



Università degli Studi di Padova

Corso di Laurea Magistrale a Ciclo Unico in Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Medicina

Direttore: prof. Paolo Simioni

UOC Clinica Medica 5

Direttore: prof. Paolo Angeli

TESI DI LAUREA

# Influenza del profilo metabolico sull'evoluzione della cirrosi epatica di diversa eziologia

Relatore. Prof.ssa Patrizia Pontisso

Correlatore: Dott. Andrea Martini

Laureando: Marco Maltarello

Anno Accademico 2023/24



## Abstract

La cirrosi epatica, stadio terminale della patologia epatica, rappresenta la condizione clinica comune alla quale giungono epatopatie croniche di eziologie differenti. Tra queste, l'eziologia metabolica (MASLD, metabolic dysfunction associated steatotic liver disease) è in aumento negli ultimi anni. La recente adozione dell'attuale definizione di MASLD ha introdotto chiari criteri per la diagnosi, in grado di distinguerla dalla steatosi di eziologia alcolica in modo più efficace e di individuare casi in cui alcol e disfunzione del metabolismo rappresentano concause di steatosi. Analogamente, la disfunzione metabolica può essere vista come concausa di malattia epatica (oltre che come sua comorbidità) anche in pazienti con epatopatia di diversa eziologia. In tale contesto, il presente studio si pone come obiettivo la caratterizzazione del profilo metabolico in soggetti affetti da epatopatia cronica in stadio avanzato con diversa eziologia, e la ricerca dell'eventuale impatto di questo sulla loro sopravvivenza. Sono stati studiati retrospettivamente 122 pazienti seguiti ambulatorialmente per un periodo mediano di 84 mesi. I risultati non hanno evidenziato differenze rilevanti nella severità della malattia epatica dei pazienti che presentavano una o più tra le disfunzioni del metabolismo considerate per la diagnosi di MASLD (ipertensione, diabete mellito di tipo 2 e BMI superiore a 25). La sopravvivenza è risultata lievemente inferiore nel gruppo con comorbidità metabolica, ma senza differenze statisticamente significative. Considerando le disfunzioni metaboliche singolarmente, la malattia all'inizio del follow-up appariva lievemente meno avanzata in pazienti con BMI elevato o ipertensione, senza significative variazioni della sopravvivenza. Tra i pazienti con diabete, la sopravvivenza è risultata sensibilmente inferiore ( $p = 0,009$ ). È stata inoltre cercata una eventuale correlazione tra il profilo metabolico di questi pazienti ed i valori del biomarcatore sierico SerpinB3/4-IgM, precedentemente associato alla progressione istologica della fibrosi nei pazienti con epatopatia cronica, che tuttavia non è stata riscontrata.

In conclusione, la malattia metabolica, se considerata complessivamente come dai criteri per la diagnosi di MASLD, non ha un impatto significativo sulla

sopravvivenza a medio termine dei pazienti con malattia epatica cronica in stadio avanzato.

## Abstract

Liver cirrhosis represents the end stage of progressive chronic liver diseases of different etiologies. Amongst these, the metabolic etiology (MASLD, metabolic dysfunction associated steatotic liver disease) is increasing in recent years. With the new definition of MASLD, clear and simple criteria for the diagnosis were introduced, helping to differentiate it from alcohol-related steatosis and to identify cases where alcohol and metabolic dysfunction play equally important pathogenetic roles. In the same way, metabolic dysfunction can be seen as a contributing cause of liver disease (as well as a comorbidity) even in patients with a cirrhosis of different etiology. Therefore, the goal of this thesis is to characterize the metabolic profile of subjects suffering from advanced stage chronic liver disease of various etiology and evaluate its impact on survival. A group of 122 outpatients with liver cirrhosis, followed up for a median time of 84 months, has been studied retrospectively. The results did not identify relevant differences in disease severity between patients with or without one or more of the metabolic dysfunctions considered for MASLD diagnosis (arterial hypertension, BMI > 25, type 2 diabetes mellitus). The survival time was slightly shorter in patients with metabolic comorbidity, but without statistical significance. Considering every metabolic dysfunction separately, at the beginning of follow-up the severity of liver disease was less advanced in patients with hypertension or higher BMI, but without significant differences on survival, while patients with diabetes presented significantly shorter survival ( $p = 0,009$ ). Data were also analysed in relation to the levels of the biomarker SerpinB3/4-IgM, previously found increased in patients with histological progression of liver disease, but no correlation was found in relation to the metabolic profile.

In conclusion, metabolic disease (as considered in criteria for MASLD diagnosis) does not seem to have a relevant impact on mid-term survival of patients with advanced stage chronic liver disease.



## Sommario

<b>1. Introduzione</b> .....	<b>8</b>
1.1 Cirrosi epatica .....	8
1.1.1 Epidemiologia.....	8
1.1.2 Cause e fattori di rischio .....	8
1.1.2.1 Alcohol-related liver disease (ALD) .....	10
1.1.2.2 Infezione da virus HCV .....	10
1.1.2.3 Infezione da virus HBV .....	11
1.1.2.4 Metabolic dysfunction associated steatotic liver disease (MASLD) .....	12
1.1.3 Patogenesi (17) .....	16
1.1.4 Fisiopatologia .....	18
1.1.5 Manifestazioni cliniche e decorso della malattia.....	19
1.1.6 Diagnosi (22) .....	25
1.1.7 Evoluzione della patologia e prognosi .....	27
1.2 Il biomarcatore SerpinB3/4-IgM .....	31
<b>2. Scopo dello studio</b> .....	<b>36</b>
<b>3. Materiali e metodi</b> .....	<b>37</b>
3.1 Disegno dello studio .....	37
3.2 Selezione dei pazienti e loro follow-up.....	37
3.3 Variabili considerate .....	38
3.3.1 Determinazione dei valori sierici di SerpinB3/4-IgM .....	39
<b>4. Risultati</b> .....	<b>42</b>
4.1 Caratteristiche generali della popolazione in studio .....	42
4.2 Confronto tra pazienti presentanti e non presentanti i criteri per MASLD .....	44
4.3 Confronto tra pazienti con BMI superiore e inferiore a 25.....	47
4.4 Confronto tra pazienti diabetici e non diabetici .....	50
4.5 Confronto tra pazienti con e senza ipertensione arteriosa .....	53
4.6 Confronto tra pazienti con valori di SerpinB3/4-IgM superiori e inferiori a 120 AU/ml.....	56
<b>5. Discussione e conclusioni</b> .....	<b>59</b>
<b>Bibliografia</b> .....	<b>65</b>

## 1. Introduzione

### 1.1 Cirrosi epatica

Il termine cirrosi fa riferimento allo stadio più avanzato della malattia epatica cronica, caratterizzato dalla presenza di fibrosi severa e fenomeni rigenerativi distribuiti in modo disomogeneo, che contribuiscono nel complesso ad una sovversione dell'architettura dell'organo e ad una riduzione della sua funzione, fino, in alcuni casi, all'insufficienza epatica.

#### 1.1.1 Epidemiologia

La cirrosi è una condizione ad alta prevalenza in tutte le aree geografiche, ugualmente distribuita tra i Paesi più e meno industrializzati. Circa due milioni di morti l'anno sono attribuibili alle complicanze delle epatopatie, tra i quali un milione alla cirrosi, collocandosi così all'undicesima posizione tra le cause di morte, ed un milione al carcinoma epatocellulare (HCC). Complessivamente sono responsabili del 3.5% delle morti in tutti il mondo. (1)

Si tratta di una condizione più comune tra gli uomini (60% del totale).

#### 1.1.2 Cause e fattori di rischio

Le cause prevalenti sono soggette ad una maggiore variabilità tra nazioni, ma complessivamente l'alcool è la più frequente, seguita da MASLD (Metabolic Associated Fatty Liver Disease), epatite B e C. Tra i 2 miliardi di consumatori di alcool, più di 75 milioni ne assumono quantità sufficienti a porli a rischio di epatopatia alcool-correlata. Allo stesso modo, 2 miliardi di soggetti obesi o sovrappeso e 400 milioni di diabetici sono a rischio di MASLD. La prevalenza di entrambe le condizioni è in crescita. (2)

La Tabella 1 riporta le principali cause eziologiche di cirrosi.



Tabella 1: Cause di epatopatia cronica.

Virali	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Epatite B</li> <li>➤ Epatite C</li> <li>➤ Epatite D</li> </ul>
Alcool correlata	
Metaboliche e genetiche	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ MASLD (Metabolic Dysfunction Associated Steatotic Liver Disease)</li> <li>➤ Emocromatosi</li> <li>➤ Morbo di Wilson</li> <li>➤ Deficit di alpha1-antitripsina</li> <li>➤ Fibrosi cistica</li> <li>➤ Deficit di lipasi acida lisosomiale</li> <li>➤ Altre</li> </ul>
Autoimmuni	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Epatite autoimmune</li> <li>➤ Colangite biliare primitiva</li> <li>➤ Colangite sclerosante primitiva</li> </ul>
Biliari	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Stenosi biliare</li> <li>➤ Atresia biliare</li> </ul>
Vascolari	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Sindrome di Budd Chiari</li> <li>➤ Malattia veno-occlusiva</li> <li>➤ Cirrosi cardiaca</li> </ul>
Correlate all'assunzioni di farmaci	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Metotrexate</li> <li>➤ Amiodarone</li> <li>➤ Metildopa</li> <li>➤ Vitamina A</li> </ul>
Criptogenetica	

La presenza contemporanea di più di una causa di danno epatico rappresenta un fattore di rischio per una più rapida evoluzione della condizione verso la cirrosi. Fattori eziologici diversi hanno inoltre un importante impatto a livello di

comorbidità: l'esempio più emblematico è quello della MASLD, dove la sindrome metabolica è presente nella maggior parte dei soggetti affetti.

#### 1.1.2.1 Alcohol-related liver disease (ALD)

L'abuso alcolico rappresenta un problema rilevante a livello mondiale, rimanendo tra le prime cause di malattia epatica cronica avanzata. Il rischio di sviluppo di cirrosi in pazienti con abuso alcolico varia molto in base al pattern di assunzione e al tipo di bevanda, diventando considerevole quando il consumo supera le 3 unità alcoliche al giorno (ogni unità alcolica equivale a 10 g di alcol puro) (3) e continuando ad aumentare in maniera proporzionale alle quantità consumate (4). Nonostante ciò, fino al 15% di coloro che ne consumano in quantità maggiori non presenta alterazioni istologiche del fegato.

A livello istologico, il danno epatico conseguente al consumo di alcol si presenta come uno spettro di alterazioni che include la steatosi e la steatoepatite fino ad arrivare alla fibrosi avanzata ed infine alla cirrosi. Nei pazienti con steatosi epatica, che interessa la maggior parte dei consumatori eccessivi, la diagnosi differenziale tra l'eziologia alcolica e quella metabolica è essenziale per guidare l'approccio clinico: questa condizione è infatti reversibile nelle sue fasi più precoci se il paziente è in grado di mantenere l'astinenza (5).

La malattia epatica alcolica raggiunge lo stadio avanzato in circa il 15-20% dei pazienti con abuso di alcol (6). Nel 2017, il numero di pazienti affetti da malattia epatica cronica in stadio avanzato con eziologia alcolica a livello globale era di 26 milioni, tra i quali 2.46 milioni in fase di scompenso (1). L'anno precedente, circa il 50% delle morti per malattia epatica cronica sono state causate dall'abuso di alcol (7).

#### 1.1.2.2 Infezione da virus HCV

Secondo stime della WHO, il numero di pazienti affetti da epatite cronica da virus C nel 2023 era di 58 milioni in tutto il mondo, 1.5 milioni dei quali di nuova diagnosi

(7). L'infezione viene acquisita per via parenterale o, meno frequentemente, tramite contatto sessuale. A causa della mancanza di sintomi associati alla cronicizzazione dell'infezione (che avviene nel 75% dei casi di infezione), molti dei pazienti non sono al corrente di essere stati infettati o lo scoprono a seguito di controlli di routine che evidenziano alterazione della funzione epatica o presenza di anticorpi nel siero.

L'evoluzione della patologia è lenta e variabile, ma può condurre il paziente a fibrosi avanzata e cirrosi. Questa evoluzione ha tuttavia recentemente subito una variazione nella sua storia naturale, grazie all'introduzione di farmaci antivirali ad azione diretta (DAA), in grado di portare il paziente all'ottenimento di una SVR (risposta virologica sostenuta, ovvero negativizzazione dell'HCV-RNA al termine della terapia) in più del 90% dei casi trattati. La scelta del farmaco per l'eradicazione è basata sulle caratteristiche del paziente e sul genotipo del virus, essendo state dimostrate ampie differenze nella risposta dei singoli ceppi.

Il rischio di ricomparsa di livelli dosabili di HCV-RNA dopo la fine del trattamento si attestano al di sotto dello 0.2% a 6 mesi, rendendo la terapia con DAA a tutti gli effetti una cura per l'infezione da HCV (8).

Il rischio di HCC e la mortalità fegato-correlata in pazienti trattati con terapia eradicante che hanno ottenuto SVR subisce una significativa riduzione, benché non venga eliminata del tutto (9).

### 1.1.2.3 Infezione da virus HBV

L'infezione cronica da HBV è una condizione ad alta prevalenza globale, per la quale si riconoscono importanti differenze regionali, con maggior prevalenza in Africa e nel Sud-Est Asiatico. Nel complesso, i soggetti con epatite B cronica erano, secondo stime della WHO, circa 296 milioni, con 1.5 milioni di nuovi casi, nel 2019. Grazie alla vaccinazione, la prevalenza della condizione è calata di più del 30% negli ultimi 20 anni (7). Ciò nonostante, rimane una delle principali cause di cirrosi e di mortalità fegato-correlata.

Come per HCV, l'acquisizione del virus può avvenire per via parenterale o sessuale. Nelle aree endemiche un importante ruolo nella diffusione è svolto dalla trasmissione verticale, dalla madre al figlio. Il contagio provoca un'epatite acuta in una porzione minoritaria dei casi (meno del 30%) e specialmente se avvenuto in età adulta. L'infezione in età perinatale o infantile predispone maggiormente alla cronicizzazione. Il danno epatico che fa seguito all'infezione è conseguenza del rapporto tra la replicazione virale all'interno degli epatociti e l'azione del sistema immunitario che cerca di arrestarla. Il danno cronico può portare allo sviluppo di cirrosi e successivamente di epatocarcinoma. Il trattamento, tramite la riduzione della replicazione virale, mira al rallentamento della progressione della patologia e permette, in alcuni casi, di ottenere una regressione almeno parziale del grado di fibrosi, se questa era già comparsa (10).

#### 1.1.2.4 Metabolic dysfunction associated steatotic liver disease (MASLD)

Il termine MASLD (11) è stato adottato di recente per indicare una condizione prima conosciuta con il termine NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease), ovvero un accumulo di grassi a livello epatico, la cui origine eziologica non sia l'assunzione cronica di alcol. Nella MASLD, il fegato grasso rappresenta la manifestazione epatica della sindrome metabolica, che interessa tutto l'organismo e di cui sono noti soprattutto gli effetti sul sistema cardiovascolare.

La nomenclatura precedente è stata abbandonata specialmente perché non in grado di chiarire quale fosse l'eziologia della condizione. Secondo il nuovo sistema classificativo, si parla di SLD (steatotic liver disease) ogni volta in cui si riscontrino accumuli epatici di grasso, indipendentemente dalla causa. Tra i soggetti con SLD, si distinguono quelli affetti da:

- MASLD, in cui la causa è la disfunzione del metabolismo,
- ALD (alcohol-related liver disease), dove la causa è l'abuso di alcol;
- MetALD (metabolic dysfunction and alcohol associated liver disease), in cui i due fattori eziologici precedenti agiscono sinergicamente, con un utilizzo

di alcol da solo insufficiente a determinare steatosi, associato ad un certo grado di disfunzione del metabolismo.

- SLD con cause specifiche (malattie monogeniche, farmacindotte, altre);
- SLD criptogenetica, in cui la causa non riesce ad essere identificata.

La nuova nomenclatura, con l'introduzione di MetALD, pone anche l'attenzione sulla possibile doppia eziologia della malattia epatica, fino ad allora poco considerata. Come alcol e disfunzione del metabolismo possono agire sinergicamente, così può avvenire anche in caso di altre cause di danno epatico compresenti.

Con MASH (metabolic dysfunction associated steatohepatitis) ci si riferisce ad una condizione clinica di maggior gravità, ovvero il sottogruppo di pazienti affetti da MASLD che presentano un'importante componente infiammatoria a livello del fegato. La presenza di MASH pone i pazienti a maggior rischio di sviluppo e progressione della fibrosi epatica.

