes: A Personal Perspective Review *Diab Care.* 2019 Feb;42(2):331-340
58. Buchwald H, Estok R, Fahrbach K, Banel D, Jensen MD, Pories WJ et al. Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and metaanalysis. *Am J Med.* 2009;122:248–56
59. Sheng B, Truong K, Spitler H, Zhang L, Tong X, Chen L. The Long-Term Effects of Bariatric Surgery on Type 2 Diabetes Remission, Microvascular and Macrovascular Complications, and Mortality: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Obes Surg.* 2017 Oct;27(10):2724-2732
60. Capoccia D, Coccia F, Guarisco G, Testa M, Rendina R, Abbatini F, Silecchia G, Leonetti F. Long-term Metabolic Effects of Laparoscopic Sleeve Gastrectomy. *Obes Surg.* 2018 Aug;28(8):2289-2296
61. Leonetti F, Busetto L, Di Lorenzo N. POSITION STATEMENT SID-SIO-SICOB Diabete e Chirurgia Bariatrica, 2017

62. Sjöström. Review of the key results from the Swedish Obese Subjects (SOS) trial – a prospective controlled intervention study of bariatric surgery. *J Intern Med.* 2013 Mar;273(3):219-34
63. Dixon JB, O'Brien PE, Playfair J, et al. Adjustable gastric banding and conventional therapy for type 2 diabetes. A randomized controlled trial *JAMA.* 2008;299:316–23
64. Schauer PR et al. Bariatric Surgery versus intensive medical therapy in obese patients with diabetes. *New Eng J of Med.* 2012 Apr 26;366(17): 1567-76
65. Thaler JP, Cummings DE. Minireview: hormonal and metabolic mechanism of diabetes remission after gastrointestinal surgery. *Endocrinol.* 2009;150:2518–25
66. Basso N, Capoccia D, Rizzello M, Abbatini F, Mariani P, Maglio C, Coccia F. First-phase insulin secretion, insulin sensitivity, ghrelin, GLP-1, and PYY changes 72 h after sleeve gastrectomy in obese diabetic patients: the gastric hypothesis. *Surg Endosc.* 2011 Nov;25(11):3540-50
67. Rubino F, Gagner M, Gentileschi P, Kini S, Fukuyama S, Feng J. The early effect of the Roux-en-Y Gastric By-Pass on hormones involved in body weight regulations and glucose metabolism. *Ann Surg.* 2004;240:236–42
68. Laferrère B, Teixeira J, McGinty J, Tran H, Egger JR, Colarusso A et al. Effect of weight loss by Gastric By-Pass surgery versus hypocaloric diet in glucose and incretin levels in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93:2479–85
69. Le Roux CW, Aylwin SJ, Batterham RL, Borg CM, Coyle F, Prasad V et al. Gut hormone profiles following bariatric surgery favour an anorectic state, facilitate weight loss, and improve metabolic parameters. *Ann Surg.* 2006;243:108–14
70. Rubino F, Forgione A, Cummings DE, Vix M, Gnuli D, Mingrone G et al. The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small intestine in the pathophysiology of type 2 diabetes. *Ann Surg.* 2006;244:741–9

71. Ryan KK, Tremaroli V, Clemmensen C, Kovatcheva-Datchary P, Myronovych A, Karns R et al. FXR is a molecular target for the effects of vertical sleeve gastrectomy. *Nature*. 2014 May 8;509(7499)
72. Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK et al. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or Gastric By-Pass surgery. *N Engl J Med*. 2002;346:1623–30
73. Faraj M, Havel PJ, Phélis S, Blank D, Sniderman AD, Cianflone K. Plasma acylation-stimulating protein, adiponectin, leptin, and ghrelin before and after weight loss induced by gastric bypass surgery in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1594-1602
74. Patti ME, Houten SM, Bianco AC, Bernier R, Larsen PR, Holst JJ et al. Serum bile acids are higher in humans with prior gastric bypass: potential contribution to improved glucose and lipid metabolism. *Obesity (Silver Spring)*. 2009 Sep;17(9):1671-7
75. Palleja A, Kashani A, Allin KH, Nielsen T, Zhang C, Li Y et al. Roux-en-Y gastric bypass surgery of morbidly obese patients induces swift and persistent changes of the individual gut microbiota. *Genome Med*. 2016 Jun 15;8(1):67
76. Laursen TL, Hagemann CA, Wei C, Kazankov K, Thomsen KL, Knop FK. Bariatric surgery in patients with non-alcoholic fatty liver disease - from pathophysiology to clinical effects. *World J Hepatol* 2019 February 27; 11(2): 138-149
77. Chavez-Tapia NC, Tellez-Avila FI, Barrientos-Gutierrez T, Mendez-Sanchez N, Lizardi-Cervera J, Uribe M. Bariatric surgery for non-alcoholic steatohepatitis in obese patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2010 Jan 20;(1):CD007340
78. Aguilar-Olivos NE, Almeda-Valdes P, Aguilar-Salinas CA, Uribe M, Méndez-Sánchez N. The role of bariatric surgery in the management of nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Metabolism* 2016; 65: 1196-1207

