

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di MEDICINA-DIMED

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN: SCIENZE CLINICHE E SPERIMENTALI

CURRICOLO: SCIENZE EPATOLOGICHE E TRAPIANTOLOGICHE

XXXV CICLO

TITOLO TESI

“NAFLD e menopausa: distribuzione del grasso corporeo, rischio cardiovascolare e intervento dietetico”

Coordinatore: Ch.mo Prof. Ferlin Alberto

Supervisore: Ch.mo Prof. Spinella Paolo

Dottorando: Francesca Meraglia

INDICE

ABSTRACT	1
INTRODUZIONE	4
CAPITOLO 1. LA NON ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE	6
1.1 Definizione	6
1.2 Epidemiologia	9
1.3 Ipotesi fisiopatologiche	12
CAPITOLO 2. NAFLD E MENOPAUSA	18
2.1 Menopausa e rischio di NAFLD	18
2.2 Alterazioni endocrine	20
2.3 Fattori metabolici	22
2.4 NAFLD, menopausa e complicanze cardiovascolari	28
CAPITOLO 3. DIAGNOSI E TRATTAMENTO DELLA NAFLD	34
3.1 NAFLD e sua diagnosi	34
3.2 NAFLD o MAFLD?	40
3.3 NAFLD e ruolo dell'alimentazione	41
3.3.1 Alimentazione come concausa	41
3.3.2 Alimentazione come terapia	45
CAPITOLO 4. PROTOCOLLO DI STUDIO	49
4.1 Obiettivi dello studio	49
4.2 Materiale e Metodi	50
4.2.1 Criteri di inclusione ed esclusione	50
4.2.2 Protocollo di studio trasversale	51
4.2.3 Protocollo di studio di intervento	53
4.2.4 Valutazioni antropometriche e valutazione della composizione corporea	54
4.2.5 Valutazioni dei parametri vitali	59
4.2.6 Valutazioni della forza muscolare	59
4.2.7 Esami laboratoristici e strumentali	60
4.2.8 Valutazione delle abitudini alimentari e schema dietetico	63

4.3 Analisi statistica	65
4.4 Risultati	66
4.4.1 Confronto in base a indice ATI	70
4.4.2 Risultati dello studio di intervento	71
4.5 Discussione	78
CONCLUSIONI	97
BIBLIOGRAFIA	98

Abstract

Background: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is the most common chronic liver disease and is a well-known risk factor for cardiovascular disease (CVD) and mortality. The prevalence and progression of NAFLD increase in women after menopause, with unfavorable changes in body fat distribution and with the increasing prevalence of metabolic syndrome. Unhealthy diet and sedentary lifestyle are the leading contributing factors to the development of NAFLD. Currently there is no pharmacological treatment for NAFLD and lifestyle modification consisting in diet and physical activity remains the first-line therapy. The aim of this study is to evaluate the effectiveness of dietary intervention to improve fatty liver disease and metabolic disorders associated to NAFLD.

Methods: Postmenopausal women (PMW) free from hormone therapy, with body mass index (BMI) from 24 to 39 kg/m² and with at least one other cardio-metabolic risk factors, were randomly recruited. A detailed questionnaire concerning lifestyle, medical history and physical activity were administered. A 7-days dietary recall was used to collect information regarding food and nutrient intake. Imaging techniques has been used for the detection of hepatic steatosis. All subjects underwent physical examination, including anthropometric (weight, height, waist and hip circumferences, and skinfolds) and blood pressure measurements, body composition by bioimpedance analysis (BIA) and blood sampling. Each patient was assigned to a hypocaloric balanced diet. They were followed-up with the re-assessment of the same protocol after six months.

Results: 66.3% of 83 PMW showed fatty liver. PMW with NAFLD had significantly higher values of BMI ($\Delta=+2.7$ kg/m²), body weight ($\Delta=+5$ kg, $p=0.04$), waist circumference ($\Delta=+8.5$ cm, $p=0.0001$), neck circumference ($\Delta=+1.2$ cm), waist to hip ratio ($\Delta=-0.05$, $p<0.0001$), waist to height ratio ($\Delta=-0.06$), subscapular skinfold thickness ($\Delta=+4.5$ mm) and absolute values of fat mass (FM) ($\Delta=+3.7$ kg) based on skinfolds and on BIA ($\Delta=+3.7$ kg). Significant differences were also found in serum fasting glucose ($\Delta=+5.2$ mg/dl) and in levels of fasting insulin ($\Delta=+4.5$ uU/mL), glycated hemoglobin ($\Delta=+2.4$ mmol/mol), tryglicerides ($\Delta=+33.4$ mg/dl, $p=0.006$), ALT ($\Delta=+7.7$ U/L, $p=0.02$) and AST/ALT ratio ($\Delta=-0.24$, $p=0.002$). Similarly, both HOMA-IR ($\Delta=+1.3$), Tyg Index ($\Delta=-0.2$) and FLI ($\Delta=+26.8$) were higher, while no differences were observed in macro- and micro-nutrients daily intake. 26 PMW with a 6-months follow up were analysed. An improvement or resolution of hepatic steatosis was observed in 65% of cases and was associated to a reduction in percentage of FM ($\Delta=-3.62\%$), in daily fat intake ($\Delta=-8.72$ g/day), especially saturated fatty acids (SFA) ($\Delta=-3.61$ g/day) and monounsaturated fatty acids (MUFA) ($\Delta=-4.85$ g/day), and in daily protein intake ($\Delta=-7.87$ g/day) with a change in percentage of calories from carbohydrates. This ratio was more like that to Mediterranean diet.

Conclusion: this dietary intervention study highlights the medium-term efficacy (six months) of hypocaloric diet in menopausal women with NAFLD and indicates the need for a multidisciplinary approach.

Introduzione

La Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) è la patologia cronica del fegato più diffusa e rappresenta un problema di salute pubblica in costante aumento sia nei Paesi Occidentali che nei Paesi in via di sviluppo, in quanto correlata ad un aumento della mortalità globale, per cause epatiche ma soprattutto cardiovascolari. Le donne nel periodo postmenopausale sono più a rischio di NAFLD. La perdita di protezione da parte degli estrogeni, in combinazione con altri fattori, sembra essere alla base del rischio aumentato di sviluppare steatosi epatica. La prima parte della presente tesi si concentra sulla revisione della letteratura circa l'associazione tra l'aumentata prevalenza di NAFLD e la menopausa con i suoi effetti sulla ridistribuzione del grasso corporeo e sulle modificazioni dell'assetto metabolico, lipidico e glucidico, che determinano un aumento del rischio cardiovascolare. Mentre numerosi autori sostengono che questi effetti siano direttamente mediati dalla carenza di estrogeni, altri autori hanno osservato, a livello di popolazione generale, come l'aumento del grasso centrale addominale sia associato ad un elevato rischio di malattie cardiovascolari e metaboliche. Stili di vita non salutari svolgono un ruolo importante nello sviluppo e nella progressione della NAFLD mentre un crescente numero di evidenze suggerisce che uno stile di vita caratterizzato da una dieta sana possa contrastarli. Tuttavia, i modelli alimentari associati ad un aumento del rischio cardiometabolico e l'efficacia di interventi dietetici mirati sono stati solo marginalmente studiati nelle donne in menopausa ed in particolare i loro effetti sulla steatosi epatica, sugli indici di adiposità e sull'assetto metabolico. Nella seconda parte della tesi si illustrano quindi il protocollo dello studio nato dall'esigenza di

valutare nelle donne in menopausa sia l'associazione di diversi pattern alimentari a priori con la NAFLD e i fattori di rischio cardio-metabolici al fine di ridurre la loro prevalenza sia il possibile effetto benefico di un intervento dietetico sulla progressione di NAFLD e i risultati ottenuti a sei mesi.

Capitolo 1

LA NON ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE

1.1 Definizione

La Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) è la più diffusa ed emergente malattia cronica del fegato, negli ultimi 20 anni la sua incidenza e prevalenza sono aumentate parallelamente all'epidemia di obesità e diabete, che costituiscono un grave problema di salute pubblica a livello globale. La NAFLD è una malattia biologicamente e clinicamente eterogenea, copre un ampio spettro di condizioni istologiche e cliniche che aumentano la morbilità e la mortalità per cause sia epatiche ma soprattutto cardiovascolari (1). La NAFLD si definisce come un'infiltrazione grassa del fegato non dovuta a causa alcolica o ad altre cause di danno epatico secondario (virali, immunitarie e farmacologiche). La prevalenza di NAFLD è in aumento a livello mondiale, dal 15 % nel 2005 è attualmente stimata intorno al 25.24 % (22.10-28.65) nella popolazione generale, intorno al 70-80% in popolazioni speciali (soggetti diabetici e obesi) e intorno al 50% in soggetti con dislipidemia (2). Una recente review e metanalisi ha stimato un tasso di prevalenza complessiva del 32.4% (29.9–34.9) e confermato un significativo aumento nel tempo, dal 25.5% negli studi precedenti al 2005 (20.1–31.0) al 37.8% (32.4–43.3) in quelli successivi al 2016 (3). Esistono una variabilità geografica significativa, con tassi di prevalenza più alti in Medio Oriente e Sud America (>30%), seguiti da Asia (27.37%), Europa (23.71%), USA (24.13%) e tassi più bassi in Africa (13%). Oltre all'etnia, le differenze tra gli studi sono legate alle variazioni legate all'età, al sesso e alle metodiche diagnostiche utilizzate, infatti risulta spesso ridotta quando diagnosticata tramite

indagini di laboratorio rispetto a quando vengono utilizzate tecniche di imaging. Nei paesi Europei si attesta al 25% con diagnosi ecografica e al 13% quando basata sulle alterazioni dei livelli delle transaminasi (2). L'incidenza totale della NAFLD è stata calcolata raramente ed è stimata di circa 46.9 casi per 1000 anni-persona (36.4-57.5); 70.8 casi ogni 1000 anni-persona (48.7-92.8) negli uomini e 29.6 casi ogni 1000 anni-persona (20.2-38.9) nelle donne ($p < 0.0001$) (3). Anche la stima diretta della prevalenza della NASH a livello di popolazione è difficoltosa perché la diagnosi richiede una biopsia epatica, che essendo invasiva è raramente eseguita, se non in pazienti selezionati. Secondo stime indirette circa il 20% dei soggetti con NAFLD ha NASH, cioè la NASH interessa dal 3% al 6% della popolazione adulta (4). Un recente studio americano su un'ampia coorte di soggetti sani con età >45 anni, utilizzando tecniche di imaging all'avanguardia e biopsia epatica ha determinato una prevalenza del 38% per la NAFLD, del 14% per la NASH e una significativa fibrosi epatica nel 6% del campione (5). Un modello epidemiologico sulla diffusione di NAFLD e NASH ha previsto entro il 2030 un aumento, rispettivamente, del 21% e del 63% della popolazione affetta negli USA (6).

La NAFLD copre uno spettro di entità clinico-istologiche che vanno dalla Non-Alcoholic Fatty Liver (NAFL) o steatosi epatica isolata (causata da accumulo focale o diffuso di trigliceridi in più del 5% degli epatociti) alla steatoepatite non alcolica detta NASH (Non-Alcoholic Steato-Hepatitis), fino alla cirrosi epatica, alla malattia epatica terminale e più raramente al carcinoma epatocellulare, che può verificarsi anche negli stadi precirrotici e in assenza di fibrosi severa, soprattutto in soggetti con sindrome metabolica (7). La storia naturale della NAFLD è variabile e la progressione, generalmente lenta, interessa una piccola percentuale dei pazienti ma che generalmente

presentano tassi di mortalità più elevati rispetto alla popolazione generale, nonostante i progressi nelle conoscenze, nella diagnosi e nel trattamento (8). La NASH, caratterizzata da segni istologici di danno cellulare, flogosi, necrosi con e senza fibrosi, è stata riconosciuta come una delle principali cause di cirrosi negli adulti negli Stati Uniti, dove la cirrosi connessa alla NASH è attualmente la seconda indicazione al trapianto di fegato e la prima nel sesso femminile, e si prevede che entro il 2030 diventerà la principale in entrambi i sessi (4).