Si stima che, tra il 2016 ed il 2020, circa il 36% della popolazione mondiale fosse affetta da MASLD. Il suo aumento, di circa dieci punti percentuali rispetto a dieci anni prima, prosegue in parallelo con quello dell'obesità e delle patologie ad essa correlate, in costante crescita (12) (13). La prevalenza di MASH tra i pazienti con MASLD privi di indicazione all'esecuzione di biopsia epatica è del 7%. Se si considerano quelli con indicazione alla biopsia, la prevalenza si aggira attorno al 60%. (14)

Considerando i soggetti affetti da diabete mellito di tipo 2, popolazione a rischio di MASLD, la prevalenza della condizione si attesta al 63%. Tra questi, circa la metà dei casi (31.5% del totale dei diabetici) rientra nei criteri per MASH. Una fibrosi di grado avanzato è presente nel 15% dei diabetici con MASLD e nel 24% di quelli con MASH. Il diabete rappresenta inoltre un fattore di rischio indipendente per la progressione del grado di fibrosi in pazienti con MASLD. (15)

**Diagnosi (11)**

Per la diagnosi di MASLD devono essere verificati contemporaneamente i seguenti criteri:

- a. presenza di steatosi epatica dimostrata con una metodica di imaging o con biopsia;
- b. positività ad almeno uno tra i fattori di rischio cardiometabolici (CMRF) riportati di seguito:
  - BMI > 25 oppure circonferenza della vita > 94 cm negli uomini e 80 cm nelle donne;
  - Glicemia a digiuno > 100 mg/dL (o 5.6 mmol/L), glicemia > 140 mg/dL (o 7.8 mmol/L) a 2 ore dalla somministrazione della dose da carico di glucosio nell'OGTT, HbA1c > 5.7% (39 mmol/L) oppure diabete mellito di tipo 2 o in terapia;
  - Pressione arteriosa > 130/85 mmHg o paziente in terapia;
  - Trigliceridi > 150 mg/dL (o 1.70 mmol/L) oppure paziente in terapia antidislipidemica;
  - HDL < 40 mg/dL (o 1 mmol/L) negli uomini e 50 (o 1.3 mmol/L) nelle donne oppure in terapia antidislipidemica.

Prima di porre diagnosi va comunque esclusa la presenza di cause specifiche di SLD, tra cui l'abuso di alcol. Se il paziente fa uso di alcol in quantità superiori a 420 g/settimana per gli uomini e 350 g/settimana per le donne (o 60 g/die per gli uomini e 50 g/die per le donne) si tratta di ALD. Quantità inferiori di alcol (tra 140 e 350 g/settimana per le donne e tra 210 e 420 g/settimana per gli uomini), in presenza di positività ad almeno un CMRF, spostano la diagnosi verso MetALD.

Per la diagnosi di MASH (così come per la diagnosi di NASH precedentemente al cambio di nomenclatura) rimane necessaria l'esecuzione di una biopsia che dimostri la presenza di ballooning epatocitario ed infiltrato infiammatorio.

Sia i pazienti con MASLD che con MASH sono asintomatici, fattore che può ostacolare la diagnosi di queste patologie. Per questa ragione, pazienti diabetici o

con sindrome metabolica dovrebbero essere studiati per la possibile presenza di steatosi, specialmente in caso di riscontro di elevati livelli di enzimi epatici. (16)

### Evoluzione della patologia e prognosi

La progressione della patologia avviene in genere lentamente, conducendo all'aumento di un grado istologico di fibrosi ogni 14 anni nei soggetti con MASLD e ogni 7 nei soggetti con MASH (16). Malgrado ciò, circa il 20% dei soggetti progredisce più rapidamente di quanto atteso.

Nonostante il danno epatico, le malattie cardiovascolari rappresentano, in generale, la principale causa di morte. La mortalità fegato-correlata è meno rilevante, tuttavia aumenta di entità all'aumentare del grado di fibrosi. Una volta raggiunto lo stadio cirrotico, il paziente rischia la comparsa delle stesse complicanze a cui sono soggetti i pazienti con malattia epatica avanzata di diversa eziologia (scompenso con ascite, encefalopatia, sanguinamento da varici, ecc.)

Differentemente dalle epatopatie croniche di altra eziologia, il rischio di sviluppo di HCC nei pazienti con MASLD non è limitato alla fase cirrotica della malattia. Alla diagnosi di HCC, i pazienti con MASLD hanno un'età più avanzata di quelli con altre eziologie, un numero maggiore di comorbidità extraepatiche ma una minore prevalenza di cirrosi: solo 2/3 dei casi. A causa dell'alta prevalenza di MASLD nella popolazione, rimane comunque difficile eseguire una sorveglianza standardizzata, ragione per cui spesso la diagnosi di HCC avviene in stadi più avanzati.

### Gestione del paziente con MASLD

Il peggioramento della condizione epatica va di pari passo con il protrarsi dell'esposizione ai fattori di rischio cardiometabolici, motivo per cui il loro controllo rappresenta la principale misura terapeutica. L'inserimento in terapia di farmaci per il controllo della pressione, della glicemia e della lipemia è indicato in tutti i pazienti che ne presentino alterazioni, indipendentemente dalla presenza di

MASLD. Modifiche nello stile di vita, che portino anche solo ad una lieve perdita di peso si sono dimostrate in grado di ridurre il contenuto di lipidi epatico a livello istologico ed in alcuni casi anche di portare alla regressione della MASH. Un regolare svolgimento di attività fisica è utile anche alla riduzione della resistenza all'insulina, portando contemporaneamente a due vantaggi per i pazienti diabetici con MASLD.

Al di fuori delle modifiche dello stile di vita e del trattamento delle comorbidità, non esistono attualmente farmaci approvati per il trattamento della MASLD. In soggetti non responsivi, la chirurgia bariatrica può essere considerata in quanto porta ad una perdita di peso ed alla riduzione delle complicanze metaboliche stabili nel lungo periodo, ed è in grado di migliorare il danno epatico associato alla MASLD (regressione di MASH e riduzione del grado di fibrosi).

Quando è raggiunto lo stadio cirrotico, il trapianto di fegato diventa una possibile opzione terapeutica. La cirrosi associata a MASLD è, attualmente, tra le prime tre indicazioni al trapianto. La sopravvivenza post-intervento è simile a quella di pazienti con diversa eziologia, con minore incidenza di rigetto ed al contempo maggiore mortalità per cause cardiovascolari. (16)

Pochi studi hanno valutato finora il peso delle comorbidità metaboliche sull'andamento della malattia epatica cronica avanzata, e in particolare rispetto alla nuova definizione di malattia metabolica (MASLD).

### 1.1.3 Patogenesi (17)

Indipendentemente dalla causa dell'epatopatia, il danno epatico progredisce attraverso una serie di fasi, per la maggiore asintomatiche. Le cause di danno cronico agiscono su tutte le sottopopolazioni cellulari presenti nell'organo, portando alle variazioni istologiche che caratterizzano la malattia. Cause di danno differenti possono convergere verso lo stadio di cirrosi epatica. Ciò non avviene, tuttavia, in tutti i pazienti epatopatici né tantomeno con le stesse tempistiche.



### Deposizioni di matrice extracellulare

La deposizione di tessuto fibroso in un fegato sottoposto ad un danno cronico è ad opera delle cellule stellate (HSC, Hepatic Stellate Cells), di natura mesenchimale, localizzate all'interno dello spazio di Disse, tra le cellule endoteliali dei sinusoidi epatici e gli epatociti. L'infiammazione causata dal danno determina l'attivazione delle HSC, che rispondono producendo matrice extracellulare. In base all'eziologia dell'infiammazione, la fibrosi può interessare per prima la regione pericentrale, nei pressi della vena centrolobulare, o la regione periportale, in prossimità degli spazi portali, ospitanti i rami dell'arteria epatica, della vena porta, e dei dotti biliari intraepatici. Con la progressione della malattia, la fibrosi si estende via via, fino ad interessare l'intero lobulo epatico, dando origine a tralci che uniscono gli spazi portali alle vene centrolobulari (fibrosi a ponte) che caratterizzano l'istologia del fegato cirrotico.

### Alterazione del microcircolo

I sinusoidi epatici sono vasi dotati di fenestrature allo scopo di favorire lo scambio di soluti da e verso il parenchima epatico. Il danno cronico provoca la defenestrazione dei sinusoidi, che assieme alla membrana basale formatasi in seguito alla deposizione di matrice extracellulare da parte delle HSC, contribuisce alla riduzione dello scambio di substrati tra sangue ed epatociti.

### Danno epatocitario

L'attivazione delle cellule di Kupffer (macrofagi stellati residenti nel fegato) mediata dai vari agenti eziologici dell'epatopatia porta al rilascio di mediatori solubili che conducono a morte gli epatociti. Inoltre, in caso di infezione virale cronica, le cellule di Kupffer fungono da APC (cellule presentanti l'antigene), sostenendo la risposta immunitaria, a sua volta responsabile del danno epatico.

### Formazione di noduli rigenerativi

Contemporaneamente, gli epatociti sono stimolati a proliferare per far fronte al danno a cui l'organo è sottoposto. Questo fenomeno, normalmente efficace, non risulta sufficiente in un fegato danneggiato cronicamente, portando alla formazione di noduli rigenerativi sparsi, che alterano ulteriormente il parenchima già sovratteso dalla fibrosi.

#### 1.1.4 Fisiopatologia

La distorsione del parenchima epatico dovuta alla fibrosi offre un ostacolo al flusso sanguigno e, in aggiunta al disequilibrio tra le concentrazioni dei fattori vasocostrittori e vasodilatatori, determina l'aumento della pressione portale. Il più studiato tra i vasodilatatori è l'ossido nitrico, rilasciato dalle cellule endoteliali, la cui produzione subisce variazioni differenti a livello epatico e splancnico: i sinusoidi epatici ne limitano il rilascio, mentre le cellule endoteliali delle arteriole splancniche lo incrementano. L'effetto di tali variazioni porta alla costrizione dei vasi epatici e a dilatazione di quelli intestinali. Complessivamente la vasodilatazione splancnica consente un cospicuo afflusso di sangue alla vena porta, che incontra successivamente difficoltà ad attraversare il tratto epatico vaso-costretto.

Il maggiore afflusso di sangue all'intestino, che già riceve circa il 25% della gittata cardiaca, sottrae volume utile al resto dell'organismo. In risposta all'ipoafflusso, a livello renale si verifica vasocostrizione, volta ad aumentare la ritenzione di sodio e acqua. Questo processo, benché efficace nell'aumentare il volume plasmatico, se protratto danneggia i reni. L'aumento del volume di plasma ottenuto causa anche un aumento dell'output cardiaco, conducendo a una circolazione iperdinamica, la quale contribuisce all'ulteriore peggioramento dell'ipertensione portale.

L'elevata pressione portale conduce a un'inversione di flusso nei circoli collaterali preesistenti e favorisce la formazione di nuove comunicazioni. Il più importante tra detti circoli collaterali si localizza a livello della giunzione gastro-esofagea.

Questi vasi, normalmente a bassa capacità, sono costretti ad accogliere un eccessivo volume sanguigno, dando origine a varici gastroesofagee.

Alla progressione della cirrosi si accompagnano alterazioni del microbiota intestinale: al variare del grado di gravità della patologia, più evidenti diventano tali alterazioni, che portano con sé l'aumento della colonizzazione batterica intestinale, il rallentamento del transito e l'aumento della permeabilità. Queste variazioni facilitano la traslocazione batterica, responsabile dello stato di infiammazione sistemica caratteristico del paziente con cirrosi, il quale a sua volta contribuisce a facilitare l'insorgere di eventi di scompenso. La perdita del filtro epatico, i fenomeni di shunt porto-sistemici e lo stato di disfunzione immunitaria unitamente alla traslocazione batterica, predispongono il soggetto con malattia epatica avanzata ad un aumentato rischio infettivo. (2)

### 1.1.5 Manifestazioni cliniche e decorso della malattia

La cirrosi è una condizione asintomatica, che rimane tale fino al verificarsi di un episodio di scompenso. In assenza di questi episodi, i pazienti possono presentare segni clinici aspecifici: eritema palmare, clubbing digitale, segno di Dupuytren, ipertrofia delle parotidi, ginecomastia, perdita dei caratteri sessuali secondari e spider naevi. Alla palpazione dell'addome può riscontrarsi epatomegalia (il fegato aumenta di dimensioni nelle fasi iniziali di malattia, per poi restringersi ed irrigidirsi) o splenomegalia ed eventualmente, all'ispezione, la presenza di circoli collaterali superficiali (caput medusae).

Con il progredire della patologia, il paziente va incontro allo scompenso, il quale rappresenta uno spartiacque per la mortalità ed è gravato da un elevato rischio di recidiva (via via più probabile al verificarsi di ogni scompenso successivo). Lo scompenso viene definito dalla comparsa di una tra le seguenti manifestazioni cliniche:

- Ascite
- Sanguinamento da varici esofagee
- Ittero

- Encefalopatia epatica
- Insufficienza renale
- Infezioni

Considerando la totalità dei pazienti con malattia epatica cronica avanzata, questi possono sviluppare uno scompenso con due differenti presentazioni (18):

- acute decompensation, rapido sviluppo di importanti manifestazioni cliniche che richiedono ricovero ospedaliero.
- non-acute decompensation, lenta comparsa di ascite o encefalopatia.

Tra i pazienti con non-acute decompensation, circa la metà andrà successivamente incontro a scompenso acuto. A questo punto, dall'acute decompensation l'evoluzione può essere di tre tipi (19):

- sviluppo di *ACLF* (acute on chronic liver failure) in  $\frac{1}{3}$  dei casi con insufficienza di uno o più organi;
- *Cirrosi scompensata instabile* in  $\frac{1}{3}$  dei casi, ovvero una condizione che costringe a ripetuti ricoveri dopo un primo episodio di scompenso acuto, senza che vi sia lo sviluppo di insufficienze d'organo come da criteri diagnostici per *ACLF*;
- *Cirrosi scompensata stabile* nel restante terzo dei casi, simile alla non-acute decompensation iniziale.

### Ascite

L'ascite è la complicanza più frequente. Si manifesta con disturbi a livello addominale e aumento della circonferenza dell'addome. Si classifica in (20):

- Ascite di *grado 1*, quando il versamento è rilevabile solo tramite indagine ecografiche;
- Ascite di *grado 2*, quando è rilevabile anche all'esame clinico come presenza di ottusità mobile alla percussione;
- Ascite di *grado 3*, quando è visibile alla sola ispezione.

L'ascite può essere anche sotto-classificata in:

- Non complicata
- Complicata, in caso di:
  - Refrattarietà alle terapie (la dose massima di diuretico è inefficace o non raggiungibile perché non tollerata);
  - Ricorrenza, se ricompare prima di 4 settimane dal risolversi del precedente episodio;
  - Infezione del liquido ascitico (peritonite batterica spontanea)
  - Insufficienza renale con compromissione della funzionalità renale di ogni grado, fino alla sindrome epato-renale (la riduzione del volume plasmatico efficace dovuta allo spostamento del liquido in addome causa l'attivazione del sistema RAA e la vasocostrizione renale).

#### Sanguinamento da varici esofagee

Nel paziente con cirrosi è la causa più frequente di sanguinamento gastro-intestinale. Si presenta con ematemesi o melena e costituisce un'emergenza medica. Il rischio di rottura dipende dalla dimensione delle varici e dalla presenza di alcuni segni endoscopici, come striature rosse sulla parete dei vasi. Poiché la rottura è un frequente evento di scompenso, si effettua sia una profilassi primaria (in pazienti con varici, in assenza di sanguinamenti pregressi) che secondaria (dopo un primo sanguinamento). Nell'ambito della profilassi primaria, l'approccio è farmacologico, con l'obiettivo di ridurre la pressione portale: l'efficacia di questa misura è stimata con l'endoscopia, che valuta la progressione delle varici, poiché la misura diretta della pressione portale richiederebbe cateterismo e per questo è poco praticata. Nel caso l'endoscopia dimostri comunque una progressione del grado delle varici, si procede con profilassi endoscopica (legatura delle varici).

Nonostante la recente riduzione dell'incidenza (grazie soprattutto a queste precauzioni) la mortalità rimane attorno al 20%. Poiché la rottura di varici espone il paziente a rischio infettivo, qualora la rottura si verificasse, le misure da seguire

includono, oltre all'interruzione del sanguinamento, anche una profilassi antibiotica.

Altri sanguinamenti gastro-intestinali nei pazienti epatopatici (correlati all'ipertensione portale, da gastropatia, enteropatia o colopatia) sono meno frequenti ma più insidiosi, poiché si presentano generalmente con anemia.

### Encefalopatia epatica

Con encefalopatia epatica si fa riferimento alla comparsa di alterazioni neuropsichiatriche potenzialmente reversibili, come conseguenza dell'aumento dei livelli circolanti di soluti tossici (prevalentemente ammonio), normalmente metabolizzati dal fegato. Nel paziente affetto da cirrosi, la disfunzione epatica e gli shunt porto-sistemici non consentono l'eliminazione efficace di tali soluti, che si concentrano nel sangue.

La gravità dell'encefalopatia epatica è classificata secondo i criteri di West Haven in 5 gradi. La condizione è subclinica nei gradi 0 e 1, dove la diagnosi può essere posta solo in seguito all'esecuzione di test neuropsicologici o elettrofisiologici. I gradi dal 2 al 4 indicano invece una condizione di encefalopatia clinicamente manifesta e si presentano nel 30-45% dei pazienti con epatopatia avanzata.

- Grado 0 (o encefalopatia minima): nessuna alterazione evidente senza test specifici.
- Grado 1: nonostante siano richiesti test specifici per la diagnosi, il colloquio con il paziente o con i familiari evidenziano un certo grado di iniziale decadimento cognitivo.
- Grado 2: letargia o apatia, disorientamento nel tempo o nello spazio di lieve entità, cambiamento di personalità, disprassia o astressi.
- Grado 3: stupor, confusione, disorientamento, comportamento bizzarro.
- Grado 4: coma.