79. Cazzo E, Jimenez LS, Pareja JC, Chaim EA. Effect of Roux-en-Y gastric bypass on nonalcoholic fatty liver disease evaluated through NAFLD fibrosis score: a prospective study. *Obes Surg* 2015; 25: 982-985
80. Yousseif A, Emmanuel J, Karra E, Millet Q, Elkalaawy M, Jenkinson AD. Differential effects of laparoscopic sleeve gastrectomy and laparoscopic gastric bypass on appetite, circulating acyl-ghrelin, peptide YY3-36 and active GLP-1 levels in non-diabetic humans. *Obes Surg* 2014; 24: 241-252
81. Gribsholt SB, Thomsen RW, Svensson E, Richelsen B. Overall and cause-specific mortality after Roux-en-Y gastric bypass surgery: A nationwide cohort study. *Surg Obes Relat Dis* 2017; 13: 581-587
82. Wahlstro A, Sayin S.I., Marschall HU and Fredrik Backhed. Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism. *Cell Metabolism* 24, July 12, 2016
83. Sayin SI, Wahlström A, Felin J, Jäntti S, Marschall HU, Bamberg K et al. Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab.* 17, 225–235
84. Fouladi F, Mitchell JE, Wonderlich JA. The Contributing Role of Bile Acids to Metabolic Improvements After Obesity and Metabolic Surgery. *Obes Surg* (2016) 26:2492–2502
85. Taoka H, Yokoyama Y, Morimoto K, Kitamura N, Tanigaki T, Takashina Y et al. Role of bile acids in the regulation of metabolic pathways. *World J of Diabetes* 2016 July 10; 7(13): 260-270
86. Düfer M, Hörth K, Wagner R, Schittenhelm B, Prowald S, Wagner TF et al. Bile acids acutely stimulate insulin secretion of mouse β -cells via farnesoid X receptor activation and K(ATP) channel inhibition. *Diabetes.* 2012 Jun;61(6):1479-89

87. Watanabe M, Houten SM, Wang L, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Heyman RA et al. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest* 2004 May;113(10):1408-18
88. Ryan KK, Kohli R, Gutierrez-Aguilar R et al. Fibroblast growth factor-19 action in the brain reduces food intake and body weight and improves glucose tolerance in male rats. *Endocrinol*. 2013 Jan;154(1):9-15. doi: 10.1210/en.2012-1891. Epub 2012 Nov 26
89. Gerhard GS, Styer AM, Wood GC, Roesch SL, Petrick AT, Gabrielsen J et al. A role for fibroblast growth factor 19 and bile acids in diabetes remission after Roux-en-Y gastric bypass. *Diab Care*. 2013 ;36(7):1859-64
90. Katsuma s, Hirasawa A, Tsujimoto G. Bile acids promote glucagon like peptide 1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 329: 386-90
91. Kohli R, Bradley D, Setchell KD, Eagon JC, Abumrad N, Klein S et al. Weight loss induced by Roux-en-Y gastric bypass but not laparoscopic adjustable gastric banding increases circulating bile acids. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98 (4): E708-12
92. Nakatani H, Kasama K, Oshiro T, Watanabe M, Hirose H et al. Serum bile acid along with plasma incretins and serum high-molecular weight adiponectin levels are increased after bariatric surgery. *Metabolism* 2009;58:1400-7
93. Ferrannini E, Camastra S, Astiarraga B, Nannipieri M, Castro-Perez J, Xie D et al. Increased Bile Acid Synthesis and Deconjugation After Biliopancreatic Diversion. *Diabetes* 2015;64:3377-85
94. Belgaumkar AP, Vincent RP, Carswell KA et al. Changes in bile acids profile after laparoscopic sleeve gastrectomy are associated with improvement in metabolic profile and fatty liver disease. *Obes Surg* 2015 doi: 10.1007/s11695-015-1878-1