Oltre al rischio di progressione e all'aumento della morbilità e mortalità legate al fegato, un crescente numero di evidenze suggerisce che la NAFLD è associata ad un aumentato rischio cardiovascolare. I pazienti con NAFLD sono a rischio di sviluppare di ipertensione arteriosa, malattia coronarica, cardiomiopatia e aritmie cardiache, con conseguente aumento della morbilità e mortalità cardiovascolari (9). Rischio che aumenta significativamente insieme al grado di progressione della steatosi epatica non alcolica. Studi recenti hanno, infatti, dimostrato che i pazienti affetti da NAFLD hanno un maggior rischio di sviluppare eventi cardiovascolari fatali e non, ma nei pazienti con fibrosi epatica avanzata l'incidenza di eventi cardiovascolari è maggiore rispetto a quella osservata in coloro che non presentano fibrosi (10). Inoltre sono state identificate associazioni tra la NAFLD, la fibrosi ad essa associata e i fattori correlati alla sindrome metabolica (obesità, ipertensione arteriosa, dislipidemia e diabete mellito) che sottendono una complessa e bidirezionale interazione tra fegato e i fattori metabolici di rischio cardiovascolare (11). Tanto che nel 2020 un gruppo di esperti ha proposto una nuova nomenclatura Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease (MAFLD) per definire la condizione di steatosi epatica associata ad alterazioni metaboliche, che può coesistere con il consumo di alcol, la presenza di altre malattie del

fegato o differenti condizioni che possono favorire la steatosi epatica, quali ad esempio l'impiego di alcuni farmaci (12). Va ricordato che la NAFLD è una patologia multifattoriale, nello sviluppo e progressione della quale, oltre alle condizioni metaboliche, svolgono un ruolo fattori genetici, epigenetici e ambientali (13). La presenza di steatosi epatica aumenta il rischio di malattie croniche epatiche ed extraepatiche tra cui diabete mellito di tipo 2 (DM2), malattia renale cronica e di alcuni tumori epatici ed extraepatici (soprattutto del tratto gastrointestinale) (12). I soggetti con NAFLD possono presentare ipotiroidismo, sindrome dell'ovaio policistico, apnea ostruttiva del sonno e psoriasi (14).

1.2 Epidemiologia

Negli anni '80 la steatoepatite non alcolica fu descritta per la prima volta come una condizione più frequente nelle donne anziane moderatamente obese con comorbidità metaboliche (15). La prima osservazione di Ludwig fu smentita da successivi studi epidemiologici che hanno mostrato una maggiore prevalenza di NAFLD nel sesso maschile, con variazioni legate all'età (16). Negli uomini si osserva una curva a "J" rovesciata, con un aumento durante l'età giovane-adulta e successivo declino dopo i 50-60 anni (17). Nelle donne invece, la prevalenza di NAFLD in età fertile è inferiore rispetto a quella degli uomini della stessa età ($\leq 50-60$ anni) (16) e aumenta dopo i 50 anni con picchi a 60-69 anni e successiva diminuzione dopo i 70 anni raggiungendo tassi simili o addirittura più alti rispetto agli uomini della stessa età (17), con un rischio paragonabile (18) o maggiore di progressione della malattia epatica (19) e con un aumento del tasso di mortalità più marcato (20). Diversi studi hanno dimostrato che la

prevalenza di NAFLD è due volte maggiore nelle donne in postmenopausa rispetto alle donne in premenopausa (21,22) ed è inferiore nelle donne in menopausa in terapia ormonale sostitutiva (TOS) rispetto a quelle non in terapia (23). Queste evidenze sono supportate anche dall'associazione dell'aumentato rischio di insorgenza e di progressione della NAFLD con l'uso di terapie ormonali antiestrogeniche (es. tamoxifene) (24).

Le donne con NAFLD di uno studio multicentrico condotto nel Nord Italia hanno circa dieci anni in più e tendono maggiormente a presentare fattori di rischio cardio-metabolici (obesità centrale, ipertensione arteriosa, alterato controllo glicemico e dislipidemia) rispetto agli uomini (25).

Altri studi hanno riportato tassi di prevalenza di NAFLD più alti nelle donne con BMI ≥ 30 kg/m² e con età >44 anni, evidenziando un abbassamento dell'età media di insorgenza nel tempo (26). Da alcuni studiosi la maggiore prevalenza nelle donne rispetto agli uomini della stessa età è stata spiegata in parte dalla maggior prevalenza di obesità riscontrata nel sesso femminile rispetto a quello maschile (27).

Diversi studi epidemiologici hanno, inoltre, evidenziato un incremento maggiore della prevalenza di NAFLD nel sesso femminile negli ultimi decenni. Dai dati del National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) emerge nelle donne adulte statunitensi con età superiore ai 45 anni, una prevalenza standardizzata per età del 35.1% ed un aumento dal 20.96% (95% CI, 18.77-23.15) nel periodo tra il 1988 e il 1994 al 26.19% (95% CI, 24.32-28.06) in quello dal 2007 al 2014 (26). In Italia i dati di prevalenza (20.0-30.0%) (28) sono sovrapponibili a quelli degli altri paesi Occidentali, in particolare lo studio Dionysos ha mostrato una prevalenza del 20% (29). Da una recente revisione e metanalisi dei dati disponibili, sembra che la

prevalenza della NAFLD nelle donne in menopausa sia maggiore di quella nella popolazione generale, con tassi del 31.64% (25.82-37.77) nei Paesi asiatici e del 27.99% (11.21-48.72) nei Paesi non asiatici e che in questa specifica popolazione una maggiore prevalenza di NAFLD è stata riscontrata con gli studi che utilizzano l'ecografia rispetto a quelli che utilizzano TC o uno score predittivo come il Fatty Liver Index (FLI) (30). Per quanto riguarda il rischio di progressione verso la NASH sembra essere simile in entrambi i sessi, mentre è maggiore del 37% quello di fibrosi avanzata nelle donne rispetto agli uomini. Anche l'età modifica l'effetto del sesso sulla gravità della NAFLD, infatti il rischio di NASH e fibrosi avanzata sono più elevati nelle donne con età media maggiore di 50 anni; le differenze di sesso nella NASH e nella fibrosi avanzata sono attenuate nelle popolazioni più giovani (19). Dai dati del Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network (NASH CRN) su soggetti adulti sottoposti a biopsia è emerso che il rischio di NASH è doppio nel sesso femminile, una volta escluse le caratteristiche sociodemografiche e i fattori di rischio metabolici (31). In uno studio cinese la prevalenza di NASH, stimata tramite l'utilizzo di uno score predittivo non invasivo (BAAT) è considerevolmente maggiore nelle donne obese e in menopausa rispetto a quelle in età fertile (32). La cirrosi e le complicanze si manifestano più frequentemente nelle pazienti di sesso femminile, che presentano dal 2007 al 2016 il 5% in più di decessi per cirrosi rispetto agli uomini, indicando che molte donne potrebbero presentare manifestazioni epatiche più gravi di NAFLD (20). Nonostante il rischio complessivo e la mortalità per HCC nelle donne con NASH sia inferiore che negli uomini (33), negli anni si è comunque registrato un aumento dei casi di NASH-HCC in lista di attesa per trapianto di fegato nel sesso femminile (34). I dati di una recente metanalisi hanno confermato che le donne con NAFLD hanno

una mortalità per tutte le cause maggiore rispetto agli uomini e un'incidenza, una prevalenza e mortalità per malattie cardiovascolari due volte superiore (35). Anche dai dati del NHANES risulta nelle donne con NAFLD un rischio maggiore di malattie cardiovascolari (CVD) (1.5, IC 95%, 1.20-1.82), di malattia cardiovascolare aterosclerotica (ASCVD) $\geq 7,5\%$ (1.96, IC 95%, 1.42-2.52) e di entrambi (1.76, IC 95%, 1.37-2.25) rispetto a quelle senza NAFLD. La mortalità a 5 anni per le donne adulte con NAFLD era significativamente più alta (1.48; IC 95%, 1.07-2.05), in particolare quelle con un punteggio ASCVD $> 7.5\%$ avevano un rischio ancora più elevato di mortalità a 5 anni per tutte le cause e per cause cardiovascolari (26). Infine il sesso femminile è stato incluso tra i fattori di rischio della steatosi epatica post-trapianto de novo o ricorrente, che si accompagna ad alterazioni metaboliche ed è associata ad eventi cardiovascolari e a una minore sopravvivenza (36).

1.3 Ipotesi fisiopatologiche

La NAFLD è una patologia multifattoriale e la sua patogenesi è complessa e non ancora del tutto chiarita, ed è il risultato dell'esposizione di individui geneticamente suscettibili a fattori metabolici e a condizioni avverse legate allo stile di vita e all'ambiente tra cui il fumo di sigaretta e l'inquinamento atmosferico (37). La steatosi epatica è conseguente all'accumulo sotto forma di gocce dei trigliceridi, che si formano dall'esterificazione degli acidi grassi liberi (FFA) e del glicerolo all'interno dell'epatocita. All'aumentato afflusso epatico di FFA possono contribuire un aumentato rilascio da parte del tessuto adiposo, un eccessivo apporto dietetico e la lipogenesi de novo (DNL) endogena. Inoltre i trigliceridi epatici possono derivare da una

ridotta capacità ossidativa epatica e/o da un diminuita sintesi o secrezione di very low density lipoproteins (VLDL) (38). La teoria iniziale dei “two hits” sulla patogenesi della NAFLD sosteneva che l’accumulo di lipidi a livello degli epatociti associato all’insulino-resistenza (IR) indotta dall’obesità, dal diabete mellito di tipo 2 e dalla dislipidemia fosse il primo insulto “first hit” e che comportasse una maggiore suscettibilità ai cosiddetti “second hits” responsabili della progressione verso la NASH e/o la fibrosi, come le citochine/adipochine infiammatorie, la disfunzione mitocondriale e lo stress ossidativo (39).

La steatosi epatica è considerata la componente epatica della sindrome metabolica e risulta associata strettamente e bidirezionalmente alla presenza di insulino-resistenza. L’iperafflusso di FFA, derivanti dalla mancata soppressione della lipolisi in condizioni di IR sistemica, a livello epatico induce disfunzione mitocondriale e saturazione della β -ossidazione degli FFA e promuove l’IR tessuto-specifica con diminuita soppressione della glucoinesi e della glicogenolisi in risposta all’insulina e induzione della DNL. La steatosi può indurre e peggiorare l’IR creando un circolo vizioso che contribuisce alla progressione della malattia, ad oggi se l’insulino-resistenza e la conseguente iperinsulinemia siano una possibile causa di NAFLD o piuttosto sia la steatosi stessa a promuovere una condizione di insulino-resistenza non è ancora chiaro (40). Numerosi altri complessi meccanismi sembrano essere coinvolti nella genesi e progressione della NAFLD correlata all’IR, che vedono coinvolti fattori genetici, epigenetici, ormonali oltre a quelli più recenti come il microbiota intestinale e la risposta immunitaria sistemica (40). La secrezione da parte dello stesso fegato steatosico di proteine, lipidi, altri metaboliti e miRNA che partecipano alla regolazione metabolica a livello epatico, muscolare e del pancreas,

sembra poter indurre IR (41). L'accumulo di alti livelli di FFA e altri metaboliti lipidici, come il diacil-glicerolo (DAG) può causare un danno epatico da lipotossicità che promuove apoptosi, autofagia, stress ossidativo, stress del reticolo endoplasmatico e infiammazione cronica ed è associato alla severità della malattia (42).

Nella progressione verso la steatoepatite svolge un ruolo fondamentale lo stress ossidativo, legato all'aumentata espressione del citocromo CYP2E1, che induce la produzione di radicali liberi (ROS) da parte del metabolismo ossidativo degli FFA. Questi promuovono la lipoperossidazione e l'apoptosi e stimolano la sintesi di citochine infiammatorie con attivazione delle cellule stellate epatiche (HSC), che giocano un ruolo importante nello sviluppo di fibrosi epatica (43).

L'incremento epatico di FFA determina anche uno stress del reticolo endoplasmatico (RE) e in risposta ad esso si ha l'attivazione di un certo numero di fattori di trascrizione e di chinasi (Unfolded protein response, UPR) che regolano la sintesi e la degradazione delle proteine. Una risposta inadeguata può condurre a IR, apoptosi, infiammazione (attraverso NF- κ B) e disfunzione mitocondriale (44).

La lipotossicità e il rilascio di pattern molecolari associati al danno (DAMP), conseguenti all'accumulo di grasso a livello epatico, attivano sia le cellule di Kupffer (KC) che le HSC promuovendo rispettivamente l'infiammazione e la fibrosi. Le KC attivate producono citochine e chemochine infiammatorie come il fattore di necrosi tumorale-alfa (TNF α), l'interleuchina-1 β (IL-1 β), l'interleuchina-6 (IL-6) che contribuiscono al danno e alla necrosi infiammatoria negli epatociti. Producono inoltre il fattore di crescita tumorale- β (TGF- β) e il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) promuovendo anche lo sviluppo di fibrosi attraverso stimoli mitogeni sulle HSC (45). ERS, ROS e lo stress ossidativo agiscono sinergicamente nella genesi e nella

progressione della NAFLD attraverso l'induzione di IR epatica, apoptosi, infiammazione e disfunzione mitocondriale (46). Recentemente accanto alla tradizionale teoria "two hits" è stata proposta quella "multiple hits", secondo la quale la steatosi e la steatopetite rappresentano due entità distinte, in cui lo stato infiammatorio svolge un'azione centrale. Oltre all'insulino-resistenza e allo stress ossidativo, altri fattori patogenetici sono associati allo sviluppo di NAFLD, in presenza o in assenza della sindrome metabolica.