Un importante ruolo nella comparsa di encefalopatia epatica è svolto dal rallentamento del transito intestinale: la maggioranza dei prodotti azotati tossici

derivano, infatti, dai processi biochimici svolti dal microbiota e sono prodotti in misura tanto maggiore quanto più lento è il transito intestinale. Per questa ragione, il mantenimento di un alvo regolare è particolarmente importante in questo tipo di pazienti. Una profilassi con antibiotici che rimangono confinati al livello del tubo gastro-enterico può aiutare a limitare lo sviluppo di questa condizione.

L'encefalopatia epatica può comparire anche come iatrogena, in seguito al posizionamento di TIPS (transjugular intrahepatic porto-systemic shunt), utilizzata in caso di ascite refrattaria o sanguinamento da varici difficile da controllare (10-50% dei casi di posizionamento).

#### Danno renale acuto e sindrome epatorenale

L'AKI (acute kidney injury) ha un'incidenza del 30-50% tra i pazienti con cirrosi ospedalizzati per scompenso. Si può porre diagnosi di AKI quando si registra un aumento dei livelli di creatinina sierica superiori a 0.3 mg/dL nelle 48 ore precedenti o un suo incremento percentuale di almeno 50% nell'ultima settimana (come da criteri KDIGO).

Le cause pre-renali sono le più frequenti, costituendo circa 2/3 dei casi di AKI.

Le forme intrinseche sono meno frequenti e dovute principalmente a necrosi tubulare acuta conseguente all'assunzione di farmaci nefrotossici o a shock.

Le cause post-renali sono poco comuni.

In aggiunta alle tre categorie classiche di danno renale, nel paziente con epatopatia in stadio avanzato può presentarsi un tipo di danno in parte funzionale ed in parte strutturale, detto AKI-HRS (acute kidney injury – hepatorenal syndrome). A differenza dell'AKI pre-renale, l'AKI-HRS non risponde al riempimento volemico e all'interruzione dei diuretici, mentre rispetto all'AKI intrinseca, non presenta danno renale evidente (proteinuria, ematuria o alterazioni ecografiche, bassi livelli di NGAL urinario).

Il danno renale può evolvere, nel paziente con cirrosi, anche con una cinetica più lenta: per le riduzioni della funzione renale che non rientrano nei criteri per la diagnosi di AKI si può parlare di NAKI-HRS (non-acute kidney injury). NAKI-HRS viene a sua volta suddiviso in AKD-HRS (acute kidney disease) se la riduzione della filtrazione glomerulare al di sotto di 60 mL/min dura meno di tre mesi, e CKD-HRS (chronic kidney disease) se dura più di tre mesi.

### Infezioni batteriche

Nonostante la non totale concordanza da parte delle società scientifiche nel considerare le infezioni batteriche come evento sufficiente a determinare lo scompenso nel soggetto affetto da epatopatia cronica in stadio avanzato, è noto che la loro presenza aumenta il rischio di ACLF e di mortalità nei pazienti ricoverati per scompenso. Per questa ragione, tutti i pazienti ricoverati per complicanze correlate alla cirrosi o che presentino un peggioramento della funzione epatica o renale dovrebbero venire studiati mediante un work-up infettivologico che escluda la presenza di infezione.

I tipi di infezioni più frequenti nei soggetti con cirrosi sono le infezioni del tratto urinario (30%) e la peritonite batterica spontanea (30%), seguite da polmoniti (20%), infezioni dei tessuti molli e della cute (10%) e batteriemie spontanee (10%).

Il termine peritonite batterica spontanea (PBS) fa riferimento all'infezione del liquido ascitico in assenza di cause addominali identificate trattabili chirurgicamente. Le manifestazioni possono includere dolore addominale, vomito, diarrea ed altri sintomi aspecifici, benché in una parte dei casi la condizione sia totalmente asintomatica. Per questo motivo, tutti i pazienti ricoverati per scompenso cirrotico e presentanti ascite dovrebbero essere sottoposti a paracentesi diagnostica per la ricerca di leucociti e l'esecuzione dell'esame colturale. Per prevenire l'insorgenza di PBS i pazienti con ascite considerati a rischio (proteine nel liquido ascitico > 15 g/L, iponatremia, insufficienza renale, Child-Pugh C o pregressa PBS) possono essere sottoposti a profilassi antibiotica.



### Acute on chronic liver failure (ACLF)

Si tratta di una condizione in cui un paziente con cirrosi epatica e scompenso acuto sviluppa l'insufficienza di uno o più organi, in modo da portare il suo rischio di mortalità a 4 settimane al di sopra del 15% (21). In base alla gravità, viene suddivisa in gradi:

- Grado 1: insufficienza di un solo organo. Non qualsiasi insufficienza d'organo rappresenta da sola un criterio sufficiente alla diagnosi di ACLF di grado 1 a causa del diverso impatto di organi distinti sulla mortalità. Una singola insufficienza d'organo configura ACLF se si tratta del rene (grado 1A) o se si tratta di un altro organo ma è comunque presente un danno anche a rene o encefalo, non sufficiente a determinare l'insufficienza di questi ultimi (grado 1B);
- Grado 2: insufficienza di due organi (mortalità a 4 settimane > 30%);
- Grado 3: tre o più insufficienze d'organo (mortalità a 4 settimane > 70%).

La valutazione della funzione degli organi è basata sul SOFA score, ad eccezione dell'encefalo, per cui si utilizza la classificazione di West Haven per l'encefalopatia epatica.

### 1.1.6 Diagnosi (22)

Nei pazienti con malattia epatica in cui si sospetta la presenza di cirrosi, l'obiettivo è stabilire il grado di fibrosi, la presenza o meno di ipertensione portale e, se non già note, le cause della patologia epatica cronica.

### Biopsia

Il gold standard per la diagnosi è l'analisi istologica della biopsia epatica, anche se gravata da una serie di svantaggi, tra cui i rischi collegati al prelievo, la scarsa adesione dei pazienti (soprattutto nel caso sia necessario ripeterla nel tempo), la variabilità tra prelievi (a causa della disomogeneità del parenchima) ed i costi elevati. La sua valutazione si basa su uno staging, che considera il grado di fibrosi,

ed un grading, che considera l'entità di infiammazione e correla con la rapidità di progressione. (23)

#### Test ematici non invasivi

Un'alternativa è rappresentata dai test ematici non invasivi (NIT), utili soprattutto qualora si voglia analizzare un'ampia popolazione con l'obiettivo di escludere con efficacia i pazienti sani. In questo modo aumenteranno i falsi positivi, che potranno poi essere ulteriormente valutati con test più accurati. Tra gli svantaggi, molti di questi sono eziologia-specifici o performano molto diversamente a seconda dell'eziologia. Si distinguono in 'semplici' e 'complessi', dove i primi sfruttano parametri di laboratorio comunemente valutati mentre i secondi richiedono specifici markers di fibrogenesi/fibrolisi. (24)

#### Elastografia (24) (25)

Con elastografia si intendono tecniche che utilizzano la misura della 'rigidità' del parenchima epatico come marker surrogato di fibrosi. Sono utili alla diagnosi di fibrosi avanzata e cirrosi grazie al basso numero di falsi positivi, e per questo vengono usati di solito come secondo approccio dopo aver individuato la popolazione a rischio. Consentono anche una migliore valutazione della prognosi. Esistono due tecniche principali:

- VCTE (Fibroscan): basato sull'ecografia, fornisce risultati attendibili a basso costo. Esistono anche altre tecniche che usano l'ecografia ma sono meno diffuse. Possono essere influenzate da BMI, ascite, epatite, colestasi, respirazione, assunzione recente di cibo e scompenso cardiaco congestizio. Cutoff consigliato attorno a 6.0 kPa per l'esclusione di fibrosi avanzata e cirrosi (se positivo va ripetuto a distanza di 6 mesi).
- MRE: basata sulla risonanza magnetica per la valutazione della propagazione di onde meccaniche, più accurata della VCTE ma, oltre ad essere più costosa, richiede personale e macchinari.

### 1.1.7 Evoluzione della patologia e prognosi

#### Considerazioni generali

Dopo la diagnosi di cirrosi, gli obiettivi per il percorso di cura del paziente diventano i seguenti:

- Rimuovere la causa di danno epatico qualora possibile;
- Ritardare lo scompenso e trattare le complicanze quando si presentano;
- Portare avanti la sorveglianza delle varici esofagee e dell'HCC.
- Valutare la prognosi;
- Porre indicazione all'inserimento in lista trapianto, se le condizioni del paziente lo giustificano.

La rimozione dell'agente eziologico dell'epatopatia rappresenta l'unica misura che può dimostrarsi efficace nel rallentare l'evoluzione della patologia e va considerata ad ogni stadio di gravità. La fibrosi epatica, nelle fasi di malattia precedenti la vera e propria cirrosi, può regredire almeno in parte se l'agente eziologico è rimosso, fenomeno che diventa marcatamente meno rilevante una volta instaurata la cirrosi. L'eradicazione dell'HCV con farmaci antivirali ad azione diretta si è dimostrata essere una misura efficace per fermare la progressione in pazienti con questa eziologia. Esercizio fisico e calo ponderale sono le principali misure da adottare per i soggetti con MASLD, ma tutti i pazienti possono trarne beneficio. L'astensione dall'alcol è mandatoria indipendentemente dall'eziologia della cirrosi. Allo stesso modo, i farmaci che possono causare danni al fegato andrebbero esclusi dall'utilizzo per quanto possibile. Se necessaria una terapia analgesica, il paracetamolo può essere somministrato in sicurezza, mentre vanno evitati i FANS per il rischio di danno renale che può conseguirne.

Nei pazienti con ipertensione portale e varici esofagee, la profilassi farmacologica (o eventualmente endoscopica, come già discusso) diminuisce l'incidenza di sanguinamento e quindi di scompenso. La sorveglianza endoscopica viene eseguita una volta l'anno.

## Valutazione prognostica

Per quanto riguarda la prognosi, una prima distinzione viene fatta tra i pazienti in compenso e quelli con cirrosi scompensata: i primi hanno un rischio di mortalità 5 volte maggiore rispetto alla popolazione generale, i secondi 10 volte maggiore. La sopravvivenza dei pazienti con cirrosi compensata è mediamente di 9-12 anni dalla diagnosi, ma si riduce a 2 anni in seguito alla comparsa di scompenso (con differenze anche in base alle specifiche manifestazioni dello scompenso). Il rischio di scompenso annuo varia a sua volta in base all'eziologia della cirrosi e si mantiene più basso in caso di HCV (4% l'anno) rispetto all'alcol ed all'HBV (entrambi intorno al 10%). (2)

Le comorbidità danno un importante contributo alla riduzione della sopravvivenza, specialmente considerando l'invecchiamento della popolazione affetta da cirrosi e l'aumento della prevalenza di MASLD.

Per la valutazione del rischio di mortalità sono comunemente utilizzati score numerici semplici da calcolare. I più utilizzati sono lo score di Child-Turcotte-Pugh e il MELD. (26)

Il Child-Pugh score (27) (28) è nato con lo scopo di individuare i pazienti che potessero beneficiare di un intervento chirurgico volto al trattamento dell'ipertensione portale (transezione dell'esofago e confezionamento di shunt porto-sistemici) ma è stato dimostrato rappresentare un fattore prognostico indipendente in diversi sottogruppi di pazienti con cirrosi. Lo score è ottenuto dalla misurazione di cinque parametri, tre forniti da esami ematochimici (bilirubina, albumina e INR) e due valutati clinicamente (ascite ed encefalopatia epatica). La somma dei punti ottenuti per ciascun parametro restituisce un valore compreso tra 5 e 15, che consente di raggruppare i pazienti in tre categorie indicate con le lettere A, B e C. È ampiamente utilizzato sia in maniera descrittiva che con fine prognostico nella pratica clinica, oltre ad essere parte di alcuni algoritmi per la selezione del trattamento in pazienti affetti da HCC (29). Nonostante la diffusione, presenta diverse limitazioni, tra le quali il fatto che ogni parametro è pesato ugualmente agli altri, la mancata considerazione di ulteriori importanti fattori che

influenzano la sopravvivenza (ad esempio la funzionalità renale) e della persistenza o meno del fattore eziologico della malattia.

Tabella 2: Parametri per il calcolo dello score di Child-Pugh. I valori ottenuti per ciascuna variabile vanno sommati tra loro per ottenere il punteggio complessivo.

Punteggio	1	2	3
Encefalopatia	Assente	Minima	Avanzata
Ascite	Assente	Controllata	Refrattaria
Bilirubina (umol/L)	< 34	34 – 51	> 51
Albumina (g/L)	> 35	28 – 35	< 28
INR	< 1.7	1.7 – 2.3	> 2.3

Il MELD score (Model for End-stage Liver Disease) (30) è anch'esso molto utilizzato nella pratica clinica. Inizialmente, lo score è nato con l'obiettivo di identificare i pazienti che potessero trarre beneficio dal posizionamento di una TIPS, ma è successivamente stato sfruttato soprattutto per stabilire la priorità in lista di attesa per il trapianto di fegato, mentre precedentemente ci si basava sul tempo trascorso dall'inserimento in lista. I parametri considerati sono quattro, tutti ottenuti da esami ematochimici: bilirubina, INR, albumina e creatinina. Va inoltre indicato se il paziente ha effettuato dialisi nella settimana precedente il test della creatinina. Diversamente dallo score di Child-Pugh, alle diverse variabili sono assegnati pesi differenti ed il punteggio finale è ottenuto tramite l'applicazione di una formula. Il punteggio ottenuto varia da 6 a 40 e correla con la sopravvivenza in assenza di trapianto, con punteggi maggiori corrispondenti a sopravvivenze minori. Attualmente è spesso preferito l'utilizzo del MELD-Na, che considera anche la concentrazione di sodio ematica, fattore prognostico indipendente.

## Carcinoma epatocellulare e sorveglianza

Il carcinoma epatocellulare (HCC) rappresenta il 90% delle neoplasie maligne primitive del fegato e ogni anno dall'1 al 4% dei pazienti affetti da cirrosi sviluppa un HCC. I maggiori fattori di rischio sono l'eziologia HBV ed HCV della cirrosi, ma si è visto che l'incidenza in pazienti con MASLD è in aumento (condizione nella quale l'HCC può comparire anche in assenza di cirrosi).

Nei pazienti affetti da epatopatia cronica in stadio avanzato, la sorveglianza per l'epatocarcinoma si basa sull'esecuzione semestrale di un'ecografia. Se la metodica dovesse evidenziare la presenza di noduli di dimensioni superiori a 1 cm, si passa ad un esame di secondo livello, rappresentato da una TC o da una RMN, in entrambi i casi con mezzo di contrasto. Le caratteristiche contrastografiche dell'HCC consentono, nella maggioranza dei casi, di porre diagnosi senza la necessità di eseguire una biopsia. Un nodulo epatico è diagnosticato come HCC se presenta una pronta assunzione di contrasto in fase arteriosa (enhancement arterioso), che lo fa apparire più chiaro del parenchima circostante, ed un rapido rilascio di contrasto in fase venosa e ritardata (washout venoso), dove appare più scuro del resto dell'organo.

L'adesione al programma di sorveglianza permette di identificare precocemente le lesioni neoplastiche e scegliere la strategia terapeutica più adatta al paziente.

## Trapianto di fegato

L'unica terapia definitiva per la cirrosi epatica avanzata è il trapianto di fegato. L'inserimento in lista va considerato per tutti i pazienti giudicati in grado di sostenere l'intervento chirurgico, in cui la sopravvivenza stimata dopo trapianto sia migliore che senza. Dovrebbero essere considerati per il trapianto tutti i pazienti con cirrosi scompensata o con MELD > 15.

## 1.2 Il biomarcatore SerpinB3/4-IgM

L'antigene del carcinoma squamocellulare (squamous cell carcinoma antigen, SCCA) è un antigene tumorale isolato per la prima volta dal siero di pazienti affetti da carcinoma squamoso della cervice uterina negli anni '70. Si tratta in realtà di un insieme di due proteine ad alta omologia, con funzioni inibitrici nei confronti delle serin-proteasi, denominate SerpinB3 (o SCCA1) e SerpinB4 (o SCCA2), codificate rispettivamente dai geni SERPINB3 e SERPINB4. (31)

Le cellule epiteliali squamose normali possono esprimere SerpinB3 e l'entità di tale espressione è più consistente nei tessuti di polmoni, ghiandole salivari, esofago, cute e prostata. In tali tessuti, il ruolo di queste serpine è di promuovere la differenziazione dell'epitelio e proteggere le cellule dall'azione di proteasi batteriche, virali o rilasciate dai mastociti.

In ambito oncologico, i livelli sierici di SerpinB3/4-IgM (immunocomplesso formato dal legame tra le serpine e le IgM) aumentano in presenza di carcinomi squamocellulari, in particolare in caso di tumori squamosi della regione testa-collo, carcinoma della cervice uterina, carcinoma della mammella, tumori del polmone del tipo NSCLC, epatoblastomi, colangiocarcinomi e carcinomi epatocellulari. In particolare, i fattori che ne incrementano le concentrazioni ematiche sono:

- Maggiori dimensioni delle neoplasie;
- Maggiore invasività o ricorrenza;
- Metastasi linfonodali o a distanza;
- Riduzione dell'immunosorveglianza.