95. Haluzíková D, Lacinová Z, Kaválková P, Drápalová J, Křížová J, Bártlová M et al. Laparoscopic sleeve gastrectomy differentially affects serum concentrations of FGF19 and FGF21 in morbidly obese subjects. *Obesity*. 2013; 21 (7): 1335-1342
96. Escalona A, Muñoz R, Irribarra V, Solari S, Allende F, Francisco Miquel J. Bile acids synthesis decreases after laparoscopic sleeve gastrectomy. *Surg Obes Relat Dis*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.soard.2015.11.015>
97. Santini F, Busetto L, Cresci B, Sbraccia P. SIO management algorithm for patients with overweight or obesity: consensus statement of the Italian Society for Obesity (SIO). *Eat Weight Disord*. 2016;21:305-7
98. American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diab Care*. 2018;41:S13-S27
99. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med*. 2006;23:469-80
100. Isokuortti E, Zhou Y, Peltonen M, Bugianesi E, Clement K, Bonnefont-Rousselot D, et al. Use of HOMA-IR to diagnose non-alcoholic fatty liver disease: a population-based and inter-laboratory study. *Diabetologia*. 2017 Oct;60(10):1873-1882
101. Rosso C, Mezzabotta L, Gaggini M, Salomone F, Gambino R, Marengo A, et al. Peripheral insulin resistance predicts liver damage in nondiabetic subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2016;63:107-16
102. Matsuda M, De Fronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diab Care* 22: 1462-1470, 1999
103. Mari A, Pacini G, Murphy E, Ludvik B, Nolan JJ. A model-based method for assessing insulin sensitivity from the oral glucose tolerance test. *Diab Care*. 2001;24:539-48.

104. Abdul-Ghani M, Matsuda M, Balas B, DeFronzo R. Muscle and Liver Insulin Resistance Indexes Derived From the Oral Glucose Tolerance Test. *Diab Care*. 2007;30:89–94
105. Utzschneider KM, Prigeon RL, Faulenbach MV, Tong J, Carr DB, Boyko EJ. Oral disposition index predicts the development of future diabetes above and beyond fasting and 2-h glucose levels. *Diab Care*. 2009 Jul;32(7):1355.
106. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC et al. The NAFLD fibrosis score: A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology* 2007; 45: 846–854
107. Wong VW, Vergniol J, Wong GL, Foucher J, Chan HL, Le Bail B et al. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010; 51: 454–462
108. Melissas J, Braghetto I, Molina JC, Silecchia G, Iossa A, Iannelli A et al. Gastroesophageal Reflux Disease and Sleeve Gastrectomy. *Obes Surg*. 2015 Dec;25(12):2430-5
109. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41:1313-21
110. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2018; 15: 11-20
111. Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol*. 2006;45:600-6
112. Bedossa P, Tordjman J, Aron-Wisnewsky J, Poitou C, Oppert JM, Torcivia A et al. Systematic review of bariatric surgery liver biopsies clarifies the natural history of liver disease in patients with severe obesity. *Gut*. 2017;66:1688-96

113. Petrick A, Benotti P, Wood GC, Still CD, Strodel WE, Gabrielsen J et al. Utility of Ultrasound, Transaminases and Visual Inspection to Assess Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Bariatric Surgery Patients. *Obes Surg.* 2015;25:2368-75
114. Lassailly G, Caiazzo R, Buob D, Pigeyre M, Verkindt H, Labreuche J et al. Bariatric Surgery Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients. *Gastroenterology.* 2015;149:379-88
115. Oni ET, Agatston AS, Blaha MJ, Fialkow J, Cury R, Sposito A et al. A systematic review: Burden and severity of subclinical cardiovascular disease among those with nonalcoholic fatty liver; Should we care? *Atherosclerosis.* 2013;230:258–67
116. Ekstedt M, Hagström H, Nasr P, Fredrikson M, Stål P, Kechagias S et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology.* 2015;61:1547–54
117. Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, Adams L, Bjornsson ES, Charatcharoenwittaya P et al. Liver fibrosis, but no other histologic features, is associated with long-term outcomes of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2015;149:389–97
118. Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H, Fujii K, et al. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med.* 2005;143:722-8
119. Svegliati-Baroni G, Bugianesi E, Bouserhal T, Marini F, Ridolfi F, Tarsetti F, et al. Post-load insulin resistance is an independent predictor of hepatic fibrosis in virus C chronic hepatitis and in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut.* 2007;56:1296-301
120. Strey CBM, Carli LA, Pioner SR, Fantinelli M, Gobbato SS, Bassols GF, et al. Impact of Diabetes Mellitus and Insulin on Nonalcoholic Fatty Liver Disease in the Morbidly Obese. *Ann Hepatol.* 2018;17:585-91