Tra i determinanti genetici maggiormente studiati il polimorfismo (I148M) del gene PNPLA 3 (con sede braccio lungo del cromosoma 22) che risulta essere legato non solo alla prevalenza e al grado di steatosi ma anche alla severità di progressione della malattia (46). PNPLA 3 codifica una proteina chiamata adiponutrina o patatin-like phospholipase-domain containing protein 3 (PNPLA3) con attività enzimatica di membrana che è coinvolta nell'idrolisi dei trigliceridi e nello stoccaggio e mobilizzazione dei lipidi. La diminuzione dell'espressione di PNPLA3 nelle donne è associata a un ridotto accumulo di goccioline lipidiche. In una coorte di donne con obesità patologica è stata rivelata una relazione tra l'espressione di PNPLA3 e NAFLD, senza l'interferenza del genere o dell'età (48). Questa insieme ad altre varianti genetiche a carico di geni TM6SF2, NCAN e PPP1R3B aumentano l'ereditabilità della NAFLD fino al 27% (6). Un recente studio ha riportato un'associazione significativa tra il polimorfismo rs2076211 del gene PNPLA3 con la prevalenza della NAFLD nel sesso maschile e in quello femminile, ma solo nelle donne in menopausa, mentre il polimorfismo rs58542926 del gene TM6SF2 era associato al rischio di NASH, nelle donne in premenopausa e in postmenopausa ma non negli uomini, suggerendo un ruolo del sesso e dello stato

riproduttivo nella modulazione della suscettibilità genetica alla NAFLD (49).

È stato anche esplorata l'interazione gene-ambiente-stile di vita nella NAFLD, con evidenze su come l'epigenetica possa contribuire alla sua eterogeneità fenotipica tramite la regolazione di geni implicati nella regolazione del processo infiammatorio, dello stress ossidativo, della riparazione dei tessuti e dei processi metabolici. Anche la regolazione epigenetica sembra variare con il sesso in studi su animali di laboratorio (50).

L'obesità e il diabete inducono IR, proliferazione degli adipociti e alterazioni della flora intestinale. L'eccesso di grasso viscerale si associa a bassi livelli di molecole ad azione insulino-sensibilizzante e antinfiammatoria (adiponectina e grelina) ed un'aumentata espressione di quelle che promuovono l'infiammazione (leptina, IL-6, TNF- α , resistina, visfatina e chemochine) influenzando il contenuto di grasso degli epatociti, la sensibilità all'insulina, l'ambiente infiammatorio del fegato e il processo fibrotico (51).

Un crescente corpo di evidenze supporta il possibile ruolo del microbiota intestinale. Le modifiche qualitative e quantitative del microbiota intestinale, influenzate da eccesso ponderale, fattori dietetici come una dieta ricca in acidi grassi trans e fruttosio, fattori genetici e metabolici sono in grado di compromettere l'integrità delle barriere epiteliali e vascolari. La conseguente aumentata traslocazione di batteri e PAMP induce endotossiemia e una risposta immunitaria persistente che promuove infiammazione a livello intestinale ed epatico tramite l'attivazione delle KC, l'alterazione del profilo degli acidi biliari e dei livelli di alcuni metaboliti (riduzione della colina ed aumento dell'etanolo) (52). Un eccessivo introito calorico e la sedentarietà sono associati ad accumulo di grasso a livello epatico, all'IR, all'aumento del

tessuto adiposo viscerale metabolicamente attivo e ad un'alterata regolazione della lipolisi, così come la composizione in macronutrienti della dieta può influenzare il rischio di genesi e progressione della steatosi (53).

Capitolo 2

NAFLD E MENOPAUSA

2.1 Menopausa e rischio di NAFLD

Le differenze nell'epidemiologia e nella storia naturale della NAFLD nei due sessi e la sua patogenesi complessa e multifattoriale, hanno acceso l'interesse sulle differenze sessuali, o differenze biologiche cioè legate agli ormoni e ai cromosomi sessuali e su quelle legate allo stile di vita definite dal genere, e sulla loro influenza sulla prevalenza, sulla presentazione clinica e sulle strategie da attuare per la prevenzione, la diagnosi, la terapia e la ricerca (54). Le differenze uomo/donna come fattore di rischio per la NAFLD devono ancora essere pienamente comprese, molti studi hanno indagato il ruolo svolto dal milieu ormonale e dai fattori riproduttivi. Oltre alla familiarità, le componenti della sindrome metabolica, l'IR/DM2, la dislipidemia e l'obesità rappresentano i principali fattori di rischio in entrambi i sessi. L'età precoce al menarca, la sindrome dell'ovaio policistico, la storia di diabete gestazionale e la menopausa definiscono un profilo di rischio unico nel sesso femminile (55).

Tra le cause maggiori dell'aumentato rischio di NAFLD c'è la menopausa. La menopausa, passaggio naturale ed inevitabile dell'invecchiamento nella donna, è definita come l'interruzione permanente dei cicli mestruali, fisiologica o iatrogena, e coincide con il termine della fertilità. Si verifica fra i 42 e i 58 anni circa, con un'età media compresa tra 48 e 52 anni sotto l'influenza di diversi fattori (genetici, ormonali e ambientali) (56). La menopausa coincide con l'esaurimento della riserva ovarica e con la graduale riduzione degli estrogeni, in particolare l'estradiolo (E2) ed è definita in maniera retrospettiva come la cessazione dei cicli mestruali da almeno 12 mesi

consecutivi associata a livelli sierici di FSH >25 mIU/ml e di estradiolo <50 pg/ml (57). Ai cambiamenti ormonali possono conseguire manifestazioni cliniche, la cui incidenza e intensità variano ampiamente e dipendono non solo da fattori genetici ma anche ambientali e legati allo stile di vita, come l'obesità, in particolare quella centrale e l'abitudine al fumo di sigaretta (58). Il 75% delle donne in menopausa riferisce sintomi vasomotori (vampate di calore, sudorazioni notturne e palpitazioni) (59), alterazioni metaboliche (dislipidemia, alterata tolleranza al glucosio, resistenza all'insulina, obesità viscerale e diabete mellito tipo 2) (60), variazioni pressorie, disturbi del sonno, riduzione del desiderio sessuale, alterazioni del trofismo cutaneo e vulvo-vaginale, modificazione degli organi di senso e della voce, dolore articolare, sindrome ansioso-depressiva, irritabilità, perdita di memoria e difficoltà di concentrazione (61). I meccanismi proposti per spiegare l'aumento della prevalenza e del rischio di progressione della NAFLD nelle donne in menopausa sono attribuibili sia alla perdita degli effetti protettivi diretti degli estrogeni sia alle modificazioni metaboliche, conseguenti ad un cambiamento sfavorevole della composizione corporea, pertanto le donne in menopausa sono state indicate come una delle popolazioni target per interventi volti a ridurre la morbilità e la mortalità legate alla NAFLD (62). Inoltre le alterazioni ormonali e metaboliche della menopausa insieme alle significative alterazioni emodinamiche responsabili di alterata pressione arteriosa, rendono la donna particolarmente vulnerabile alla patologia cardiovascolare. A tutt'oggi non sono del tutto chiari i meccanismi alla base dell'aumentato rischio cardiovascolare in menopausa (63) e nei soggetti con NAFLD (64). La prevenzione, la diagnosi precoce e il trattamento di queste condizioni

rappresentano elementi di primario interesse sia in ambito clinico che di ricerca.

2.2. Alterazioni endocrine

Tra le cause maggiori dell'aumentato rischio di NAFLD, sembra esserci la perdita di protezione data dagli estrogeni. Nel sesso femminile l'estradiolo è coinvolto nella complessa regolazione del metabolismo energetico tramite il legame con i recettori per gli estrogeni, in particolare ER α , presenti a livello delle cellule epatiche che cooperano a diversi livelli nella regolazione delle funzioni epatiche. Gli estrogeni promuovono la lipolisi e la beta-ossidazione degli acidi grassi, la clearance del colesterolo LDL e la sintesi di colesterolo HDL, la glicolisi e la glicogenosintesi mentre limitano l'accumulo di trigliceridi inibendo la lipogenesi, l'assorbimento degli acidi grassi e la sintesi di colesterolo e riducono la gluconeogenesi epatica (65).

Inoltre gli estrogeni inibiscono la fibrogenesi inibendo l'attivazione e la proliferazione delle cellule stellate, regolano il metabolismo cellulare prevenendo disfunzioni mitocondriali, riducendo lo stress ossidativo e l'invecchiamento cellulare, e potenziano l'immunità innata e i meccanismi antiossidanti inibendo la lipoperossidazione lipidica (66). Gli estrogeni a livello delle KC promuovono lo switch dal sottotipo pro infiammatorio a quello antinfiammatorio, che tramite la sintesi di citochine ad azione antinfiammatoria, accelera la risoluzione del processo infiammatorio e la riparazione cellulare (67).

I dati epidemiologici sulla minore prevalenza e progressione della NAFLD nelle donne in età fertile rispetto a quelle in menopausa sembrano suggerire un ruolo protettivo degli estrogeni (16,17). Inoltre sembra che la terapia ormonale sostitutiva (TOS) possa essere un fattore protettivo (68,69) ma questo è stato dimostrato in pochi studi e sembra

essere correlato ad una ridotta frequenza di alterazioni metaboliche nelle donne in TOS (70). Anche le donne in terapia ormonale anti estrogenica (es. tamoxifene) presentano una maggiore prevalenza e un aumentato rischio di progressione della NAFLD, che a sua volta peggiora la sopravvivenza nelle pazienti con tumore della mammella (24), ma anche in questo caso gli effetti negativi sembrano essere associati alla presenza di sovrappeso e/o obesità e delle componenti della sindrome metabolica (71). Diversi studi su modelli animali hanno descritto i meccanismi alla base dell'accumulo di lipidi nel fegato di topi ovariectomizzati (72) e dimostrato gli effetti diretti degli estrogeni esogeni sul metabolismo lipidico (73). È stato individuato il ruolo centrale dell'ER α nella flessibilità metabolica del fegato in risposta alle variabili richieste energetiche legate alla riproduzione, che potrebbe contribuire alla diversa risposta ad una dieta ad alto contenuto lipidico nei due sessi in un modello murino (74). Inoltre è stato dimostrato il ruolo della carenza degli estrogeni sull'accelerazione della progressione della fibrosi epatica, probabilmente conseguente alla perdita delle sue azioni antinfiammatorie, antiossidanti e antiapoptotiche (75,76). In un modello di zebrafish sottoposto ad un regime di sovralimentazione, la senescenza ovarica facilita sia lo sviluppo di steatosi epatica sia la progressione fibrotica (77). Tra le donne in postmenopausa con NAFLD, la menopausa precoce e una maggiore durata della carenza di estrogeni sembrano essere associate alla gravità della fibrosi epatica, indipendentemente dalla TOS, dall'età, dalle alterazioni metaboliche, dal consumo di alcol e dall'abitudine al fumo di sigaretta (78). Studi sia in vitro che in vivo hanno confermato il ruolo della somministrazione dell'estradiolo nell'inibire la produzione spontanea di citochine pro-infiammatorie (IL-6 e TNF α) e la proliferazione delle cellule stellate epatiche (79). Queste evidenze

supportano il ruolo protettivo degli estrogeni nella progressione della NAFLD attraverso numerosi e complessi meccanismi mentre l'ipoestrogenismo e la perdita degli effetti sulla regolazione del metabolismo epatico e sul controllo dell'infiammazione potrebbero spiegare la suscettibilità alla NAFLD e alla sua progressione nelle donne in postmenopausa ma i potenziali meccanismi non sono ancora del tutto chiari (80).

Una recente revisione di 60 studi epidemiologici, clinici e sperimentali ha confermato che il rischio di sviluppare NAFLD aumenta nelle donne dopo la menopausa, e questo sembra essere attribuibile principalmente alla perdita della protezione da parte degli estrogeni, ma sottolinea la necessità di una maggiore comprensione di tutte quelle condizioni, tra cui le alterazioni metaboliche, le diete ad alto contenuto di grassi e/o di fruttosio e la sedentarietà che ne predispongono l'insorgenza per individuare un fenotipo a rischio e attuare strategie di prevenzione (81).