Si ritiene che SerpinB3 (SCCA1) possa avere un ruolo nello sviluppo di neoplasie, a causa di una serie di meccanismi molecolari che le conferiscono una funzione anti-apoptotica. Si è infatti dimostrata in grado di:

- Inibire le catepsina-proteasi lisosomiali e dunque ostacolare il rilascio del citocromo c mitocondriale, conferendo resistenza all'apoptosi indotta da farmaci antineoplastici (32);

- Inibire JNK e p38 (della famiglia delle MAP chinasi), mediante un meccanismo indipendente dall'azione anti-proteasica, che fornisce resistenza all'esposizione a radiazioni (33) (34).
- Legare il complesso I della catena respiratoria mitocondriale, ostacolando la produzione di ROS e limitando l'effetto pro-ossidante di alcuni farmaci (quali cisplatino e doxorubicina) (35);

Oltre a ciò, SerpinB3 favorisce la proliferazione e l'invasività delle cellule tumorali deregolando i processi di adesione intercellulare e permettendo la transizione epitelio-mesenchimale (36). Altri meccanismi includono l'inibizione dell'infiltrazione tumorale da parte di cellule natural killer (37) e l'up-regolazione di Myc.

### 1.2.1 Ruolo di SerpinB3/4 nello studio della malattia epatica

SerpinB3 non è rilevabile tramite analisi immunoistochimica del tessuto epatico sano. La sua espressione aumenta progressivamente in caso di epatopatia cronica, come risposta cellulare al danno cronico. I livelli aumentano ulteriormente in caso di formazione di noduli displastici ed HCC.

#### 1. Progressione della fibrosi nelle epatopatie croniche

In pazienti con epatopatia cronica non trattata, i livelli circolanti di SerpinB3/B4-IgM sono stati misurati due volte, la seconda volta a distanza di anni dal primo prelievo. L'aumento di concentrazione è stato rilevato solamente nel siero di coloro in cui la fibrosi epatica (controllata con biopsia) è peggiorata di due o più gradi istologici. (38) Ciò indica la potenziale utilità nel monitoraggio dei valori di SerpinB3/4-IgM per individuare i pazienti epatopatici maggiormente a rischio di cirrosi.

#### 2. Ruolo di SerpinB3/4-IgM nella steatosi epatica

Il ruolo del biomarcatore nello studio della malattia epatica di origine metabolica è ancora in corso di valutazione. Il primo studio a indagare la presenza di un collegamento tra i livelli sierici di SerpinB3/4-IgM e NAFLD/NASH



(precedentemente al cambio di nomenclatura) è stato condotto nel 2019 su un gruppo di pazienti obesi sottoposti ad intervento di sleeve gastrectomy laparoscopica (39). I prelievi per SerpinB3/4-IgM sono stati eseguiti prima (entro 6 mesi dalla data) e dopo (12 mesi) la procedura. I risultati ottenuti indicano un'apparente assenza di correlazione tra la presenza di NAFLD e i valori di SerpinB3/4-IgM (non differenze significative tra pazienti con e senza steatosi), così come tra questi ultimi e la prognosi. Nessuna differenza nei valori di SerpinB3/4-IgM nemmeno dividendo i pazienti in base al profilo glicemico. La differenza tra i valori di SerpinB3/4-IgM prima e dopo la procedura, inoltre, non è stata significativa, nonostante il miglioramento di tutti gli altri parametri laboratoristici misurati.

In uno studio precedente condotto su pazienti con epatite C cronica, SerpinB3/4-IgM era stato tuttavia individuato come parametro in correlazione con la presenza di NASH all'istologia (la steatosi è frequente in pazienti con infezione da HCV, specialmente se di genotipo 3). (40)

Tra i ritrovamenti su modelli animali che potrebbero avvalorare l'ipotesi di un'associazione, c'è un recente studio che ha dimostrato che la produzione ed il rilascio di SerpinB3 da parte degli epatociti danneggiati conduce alla genesi di macrofagi con un fenotipo pro-infiammatorio e pro-fibrogenico, caratterizzato dalla produzione delle stesse citochine e dall'espressione degli stessi marker cellulari dei macrofagi associati a NASH (NAMs, ritrovati nel fegato di pazienti affetti da tale condizione), suggerendo che possa giocare un ruolo importante nella progressione della patologia. (41).

### 3. Risposta alla terapia antivirale

In pazienti HCV-positivi trattati con ribavirina ed interferone peghilato che hanno ottenuto SVR (risposta virologica sostenuta) si è registrata una diminuzione dei valori sierici di SerpinB3/4-IgM, rimasti ridotti anche ad un anno dalla fine del trattamento. Nessuna riduzione è stata invece individuata in pazienti non responsivi alla terapia. (42)

### 4. Prognosi in pazienti affetti da cirrosi

Una coorte di pazienti con cirrosi di eziologia mista è stata seguita per lunghi periodi di tempo (mediana di 130 mesi). Sono stati individuati dei cutoff utili per distinguere due gruppi prognostici che differiscono sia per HCC-free survival che per overall survival. Il cutoff in questione è 120 AU/mL. (43)

#### 5. Rischio di HCC in pazienti affetti da cirrosi

In pazienti con cirrosi seguiti nel tempo, classe di Child-Pugh variabile, l'aumento dei valori di SerpinB3/4-IgM nel siero è stato individuato più di un anno prima della diagnosi clinica di HCC, periodo nel quale le variazioni di AFP non erano significative (44). Un secondo studio, retrospettivo, ha confermato tali rilevazioni (45). Questo, insieme all'aumento di espressione di SERPINB3 ritrovato all'istologia già in noduli displastici, prima che questi diventassero veri e propri HCC, avvalorava l'ipotesi che l'aumento di espressione di SERPINB3 sia un evento precoce nella carcinogenesi epatica. Studi successivi hanno cercato di individuare un modello per la predizione dello sviluppo di HCC: tra quelli considerati, il più utile è basato su SerpinB3/4-IgM, AFP e creatinina (o, con poche differenze, solo i primi due) (46). Con questo modello è possibile distinguere gruppi di rischio in base a quanti parametri si trovano al di fuori del cutoff identificato, ipoteticamente utilizzabili per guidare un programma di sorveglianza basato sul rischio calcolato per il singolo paziente invece che servirsi di un approccio one-size-fits-all.

#### 6. SerpinB3/4-IgM come marker per la diagnosi di HCC

In ragione dei ritrovamenti immunohistochimici, si è pensato di provare ad utilizzare SerpinB3/4-IgM sierica come marker per la diagnosi precoce di HCC. I valori di SerpinB3/4 libera nei pazienti con carcinoma epatico si sono dimostrati sotto i limiti di rilevabilità. Le concentrazioni dell'immunocomplesso formato da SerpinB3/4 ed IgM (SerpinB3/4-IgM) rappresentano invece un marker attendibile: sotto i limiti di rilevabilità nei controlli sani, in aumento progressivo nei diversi stadi di malattia epatica fino all'HCC. (47)

Si è dimostrata inoltre l'indipendenza della variazione di alfa-fetoproteina (AFP) e SerpinB3/4-IgM, permettendo di usarli in maniera combinata per aumentare la sensibilità del test senza perdere specificità.

## 7. Prognosi in pazienti con HCC

Uno studio ha dimostrato l'associazione tra livelli di SerpinB3/4-IgM e la sopravvivenza di pazienti con HCC, intesa sia come overall survival che come progression-free survival. Valori al di sopra di 130 AU/mL identificano i pazienti con prognosi peggiore. È inoltre stata rilevata un'associazione con la risposta alle terapie (chirurgia, chemioembolizzazione arteriosa, ablazione percutanea). (48)

## 8. Prognosi in pazienti con colangiocarcinoma

Un recente studio (49) ha messo in evidenza come sia la misurazione di SerpinB3/4-IgM nel siero che il riscontro immunohistochimico di SerpinB3 in campioni di tessuto tumorale caratterizzino un sottogruppo di pazienti affetti da colangiocarcinoma con peggiore prognosi.

## 2. Scopo dello studio

Lo studio si pone come obiettivo la valutazione dell'impatto della comorbidità metabolica su pazienti affetti da malattia epatica cronica avanzata di varia eziologia. Inoltre, la ricerca di una eventuale correlazione tra questa componente ed i valori sierici del marcatore SerpinB3/4-IgM.

### 3. Materiali e metodi

#### 3.1 Disegno dello studio

Lo studio si configura come retrospettivo, basato su dati raccolti prospetticamente durante i controlli periodici a cui i pazienti venivano sottoposti. Tutti i pazienti sono stati seguiti ambulatorialmente.

Lo studio è stato condotto seguendo i principi della Dichiarazione di Helsinki e ha ricevuto l'approvazione del comitato etico locale.

#### 3.2 Selezione dei pazienti e loro follow-up

La coorte studiata è costituita da 122 soggetti. I pazienti inclusi nello studio sono stati selezionati tra quelli afferenti ai controlli periodici presso gli Ambulatori del Centro Regionale per le Malattie di Fegato dell'Azienda Ospedale - Università Padova.

Da un pool iniziale di 157 pazienti, con prelievo sierico per SerpinB3/4-IgM e BMI disponibili, sono stati esclusi i pazienti con:

- malattia epatica cronica in stadio non avanzato;
- mancata disponibilità di dati clinici e/o di laboratorio completi in prossimità della data del prelievo per la determinazione di SerpinB3/4-IgM (ottenuti all'interno di un intorno di 6 mesi);
- dialisi al momento del prelievo.

I pazienti sono stati seguiti con controlli ambulatoriali semestrali come raccomandato dalle linee guida nazionali e internazionali in uso al momento, per lo stadio e l'eziologia della malattia epatica, seguendo il modello Care Management Program (50).

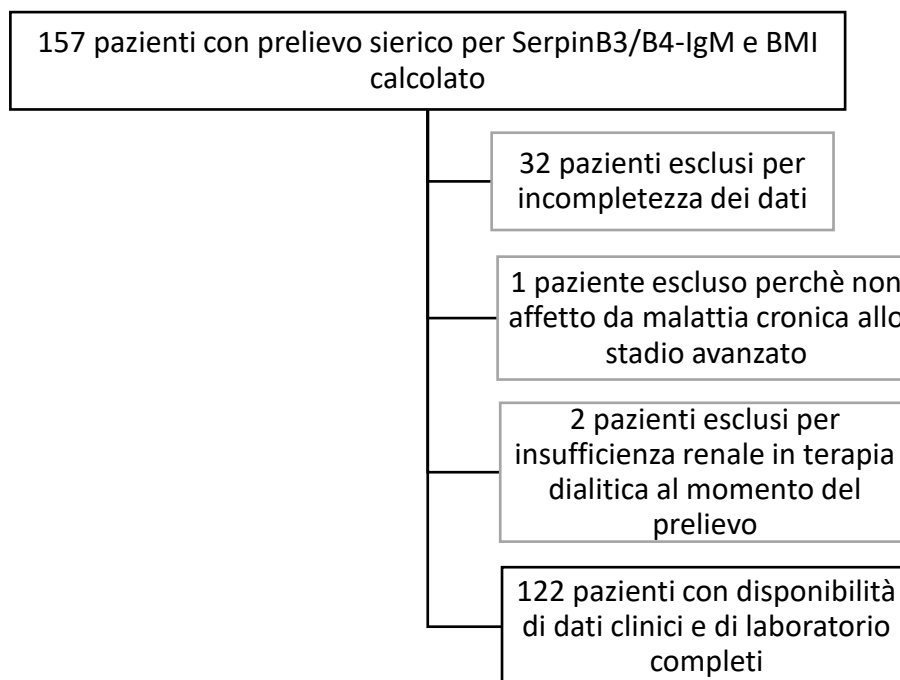
I soggetti che durante il follow-up hanno sviluppato lesioni sospette per HCC evidenti all'ecografia sono stati studiati con TC o RMN, ed eventualmente indirizzati al trattamento adeguato in base alle caratteristiche della neoplasia.

La durata del follow-up è stata calcolata come numero di mesi intercorsi tra la data del prelievo per la determinazione di SerpinB3/4-IgM e l'ultimo controllo

ambulatoriale eseguito o l'exitus o il trapianto. L'essere sottoposti a trapianto di fegato è stato considerato come evento determinante l'uscita dallo studio: in questo caso la data di fine follow-up coincide con quella di esecuzione della procedura.

All'applicazione dei criteri di esclusione, i pazienti inclusi nello studio sono stati 122. Il processo di selezione è rappresentato dalla Figura 1. L'analisi è basata su dati relativi al periodo di tempo intercorso tra giugno 2007 e luglio 2023. I pazienti sono stati seguiti per un tempo mediano di 84 mesi.

Figura 1: Processo di selezione dei pazienti.



### 3.3 Variabili considerate

Per ogni paziente, al momento del prelievo sono stati raccolti dati riguardo parametri anamnestici, tra cui sesso, età, altezza, peso, abitudine al fumo e al consumo di alcolici ed eziologia della cirrosi.

Per valutare lo stato metabolico si sono considerate la presenza di diabete mellito di tipo 2, di ipertensione ed il BMI. Tra i criteri raccomandati per la diagnosi di

MASLD, si è scelto di considerare unicamente la presenza di una diagnosi confermata di ipertensione arteriosa o di diabete mellito, o di un BMI al di sopra di 25. I pazienti ritenuti rientranti nei criteri per MASLD secondo questo studio sono, quindi, solamente quelli che presentavano la positività di uno o più tra questi criteri.

Le analisi di laboratorio eseguite sono state:

- Emocromo;
- glicemia a digiuno;
- creatinina per la funzionalità renale;
- bilirubina totale, AST, ALT, GGT, INR ed albumina per la funzione epatica;
- AFP e SerpinB3/4-IgM.

In aggiunta sono state valutate clinicamente la presenza di ascite ed encefalopatia epatica. I parametri clinici e di laboratorio sono stati inoltre utilizzati per il calcolo degli score di Child-Pugh e MELD.

Infine, sono state considerate le date di esecuzione del prelievo per la determinazione di SerpinB3/4-IgM, dell'ultima visita di follow-up (o di uscita dallo studio) e della diagnosi di HCC, nel caso di epatopatia evolutiva.

### 3.3.1 Determinazione dei valori sierici di SerpinB3/4-IgM

Per la misurazione dell'immunocomplesso SerpinB3/4-IgM si è fatto uso del kit Hepa-IC, standardizzato da Xeptagen (Venezia, Italia). Si tratta di un saggio eseguito con metodo ELISA indiretto. La procedura è, in breve, la seguente:

- 100 µL di una soluzione contenente anticorpi oligoclonali anti-SerpinB3 (concentrazione 10 µg/mL) vengono fissati nei pozzetti di una piastra per microtitolazione ed incubati per una notte a 4°C.
- Trascorso il tempo d'incubazione, si eseguono 3 lavaggi con una soluzione detergente di PBS-Tween20 0,05%. Ai pozzetti vengono quindi aggiunti 200 µL di albumina sierica bovina (BSA) all'1%, prima di lasciarli ad incubare per altre 2 ore a temperatura ambiente.

- Si eseguono 6 ulteriori lavaggi, per poi trattare i pozzetti con 100  $\mu$ L di siero del paziente da testare, diluito 1:8 con una soluzione di PBS-Tween20 0,05%-BSA 1%. Si lascia ad incubare per un'ora.
- A questo punto si passa alla rivelazione della reazione, utilizzando un anticorpo anti-IgM umane coniugato con perossidasi ed allo sviluppo con TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidine) e streptavidina-HRP.
- La reazione è quindi bloccata con aggiunta di 100  $\mu$ L di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M e la densità ottica misurata a 405 nm utilizzando un lettore di piastre Victor X3 (Perkin Elmer).

La concentrazione di immunocomplessi viene infine espressa come unità arbitrarie (AU) ed è ottenuta confrontando i valori di densità ottica ottenuti con una curva di calibrazione, costruita con soluzioni standard a concentrazioni comprese tra 6.25 AU/mL e 200 AU/mL, contenute nel kit. Per campioni con concentrazioni calcolate superiori a 200 AU/mL, il procedimento viene ripetuto dopo una preventiva ulteriore diluzione del siero del paziente (es. 1:16 o 1:32).

### 3.4 Analisi statistica

Le variabili continue sono state espresse come mediana e intervallo interquartile e sono state confrontate mediante il test U di Mann-Whitney. Le variabili non continue sono state espresse come frequenza assoluta e percentuale, e confrontate utilizzando il Chi-quadrato o il test esatto di Fisher.

Il periodo di follow-up è stato considerato tra la data del prelievo e la data del decesso o del trapianto. L'influenza delle variabili sulla sopravvivenza della coorte è stata espressa con le curve di sopravvivenza, costruite seguendo il metodo di Kaplan-Meier e la significatività delle differenze tra funzioni di sopravvivenza è stata calcolata con il test Log Rank (Mantel-Cox).