121. Souto KP, Meinhardt NG, Ramos MJ, Ulbrich-Kulkzynski JM, Stein AT, Damin DC. Nonalcoholic fatty liver disease in patients with different baseline glucose status undergoing bariatric surgery: analysis of intraoperative liver biopsies and literature review. *Surg Obes Relat Dis.* 2018;14:66-73
122. Blond E, Disse E, Cuerq C, Draï J, Valette PJ, Laville M et al. EASL-EASD-EASO clinical practice guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease in severely obese people: do they lead to over-referral? *Diabetologia.* 2017 Jul;60(7):1218-1222
123. Poynard T, Lassailly G, Diaz E, Clement K, Caiazzo R, Tordjman J et al. Performance of biomarkers FibroTest, ActiTest, SteatoTest, and NashTest in patients with severe obesity: meta analysis of individual patient data. *PLoS One.* 2012;7:e30325
124. Sheth H, Bagasrawala S, Shah M, Ansari R, Olithselvan A, Lakdawala M. The HAALT Non-invasive Scoring System for NAFLD in Obesity. *Obes Surg.* 2019 Aug;29(8):2562-2570
125. Ooi GJ, Earnest A, Kemp WW, Burton PR, Laurie C, Majeed A et al. Evaluating feasibility and accuracy of non-invasive tests for nonalcoholic fatty liver disease in severe and morbid obesity. *Int J Obes (Lond),* 2018 Nov;42(11):1900-1911
126. Fedchuk L, Nascimbeni F, Pais R, Charlotte F, Housset C, Ratziu V et al. Performance and limitations of steatosis biomarkers in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;40:1209–22
127. Polyzos SA, Slavakis A, Koumerkeridis G, Katsinelos P, Kountouras. Noninvasive Liver Fibrosis Tests in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An External Validation Cohort. *J Horm Metab Res.* 2019 Feb;51(2):134-140
128. Attia D, Bantel H, Lenzen H, Manns MP, Gebel MJ, Potthoff A. Liver stiffness measurement using acoustic radiation force impulse elastography in

- overweight and obese patients. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016 Aug;44(4):366-79
129. Arab JP, Karpen SJ, Dawson PA, Arrese M, Trauner M. Bile acids and nonalcoholic fatty liver disease: Molecular insights and therapeutic perspectives. *Hepatology.* 2017 Jan;65(1):350-362. doi: 10.1002/hep.28709. Epub 2016 Aug 4
 130. Mouzaki M, Wang AY, Bandsma R, Comelli EM, Arendt BM, Zhang L. Bile Acids and Dysbiosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease *PLoS One.* 2016 May 20;11(5):e0151829
 131. Ridlon JM, Bajaj JS. The human gut sterolbiome: bile acid microbiome endocrine aspects and therapeutics. *Acta Pharm Sin B* 2015;5:99-105
 132. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB, Bajaj JS. Bile acids and the gut microbiome. *Curr Opin Gastroenterol* 2014;30:332-338
 133. Parseus A, Sommer N, Sommer F, Caesar R, Molinaro A, Stahlman M, et al. Microbiota-induced obesity requires farnesoid X receptor. *Gut.* 2017 Mar;66(3):429-437
 134. Talavera O. C., Tailleux A., Lefebvre P., Staels B. Bile acid control of metabolism and inflammation in obesity, type 2 diabetes, dyslipidemia and NAFLD. *Gastroenterology.* 2017 May;152(7):1679-1694
 135. Pournaras DJ, Glicksman C, Vincent RP et al. The role of bile after Roux-en-Y gastric bypass in promoting weight loss and improving glycaemic control. *Endocrinol* 2012;153:3613-3619
 136. Steinert RE, Peterli R, Keller S, Meyer-Gerspach AC, Drewe J, Peters T et al. Bile Acids and Gut Peptide Secretion after Bariatric Surgery: A 1-Year Prospective Randomized Pilot Trial. *Obesity* 2013;21:E660–E668
 137. Laursen TL, Hagemann CA, Wei C, Kazankov K, Thomsen KL, Knop FK. Bariatric surgery in patients with non-alcoholic fatty liver disease - from pathophysiology to clinical effects. *World J Hepatol.* 2019 Feb 27;11(2):138-149.

138. Viana EC, Araujo-Dasilio KL, Miguel GP, Bressan J, Lemos EM, Moyses MR et al. Gastric bypass and sleeve gastrectomy: the same impact on IL-6 and TNF- α . Prospective clinical trial. *Obes Surg* 2013; 23: 1252-1261
139. Nickel F, Tapking C, Benner L, Sollors J, Billeter AT, Kenngott HG. Bariatric Surgery as an Efficient Treatment for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in a Prospective Study with 1-Year Follow-up : BariScan Study. *Obes Surg* 2018; 28: 1342-1350
140. Karlas T, Dietrich A, Peter V, Wittekind C, Lichtinghagen R, Garnov N. Evaluation of Transient Elastography, Acoustic Radiation Force Impulse Imaging (ARFI), and Enhanced Liver Function (ELF) Score for Detection of Fibrosis in Morbidly Obese Patients. *PLoS One*. 2015 Nov 3;10(11):e0141649
141. Coccia F, Testa M, Guarisco G, Di Cristofano C, Silecchia G, Leonetti F, Gastaldelli A, Capoccia D. Insulin resistance, but not insulin response, during oral glucose tolerance test (OGTT) is associated to worse histological outcome in obese NAFLD. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* *in press*