2.3 Fattori metabolici

Non tutti gli autori concordano sulla menopausa come fattore di rischio di NAFLD di per sé. In un ampio studio italiano la maggiore prevalenza della steatosi epatica nelle donne in postmenopausa rispetto a quelle in età fertile non era associata alla durata della menopausa ma all'adiposità, in particolare quella centrale, tipica dell'età e alle sue conseguenze metaboliche sfavorevoli (82). Altri autori hanno mostrato l'associazione tra NAFLD e alterazioni metaboliche, che seppur differenti nelle donne in premenopausa rispetto a quelle in menopausa, in entrambi i casi erano connesse all'obesità centrale e all'insulino-resistenza, sottolineando l'importante ruolo di questi fattori nella patogenesi della NAFLD, indipendentemente dallo stato riproduttivo.

In particolare nelle donne in menopausa il diabete, la trigliceridemia elevata e l'obesità centrale hanno mostrato un'associazione significativa con il rischio di NAFLD (83). Conseguentemente alla carenza di estrogeni, e al relativo aumento dei livelli degli androgeni, durante la transizione menopausale si assiste ad una ridistribuzione del grasso corporeo, ad una modifica del profilo lipidico in senso aterogeno (riduzione del colesterolo HDL, aumento delle LDL piccole e dense e dei trigliceridi) e ad aumento dei livelli di glucosio e di insulina, con un aumento della prevalenza della sindrome metabolica indipendentemente dall'età (84). Gli estrogeni e l'espressione dei loro recettori contribuiscono alla regolazione del bilancio energetico (regolazione dell'appetito, del comportamento alimentare e del dispendio energetico), del metabolismo glucidico e dello sviluppo del tessuto adiposo, agendo a livello di tessuti e organi responsivi agli ormoni sessuali come cervello, tessuto adiposo, pancreas, fegato, muscolo scheletrico, tessuto osseo e sistema cardiovascolare (85).

Sebbene la carenza degli estrogeni possa alterare l'omeostasi energetica regolando i segnali di fame e sazietà e riducendo il metabolismo basale (86), l'incremento ponderale di per sé non sembra essere influenzato in maniera diretta da essi (87) e quindi non è ancora chiaro se l'aumentata prevalenza di sovrappeso e/o obesità nelle donne in menopausa, stimata intorno al 39% (88) sia da attribuire allo stato menopausale o ad altri fattori come l'età, l'etnia, il peso corporeo in premenopausa, l'esercizio fisico, il consumo di alcol, il livello di istruzione, la parità e la storia familiare di obesità (89). Dai dati di una recente metanalisi degli studi presenti in letteratura sembra che l'aumento della massa grassa totale durante la transizione menopausale sia da attribuire al processo di invecchiamento cronologico, mentre l'aumento della percentuale del tessuto adiposo viscerale e la riduzione di quella del tessuto adiposo

gluteo-femorale siano indicativi dei cambiamenti nella composizione corporea conseguente al calo dei livelli degli estrogeni e al relativo aumento di quelli del testosterone (90). Tra le azioni dell'estradiolo ci sono infatti la stimolazione dell'attività della lipoproteina lipasi (LPL) negli adipociti femorali e della lipolisi negli adipociti addominali, di conseguenza l'ipoestrogenismo favorisce un maggiore accumulo di grasso a livello addominale. Questi cambiamenti nel deposito di grasso viscerale, che rappresenta mediamente il 5%–8% del grasso corporeo totale durante il periodo riproduttivo e il 15%–20% in quello menopausale, sono stati ampiamente dimostrati da studi che hanno utilizzato metodiche per la valutazione della composizione corporea come la DEXA (raggi X a doppia-energia ad assorbimento) o la tomografia computerizzata e risonanza magnetica (91).

Il grasso viscerale (VAT) è metabolicamente molto attivo e gli FFA e il glicerolo derivanti dalla lipolisi vengo rilasciati nel circolo portale e arrivano al fegato dove tendono ad accumularsi in vescicole. Con l'aumento del grasso viscerale in menopausa aumenta l'apporto di FFA e DAG ad un fegato, in cui il metabolismo lipidico è alterato (riduzione della β -ossidazione, aumento della sintesi lipidica e dell'adipogenesi epatica) in seguito alla carenza di estrogeni, con conseguente sviluppo di steatosi epatica e resistenza insulinica (92).

L'obesità, in particolare quella viscerale, è associata non solo a IR sistemica e alla dislipidemia ma anche ad uno stato infiammatorio sistemico di basso grado conseguente al rilascio da parte del VAT di citochine pro-infiammatorie (TNF alfa, IL-6, IL-1, proteina C reattiva, resistina e fattore di crescita dell'endotelio vascolare, VEGF) e alla riduzione dei livelli di adiponectina. Questo favorisce la perossidazione lipidica e il danno ossidativo (93).

Il passaggio da un pattern ginoide (distribuzione del grasso periferica, a livello dei glutei e fianchi) ad uno androide (distribuzione del grasso centrale, addominale) è alla base delle alterazioni metaboliche tipiche della sindrome metabolica e quindi della sua aumentata incidenza nelle donne in postmenopausa che varia dal 32.6 al 41.5%. La sindrome metabolica è caratterizzata nella donna dalla presenza di almeno 3 di 5 criteri: circonferenza vita ≥ 80 cm (caucasici); pressione arteriosa $\geq 130/85$ o in terapia antipertensiva; glicemia a digiuno ≥ 100 mg/dl (5,6 mmol/l) o in terapia per DM2; trigliceridi >150 mg/dl (>1.7 mmol/l), colesterolo HDL <50 mg/dl (<1.3 mmol/l) (94). Risulta chiaro che oltre alle malattie cardiovascolari e al diabete mellito di tipo 2, la sindrome metabolica aumenta il rischio di steatosi epatica non alcolica e della sua progressione (95).

Alcuni autori hanno individuato come fattori di rischio indipendenti di NAFLD comuni sia nelle donne in pre- che in postmenopausa l'eccesso ponderale e la SM, ma nello stesso tempo osservato che il numero delle donne che soddisfaceva i criteri per la sindrome metabolica era maggiore nel secondo gruppo (96). Altri hanno evidenziato una mancanza di associazione tra la menopausa precoce e il rischio di NAFLD (97) e solo pochi studi hanno dimostrato un effetto benefico della terapia ormonale sostitutiva sulla NAFLD, che nella maggior parte dei casi erano sui fattori metabolici ad essa associati (81). Questi dati, insieme all'evidenza che nei soggetti lean-NAFLD (senza sovrappeso o obesità) l'adiposità addominale è indipendentemente associata allo sviluppo di steatosi/steatoepatite e alla più recente che tra questi pazienti quelli di sesso femminile sono più suscettibili alla SM rispetto a quelli di sesso maschile (98,99), suggeriscono che l'adiposità centrale e l'IR possano essere i principali fattori legati allo sviluppo di NAFLD nelle donne in postmenopausa. Senza sottovalutare gli altri

fattori, come i cambiamenti delle abitudini alimentari e/o dei regimi dietetici scorretti, la tendenza alla sedentarietà e i loro cambiamenti con l'età in questa delicata fase della vita di una donna. La menopausa è infatti associata ad una riduzione del metabolismo basale e dell'attività fisica. Con l'invecchiamento si assiste alla diminuzione delle prestazioni fisiche, con riduzione della forza e della potenza muscolare, che sembra avvenire più rapidamente nelle donne di media età ed è probabilmente associato ai cambiamenti ormonali della menopausa (100). Il calo degli ormoni sessuali causa la perdita di massa e funzione muscolare favorendo la sarcopenia; il deficit di estradiolo è associato a riduzione della massa muscolare totale, della massa muscolare appendicolare e dell'area di sezione trasversa delle fibre muscolari, indipendente dall'invecchiamento fisiologico. Questi effetti, che sono probabilmente dovuti alla perdita del loro effetto inibitorio sul catabolismo proteico, sembrano essere correlati alla durata della menopausa. Tuttavia gli studi sul ruolo della terapia ormonale sostitutiva sulla prevenzione della perdita della massa muscolare hanno mostrato risultati contrastanti (101,102). Diversi studi trasversali hanno dimostrato che una riduzione della massa muscolare, sia in termini quantitativi che qualitativi, possa contribuire all'insorgenza della NAFLD e un recente studio prospettico Europeo ne ha dimostrato anche l'associazione con il rischio di progressione della steatosi epatica non alcolica (103). Inizialmente tra le possibili spiegazioni c'erano il fatto che un'alta percentuale di massa muscolare si associa ad un metabolismo basale (104) e un dispendio energetico più elevati e che la perdita della massa muscolare induce IR. L'insulina regola l'assorbimento del glucosio periferico a livello del muscolo scheletrico, la compromissione della sua funzione contribuisce notevolmente allo sviluppo dell'insulino-resistenza. Un ridotto uptake del glucosio e la

conseguente riduzione della glicogenosintesi a livello del tessuto muscolare causano un aumento della lipogenesi epatica, che a sua volta induce IR che si traduce in una mancata inibizione della proteolisi e riduzione della sintesi proteica, generando un circolo vizioso (105). Ad oggi molteplici e complessi sono i meccanismi che sembrano regolare la relazione tra massa muscolare scheletrica, tessuto adiposo e steatosi epatica e numerose le molecole che ne prendono parte (106). In particolare le miochine, molecole prodotte dal fegato con funzioni autocrine, paracrine ed endocrine, che regolano non solo il metabolismo del muscolo scheletrico ma esercitano differenti effetti biologici nel cross-talk fra organi deputati al mantenimento dell'omeostasi glicometabolica (107). Uno studio condotto nelle donne in post-menopausa, ha documentato un'associazione tra la gravità della NAFLD e la riduzione della massa e della forza muscolare indipendentemente dall'IR, nonostante le evidenze che suggeriscono una maggiore sensibilità del tessuto muscolare all'azione dell'insulina nel sesso femminile. Pertanto gli autori hanno ipotizzato una possibile relazione tra l'inattività fisica e l'alterato rilascio di miochine da parte del muscolo alla base dell'associazione con la NAFLD in questa specifica popolazione (108). Contrariamente un ampio studio cinese ha dimostrato che nelle donne in menopausa non solo la massa grassa ma anche la massa magra è associata in maniera indipendente alla sindrome metabolica, dopo l'aggiustamento per età, sesso, abitudine al fumo, attività fisica, farmaci e storia familiare. Tra le possibili spiegazioni l'accumulo di lipidi intramiocellulari e intermiocellulari nelle donne con IR e la secrezione da parte del muscolo di IL-18, citochina ad azione proaterogena e diabetogena (109).

Alla luce dei cambiamenti della composizione corporea, in termini di massa magra e massa grassa e della loro ridistribuzione, e delle

ripercussioni sulle varie componenti della SM, appare fondamentale una accurata valutazione nelle donne in menopausa, al fine di individuare i soggetti a rischio e di attuare strategie di prevenzione e cura volte a ridurre la morbilità e la mortalità associata NAFLD e ai fattori di rischio cardiometabolici (110).

2.4 NAFLD, menopausa e complicanze cardiovascolari

Un crescente numero di evidenze conferma l'associazione tra NAFLD e l'aumentata incidenza e prevalenza di malattia cardiovascolare (CVD), in particolare coronarica, cerebrovascolare e vascolare periferica (111,112). La NAFLD sembra essere un forte predittore indipendente di CVD in entrambi i sessi e si associa ad una maggiore gravità degli eventi e ad una peggiore prognosi (113,114,115). Oltre al maggior rischio di ipertensione e di aterosclerosi coronarica e carotidea, i pazienti NAFLD presentano anche un rischio maggiore di malattia renale cronica e di altre complicanze cardiache (ad esempio, sclerosi della valvola aortica, disfunzione/ipertrofia cardiaca, insufficienza cardiaca congestizia e fibrillazione atriale) (116). Ad oggi i meccanismi alla base di questa associazione non sono completamente compresi, vari fattori biochimici e fisiologici che vanno dall'infiammazione sistemica, alla disfunzione endoteliale, alla dislipidemia e alle alterazioni del metabolismo del glucosio possono precipitare entrambe le condizioni (117). Attualmente, nell'associazione NAFLD-CVD, oltre all'accumulo di grasso in sedi ectopiche (cuore e rene), studi sperimentali attribuiscono un ruolo ad una varietà di mediatori proinfiammatori, procoagulanti e profibrogenici rilasciati dal fegato steatosico (118), alle alterazioni del microbiota intestinale e a fattori genetici ed epigenetici (119).