I pazienti sono stati suddivisi in gruppi e confrontati tra loro. Si sono confrontati:



- Pazienti positivi ai criteri per MASLD come cofattore di malattia epatica con pazienti negativi agli stessi criteri;
- Pazienti ipertesi e non ipertesi;
- Pazienti diabetici e non diabetici;
- Pazienti con BMI > 25 e pazienti con BMI ≤ 25;
- Pazienti con valori del biomarcatore sierico SerpinB3/4-IgM ≥ 120 AU/ml e pazienti con valori < 120 AU/ml.

Quando il p-value calcolato è risultato < 0,05, le differenze tra i gruppi sono state considerate significative. L'analisi statistica è stata svolta tramite il software SPSS versione 29.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

## 4. Risultati

### 4.1 Caratteristiche generali della popolazione in studio

La Tabella 3 riporta le caratteristiche generali della popolazione studiata. Questa è costituita da 122 pazienti, 79 maschi (64.8%) e 43 femmine (35.2%), la cui età mediana al momento del prelievo per la determinazione di SerpinB3/4-IgM era 56 anni.

Per quanto riguarda le caratteristiche dell'epatopatia, l'eziologia più diffusa è stata l'infezione da HCV (43%), seguita dall'abuso alcolico (32%) e dall'HBV (15.7%). Cause differenti da queste costituivano nel complesso il 9% dei casi. Utilizzando lo score di Child-Pugh, l'epatopatia è risultata di classe A per la maggioranza dei pazienti (64%). Le classi B e C erano meno diffuse, contribuendo rispettivamente per il 27.2% e 8.7%. Il MELD mediano era di 10 punti.

In merito alla comorbidità e alle concause di malattia epatica, la positività ai criteri per MASLD (così come descritti al paragrafo 3.3, ovvero presenza di uno o più tra diabete, ipertensione e BMI > 25) è stata riscontrata in 90 pazienti su 122, corrispondenti al 73.4%. Il BMI elevato è stato il criterio più presente nel campione in studio, con il 46.7% dei pazienti in sovrappeso o obesi (ed un BMI mediano di 25.7). La seconda comorbidità più frequente è stata l'ipertensione, presente nel 35.2% dei pazienti, seguita dal diabete, nel 23.3%.

Durante il follow-up lo sviluppo di HCC accertato mediante tecniche di imaging è stato rilevato in 27 pazienti (22.1%). Inoltre, 14 pazienti si sono sottoposti alla procedura di trapianto di fegato (11.5%), in base alle complicanze ed alla gravità della loro epatopatia.

Per il biomarcatore SerpinB3/4-IgM sono stati considerati i valori sierici ed il rapporto di questi con il cutoff di 120 AU/ml. Tra i pazienti, 43 (35.2%) avevano valori superiori a tale limite.

Tabella 3: Caratteristiche della popolazione in studio

Variabili		Popolazione dello studio (n=122)
Età (anni)		56.3 (48.6-64.3)
Sesso	Maschile	79 (64.8%)
	Femminile	43 (35.2%)
Eziologia	HCV	52 (43.0%)
	HBV	19 (15.7%)
	Alcol	39 (32.2%)
	Altro	11 (9.1%)
Positività ai criteri per MASLD		90 (73.8%)
Diabete		28 (23.3%)
Ipertensione		43 (35.2%)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )		25.7 (24.2-28.7)
Emoglobina (g/dl)		13.4 (12.2-14.9)
Glicemia (mg/dl)		100.5 (95-120.7)
Bilirubina (μmol/l)		19.5 (11.5-30.8)
Creatinina (μmol/l)		80.0 (63.75-80.0)
INR		1.14 (1.07-1.25)

Variabili		Popolazione dello studio (n=122)
Albumina (g/l)		39.0 (32.0-43.0)
AST (U/l)		52 (33.5-84.0)
ALT (U/l)		39 (28.5-69.0)
GGT (U/l)		45 (28-94.5)
AFP (IU/ml)		4.6 (2.8-8.8)
MELD		10 (8-13)
Child-Pugh	Punteggio score	6 (5-8)
	Classe A	66 (64.1%)
	Classe B	28 (27.2%)
	Classe C	9 (8.7%)
Ascite al momento del prelievo		18 (14.8%)
Trapiantati nel follow-up		14 (11.5%)
HCC nel follow-up		27 (22.1%)
SerpinaB3/4-IgM (AU/mL)		90.0 (50.0-203.5)
SerpinaB3/4-IgM > 120 AU/mL		43 (35.2%)

I dati sono espressi come: mediana (range interquartile) per le variabili continue e frequenza assoluta (percentuale) per le variabili discrete. Abbreviazioni utilizzate: *AFP* alfa-fetoproteina; *ALT* alanina aminotransferasi; *AST* aspartato aminotransferasi; *AU* arbitrary units; *BMI* body mass index; *GGT* gamma-glutamyl transferasi; *HBV* virus dell'epatite B; *HCC* carcinoma epatocellulare; *HCV* virus dell'epatite C; *INR* international normalized ratio per l'espressione del tempo di protrombina; *MASLD* metabolic dysfunction associated steatotic liver disease; *MELD* Model for End-stage Liver Disease.

## 4.2 Confronto tra pazienti presentanti e non presentanti i criteri per MASLD

Per valutare l'impatto della componente metabolica sulla malattia epatica, i pazienti sono stati studiati dividendoli in due gruppi in base alla presenza o assenza dei criteri per MASLD. La Tabella 4 riporta il confronto tra queste due popolazioni composte rispettivamente da 90 individui rientranti nei criteri per MASLD e 32 non rientranti. La distribuzione per sesso è omogenea. L'età è invece differente nei due gruppi, con i pazienti con MASLD mediamente più anziani (età mediana di 57.9 anni nei soggetti con MASLD, 51.4 in quelli negativi ai criteri). Le uniche variabili confrontate a raggiungere una significatività statistica ( $p$ -value  $< 0.05$ ) sono state il BMI e la glicemia, come già atteso in quanto strettamente legate ai criteri per la suddivisione dei pazienti nei gruppi.

L'epatopatia ha in entrambi i gruppi un'etiologia da HCV come prima causa, seguita dall'uso di alcol, l'infezione da HBV e altre cause. Dagli esami di laboratorio emerge una funzione epatica sostanzialmente paragonabile, con valori di AST e INR lievemente superiori nei pazienti con MASLD, bilirubina e GGT maggiori tra i pazienti senza MASLD. Anche i valori di AFP sono mediamente più elevati nei pazienti senza MASLD.

Lo score di Child-Pugh mostra una maggiore diffusione della classe A e della classe C tra i pazienti con i criteri per MASLD rispetto al restante gruppo. Il punteggio MELD mediano è risultato maggiore nei pazienti senza criteri MASLD, ma non significativamente.

Nonostante i valori mediani di SerpinB3/4-IgM siano lievemente più elevati tra i pazienti con MASLD, la proporzione di soggetti al di sopra del cutoff scelto è paragonabile nei due insiemi.

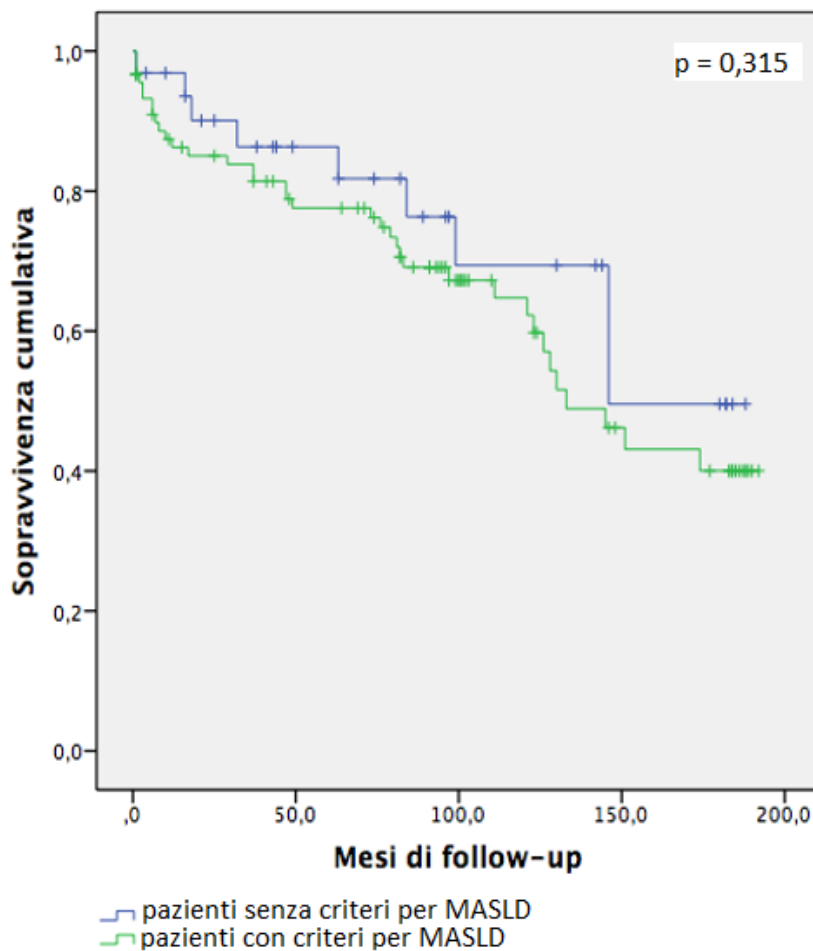
Confrontando infine la sopravvivenza dei pazienti nei due gruppi mediante apposite curve, riportate in Figura 2, i pazienti con positività ai criteri per MASLD sono sopravvissuti nel complesso poco meno dei restanti soggetti, senza che la differenza raggiungesse la significatività ( $p = 0,315$ ).

Tabella 4: Caratteristiche della popolazione in studio in funzione della presenza di MASLD come cofattore della malattia epatica avanzata

Variabili		Pazienti con MASLD (n=90)	Pazienti senza MASLD (n=32)	p-value
Età (anni)		57,9 (51-65,4)	51,4 (43,7-58,4)	0,003
Sesso	Maschile	57 (63,3%)	22 (68,8%)	0,582
	Femminile	33 (36,7%)	10 (31,2%)	
Eziologia	HCV	37 (41,6%)	15 (46,9%)	0,829
	HBV	15 (16,9%)	4 (12,5%)	
	Alcol	28 (31,5%)	11 (34,4%)	
	Altro	9 (10,1%)	2 (6,2%)	
Diabete		28 (31,8%)	0	0
Ipertensione		43 (47,8%)	0	0
BMI		26,6 (25,3-29,7)	23,1 (21,8-24,2)	<0,001
Emoglobina (g/dl)		13,4 (12-14,9)	13,4 (12,8-15)	0,712
Glicemia (mg/dl)		108 (95-131)	95 (95-104)	0,022
Bilirubina (µmol/l)		18,9 (11-29,7)	21 (12,8-33,7)	0,434
Creatinina (µmol/l)		80 (64-80)	80 (62-80)	0,753
INR		1,14 (1,07-1,25)	1,11 (1,04-1,25)	0,487
Albumina (g/l)		39 (32-43)	38,5 (31,7-43,2)	0,973
AST (U/l)		52,5 (32-87)	50 (37-77)	0,947
ALT (U/l)		39 (28-71,7)	39 (30-63)	0,979
GGT (U/l)		45 (27,5-101,5)	51 (33,5-90,5)	0,682
AFP (IU/ml)		4,1 (2,7-8,6)	5,3 (3,5-9,2)	0,199
MELD		9 (8-13)	11 (8,5-12,5)	0,447
Child-Pugh	Punteggio	6 (5-8)	6 (6-8)	0,101
	Classe A	51 (67,1%)	15 (55,6%)	0,407
	Classe B	18 (23,7%)	10 (37%)	
	Classe C	7 (9,2%)	2 (7,4%)	
Ascite		13 (14,4%)	5 (15,6%)	0,872
Serpina3/4-IgM (AU/ml)		91 (53,2-198,7)	88,5 (36,2-214,5)	0,564
Serpina3/4-IgM > 120 AU/ml		32 (35,6%)	11 (34,4%)	0,904

I dati sono espressi come: mediana (range interquartile) per le variabili continue e frequenza assoluta (percentuale) per le variabili discrete. Abbreviazioni utilizzate: *AFP* alfa-fetoproteina; *ALT* alanina aminotransferasi; *AST* aspartato aminotransferasi; *AU* arbitrary units; *BMI* body mass index; *GGT* gamma-glutamyl transferasi; *HBV* virus dell'epatite B; *HCC* carcinoma epatocellulare; *HCV* virus dell'epatite C; *INR* international normalized ratio per l'espressione del tempo di protrombina; *MASLD* metabolic dysfunction associated steatotic liver disease; *MELD* Model for End-stage Liver Disease.

Figura 2. Curve di sopravvivenza, costruite con il metodo di Kaplan-Meier, per il confronto di pazienti che presentano o non presentano positività ai criteri per MASLD.



Successivamente, è stato studiato come le singole disfunzioni del metabolismo che compongono i criteri per la diagnosi di MASLD (BMI, diabete ed ipertensione arteriosa) vadano ad influenzare l'andamento clinico della malattia epatica.

### 4.3 Confronto tra pazienti con BMI superiore e inferiore a 25

Al fine di valutare l'impatto delle singole tipologie di comorbidità, i pazienti sono stati divisi ulteriormente in gruppi. Una prima divisione è stata effettuata in base al BMI, dividendo i soggetti con BMI  $\leq 25$  da quelli con BMI  $> 25$ , come riportato in Tabella 5.

Il gruppo di pazienti con BMI  $\leq 25$  è costituito da 65 individui, tutti normopeso (BMI compreso tra 18 e 25), quello con BMI  $> 25$  da 57 pazienti sovrappeso o obesi di vario grado. La distribuzione per sesso è differente nei due gruppi, con una maggior frazione di maschi nel gruppo con BMI basso (69.2%) rispetto a quello con BMI alto (59.6%). Anche l'età è differente, con i pazienti in sovrappeso/obesi generalmente più anziani dei normopeso (mediana rispettivamente di 58.6 e 55 anni), benché questa differenza sia sotto al limite di significatività.

Il diabete come comorbidità è presente in egual misura nei due insiemi, mentre l'ipertensione è spiccatamente più frequente nei pazienti con BMI alto (47.4%, mentre nei normopeso 24.6%).

Per quanto riguarda la malattia epatica, l'eziologia ha una distribuzione simile nei gruppi, con HCV come prima causa, seguito da alcol, HBV ed altre. Gli esami laboratoristici usati per valutare la patologia epatica mostrano valori generalmente migliori nel gruppo con BMI maggiore (AST, ALT, GGT, bilirubina, INR e AFP più bassi, albumina più elevata), anche se sotto al limite di significatività, fatta eccezione per AFP. Considerando le classi di Child-Pugh si ha una conferma di tale dato, con maggior frequenza di pazienti in classe A all'interno del gruppo con BMI elevato (71,1%) rispetto a quello con BMI normale (58,6%). Anche il punteggio MELD è più alto per i pazienti normopeso, ma senza raggiungere la soglia della significatività.

Infine, il marcatore SerpinB3/4 presenta valori sierici generalmente maggiori in soggetti con BMI  $\leq 25$ , ma anche in questo caso, senza differenze significative.

Tabella 5: Caratteristiche della popolazione in funzione della presenza di BMI > 25 come cofattore della malattia epatica avanzata.