Anche la menopausa sembra rappresentare di per sé un fattore di rischio cardiovascolare. Dai dati dello studio Framingham emerge una minore incidenza di CVD nelle donne prima dei 45 anni rispetto agli uomini di pari età. Le differenze si riducono dopo la menopausa con un aumento dell'incidenza nel sesso femminile, pertanto le patologie cardiovascolari nel sesso femminile si manifestano circa 10 anni dopo rispetto a quello maschile, con manifestazioni cliniche differenti e con una prognosi peggiore. Tali differenze sembrano essere alla base dei più elevati tassi di mortalità nelle donne (120). Il deficit di estrogeni svolge un ruolo importante nel processo di aterogenesi per la perdita sia dei loro effetti protettivi diretti sull'endotelio sia di quelli indiretti su fattori vasoattivi, proinfiammatori, metabolici e sul sistema di coagulazione; tuttavia i dati derivanti da ampi trials clinici non hanno evidenziato alcun effetto favorevole della terapia estrogenica sulla funzione endoteliale e sugli outcomes clinici (121). E nonostante il rischio di sviluppare malattia coronarica sia correlato all'età della menopausa e risulti maggiore nelle donne con menopausa precoce, cioè insorta prima dei 40 anni, questa associazione è evidente soltanto prima dei 60 anni (122); quindi ad oggi non è ancora chiaro se la transizione menopausale possa aggravare il processo aterosclerotico indipendentemente dal fisiologico processo di invecchiamento e dalle modificazioni metaboliche (123).

Recentemente diverse società scientifiche hanno evidenziato il divario di genere esistente non solo in ambito di ricerca, ma anche in quello clinico e terapeutico ed espresso la necessità di focalizzarsi sulla prevenzione delle malattie cardiovascolari nella donna, soprattutto dopo la cessazione del periodo riproduttivo (124,125). In particolare nella dichiarazione scientifica dell'American Heart Association viene inserita la NAFLD tra i cambiamenti metabolici che si possono

verificare durante la transizione menopausale e che hanno un impatto sul rischio cardiovascolare e pertanto vanno riconosciuti, monitorati, trattati e quando possibile prevenuti (126). La steatosi epatica non alcolica sembra associata alla perdita della protezione dalle malattie cardiovascolari conferita dal sesso femminile in età fertile. Uno studio ha mostrato un rischio simile di CVD nelle donne e uomini con NAFLD, a differenza delle donne della popolazione generale, che hanno mostrato il 29% in meno di probabilità di sviluppare CVD (infarto del miocardio, angina e stroke) rispetto ai maschi della stessa età. Inoltre, le donne NAFLD sviluppano CVD in età più giovane rispetto alle donne della popolazione generale e presentano tassi di mortalità più elevata (127). Nelle donne dopo i 50 anni, si verifica un rapido ispessimento della tonaca muscolare della parete vascolare con fibrosi del tessuto connettivo. La NAFLD è stata individuata come fattore di rischio indipendente di aterosclerosi carotidea subclinica, in quanto si associa ad un aumento dello spessore medio-intimale carotideo (IMT), del contenuto di calcio coronarico e della rigidità o stiffness della parete arteriosa, ma solo nel sesso femminile (128). Una recente metanalisi dei dati presenti in letteratura ha confermato una maggiore incidenza e prevalenza di eventi cardiovascolari e di mortalità sia per cause cardiovascolari che per tutte le cause nelle donne con NAFLD rispetto agli uomini. Anche l'invecchiamento (a partire dai 42 anni) nel sesso femminile sembra essere associato ad un tasso di mortalità più elevato. Infine gli autori hanno anche evidenziato la disparità di genere nei dati raccolti nella maggior parte delle pubblicazioni prese in esame (129). In un unico studio condotto in donne in post-menopausa, si è osservata una correlazione significativa tra steatosi epatica non alcolica e la prevalenza di calcificazione delle arterie coronariche, che aumenta con il grado di severità della NAFLD

ma che sembra essere per lo più legata all'IR (130). La sindrome metabolica determina un incremento del 35% della mortalità per tutte le cause, del 53% per patologie cardiovascolari, del 52% per patologia coronarica e del 76% per ictus cerebrali. Il rischio relativo di patologie cardiovascolari associato alla sindrome metabolica risulta più elevato nelle donne rispetto agli uomini (131), rispettivamente del 78% vs 63% (132). L'aumento del rischio cardiovascolare non è correlato soltanto alla SM, ma aumenta proporzionalmente in presenza di due o più delle sue componenti (133). La NAFLD può aumentare il rischio di ipertensione e pre-ipertensione e insieme possono potenziare il rischio di CVD (134). La presenza e la gravità della NAFLD sono associate bidirezionalmente all'ipertensione arteriosa, indipendentemente dalla presenza di altri fattori di rischio cardiometabolici. Diverse sono le ipotesi patogenetiche proposte che comprendono le alterazioni metaboliche e il rilascio di molecole ad azione proinfiammatoria e ossidante che causano IR, infiammazione sistemica, stress ossidativo, l'attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS) e del sistema nervoso simpatico (SNS), l'accumulo di grasso ectopico (a livello perivascolare e del seno renale) ed effetti diretti sul sistema vascolare, tramite la regolazione della funzione dell'ossido nitrico sintasi (NOS) e aumento della rigidità arteriosa (135).

In altri studi i livelli di PA sono risultati più elevati anche in soggetti con NAFLD non ipertesi (136) e in alcuni casi i livelli di pressione arteriosa sistolica (SBP) o pressione arteriosa diastolica (DBP) avevano una stretta relazione con la presenza di SM, con la glicemia a digiuno, l'uricemia, la trigliceridemia e la colesterolemia sia totale che LDL (137). In un ampio studio Wang e coll. hanno trovato un'associazione diretta tra i valori di pressione arteriosa media e

l'incidenza di NAFLD nelle donne non obese con normali livelli plasmatici di colesterolo LDL ma non negli uomini (138).

Uno studio recente ha individuato nel sesso femminile livelli più elevati di biomarkers cardiometabolici associati con l'adiposità e con aumento del rischio cardiovascolare (139). La composizione corporea sembra giocare un ruolo importante nelle differenze di genere delle complicanze cardiovascolari, l'adiposità viscerale nelle donne obese sembra essere associata alla presenza di fattori di rischio cardiometabolici, più che negli uomini (140). Un fenotipo caratterizzato da un maggiore accumulo di tessuto adiposo a livello gluteo-femorale sembra avere un ruolo protettivo solo nella donna, mentre una più alta percentuale di massa muscolare svolge un ruolo protettivo in entrambi i sessi (141). Inoltre la riduzione della forza muscolare è associata ad un aumento del rischio di CVD (142). La sarcopenia nei pazienti con NAFLD aumenta il rischio di mortalità per tutte le cause, ma soprattutto per cause cardiovascolari e il sesso femminile sembra essere un fattore predittivo indipendente di sarcopenia nei soggetti NAFLD, insieme all'età e alla sedentarietà (143). Diversi studi hanno evidenziato come una riduzione percentuale della massa muscolare sia correlata all'aumento dei valori pressori (144) e che la sarcopenia possa essere associata all'ipertensione (145) e all'aumento della stiffness arteriosa in donne diabetiche in menopausa (146).

Dopo la menopausa la presenza di NAFLD sembra associarsi in maniera indipendentemente ad una frequenza cardiaca a riposo più elevata, indicatore di un'alterazione della funzione del sistema nervoso autonomo e riconosciuto come predittore di mortalità cardiovascolare (147). Anche la presenza di sintomi vasomotori moderati o severi è associata ad un aumentato spessore medio-intimale carotideo (IMT) e

a un maggiore rischio di CVD (148,149). Uno studio coreano ha dimostrato come la presenza di sintomi vasomotori moderati o severi sia associata alla steatosi epatica non alcolica e alla sua gravità, indipendentemente da età, obesità e IR (150). Ad oggi non sono del tutto chiari i meccanismi alla base dell'aumentato rischio cardiovascolare nei soggetti con NAFLD. Soprattutto sono pochi i dati disponibili nelle donne in menopausa e pertanto dovrebbero essere condotti studi mirati per accertare se la NAFLD sia un fattore di rischio cardiovascolare specifico/indipendente in questa popolazione di soggetti.

Capitolo 3

DIAGNOSI E TRATTAMENTO DELLA NAFLD

3.1 NAFLD e sua diagnosi

La maggior parte dei pazienti con NAFLD sono asintomatici o paucisintomatici (astenia e dolenzia in corrispondenza del quadrante addominale superiore destro) e spesso viene identificata casualmente quando il soggetto effettua degli accertamenti per altra causa per riscontro di aumentati livelli degli indici di citolisi epatica o di steatosi epatica ad un'ecografia eseguita per altri motivi (151).

Le linee guida congiunte EASL–EASD–EASO (European association for the study of the liver, European association for the study of Diabetes and European Association for the Study of Obesity) per la diagnosi, il trattamento e il follow up dei pazienti NAFLD suggeriscono di sottoporre questi soggetti ad una valutazione iniziale volta ad escludere il consumo di alcol (nella popolazione femminile < 20 g/die) e le cause secondarie di steatosi epatica ad indagare la familiarità e la presenza di comorbidità come diabete, ipertensione e CVD (152). Numerose possono essere le cause di steatosi epatica secondaria come alcune epatopatie ad eziologia virale (HBV e HCV), ad eziologia autoimmune, l'emocromatosi, la malattia di Wilson o il deficit di alfa 1 AT ma anche patologie sistemiche (malattie infiammatorie intestinali, malattia celiaca, tireopatie, PCOS, OSAS, ipopituitarismo o ipogonadismo) o genetiche (ipobetalipoproteinemia, lipodistrofie familiari e acquisite, sindrome di Turner, fibrosi cistica). Esistono inoltre cause nutrizionali (nutrizione parenterale totale, resezione intestinale estesa, by-pass digiuno-ileale) e iatrogene (glucocorticoidi, amiodarone, metotrexate etc).

Altrettanto importante è un dettagliato esame obiettivo con rilevazione dei parametri antropometrici (peso, altezza, il calcolo del BMI, della circonferenza vita) e di eventuali variazioni del peso corporeo (152). Una lieve o moderata epatomegalia è il più comune reperto obiettivo. I pazienti con NAFLD possono presentare iperlipidemia, iperglicemia e iperinsulinemia ma non esistono markers biumorali specifici, nei quadri meno severi si può osservare un incostante e moderato incremento nei livelli delle transaminasi (1-2 volte al di sopra del range di normalità) con un rapporto AST/ALT tipicamente <1 (153). I livelli di alanina aminotransferasi (ALT) sono generalmente maggiori di quelli di aspartato aminotransferasi (AST) mentre quelli di γ -glutamiltanspeptidasi (γ GT) possono essere 3 volte al di sopra del range di normalità. Queste alterazioni possono correlare con la severità del danno epatico che tuttavia può essere significativo anche nei casi di normalità biochimica (154). Elevati livelli di γ GT e l'inversione del rapporto AST/ALT possono essere indicatori di prognosi sfavorevole, suggerendo una fibrosi iniziale o avanzata che si associa a danno mitocondriale (155,156).

I pazienti con NAFLD possono presentare valori aumentati della ferritinemia, con saturazione della transferrina spesso normale, che aumenta il rischio di insulino-resistenza e diabete mellito di tipo 2 (157,158). Nei pazienti con NAFLD lo screening per la SM e il DM2 sono fondamentali per cui va eseguito il dosaggio della glicemia basale o dell'emoglobina glicata (HbA1c) e nei soggetti ad alto rischio un test da carico orale di glucosio. In alternativa la valutazione della sensibilità all'insulina può essere stimata mediante indici surrogati come l'Homeostatic Model of Insulin Resistance (HOMA-IR-), indice derivato da glicemia e insulinemia a digiuno (152).

Recenti studi hanno dimostrato che l'indice Trigliceridi-Glicemico (TyG), basato sui valori di glicemia e trigliceridi, riflette il controllo glicemico ed è buon predittore della resistenza all'insulina. L'indice correla sia con HOMA-IR sia con il clamp euglicemico-iperinsulinemico (153). Nei pazienti con riscontro di steatosi va indagato inoltre il profilo lipidico, che presenta tipicamente elevati livelli sierici di trigliceridi e colesterolo LDL e bassi valori di colesterolo HDL (152).

Il gold standard per la diagnosi di NAFLD è la biopsia epatica, in quanto è la tecnica più sensibile e specifica ed in grado di fornire informazioni di tipo prognostico. Tuttavia è una procedura invasiva, con una scarsa accettabilità da parte dei pazienti che in rari casi può indurre complicanze anche gravi ed è soggetta ad altre limitazioni come gli errori di campionamento. Alla luce dei dati epidemiologici sottoporre tutti i pazienti con NAFLD a valutazione biotipica risulterebbe impraticabile e molto costoso. Per questo negli ultimi decenni notevoli passi avanti sono stati compiuti nella ricerca di metodi diagnostici non invasivi (159). La presenza di steatosi può essere valutata attraverso differenti tecniche di imaging come l'ecografia, la tomografia computerizzata (TC), la risonanza magnetica e la spettroscopia protonica di risonanza magnetica (HMRS), che è attualmente considerata la tecnica di imaging più accurata ma come le altre non è in grado di rilevare l'infiammazione (NASH), che in termini prognostici risulta più importante. Anche il Fibroscan (elastografia epatica), una metodica diagnostica validata per quantificare la fibrosi epatica nei pazienti con epatite virale cronica ed epatopatia alcolica, sembra essere utile anche se meno accurata nella rilevazione della steatosi e della fibrosi lieve (160).

Le linee guida indicano l'ecografia epatica come l'indagine di prima linea per la diagnosi di steatosi epatica, essendo una metodica non invasiva, disponibile su larga scala ed economica. I limiti sono nella scarsa accuratezza nel rilevare steatosi quando l'accumulo di grasso interessa meno del 20% degli epatociti o negli individui con BMI >40 kg/mq e nella riproducibilità, in quanto è una metodica operatore-dipendente (152). L'ecografia epatica ha una sensibilità del 79.7%, che aumenta con l'aumentare del grado di steatosi, e una specificità del 86.2%. Il fegato steatosico, definito brillante ("bright liver"), presenta un'ecogenicità maggiore rispetto alla corticale midollare del rene e al parenchima splenico a causa dell'accumulo di vacuoli di grasso intracellulari, con maggiore riflessione delle onde acustiche (160). I dati ecografici mostrati in B-mode (scala di grigi) consentono di indentificare 3 diversi gradi di steatosi in base all'ecogenicità, alle differenze tra ecogenicità del parenchima epatico e della corteccia renale e alla definizione delle strutture vascolari sia portali che sovraepatiche e del diaframma. Nella steatosi lieve (Grado 1) c'è un incremento della ecogenicità del parenchima epatico quando messa a confronto con quella del rene; nella steatosi moderata (Grado 2) l'incremento della ecogenicità del parenchima epatico è associato ad attenuazione del fascio in profondità e non risultano distinguibili le strutture vascolari mentre il diaframma risulta ancora ben visibile lungo il contorno profondo del fegato. Nella steatosi severa (Grado 3) l'ecogenicità è marcatamente aumentata e associata ad attenuazione posteriore tale da non rendere visibili la biforcazione portale, le strutture vascolari e il diaframma. Recentemente sono stati introdotti dei parametri ecografici quantitativi della steatosi epatica per ottenere una stadiazione più precisa. Tra questi l'Attenuation Imaging

Technology (ATI), un'applicazione dell'ecografo Aplio i800 Canon Medical System capace di stimare il coefficiente di attenuazione degli ultrasuoni nei tessuti e che viene visualizzato in una mappa a colori 2-D sovrapposta all'immagine ecografica B-mode corrispondente. Una volta definita la regione di interesse (ROI), il grado di attenuazione del segnale ultrasonoro è codificato a colori con colori blu chiaro che si mescolano a tonalità arancioni in caso di elevata attenuazione e il coefficiente di attenuazione è calcolato in decibel per centimetro per megahertz (dB/cm/MHz), filtrando i vasi o i forti artefatti (161). Alcuni recenti studi hanno confermato l'affidabilità di questa tecnica nella rilevazione e nella quantificazione della steatosi epatica, comparandola alla biopsia epatica o ad altre tecniche di imaging (162,163). ATI permette di quantificare numericamente il grado di steatosi epatica, valori di $ATI < 0,63$ escludono la presenza di steatosi (S0), ATI tra 63-70 indica un grado di steatosi lieve (S1), $ATI > 0,70$ un grado di steatosi moderato (S2) e $ATI > 0,75$ un grado di steatosi severa (164).

Anche il Controlled Attenuation Parameter (CAP) è un parametro di attenuazione misurato tramite Fibroscan, espresso in decibel per metro (dB/m) e permette la quantificazione e la stadiazione della steatosi epatica, anche se in maniera meno precisa rispetto alle altre tecniche poiché sembra essere influenzato dalla presenza di diabete e dal BMI. I cutoff sono risultati essere 248 dB/m, 268 dB/m e 280 dB/m ad indicare rispettivamente steatosi lieve, moderata e severa (160). Le linee guida dell'Associazione Italiana per lo Studio del Fegato (AISF), della Società Italiana di Diabetologia (SID) e della Società Italiana dell'Obesità (SIO) lo suggeriscono come strumento alternativo per la valutazione non invasiva e il follow up della steatosi, nonostante la necessità di ulteriori studi (168).

Infine ogni volta che gli strumenti di imaging non sono disponibili o fattibili (ad es. ampi studi epidemiologici) le linee guida raccomandano l'utilizzo di biomarcatori sierici e degli score, ormai validati in ampie popolazioni, come alternativa accettabile per la diagnosi di steatosi (152). Numerosi score esistono per facilitare la diagnosi di NAFLD. Tra questi il Fatty Liver Index (FLI) un semplice algoritmo, elaborato da Bedogni e coll. sulla base dei dati dello studio Dionysos, per la determinazione di steatosi epatica nella popolazione generale. L'algoritmo si basa sui valori di BMI, circonferenza vita, trigliceridi e γ GT e genera un punteggio che varia da 0 a 100. Un FLI <30 esclude la presenza di un fegato grasso e un FLI ≥ 60 è associato a steatosi. L'accuratezza diagnostica del FLI è di 0.84 (0.81-0.87). La probabilità stimata di avere un fegato grasso con un FLI >60 è del 78%, mentre con un FLI <30 è del 9% (165). Ad oggi numerosi studi ne hanno confermato l'utilità non solo nell'identificazione della steatosi nei soggetti ad alto rischio ma anche nel predire il rischio di SM, DM2 e CVD. Sembra inoltre essere associato al rischio di malattia renale cronica e di alcuni tumori e alla mortalità per tutte le cause (166). Un ampio studio coreano ha confermato il suo valore predittivo nelle donne in menopausa ne raccomanda l'utilizzo in questa specifica popolazione (183). Altri punteggi possono essere utilizzati per stimare il rischio di fibrosi, tra questi il NAFLD fibrosis score (NFS), il Fibrosis 4 Index (FIB-4), l'Enhanced Liver Fibrosis (ELF) e il Fibrotest (154). Secondo linee guida i soggetti con FIB-4 >1.30 dovrebbero essere sottoposti alla misurazione della stiffness epatica mediante elastografia transitoria come test di triage per escludere la presenza di fibrosi (168).

3.2 NAFLD O MAFLD?

Recentemente un gruppo di esperti ha proposto di superare l'attuale nomenclatura NAFLD e di adottare l'acronimo MAFLD (Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease) per identificare una condizione di steatosi epatica associata ad alterazioni metaboliche sistemiche (12). La proposta mira a superare l'attuale diagnosi di esclusione per passare ad una inclusiva che sottolinea l'importanza dell'obesità, della sindrome metabolica e del diabete mellito di tipo 2 nello sviluppo e nella progressione della steatosi epatica. La diagnosi di MAFLD dovrebbe basarsi sulla presenza di steatosi epatica (definita con tecniche di imaging, biopsia epatica, scores o biomarkers) associata a sovrappeso/obesità o a DM2 oppure alla presenza di almeno due alterazioni metaboliche tra: aumento della circonferenza vita, aumento della pressione arteriosa, elevati livelli di trigliceridemia o di proteina C reattiva (PCR), bassi livelli di HDL, alterata glicemia a digiuno o presenza di insulino-resistenza (12).

Nella nuova diagnosi di MAFLD possono essere inclusi anche quei pazienti con steatosi epatica di altra eziologia (epatiti virali croniche B e C o altre epatopatie croniche) e quelli non obesi e non diabetici nei quali la presenza di fegato grasso si accompagna a quella di almeno due alterazioni metaboliche (169,170). Permette inoltre di superare le criticità sull'assunzione di alcol e sui livelli di consumo emerse negli anni, che tuttavia rappresenta uno dei fattori di rischio di progressione malattia (171). Un ampio studio ha inoltre dimostrato che l'utilizzo dei criteri per la definizione di MAFLD aiuti ad identificare i pazienti con steatosi ad alto rischio di progressione, in quanto rispetto a quelli con NAFLD presentano un BMI più elevato, comorbidità, alterazioni metaboliche e livelli di enzimi epatici più elevati (172). La nuova

definizione, ponendo l'accento sull'eziopatogenesi metabolica non solo facilita la diagnosi ma sottolinea la necessità di nuovi approcci in ambito terapeutico e di ricerca.

3.3 NAFLD e ruolo dell'alimentazione nella prevenzione e nella terapia

Stili di vita non salutari svolgono un ruolo importante nella patogenesi della NAFLD. La sua crescente prevalenza e progressione è correlata al parallelo incremento dell'invecchiamento della popolazione generale e dell'obesità. Il progressivo e ubiquitario cambiamento dello stile di vita degli ultimi decenni, abitudini alimentari scorrette e sedentarietà hanno influenzato in modo significativo l'epidemiologia di tali patologie. Non essendo disponibile ad oggi una terapia farmacologica standardizzata per i pazienti con NAFLD, il trattamento è basato sulle modifiche dello stile di vita tra cui la perdita di peso, i cambiamenti nella dieta e l'aumento dell'attività fisica (173).

3.3.1 Alimentazione come concausa

I dati presenti in letteratura suggeriscono l'associazione della steatosi epatica non alcolica con vari gruppi di alimenti e con pattern dietetici, tuttavia non permettono di definire in maniera univoca le abitudini alimentari associate al rischio di sviluppare NAFLD. La Western diet, tipica dei paesi Occidentali, è legata ad un rischio elevato di steatosi epatica e obesità poiché è caratterizzata da elevato consumo di carni processate, pane bianco, cereali raffinati, bibite e dolci che oltre a fornire un eccessivo apporto calorico, contengono zuccheri semplici, come il fruttosio e grassi saturi e trans e sodio. La Western diet è associata ad aumento dei livelli di glicemia e insulinemia postprandiali,

della lipogenesi de novo a livello epatico e ha effetti proinfiammatori e ossidanti (174).

L'eccessivo apporto di calorie associato allo stile di vita sedentario e il conseguente aumento del peso corporeo (anche solo di 3-5 kg), sembrano essere i principali fattori di rischio per lo sviluppo di NAFLD, indipendentemente dal BMI di partenza (175). Alcuni autori hanno dimostrato nei pazienti con NAFLD un introito calorico giornaliero significativamente più elevato rispetto ai controlli sani e solo deboli associazioni tra le differenze nella composizione in macronutrienti della dieta (176). L'iperalimentazione è strettamente connessa allo sviluppo di steatosi epatica e può indurre significativi aumenti dei livelli di ALT già dopo quattro settimane (177) e un aumentato rischio di progressione. Un apporto calorico costantemente elevato causa obesità e quindi contribuisce a IR e all'accumulo intraepatico di trigliceridi attraverso differenti meccanismi. Un bilancio energetico positivo porta ad espansione del tessuto adiposo sottocutaneo, ma il superamento della sua capacità massima di accumulare lipidi predispone alla deposizione in sede ectopica, in particolare a livello del tessuto adiposo viscerale, fegato, muscolo, pancreas e muscolo cardiaco con conseguente sviluppo di lipotossicità e insulino-resistenza (178). Nei soggetti con ridotta capacità del tessuto adiposo sottocutaneo di accumulare lipidi anche piccoli incrementi della massa corporea sono associati a IR e steatosi epatica (179).

Contrariamente altri studi hanno riscontrato un apporto energetico simile nei soggetti con NAFLD rispetto alla popolazione sana ma con notevoli differenze nella composizione della dieta (180), caratterizzata da eccessivo consumo di grassi, in particolare saturi (SFA), da ridotta assunzione di fibre e di alimenti contenenti ω 3 (181) e/o da assunzione

in eccesso di carboidrati raffinati e zuccheri semplici, soprattutto di fruttosio (182).