Variabili		Pazienti con BMI > 25 (n=57)	Pazienti con BMI ≤ 25 (n=65)	p-value
Età (anni)		58,6 (50,8-66,6)	55 (46,5-63)	0,101
Sesso	Maschile	34 (59,6%)	45 (69,2%)	0,0269
	Femminile	23 (40,4%)	20 (30,8%)	
Eziologia	HCV	22 (39,3%)	30 (46,2%)	0,555
	HBV	10 (17,9%)	9 (13,8%)	
	Alcol	17 (30,4%)	22 (33,8%)	
	Altro	7 (12,5%)	4 (6,2%)	
Diabete		13 (23,6%)	15 (23,1%)	0,942
Ipertensione		27 (47,4%)	16 (24,6%)	0,009
Emoglobina (g/dl)		13,4 (12-15)	13,4 (12,5-14,5)	0,789
Glicemia (mg/dl)		108 (95-131)	95 (95-116)	0,139
Bilirubina (μmol/l)		17,7 (9,7-28,5)	21,3 (13,6-34,1)	0,074
Creatinina (μmol/l)		80 (67-80)	78 (62-80)	0,309
INR		1,11 (1,03-1,27)	1,14 (1,1-1,25)	0,6
Albumina (g/l)		40 (33-43)	38,5 (31,7-42,2)	0,338
AST (U/l)		47 (30-78,5)	58,5 (38-87)	0,093
ALT (U/l)		38 (28,5-60,5)	39 (28,5-73,5)	0,740
GGT (U/l)		41 (24-106)	56 (34,5-90,5)	0,331
AFP (IU/ml)		3,4 (2,4-7,7)	5 (3,2-9,3)	0,042
MELD		9 (7-13)	10 (8-13)	0,217
Child-Pugh	Punteggio	6 (5-7,5)	6 (5-8)	0,099
	Classe A	32 (71,1%)	34 (58,6%)	0,038
	Classe B	7 (15,6%)	21 (36,2%)	
	Classe C	6 (13,3%)	3 (5,2%)	
Ascite		9 (15,8%)	9 (13,8%)	0,763
Serpina3/4-IgM (AU/ml)		88 (50,5-172,5)	91 (43,5-235)	0,642
Serpina3/4-IgM > 120 AU/ml		18 (31,6%)	25 (38,5%)	0,427

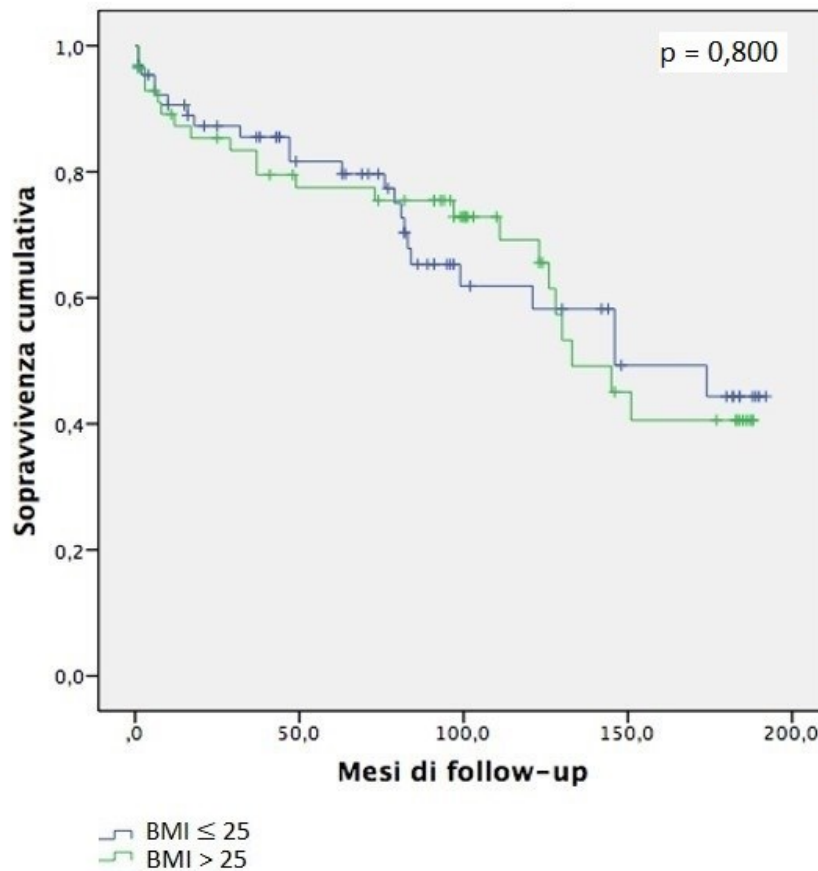
I dati sono espressi come: mediana (range interquartile) per le variabili continue e frequenza assoluta (percentuale) per le variabili discrete. Abbreviazioni utilizzate: *AFP* alfa-fetoproteina; *ALT*



alanina aminotransferasi; *AST* aspartato aminotransferasi; *AU* arbitrary units; *BMI* body mass index; *GGT* gamma-glutamyl transferasi; *HBV* virus dell'epatite B; *HCC* carcinoma epatocellulare; *HCV* virus dell'epatite C; *INR* international normalized ratio per l'espressione del tempo di protrombina; *MASLD* metabolic dysfunction associated steatotic liver disease; *MELD* Model for End-stage Liver Disease.

La costruzione delle curve di sopravvivenza, riportate nella Figura 3, evidenzia come il BMI non abbia un'influenza molto rilevante nella determinazione della sopravvivenza dei pazienti con malattia epatica cronica in stadio avanzato. Le due curve non si separano in modo chiaro (p-value = 0,800).

Figura 3. Curve di sopravvivenza, costruite con il metodo di Kaplan-Meier, per il confronto di pazienti con BMI superiore o inferiore a 25.



#### 4.4 Confronto tra pazienti diabetici e non diabetici

Una terza divisione è stata fatta in base alla presenza del solo diabete mellito di tipo 2 come comorbidità della malattia epatica ed i dati sono riportati in Tabella 6. Il gruppo dei pazienti con diabete è costituito da 28 soggetti, quello dei pazienti senza diabete da 92. Anche in questo caso, l'età è differente tra i due insiemi, con un'età mediana maggiore per i pazienti con diabete (60,5, rispetto a 54,4 dei non diabetici). Allo stesso modo, la distribuzione per sesso è diversa, con una maggior proporzione di maschi all'interno del gruppo dei diabetici, anche se sotto al limite di significatività.

L'associazione tra ipertensione e diabete è rilevante, con 64,4% dei pazienti diabetici che sono anche ipertesi, mentre solo il 26,1% dei soggetti non diabetici presenta ipertensione. Il BMI è invece distribuito pressoché ugualmente tra i due gruppi.

L'eziologia della malattia epatica è maggiormente rappresentata dall'alcol tra i diabetici, con una frequenza relativa del 42,9%, pari a quella dell'infezione da HCV all'interno dello stesso gruppo. Tra i pazienti non diabetici, si ripropone invece l'ordine di prevalenza delle eziologie visto finora, dal più al meno frequente: HCV, alcol, HBV ed altro.

Gli esami di laboratori mostrano una funzione epatica leggermente più compromessa nei pazienti con diabete, che presentano livelli di AST, ALT, GGT e bilirubina maggiori, nonostante non sia raggiunta la significatività. I pazienti presentano inoltre la stessa distribuzione all'interno delle classi di Child-Pugh e punteggi MELD poco differenti (mediana 9 per i pazienti con diabete, 10 per quelli senza).

I livelli di SerpinB3/4-IgM nel siero presentano valori mediani lievemente più alti nei pazienti diabetici. Al confronto di tali valori con il cutoff prescelto, i pazienti che superano le 120 AU/ml sono paragonabili nei due gruppi.

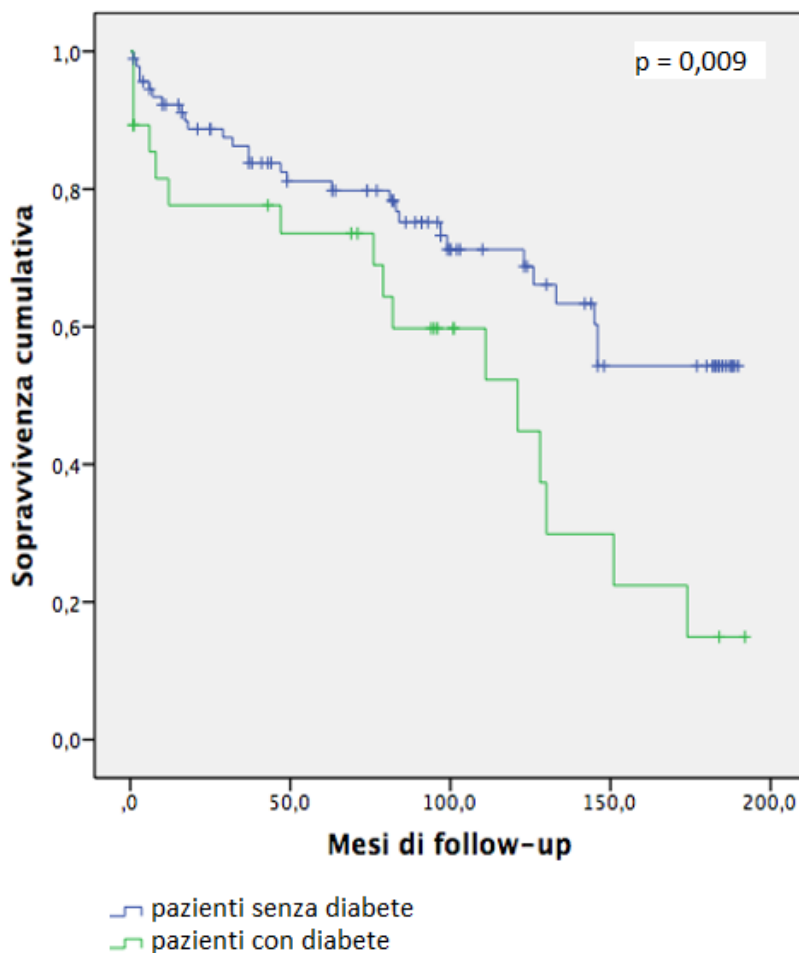
Tabella 6: Caratteristiche della popolazione in funzione della presenza di diabete mellito di tipo 2 come cofattore della malattia epatica avanzata.

Variabili		Pazienti con diabete (n=28)	Pazienti senza diabete (n=92)	p-value
Età (anni)		60,5 (56,5-67,8)	54,4 (46,7-63,1)	0,002
Sesso	Maschile	22 (78,6%)	56 (60,9%)	0,086
	Femminile	6 (21,4%)	36 (39,1%)	
Eziologia	HCV	12 (42,9%)	39 (42,9%)	0,186
	HBV	4 (14,3%)	15 (16,5%)	
	Alcol	12 (42,9%)	26 (28,6%)	
	Altro	0	11 (12,1%)	
Ipertensione		18 (64,3%)	24 (26,1%)	< 0,001
BMI		25,3 (24,5-28)	25,7 (23,7-28,6)	0,721
Emoglobina (g/dl)		13,2 (11,3-14,1)	13,4 (12,5-15)	0,263
Glicemia (mg/dl)		137 (116-154)	95 (95-109)	< 0,001
Bilirubina (μmol/l)		20,1 (14,7-31,1)	19,15 (10,4-31,4)	0,325
Creatinina (μmol/l)		80 (61,5-85,7)	78 (64,2-80)	0,110
INR		1,14 (1,08-1,29)	1,14 (1,06-1,25)	0,447
Albumina (g/l)		39 (32-43)	39 (32-43,7)	0,752
AST (U/l)		56 (33,5-98,2)	50 (33-84)	0,485
ALT (U/l)		43 (27-87,7)	38 (29-63)	0,519
GGT (U/l)		50 (33,5-88,5)	47 (25-105,7)	0,654
AFP (IU/ml)		4 (2,2-8)	4,7 (3-9,2)	0,259
MELD		9 (8-14)	10 (8-13)	0,781
Child-Pugh	Punteggio	6 (5-8)	6 (5-8)	0,763
	Classe A	16 (64%)	48 (63,2%)	0,983
	Classe B	7 (28%)	21 (27,6%)	
	Classe C	2 (8%)	7 (9,2%)	
Ascite		5 (17,9%)	13 (14,1%)	0,629
SerpinaB3/4-IgM (AU/ml)		91 (57,5-173,5)	89,5 (50-214,5)	0,828
SerpinaB3/4-IgM > 120 AU/ml		10 (35,7%)	32 (34,8%)	0,928

I dati sono espressi come: mediana (range interquartile) per le variabili continue e frequenza assoluta (percentuale) per le variabili discrete. Abbreviazioni utilizzate: *AFP* alfa-fetoproteina; *ALT* alanina aminotransferasi; *AST* aspartato aminotransferasi; *AU* arbitrary units; *BMI* body mass index; *GGT* gamma-glutamyl transferasi; *HBV* virus dell'epatite B; *HCC* carcinoma epatocellulare; *HCV* virus dell'epatite C; *INR* international normalized ratio per l'espressione del tempo di protrombina; *MASLD* metabolic dysfunction associated steatotic liver disease; *MELD* Model for End-stage Liver Disease.

Le curve riportate in Figura 4 confrontano la sopravvivenza di pazienti diabetici e non diabetici. Le curve si separano nettamente e precocemente, con una sopravvivenza mediana significativamente minore per i pazienti affetti da diabete ( $p = 0,009$ ).

Figura 4: Curve di sopravvivenza, costruite con il metodo di Kaplan-Meier, per il confronto di pazienti affetti o meno da diabete mellito di tipo 2.



#### 4.5 Confronto tra pazienti con e senza ipertensione arteriosa

Un'ulteriore divisione in gruppi si è basata sulla presenza (43 pazienti) o assenza (79 pazienti) di ipertensione arteriosa: il confronto è riportato in Tabella 7. Entrambi i gruppi sono composti da circa il 65% di maschi ed il 35% di femmine. L'età è maggiore per i soggetti ipertesi, con una mediana di 60,8 anni, rispetto ai non ipertesi (mediana 54,1 anni).

Sia diabete che BMI elevato sono più diffusi all'interno del gruppo degli ipertesi. I pazienti con diabete rappresentano il 42,9% dei pazienti con ipertensione mentre solo il 12,8% dei pazienti senza ipertensione. Similmente, il BMI mediano dei soggetti ipertesi è 27 (corrispondente al sovrappeso, con un range interquartile interamente al di sopra del normopeso), mentre quello dei normotesi è 25, al limite del normopeso.

Gli esami di laboratorio riportano una funzione epatica apparentemente più conservata nei pazienti ipertesi, con minori valori di bilirubina, AST, GGT ed INR e maggiori livelli di albumina, benché queste differenze non siano risultate significative (fatta eccezione per la bilirubina). La glicemia, come prevedibile dalla distribuzione dei pazienti con diabete, è notevolmente più elevata tra gli ipertesi.

L'epatopatia vede HCV come agente eziologico principale tra gli ipertesi (55,8%), seguito dall'alcol come seconda causa (23,3%). Nel gruppo di pazienti senza ipertensione, la causa principale di epatopatia è invece l'abuso alcolico (37,2%), con a seguire l'infezione da virus C (35,9%). In entrambi gli insiemi, HBV e 'altro' occupano rispettivamente il terzo ed il quarto posto per frequenza.

La gravità della malattia epatica, valutata mediante lo score di Child-Pugh, è mediamente maggiore nei pazienti non ipertesi, con una maggior frazione classificata come classe B (31,9%) e classe C (11,6%), rispetto agli ipertesi (rispettivamente, 17,6% e 2,9%). Anche utilizzando il MELD, i pazienti ipertesi risultano avere punteggi inferiori rispetto ai non ipertesi con una mediana di 9 punti nel primo gruppo e 11 nel secondo.

La misura dei livelli sierici di SerpinB3/4-IgM ha restituito valori maggiori per i pazienti ipertesi (101 AU/ml di mediana) quando confrontati con i non ipertesi (87

AU/ml). Esaminando la presenza di valori superiori al cut-off di 120 AU/ml, i soggetti ipertesi sono risultati più frequentemente al di sopra dei limiti. Questa differenza non ha tuttavia raggiunto la significatività statistica (p-value 0,127).

Tabella 7: Caratteristiche della popolazione in funzione della presenza di ipertensione arteriosa come comorbidità della malattia epatica avanzata.

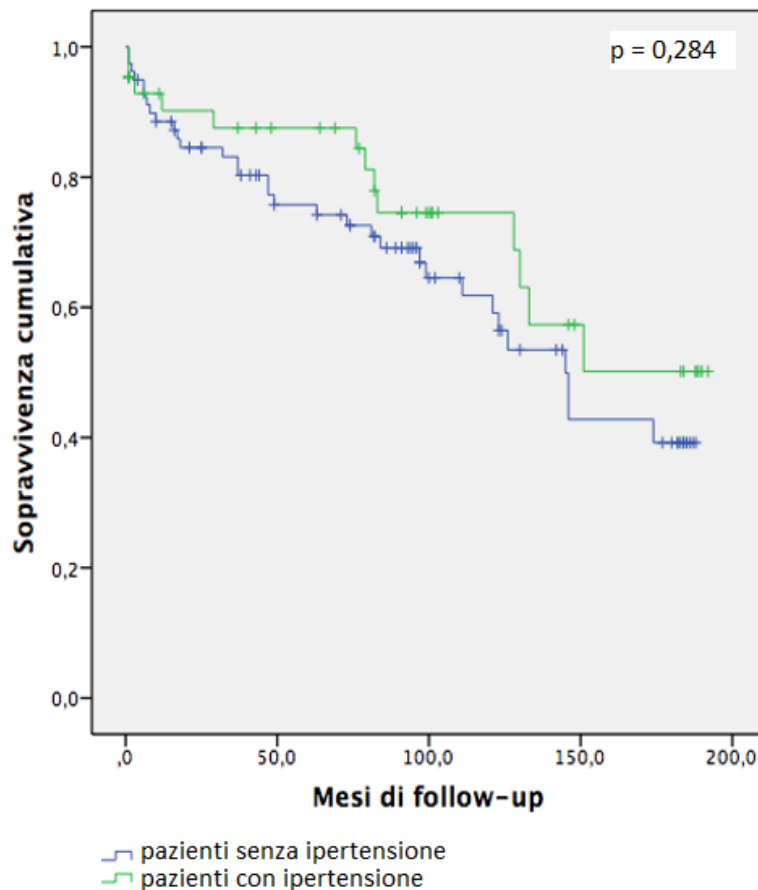
Variabili		Pazienti con ipertensione (n=43)	Pazienti senza ipertensione (n=79)	p-value
Età (anni)		60,8 (54,5-67,9)	54,1 (46,7-61,5)	<0,001
Sesso	Maschile	28 (65,1%)	51 (64,6%)	0,951
	Femminile	15 (34,9%)	28 (35,4%)	
Eziologia	HCV	24 (55,8%)	28 (35,9%)	0,177
	HBV	5 (11,6%)	14 (17,9%)	
	Alcol	10 (23,3%)	29 (37,2%)	
	Altro	4 (9,3%)	7 (9%)	
Diabete		18 (42,9%)	10 (12,8%)	<0,001
BMI		27,5 (25-30,7)	25 (23,7-27,7)	0,002
Emoglobina (g/dl)		13,8 (12,6-14,7)	13,2 (12-15)	0,278
Glicemia (mg/dl)		117 (95-142)	95 (95-115)	0,004
Bilirubina (µmol/l)		17,7 (9,7-26,8)	22,2 (12,8-34,4)	0,022
Creatinina (µmol/l)		80 (66,5-81,5)	80 (62-80)	0,34
INR		1,1 (1,02-1,19)	1,14 (1,08-1,29)	0,061
Albumina (g/l)		40 (35,5-43)	38 (31-43)	0,272
AST (U/l)		45 (31-84)	58,5 (35-84,7)	0,286
ALT (U/l)		40 (28-78)	38,5 (28,7-65)	0,760
GGT (U/l)		44,5 (22,5-92,7)	50,5 (29,5-97,5)	0,415
AFP (IU/ml)		4,8 (2,3-10,2)	4,4 (2,9-8,5)	0,916
MELD		9 (8-10)	11 (8-13,7)	0,032
Child-Pugh	Punteggio	5,5 (5-6)	6 (5-8)	0,013
	Classe A	27 (79,4%)	39 (56,5%)	0,064
	Classe B	6 (17,6%)	22 (31,9%)	
	Classe C	1 (2,9%)	8 (11,6%)	
Ascite		5 (11,6%)	13 (16,5%)	0,473

SerpinB3/4-IgM (AU/mL)	101 (50-263)	87 (50-162)	0,223
SerpinB3/4-IgM > 120 AU/ml	19 (44,2%)	24 (30,4%)	0,127

I dati sono espressi come: mediana (range interquartile) per le variabili continue e frequenza assoluta (percentuale) per le variabili discrete. Abbreviazioni utilizzate: *AFP* alfa-fetoproteina; *ALT* alanina aminotransferasi; *AST* aspartato aminotransferasi; *AU* arbitrary units; *BMI* body mass index; *GGT* gamma-glutamyl transferasi; *HBV* virus dell'epatite B; *HCC* carcinoma epatocellulare; *HCV* virus dell'epatite C; *INR* international normalized ratio per l'espressione del tempo di protrombina; *MASLD* metabolic dysfunction associated steatotic liver disease; *MELD* Model for End-stage Liver Disease.