Gli acidi grassi saturi e il colesterolo introdotti con la dieta inducono aumento dei trigliceridi intraepatici (TG) e insulino-resistenza indipendentemente da peso corporeo. Nei regimi di dieta isocalorici un eccesso di grassi, in particolare SFA si associa all'accumulo di TG a livello epatico, mentre diete ricche di acidi grassi monoinsaturi (MUFA) o polinsaturi (PUFA) tendono a diminuire i TG. Questo sembra dipendere dagli effetti potenzialmente lipotossici degli SFA, capaci di indurre disfunzione mitocondriale, stress del reticolo endoplasmatico e stress ossidativo. Diverse le ipotesi sui meccanismi alla base di questi effetti tra cui alterazioni del metabolismo dei fosfolipidi e la regolazione di geni lipogenici. Mentre l'accumulo di metaboliti intermedi del metabolismo lipidico (DAG e acetilcarnitine) sembrano essere alla base dell'insulino-resistenza e del processo infiammatorio (183). In uno studio condotto su donne di età media la somministrazione di una dieta isocalorica ad alto contenuto di grassi per due settimane ha portato ad un incremento del grasso epatico e dell'insulina basale, non associati a cambiamenti del tessuto adiposo viscerale e sottocutaneo (184). Come visto in precedenza il calo degli estrogeni potrebbe avere effetti sul metabolismo epatico dei lipidi ed essere legato ad un aumento dell'accumulo di TG a livello epatico in risposta ad una dieta ricca di grassi (80) ma ad oggi sono pochi gli studi che hanno indagato gli effetti nelle donne in menopausa.

Numerosi studi hanno esaminato l'impatto dell'assunzione di zuccheri semplici, in particolare glucosio e fruttosio sull'accumulo di TG a livello epatico e sulle alterazioni metaboliche ad essa associate. Un eccessivo consumo di zuccheri semplici porta ad aumentato accumulo di grasso epatico in un tempo relativamente breve e in maniera

indipendente dall'aumento del peso corporeo. Questo sembra essere legato ad un aumento della DNL epatica indotto da un eccessivo consumo di carboidrati, che generalmente si associa ad incremento del tessuto adiposo viscerale e che sembra riflettersi nei valori ematici di trigliceridi e di VLDL, più che in quelli di glicemia, insulina e degli indici di sensibilità insulinica (185).

Il consumo eccessivo di fruttosio è associato a steatosi, in quanto promuove la lipogenesi come substrato e come attivatore della DNL (186). Inoltre promuove la progressione verso la NASH e la fibrosi, inducendo stress ossidativo e del reticolo endoplasmatico, infiammazione e promuovendo la secrezione di lipidi, epatochine e acido urico che portano ad alterazioni delle funzioni intestinali, muscolari e del tessuto adiposo (187). Alcuni autori hanno riportato che un modello alimentare caratterizzato da eccessiva assunzione di frutta, dolci, bevande e snack zuccherati quindi ad alto contenuto di fruttosio, sembra essere positivamente associato allo sviluppo di NAFLD solo nel sesso femminile (188).

Minori sono le evidenze sugli effetti delle proteine della dieta sul rischio di sviluppare steatosi epatica, nonostante la Western diet sia caratterizzata da un eccessivo consumo di proteine di origine animale, soprattutto carne rossa. In un recente studio è emerso che i soggetti con steatosi epatica o con NASH, assumono una quota percentuale di proteine significativamente maggiore rispetto ai controlli sani (18% vs 15.8%), e gli effetti potrebbero essere legati alla diversa composizione amminoacidica e alle modificazioni indotte sulla flora microbica intestinale (189).

Infine lo sviluppo e il rischio di progressione di NAFLD si associa al deficit di colina. La colina è un componente essenziale delle membrane cellulari ed è necessaria per la sintesi dei fosfolipidi e per il trasporto di VLDL dal fegato nel circolo ematico. La sua carenza inibisce l'efflusso di TG dal fegato con conseguente accumulo (190). Gli estrogeni svolgono un ruolo fondamentale nel metabolismo di questa amina, quindi con la menopausa si ha una maggiore suscettibilità alla sua carenza (191).

Ad oggi non sono molti gli studi che hanno investigato la relazione tra rischio di NAFLD nella popolazione adulta, soprattutto donne in menopausa e pattern dietetici, intesi come modelli specifici di alimentazione, che permettono di ottenere un quadro più completo della dieta seguita rispetto all'analisi dei singoli micro- e macro-nutrienti, e grazie alla loro facilità di interpretazione, possono essere utili a fini educazionali e di intervento in ambito nutrizionale (192).

3.3.2 Alimentazione come terapia

Poiché non esiste una terapia farmacologica standardizzata attualmente disponibile per i pazienti con NAFLD, la correzione dello stile di vita e delle abitudini alimentari è ad oggi la strategia più efficace per prevenire o ridurre la progressione della steatosi verso la steatoepatite. Le linee guida congiunte EASL–EASD–EASO per la gestione della NAFLD raccomandano in primis una restrizione calorica (500-1000 kcal/die) associata ad un aumento dell'attività fisica al fine di ottenere un calo ponderale del 7-10% in quanto la riduzione del peso corporeo di per sé può portare alla riduzione delle transaminasi e del grasso epatico, e al miglioramento istologico o addirittura alla regressione della NAFLD indipendentemente dalla modalità con cui è stata ottenuta (counselling nutrizionale, chirurgia bariatrica o trattamento

farmacologico) (152). Una recente metanalisi ha evidenziato gli effetti dose-risposta del calo ponderale sul miglioramento degli indicatori di steatosi epatica (biomarcatori ematici, come ALT e AST parametri radiologici e istologici) nei soggetti con NAFLD nel breve e medio termine. Tuttavia essendo le evidenze a lungo termine limitate, e considerato che il recupero del peso è comune dopo il completamento di un programma di calo ponderale, gli autori sottolineano la necessità di ulteriori studi (193). In un trial randomizzato la metà dei soggetti con NAFLD non obesi ha raggiunto la remissione con una riduzione del peso del 3-5% mentre nei pazienti obesi è stata ottenuta con un calo ponderale del 7-10% (194). Gli interventi sullo stile di vita finalizzati al calo ponderale sono associati anche a miglioramento e/o risoluzione della NASH e miglioramento della fibrosi (195).

Nelle donne in menopausa un calo ponderale modesto (di circa 3-4 kg) e mantenuto nel tempo può avere effetti favorevoli sul profilo metabolico, la (dislipidemia e tolleranza glucidica) e sulla pressione arteriosa (196). La perdita di peso clinicamente significativa è molto più difficile da raggiungere nelle donne in perimenopausa a causa di diversi fattori (caratteristiche metaboliche, cliniche e fattori psicologici) (197); pertanto le raccomandazioni comunemente rivolte alla popolazione generale per la gestione del peso e della salute metabolica potrebbero non avere gli stessi benefici (198). Inoltre il calo ponderale in questa specifica popolazione richiede un'attenzione particolare per la possibile accelerata perdita di massa magra sia a livello muscolo-scheletrico che osseo, che potrebbe facilitare l'osteoporosi e, quindi, un declino della funzione fisica. Pertanto è importante associare l'esercizio fisico volto a mantenere la forza muscolare (199). Ad oggi esistono pochi dati in letteratura sugli effetti dei vari pattern alimentari sulla

perdita di peso e sulla composizione corporea nelle donne in postmenopausa (200).

Un acceso dibattito in letteratura esiste anche sul pattern alimentare che dovrebbe essere adottato nei pazienti con NAFLD. Le linee guida congiunte EASL–EASD–EASO suggeriscono un pattern alimentare definito come dieta mediterranea (evidenza B1) alla luce delle evidenze presenti in letteratura sull'associazione tra aderenza a questo pattern e una maggiore riduzione del grasso epatico, anche se non accompagnata da perdita di peso, rispetto ad una dieta a basso contenuto di grassi e ricca in carboidrati; anche se sottolineano la necessità di ulteriori studi (154). La dieta mediterranea (DM) (caratterizzata da un elevato consumo di alimenti di origine vegetale poco raffinati, da olio d'oliva come principale fonte di grassi, da basso a moderato consumo di prodotti lattiero-caseari, di pesce, di pollame e di vino e da basso consumo di carne rossa) ha effetti benefici sull'obesità addominale, sul profilo lipidico, sul metabolismo del glucosio e sui livelli di pressione arteriosa, cioè tutte le componenti della SM, che sono fattori di rischio per lo sviluppo di NAFLD e malattie cardiovascolari oltre ad essere associata ad una riduzione della mortalità e morbilità totale e cardiovascolare (201). Oltre agli effetti favorevoli sulla composizione corporea, il potenziale effetto della DM sulla riduzione dello sviluppo e della progressione della NAFLD è principalmente attribuito all'azione antinfiammatoria e antiossidante di alcuni dei suoi componenti come le fibre, gli acidi grassi monoinsaturi, gli omega 3 e i fitosteroli. I polifenoli e gli acidi grassi monoinsaturi contenuti nella frutta e verdura e nell'olio d'oliva, sembrano inibire la DNL e migliorare la sensibilità periferica all'insulina, principalmente attraverso i loro effetti antiossidanti, antinfiammatori e antifibrotici (202,203). L'apporto di PUFA omega-3 derivato dal consumo di pesce e frutti di mare sembra

ridurre l'accumulo di lipidi epatici, i livelli degli enzimi epatici e la resistenza all'insulina, oltre ad avere effetti antinfiammatori (204). Infine recenti evidenze suggeriscono la capacità della DM di esercitare i suoi effetti benefici sul controllo del peso e sulla sensibilità insulinica attraverso la modulazione del microbiota intestinale (205). Tuttavia, l'efficacia dei modelli dietetici esistenti, come la dieta mediterranea, l'approccio DASH, una dieta a basso contenuto di grassi o una dieta a ridotto contenuto di carboidrati, non è stata completamente studiata nelle donne in post-menopausa in relazione all'insorgenza della NAFLD e la progressione in NASH.

Capitolo 4

PROTOCOLLO DI STUDIO

4.1 Obiettivi dello studio

Questo studio che ha come obiettivo principale quello di valutare i cambiamenti avvenuti nell'arco di sei mesi nelle abitudini alimentari delle donne in menopausa e la loro possibile associazione con la progressione della NAFLD, con le modifiche della composizione corporea e dei parametri metabolici. Questo studio è stato svolto nell'ambito del più ampio studio CAR-PREDIME (studio sulla prevenzione cardiovascolare in menopausa con la dieta) che ha come obiettivo primario quello di quantificare le modificazioni cardiometaboliche che si possono osservare nelle donne in menopausa al termine di un intervento dietetico della durata di 24 mesi, finalizzato alla riduzione del rischio cardiovascolare in questa particolare categoria di soggetti. Tra gli endpoint secondari rientrano la valutazione a posteriori dell'aderenza ai diversi pattern dietetici, e la verifica di eventuali variazioni dell'incidenza di steatosi epatica non alcolica, ipertensione arteriosa e altri fattori di rischio cardiometabolici. Inoltre, questo studio permetterà di individuare sia gli specifici pattern che le abitudini alimentari a priori delle donne in menopausa e di identificare la loro possibile associazione con obesità, composizione corporea, attività fisica, NAFLD, fattori di rischio cardiometabolico e aterosclerosi subclinica. La composizione in macro- e micro- nutrienti degli alimenti, la frequenza, il tempo e il numero di pasti al giorno e la proporzione di calorie per pasto saranno valutati come potenziali fattori predittivi indipendenti di rischio di NAFLD. Lo scopo finale dello studio è quello di poter identificare i modelli dietetici errati che determinano un aumento del rischio cardiometabolico e di ottenere dati utili all'individuazione di possibili linee di indirizzo e di intervento

rivolte a promuovere la prevenzione delle malattie cardiovascolari nelle donne in menopausa.

4.2 Materiali e metodi

4.2.1 Criteri di inclusione ed esclusione

Lo studio CARPREDIME prevede l'arruolamento mediante adesione spontanea oppure in seguito ad una prima visita presso l'Ambulatorio del rischio cardiovascolare dell'UOC di Dietetica e Nutrizione Clinica dell'Azienda Ospedale – Università di Padova diretta dal Prof. Paolo Spinella, di donne in menopausa, la loro assegnazione ad uno schema dietetico e regolari follow up trimestrali, il tutto per 24 mesi, con protocollo identico alla visita di arruolamento eccetto per gli esami bioumorali e l'ecografia epatica che vengono eseguiti ogni sei mesi. Sono incluse nello studio donne di età compresa tra i 30 e i 65 anni, con un indice di massa corporea (IMC) compreso tra 24 e 39 kg/m², che presentano almeno un fattore di rischio cardiovascolare e che al momento del reclutamento devono trovarsi in stato menopausale, sia fisiologico che chirurgico, secondo quanto definito dai criteri utilizzati nel Massachusetts Women's Healthy Study, ossia assenza di mestruazioni per almeno 12 mesi consecutivi associata a livelli sierici di FSH >25 mIU/ml e di estradiolo < 50 pg/ml (57).