Il confronto tra le curve di sopravvivenza di pazienti con e senza ipertensione arteriosa, riportate in Figura 5, evidenzia una maggiore sopravvivenza dei pazienti ipertesi, benché questa non raggiunga la significatività statistica ( $p = 0,284$ )

Figura 5. Curve di sopravvivenza, costruite con il metodo di Kaplan-Meier, per il confronto di pazienti affetti o meno da ipertensione arteriosa.



#### 4.6 Confronto tra pazienti con valori di SerpinB3/4-IgM superiori e inferiori a 120 AU/ml

Si è proseguito, infine, andando a valutare la capacità del marcatore SerpinB3/4-IgM di riconoscere un insieme di pazienti affetti da epatopatia cronica in stadio avanzato con un peggior profilo metabolico, utilizzando il cutoff di 120 AU/ml per la distinzione. I dati ottenuti dalla suddivisione sono riportati in Tabella 8. All'interno della popolazione studiata, circa i due terzi dei pazienti presentavano valori di SerpinB3/4-IgM al di sotto del cutoff ed un terzo al di sopra dello stesso (rispettivamente, 79 e 43 soggetti). Nei due gruppi la distribuzione per sesso è risultata omogenea, così come l'età.

Per quanto riguarda le comorbidità, la diffusione di tali condizioni nei due sottogruppi è proporzionale, senza differenze significative sia considerando le disfunzioni del metabolismo assieme (criteri per MASLD) che individualmente.

L'eziologia dell'epatopatia differisce, invece, tra le due sottopopolazioni: la causa più frequente è risultata essere l'abuso di alcol tra i soggetti con valori di SerpinB3/4-IgM al di sotto del cutoff (43,6%) e l'infezione da HCV tra quelli con valori al di sopra del cutoff (69,8%).

Gli esami di laboratorio riportano valori paragonabili per la maggior parte dei parametri. Un'eccezione è rappresentata dagli indici di citolisi epatica, ALT e AST, entrambi più elevati tra i pazienti con valori di SerpinB3/4-IgM al di sopra del cutoff. Ulteriore differenza sta nei valori di AFP, maggiori tra i pazienti con elevati livelli del biomarcatore.

La gravità della malattia epatica valutata mediante gli score clinici MELD e di Child-Pugh è simile tra i due gruppi, senza significative differenze. La classe A di Child-Pugh è la maggiormente rappresentata in entrambi i gruppi, seguita dalla B e dalla C.

Confrontando la sopravvivenza dei due gruppi di pazienti mediante le apposite curve, riportate in Figura 6, non si notano significative differenze.

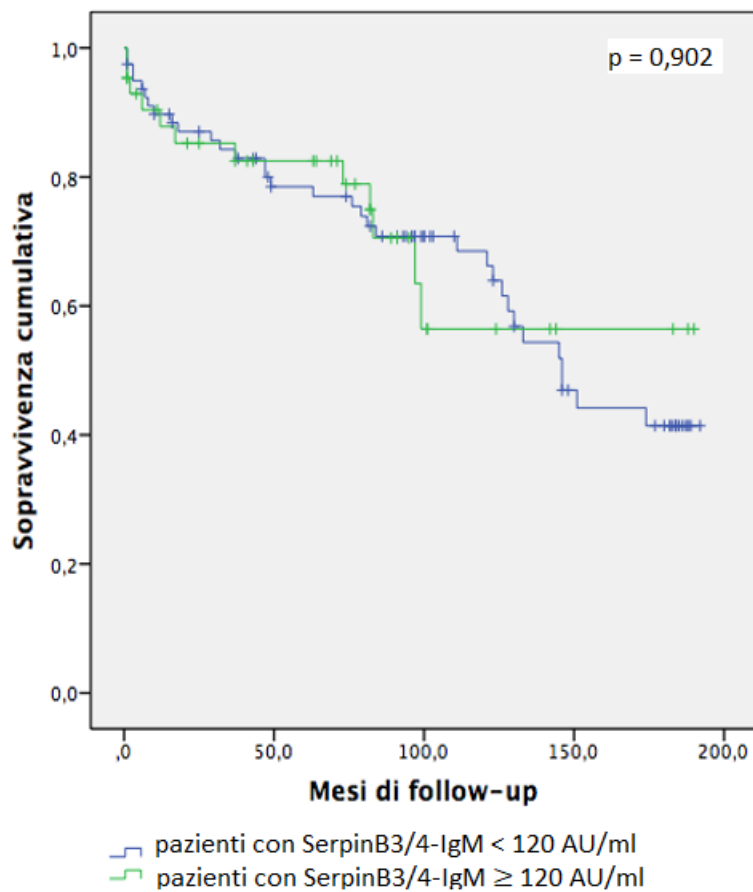


Tabella 8: Caratteristiche della popolazione in funzione della presenza di valori sierici di SerpinB3/4-IgM superiori o inferiori al cutoff di 120 AU/ml.

Variabili		Pazienti con SerpinB3/4-IgM < 120 AU/ml (n=79)	Pazienti con SerpinB3/4-IgM ≥ 120 AU/ml (n=43)	p-value
Età (anni)		55,9 (48,1-64,4)	57,7 (51,2-63,8)	0,532
Sesso	Maschile	52 (65,8%)	27 (62,8%)	0,738
	Femminile	27 (34,2%)	16 (37,2%)	
Eziologia	HCV	22 (28,2%)	30 (69,8%)	< 0,001
	HBV	15 (19,2%)	4 (9,3%)	
	Alcol	34 (43,6%)	5 (11,6%)	
	Altro	7 (9%)	4 (9,3%)	
Criteri per MASLD		58 (73,4%)	32 (74,4%)	0,904
BMI (kg/m <sup>2</sup> )		25,7 (24,4-28,7)	25,2 (22,9-28,8)	0,277
BMI > 25		37 (46,8%)	20 (46,5%)	0,973
Diabete		17 (22,1%)	11 (25,6%)	0,663
Ipertensione		30 (38%)	13 (30,2%)	0,392
Emoglobina (g/dl)		13,2 (11,6-14,7)	13,6 (12,9-15)	0,205
Glicemia (mg/dl)		95 (95-119)	108 (95-123)	0,113
Bilirubina (μmol/l)		20 (12,3-32,1)	18,1 (10,8-28,4)	0,337
Creatinina (μmol/l)		80 (66,7-80)	73 (61,2-80)	0,132
INR		1,11 (1,06-1,26)	1,15 (1,07-1,25)	0,613
Albumina (g/l)		39 (32-43)	39 (32-42,2)	0,877
AST (U/l)		45 (31,7-65)	66 (41-133)	< 0,001
ALT (U/l)		36 (26-52)	56 (39-121)	< 0,001
GGT (U/l)		44,5 (27,7-87,2)	62,5 (29,2-114)	0,438
AFP (IU/ml)		4 (2,5-8,2)	5,8 (3,1-10,4)	0,030
MELD		10 (8-13,7)	9 (8-12,5)	0,404
Child-Pugh	Punteggio	6 (5-8)	6 (5-7)	0,320
	Classe A	40 (59,7%)	26 (72,2%)	0,406
	Classe B	21 (31,3%)	7 (19,4%)	
	Classe C	6 (9%)	3 (8,3%)	
Ascite		12 (15,2%)	6 (14%)	0,854

I dati sono espressi come: mediana (range interquartile) per le variabili continue e frequenza assoluta (percentuale) per le variabili discrete. Abbreviazioni utilizzate: *AFP* alfa-fetoproteina; *ALT* alanina aminotransferasi; *AST* aspartato aminotransferasi; *AU* arbitrary units; *BMI* body mass index; *GGT* gamma-glutamyl transferasi; *HBV* virus dell'epatite B; *HCC* carcinoma epatocellulare; *HCV* virus dell'epatite C; *INR* international normalized ratio per l'espressione del tempo di protrombina; *MASLD* metabolic dysfunction associated steatotic liver disease; *MELD* Model for End-stage Liver Disease.

Figura 6. Curve di sopravvivenza, costruite secondo il metodo di Kaplan-Meier, per il confronto di pazienti con valori sierici di SerpinB3/4-IgM superiori e inferiori a 120 AU/ml.



## 5. Discussione e conclusioni

Il principale obiettivo con cui si è portato avanti lo studio è analizzare l'influenza che la compresenza di comorbidità metaboliche esercita sulla malattia epatica di altra eziologia. Per questa ragione, i pazienti inclusi nello studio non erano pazienti affetti da MASLD ma da un'epatopatia con eziologia diversa, principalmente virale o correlata all'abuso di alcol, nel contesto della quale la malattia metabolica rappresentava una comorbidità.

Nonostante la presenza di numerosi studi in letteratura che considerano la prevalenza e l'impatto delle singole comorbidità metaboliche sulla prognosi di soggetti con malattia epatica cronica in stadio avanzato, pochi considerano invece la presenza di più disfunzioni del metabolismo complessivamente, come indicato dai nuovi criteri per la diagnosi di MASLD. Tra questi ultimi, uno studio del 2010 (precedente all'introduzione della nuova definizione) condotto con l'obiettivo di individuare differenze nella prevalenza di comorbidità metaboliche tra pazienti con cirrosi di eziologia varia andati o meno incontro a sviluppo di HCC non ha riscontrato differenze di incidenza tra i due gruppi (51). Un secondo studio, del 2023, eseguito su pazienti affetti da epatite cronica da virus B con diverso grado d'avanzamento, ha indicato la presenza di un maggior numero di eventi fegato-correlati nei pazienti con comorbidità metabolica (52).

Una prima considerazione necessaria alla valutazione dei risultati riguarda l'età mediana nei sottogruppi individuati durante l'analisi statistica. Sia nella distinzione operata considerando diabete, ipertensione e BMI > 25 assieme (criteri per MASLD) che ognuno di questi singolarmente, il gruppo con comorbidità metabolica è risultato avere un'età mediana maggiore. Tali differenze rispecchiano la prevalenza delle singole disfunzioni del metabolismo e della sindrome metabolica nel complesso nella popolazione generale (53) (54): queste condizioni diventano via via più frequenti nel corso dell'invecchiamento e così accade anche nei pazienti con epatopatia cronica. La differenza d'età non raggiunge la significatività solamente considerando il solo BMI, nonostante una differenza sia presente ( $p=0.101$ ): anche ciò è in accordo con la distribuzione

dell'obesità nella popolazione generale, dove la percentuale di soggetti affetti non cresce linearmente con l'età. Nel gruppo con BMI elevato, la popolazione femminile è proporzionalmente più rappresentata che tra i normopeso, fattore che potrebbe contribuire alla differenza d'età tra i gruppi, data la maggior prevalenza di obesità tra le donne nel periodo post-menopausale (55).

Le suddivisioni sulla base di presenza/assenza delle singole comorbidità metaboliche hanno messo in luce le correlazioni tra queste, come evidente anche nella popolazione generale. Nello specifico all'interno dei pazienti con malattia epatica cronica in stadio avanzato:

- I pazienti sovrappeso e obesi sono più frequentemente ipertesi rispetto ai normopeso;
- I pazienti con diabete sono per la maggior parte ipertesi e con maggior frequenza rispetto ai non diabetici;
- I pazienti con ipertensione sono più frequentemente diabetici ed hanno un BMI tendenzialmente maggiore rispetto ai non ipertesi.

Studiando la gravità della malattia epatica all'inizio del follow-up, con l'utilizzo di esami di laboratorio (AST, ALT, GGT, bilirubina, INR, AFP) e score clinici (MELD e Child-Pugh), la suddivisione sulla base dei criteri per MASLD e della presenza del solo diabete non hanno individuato differenze significative. Considerando il solo BMI, i pazienti sovrappeso ed obesi sono risultati affetti da una malattia epatica in media meno avanzata utilizzando lo score di Child-Pugh, con una maggior proporzione di soggetti in classe A rispetto ai normopeso ( $p=0.038$ ). Un BMI elevato non appare quindi, ad una prima analisi, un cofattore determinante per l'evoluzione della malattia epatica. Nonostante questo, l'assenza di un'analogia differenza negli altri parametri di funzione epatica impedisce di conferirgli un ruolo protettivo. Unica ulteriore significatività è per i valori di AFP, maggiori tra i normopeso ma comunque poco rilevanti dal punto di vista clinico. Nel confronto tra pazienti con e senza ipertensione, complessivamente i pazienti con ipertensione in comorbidità presentano uno stadio meno avanzato di epatopatia, dato avvalorato dal riscontro di valori meno elevati di bilirubina, MELD e punteggi

di Child-Pugh. La divisione in classi secondo il Child-Pugh score pone i soggetti più comunemente in classe A in entrambi i gruppi, ma con una frequenza maggiore tra gli ipertesi (79% contro 56%). La differenza nella divisione in classi diviene significativa se si considerano le classi B e C come accorpate (B+C 20,5% tra gli ipertesi e 43,5% tra i non ipertesi,  $p=0.023$ ). Questa distribuzione è almeno in parte spiegabile dalle modifiche fisiopatologiche che avvengono a livello circolatorio nella cirrosi epatica. La vasodilatazione splancnica e la sindrome iperdinamica che interessano i pazienti con epatopatia cronica in stadio avanzato sono in genere responsabili di un complessivo abbassamento della pressione arteriosa. Per questa ragione, si può pensare che i pazienti con una maggior gravità clinica presentino anche meno frequentemente ipertensione arteriosa, con tendenza invece all'ipotesione.

Successivamente, sono state costruite curve per il confronto della sopravvivenza tra pazienti con e senza comorbidità metaboliche. La valutazione di queste curve è tuttavia complicata dalle differenze d'età già discusse che intercorrono tra i gruppi e alla luce di tali differenze vengono fatte le considerazioni seguenti.

- a. Positività o meno ai criteri per MASLD: la positività si associa ad una sopravvivenza lievemente minore e con pendenza costante nel corso del follow-up. Nonostante la gravità clinica della malattia epatica all'inizio del percorso di follow-up fosse la stessa, i due campioni presentavano età differenti, fattore che potrebbe essere responsabile delle differenze riscontrate.
- b. BMI: un BMI elevato, nel campione analizzato, ha avuto un impatto sulla sopravvivenza non rilevante. I soggetti hanno mantenuto una sopravvivenza paragonabile nonostante la differenza di età (maggiore nel gruppo a BMI elevato ma comunque più omogenea rispetto alle altre suddivisioni) e alla maggior gravità clinica dei pazienti normopeso. Nella valutazione di questo parametro va tenuto a mente che sarcopenia ed ascite sono fattori prognostici negativi nella malattia epatica avanzata e il BMI, non valutando l'effettiva composizione corporea, non permette di distinguere pazienti che presentano queste condizioni.

- c. Ipertensione: sembra avere un ruolo protettivo sull'evoluzione della patologia, la sua presenza è associata ad una sopravvivenza maggiore, nonostante l'età più avanzata dei soggetti ipertesi all'inizio del follow-up. I pazienti con ipertensione presentavano anche una minore gravità clinica della malattia all'inizio dello studio. L'ipotensione è, al contrario, riconosciuta come fattore prognostico negativo nella malattia epatica cronica in stadio avanzato (56). Queste differenze sono tuttavia non significative.
- d. Diabete: rappresenta la comorbidità con maggior impatto sulla sopravvivenza, come evidente dalla separazione precoce e più spiccata delle curve di sopravvivenza ( $p = 0,009$ ). La gravità della patologia epatica al momento della raccolta dei dati era paragonabile tra i due gruppi. Anche in questo caso, il dato può essere influenzato dall'età più avanzata dei pazienti con diabete.

Infine, sono stati confrontati pazienti con valori del biomarcatore SerpinB3/4-IgM al di sopra e al di sotto del cutoff fissato di 120 AU/ml con l'obiettivo di valutare la correlazione con il profilo metabolico o la capacità di identificare sottogruppi a maggiore o minore sopravvivenza. I due gruppi hanno mostrato differenze nei valori di transaminasi (AST, ALT) più elevati per i pazienti al di sopra del cutoff. Ciò è verosimilmente attribuibile alla malattia sottostante, associata ad un fenotipo maggiormente citolitico tra i pazienti con livelli elevati di biomarcatore. Un'ulteriore differenza è rappresentata da AFP: questa, come noto in letteratura (44), è maggiore nei soggetti a rischio di sviluppare HCC, così come lo sono i valori di SerpinB3/4-IgM. Per quanto riguarda la sopravvivenza, non sono state misurate differenze significative nel medio termine.

In conclusione, la malattia metabolica, se considerata complessivamente come da criteri per la diagnosi di MASLD, non ha un impatto significativo sulla sopravvivenza a medio termine dei pazienti con malattia epatica cronica in stadio avanzato. Considerando le sue componenti in maniera isolata, il BMI elevato ha un impatto trascurabile, l'ipertensione è associata ad una sopravvivenza lievemente superiore ma non significativa, mentre il diabete rappresenta la

componente maggiormente impattante sulla sopravvivenza, marcatamente ridotta nei soggetti affetti. Inoltre, il biomarcatore SerpinB3/4-IgM non sembra adatto ad identificare pazienti con peggiore profilo metabolico.





## Bibliografia

1. *The global, regional and national burden of cirrhosis by cause in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017.* **Sepanlou SG, Safiri S, Bisignano C, et al.** 2020, Lancet Gastroenterology Hepatology.
2. *Liver cirrhosis.* **Ginés P, Krag A, Abraldes JG, et al.** 2021, Lancet, Vol. 398, pp. 1359-76.
3. *Drinking habits as cofactors of risk for alcohol induced liver damage. The Dionysos Study Group.* **Bellentani S, Saccoccio G, Costa G, et al.** 41, 1997, Gut, pp. 845–50.
4. *Per capita alcohol consumption and liver cirrhosis mortality in 14 European countries.* **M, Ramstedt.** 96, 2001, Addiction, pp. S19–33.
5. *Effects of prolonged ethanol intake: production of fatty liver despite adequate diets.* **Lieber CS, Jones DP, Decarli LM.** 44, 1965, J Clin Invest, pp. 1009–21.
6. *Comparison of the natural history of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease.* **Mills SJ, Harrison SA.** 7, 2005, Curr Gastroenterol Rep , pp. 32–6. .
7. *The Global Burden of Liver Disease.* **Younossi ZM, Wng G, Anstee QM, Henry L.** 21, 2023, Clinical Gastroenterology and Hepatology, pp. 1978-91.
8. *Late Relapse Versus Hepatitis C Virus Reinfection in Patients With Sustained Virologic Response After Sofosbuvir-Based Therapies.* **Sarrazin C, Isakov V, Svarovskaia ES, Hedskog C, et al.** 1, 2017, Clinical Infectious Diseases, Vol. 64, pp. 44-52.
9. *Clinical outcomes in patients with chronic hepatitis C after direct-acting antiviral treatment: a prospective cohort study.* **Carrat F, Fontaine H, Dorival C, Simony M, et al.** 10179, 2019, Lancet, Vol. 393, pp. 1453-64.
10. *EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection.* **EASL.** 2017, Journal of Hepatology, Vol. 67, pp. 370-98.
11. *A multisociety Delphi consensus statement on the new fatty liver disease nomenclature.* **Rinella ME, Lazarus JV, Ratziu V, Franque SM, et al.** 6, 2023, Journal of Hepatology, Vol. 79, pp. 1542-56.
12. *The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review.* **Younossi ZM, Golabi P, Paik JM, Henry A, Van Dongen C, Henry L.** 77, 2023, Hepatology, pp. 1335-47.
13. *The Most Recent and In-depth Meta-analytic Assessment of the Global Epidemiology of Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD).* **Younossi ZY, Paik JM, Golabi P.** London : EASL, 2022.
14. *Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention.* **Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, et al.** 1, 2018, Nature Reviews Gastroenterology Hepatology, Vol. 15, pp. 11-20.

15. *Global prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus: an updated systematic review and meta-analysis.* **En Li Cho E, Zhe Ang C, Quek J, Fu CE, et al.** 2023, *Gut*, Vol. 72, pp. 2138-2148.
16. *EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease.* **EASL, EASD, EASO.** 2016, *Journal of Hepatology*, Vol. 64, pp. 1388-402.
17. *Pathogenesis of liver cirrhosis.* **Zhou WC, Zhang QB, Qiao L.** 23, 2014, *World Journal of Gastroenterology*, Vol. 20, pp. 7312-24.
18. *A new clinical and prognostic characterization of the patterns of decompensation of cirrhosis.* **Tonon M, D'Ambrosio R, Calvino V, Tosetti G, Barone A, Incicco S, Gambino C, Gagliardi R, Borghi M, Zeni N, Piano S, Lampertico P, Angeli P.** 2023, *J Hepatol*, pp. S0168-8278(23)05359-X. doi: 10.1016/j.jhep.2023.12.005.
19. *The PREDICT study uncovers three clinical courses of acutely decompensated cirrhosis that have distinct pathophysiology.* **Trebicka J, Fernandez J, Papp M, Caraceni P, Laleman W, Gambino C, Giovo I, Uschner FE, Jimenez C, Mookerjee R, Gustot T, Albillos A, Bañares R, Janicko M, Steib C, Reiberger T, Acevedo J, Gatti P, Bernal W, Zeuzem S, Zipprich A, Piano S, Berg T, et al.** 4, 2020, *J Hepatol*, Vol. 73, pp. 842-54.
20. *EASL Clinical Practice Guidelines for the management of patients with decompensated cirrhosis.* **Liver, European Association for the Study of the.** 2, 2018, *J Hepatol*, Vol. 69, pp. 406-60.
21. *Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis.* **Moreau R, Jalan R, Gines P, Pavesi M, Angeli P, Cordoba J, Durand F, Gustot T, Saliba F, Domenicali M, Gerbes A, Wendon J, Alessandria C, Laleman W, Zeuzem S, Trebicka J, Bernardi M, Arroyo V and Consortium, CANONIC Study Investigators of the EASL–CLIF.** 7, 2013, *Gastroenterology*, Vol. 144, pp. 1426-37.
22. *Liver fibrosis quantification.* **Venkatesh SK, Torbenson MS.** 3, 2022, *Abdom Radiol*, Vol. 47, pp. 1032-52.
23. *Liver biopsy for assessment of chronic liver disease: a synopsis.* **Chowdhury AB, Mehta KJ.** 2023, *Clinical and Experimental Medicine*, Vol. 23, pp. 273-285.
24. *Advances in non-invasive assessment of hepatic fibrosis.* **Loomba R, Adams LA.** 7, 2020, *Gut*, Vol. 69, pp. 1343-52.
25. *Liver fibrosis assessment: MR and US elastography.* **Ozturk A, Olson MC, Samir AE, Venkatesh SK.** 9, 2022, *Abdom Radiol*, Vol. 47, pp. 3037-50.
26. *Assessment of the prognosis of cirrhosis: Child-Pugh versus MELD.* **Durand F, Valla D.** 2005, *Journal of Hepatology*, Vol. 42, pp. S100-S107.
27. **Child CG, Turcotte JG.** *Surgery and portal hypertension. Liver and portal hypertension.* Philadelphia : W. B. Saunders Co., 1964.
28. *Transection of the oesophagus for bleeding varices.* **Pugh RN, Murray-Lyon IM, et al.** 1973, *British Journal of Surgery*, Vol. 60, pp. 646-649.

29. *BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update.* **Reig M, Forner A, Rimola J, et al.** 3, 2022, *Journal of Hepatology*, Vol. 76, pp. 681-93.
30. *A model to predict survival in patients with end-stage liver disease.* **Kamath PS, Weisner RH, Malinchoch M, et al.** 2001, *Hepatology*, Vol. 33, pp. 464-70.
31. *SERPINB3 (serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3).* **Pontisso P, Turato C.** 3, 2015, *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, Vol. 19, pp. 202-209.
32. *Inhibition of apoptosis in human tumor cells by tumor-associated serpin, SCC antigen.* **Suminami Y, Nagashima S, Vujanovic NL, Hirabayashi K, et al.** 2000, *British Journal of Cancer*, Vol. 82, pp. 981-89.
33. *Serpin squamous cell carcinoma antigen inhibits UV-induced apoptosis via suppression of c-Jun NH2-terminal kinase.* **Katagiri C, Nakanishi J, Kadoya K, Hibino T.** 2006, *Journal of Cell Biology*, Vol. 172, pp. 983-90.
34. *Squamous cell carcinoma antigen suppresses radiation-induced cell death.* **Murakami A, Suminami Y, Hirakawa H, Nawata S, Numa F, Kato H.** 2001, *British Journal of Cancer*, Vol. 172, pp. 851-8.
35. *SERPINB3 protects from oxidative damage by chemotherapeutics through inhibition of mitochondrial respiratory complex I.* **Ciscato, Sciacovelli M, Villano G, Turato C, Bernardi P, Rasola A, Pontisso P.** 2014, *Oncotarget*, Vol. 5, pp. 2418-27.
36. *SERPINB3 induces epithelial mesenchymal transition.* **Quarta S, Vidalino L, Turato C, Ruvoletto M, Calabrese F, Valente M, Cannito S, et al.** 2010, *Journal of Pathology*, Vol. 221, pp. 343-56.
37. *Suppression of squamous cell carcinoma (SCC)-related serpin, SCC Antigen, inhibits tumor growth with increased intratumoral infiltration of killer cells.* **Suminami Y, Nagashima S, Muratami A, Nawata S, Gondo T, et al.** 2001, *Cancer Res*, Vol. 61, pp. 176-80.
38. *Monitoring SCCA-IgM complexes in serum predicts liver disease progression in patients with chronic hepatitis.* **Biasiolo A, Chemello L, Quarta S, Cavalletto L, Bortolotti F, Caberlotto C, Beneduce L, et al.** 2008, *J Viral Hepat*, Vol. 15, pp. 246-9.
39. *SCCA-IgM as a potential biomarker of non-alcoholic fatty liver disease in patients with obesity, prediabetes and diabetes undergoing sleeve gastrectomy.* **Bettini S, Bordigato E, Milan G, Dal Pra C, Favaretto F, Belligoli A, Sanna M, Serra R, Foletto M, Prevedello L, Busetto L, Fassina G, Vettor R, Fabris R.** 2019, *Obesity Facts*, Vol. 12, pp. 291-306.
40. *HCV genotype 3 and squamous cell carcinoma antigen (SCCA)-IgM are independently associated with histological features of NASH in HCV-infected patients.* **A Martini, G Fattovich, M Guido, E Bugianesi, A Biasiolo, D Ieluzzi, A Gallotta, G Fassina, C Merkel, A Gatta, F Negro, P Pontisso.** 10, 2015, *J Viral Hepat*, Vol. 22, pp. 800-8.

41. *SerpinB3 as a pro-inflammatory mediator in the progression of experimental non-alcoholic fatty liver disease.* **Novo E, Cappon A, Villano G, Quarta S, Cannito S, Bocca C, Turato C, Guido M, et al.** 2022, *Front Immunol*, Vol. 13.
42. *SCCA-IC serum levels are predictive of clinical response in HCV chronic hepatitis to antiviral therapy a multicentric prospective study.* **Fransvea E, Trerotoli P, Sacco R, Bernabucci V, Milella M, Napoli N, Mazzocca A, et al.** 2010, *J Viral Hepat*, Vol. 17, pp. 563-8.
43. *Serum squamous cell carcinoma antigen-immunoglobulin M complex levels predict survival in patients with cirrhosis.* **Cagnin M, Biasiolo A, Martini A, Ruvoletto M, Quarta S, Fasolato S, Angeli P, Fassina G, Pontisso P.** 1, 2019, *Nature Scientific Reports*, Vol. 9.
44. *Progressive increase of SCCA-IgM immune complexes in cirrhotic patients is associated with development of hepatocellular carcinoma.* **Pontisso P, Quarta S, Caberlotto C, Beneduce L, Marino M, Bernardinello E, Beneduce L, et al.** 2006, *Int J Cancer*, Vol. 119, pp. 735-40.
45. *Serum Scca-IgM as a predictor of hepatocellular carcinoma. An update in patients with cirrhosis.* **Buccione D, Fatti G, Gallotta A, Loggi E, Di Donato R, Testa L, Saitta C, et al.** 2012, *O J Gas*, Vol. 2, pp. 56-61.
46. *Combination of squamous cell carcinoma antigen immunocomplex and alpha-fetoprotein in mid- and long-term prediction of hepatocellular carcinoma among cirrhotic patients.* **Gil-Gómez A, Rojas A, Liu CH, Gallego-Duran R, Muñoz-Hernandez R, Fassina G, Pontisso P, Ampuero J, Romero-Gómez M.** 48, 2021, *World J Gastroenterol*, Vol. 27, pp. 8343-56.
47. *Squamous cell carcinoma antigen-immunoglobulin M complexes as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma.* **Beneduce L, Castaldi F, Marino M, Quarta S, et al.** 2005, *Cancer*, Vol. 103, pp. 2558-65.
48. *Diagnostic and prognostic role of SCCA-IgM serum levels in hepatocellular carcinoma (HCC).* **Pozzan C, Cardin R, Picciocchi M, Cazzagon N, Maddalo G, Vanin V, Giacomini A, et al.** 8, 2014, *J Gastroenterol Hepatol*, Vol. 29, pp. 1637-44.
49. *SerpinB3/4 Expression Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Cholangiocarcinoma.* **Martini A, Prasai K, Zemla TJ, Ahmed FY, Elnagar MB, Giama NH, Guzzardo V, Biasiolo A, Fassan M, Yin J, Pontisso P, Roberts LR.** 1, 2024, *Cancers*, Vol. 16, p. 225.
50. *How to improve care in outpatients with cirrhosis and ascites: a new model of care coordination by consultant hepatologists.* **Morando F, Maresio G, Piano S, Fasolato S, Cavallin M, Romano A, Rosi S, Gola E, Frigo AC, Stanco M, Destro C, Rupolo G, Mantoan D, Gatta A, Angeli P.** 2, 2013, *J Hepatol*, Vol. 59, pp. 257-64.
51. *Metabolic risk factors are a major comorbidity in patients with cirrhosis independent of the presence of hepatocellular carcinoma.* **Hessheimer AJ, Forner A, Varela M, Bruix J.** 10, 2010, *Eur J Gastroenterol Hepatol*, Vol. 22, pp. 1239-44.
52. *Association Between the Presence of Metabolic Comorbidities and Liver-Related Events in Patients With Chronic Hepatitis B.* **Patmore LA, Katwaroe WK, van der Spek D, Choi HSJ, Patel K, Brakenhoff S, van der Meer AJ, Brouwer WP, van Kleef LA, de Kneegt**

**RJ, Hansen BE, de Man RA, Feld JJ, Janssen HLA, Sonneveld MJ.** 12, 2023, Clin Gastroenterol Hepatol, Vol. 21, pp. 3089-96.

53. *Global Disparities of Hypertension Prevalence and Control: A Systematic Analysis of Population-Based Studies From 90 Countries.* **Mills KT, Bundy JD, Kelly TN, Reed JE, Kearney PM, Reynolds K, Chen J, He J.** 6, 2016, Circulation, Vol. 134, pp. 441-50.

54. *Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030.* **Sarah Wild, Gojka Roglic, Anders Green, Richard Sicree, Hilary King.** 5, 2004, Diabetes Care, Vol. 27, pp. 1047-53.

55. *The obesity epidemic in the United States--gender, age, socioeconomic, racial/ethnic, and geographic characteristics: a systematic review and meta-regression analysis.* **Wang Y, Beydoun MA.** 2007, Epidemiol Rev.

56. *Incidence, predictors and outcomes of acute-on-chronic liver failure in outpatients with cirrhosis.* **Piano S, Tonon M, Vettore E, Stanco M, Pilutti C, Romano A, Mareso S, Gambino C, Brocca A, Sticca A, Fasolato S, Angeli P.** 6, 2017, J Hepatol, Vol. 67, pp. 1177-84.

57. *Hepatitis C virus prevalence and level of intervention required to achieve the WHO targets for elimination in the European Union by 2030: a modelling study.* **Collaborators, European Union HCV.** 2, 2017, Lancet Gastroenterol Hepatol, pp. 161-76.