I criteri di esclusione sono l'assunzione di terapia ormonale sostitutiva che può causare spotting impedendo una chiara definizione circa l'insorgenza della menopausa, uno stato menopausale che non può essere determinato con precisione per chemioterapia e/o radioterapia, la presenza di malattie cardiovascolari ed epatiche di grado avanzato, di insufficienza renale cronica o di neoplasia attiva, la diagnosi di

depressione o disturbi del comportamento alimentare e problemi gastrointestinali che impedirebbero ai soggetti di seguire uno schema dietetico. Anche le donne con obesità patologica ($BMI \geq 39$ kg/mq) sono escluse dallo studio, poiché questa condizione è di per sé un forte fattore di rischio di malattia cardiovascolare, che potrebbe oscurare le associazioni con covariate meno forti quali i pattern alimentari. Sono state inoltre escluse le donne che consumano più di 20 g/die di alcol, donne con steatosi secondaria ad epatopatie (epatite virale HBV e HCV, epatite autoimmune, malattia di Wilson, emocromatosi e deficit alfa1 AT, epatite da farmaci), donne con storia recente di nutrizione parenterale totale o di resezione intestinale estesa o by-pass digiunoileale, donne con patologie sistemiche quali malattie infiammatorie intestinali, malattia celiaca, sindrome nefrosica, tireopatie e patologie genetiche (ipobetalipoproteinemia, lipodistrofie familiari o acquisite e fibrosi cistica) per escludere cause di steatosi secondaria.

4.2.2 Protocollo di studio trasversale

La valutazione di rispondenza ai criteri di inclusione ed il reclutamento di ogni soggetto avviene in prima visita, durante la quale ogni donna in reclutata firma il consenso informato. Tutte le indagini sono condotte conformemente alla Dichiarazione di Helsinki (2006). Ogni soggetto è sottoposto ad un questionario dettagliato riguardante dati personali, stile di vita, fumo e abitudini voluttuarie, in particolare l'assunzione di alcol al momento dell'indagine e in passato (tipo di bevande alcoliche, modalità di consumo, durata dell'esposizione), qualità di vita, anamnesi familiare, anamnesi patologica prossima e remota per valutare la storia familiare e personale di diabete, ipertensione e malattie cardiovascolari, e anamnesi farmacologica per escludere cause secondarie di steatosi epatica. L'attività fisica è valutata mediante l'IPAQ (International

Physical Activity Questionnaire), questionario validato sulla quantità di tempo speso in attività fisiche ad alta e media intensità (minuti/settimana e giorni/settimana) (207). Dalle informazioni così raccolte, vengono calcolati, per ogni categoria di attività fisica, i MET (equivalenti metabolici, ossia min/settimana di quella specifica attività). In base al totale dei MET- minuti, le persone sono considerate inattive (categoria 1), moderatamente attive (categoria 2) e attive (categoria 3). L'anamnesi alimentare viene eseguita tramite un recall settimanale. Score dietetici validati sono utilizzati per valutare l'aderenza a diversi pattern. Il livello di aderenza al pattern "dieta mediterranea" (caratterizzata da un elevato consumo di alimenti di origine vegetale poco raffinati, da olio d'oliva come principale fonte di grassi, da basso a moderato consumo di prodotti lattiero-caseari, di pesce, di pollame e di vino e da basso consumo di carne rossa) si valuta tramite il questionario MEDAS utilizzato nello studio PREDIMED. È composto da 14 items a cui viene assegnato il punteggio di 1 se il criterio è soddisfatto oppure 0 se non soddisfatto. Un punteggio totale ≤ 5 indica una bassa aderenza, punteggi tra 6-9 moderata aderenza e valori ≥ 10 indicano un'aderenza elevata (208). Per valutare l'aderenza ad una dieta Low Fat viene somministrato un questionario quantitativo basato su 9 items, anche questo impiegato nello studio PREDIMED (209). Viene eseguita la visita medica comprensiva di valutazioni antropometriche e della composizione corporea, rilevamento dei parametri vitali, il test di forza, la valutazione e la definizione del grado di steatosi mediante tecniche di imaging. Per la valutazione dell'assetto metabolico sono richiesti esami bioumorali da eseguire a digiuno.

4.2.3 Protocollo di studio di intervento

Come previsto dal protocollo di studio le donne reclutate vengono suddivise in due gruppi in base alla presenza di NAFLD. Ad ognuna è assegnato uno schema dietetico ipocalorico equilibrato con indicazioni nutrizionali e consigli dietetici per favorire l'adesione allo schema ed il corretto suo utilizzo. Ogni partecipante dopo aver seguito la dieta assegnata per un periodo di 6 mesi viene rivalutata ad una visita di controllo ambulatoriale. In figura 1 sono riportate le indagini previste a al tempo 0 (T0) e a 6 mesi (T6).

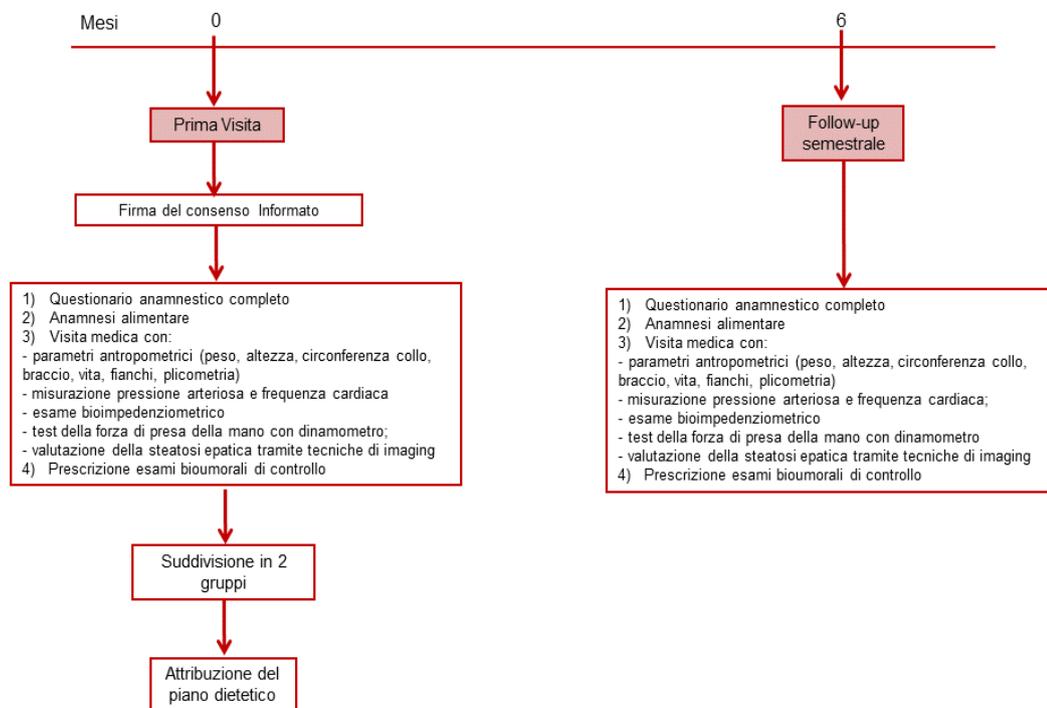


Figura 1. Schema riassuntivo ed esemplificativo del protocollo di studio.

Al T6 si aggiorna il questionario anamnestico, si somministra un questionario per la valutazione dell'attività fisica quotidiana (IPAQ: International Physical Activity Questionnaire), si eseguono un'anamnesi alimentare tramite recall settimanale e i questionari per la valutazione dell'aderenza ai diversi pattern dietetici (questionario di

aderenza dieta Mediterranea e questionario di aderenza dieta Low Fat). Si effettua una visita medica comprensiva della valutazione dei parametri antropometrici, della composizione corporea, del rilevamento dei parametri vitali e del test della forza. Infine vengono rivalutati la presenza e il grado di steatosi epatica tramite imaging e l'assetto metabolico.

4.2.4 Valutazioni antropometriche e valutazione della composizione corporea

L'antropometria comprende un insieme di tecniche non invasive utilizzate per la determinazione delle proporzioni, dimensioni e composizione corporee. Le misure antropometriche sono il peso, l'altezza, le circonferenze (vita, fianchi, arti e collo) e le pliche cutanee. La loro combinazione permette il calcolo degli indici antropometrici staturò-ponderali, di adiposità e di muscolarità.

Nel nostro studio il peso (in kg) è stato rilevato utilizzando una bilancia elettronica da un operatore posto di fronte al soggetto in biancheria intima. L'altezza (in m) è stata misurata con uno stadiometro, con il paziente in posizione eretta con il peso distribuito uniformemente, in biancheria intima e senza scarpe. Il piano ideale che passa tra il margine posteriore dell'orbita sinistra e il trago omolaterale (piano di Francoforte) era parallelo al pavimento e alla barra orizzontale dello stadiometro, le braccia lungo i fianchi con il palmo rivolto verso le cosce, i talloni e le ginocchia uniti, e i piedi a formare un angolo di 60°. L'indice di massa corporea (IMC) è stato calcolato (in kg/m²) dividendo il peso per il quadrato dell'altezza. I soggetti sono stati definiti obesi in presenza di un BMI ≥ 30 kg/m².

La rilevazione della circonferenza del collo (in cm) è avvenuta tramite l'applicazione da parte di un operatore di un metro subito al di sotto della prominente laringea, con la testa del paziente posizionata sul piano di Francoforte. La circonferenza del braccio (in cm) è stata misurata in corrispondenza del punto medio del muscolo tricipitale (punto medio di una linea tra margine laterale del processo coraco-acromiale della scapola e il margine inferiore del processo olecranonico dell'ulna) con il soggetto in posizione eretta e il braccio lungo il fianco (210). Per la determinazione della misura della circonferenza vita (in cm) esistono diversi punti di repere. Secondo il protocollo WHO (World Health Organization) la misurazione deve essere effettuata nel punto medio tra il margine inferiore dell'ultima costa e quello superiore della cresta iliaca; mentre secondo il protocollo NIH (National Institute of Health) e dello studio NHANES III (National Health and Nutrition Examination Survey), si effettua posizionando il metro al di sopra della cresta iliaca. Mentre altri studi valutano la circonferenza nel punto più stretto della vita (211). Nel presente studio, la circonferenza vita (in cm) è stata misurata nel punto più stretto e la circonferenza fianchi (in cm) nel punto più largo, utilizzando un metro a nastro durante la respirazione normale nel soggetto in posizione eretta, con l'addome rilassato e scoperto, le braccia pendenti ai lati del corpo e con i piedi uniti. Sono stati calcolati il Waist to Hip Ratio (WHR) indice del rapporto tra circonferenza vita (in cm) e la circonferenza fianchi (in cm) che consente di identificare la distribuzione adiposa e il Waist-to-Height Ratio (WHtR) rapporto vita/altezza che si è calcolato dividendo la circonferenza vita (in cm) per l'altezza (in cm), utile per la previsione di obesità centrale se $\geq 0,5$. Il metabolismo basale (in kcal) è stato calcolato applicando la formula di Harris–Benedict validata nella donna

$[655,1 + (9,563 \times \text{peso in kg}) + (1,850 \times \text{altezza in cm}) - (4,676 \times \text{anni})]$
(212).

Le pliche cutanee, costituite da un doppio strato di cute e dal tessuto adiposo sottostante, possono essere misurate in diversi siti corporei, i più comuni sono a livello tricipitale, bicipitale, della cresta iliaca, della coscia, sottoscapolare, addominale, del torace con diverse tecniche di misurazione (211). In questo studio, le pliche tricipitale (punto medio del muscolo, in corrispondenza del punto di reperi della circonferenza del braccio), sottoscapolare (al margine inferiore della scapola, orientata 45° rispetto al piano orizzontale), soprailiaca (orientata 45° appena al di sopra della cresta iliaca in corrispondenza dell'intersezione fra linea ascellare anteriore e linea tra le creste iliache) e della coscia (in verticale nel punto medio della linea mediana anteriore della coscia fra inguine e bordo superiore della rotula) sono misurate in triplicato con un'approssimazione di 0.1 mm al lato sinistro del soggetto in posizione eretta con muscolatura rilassata utilizzando un plicometro Harpenden (Bedfordshire, UK) con una pressione di calibro di 0.01 kg/mm² ± 10% con un'apertura delle branche di 90 mm². Per ogni plica è stata calcolata la media (in mm) delle tre misurazioni. Successivamente è stata calcolata la densità corporea utilizzando l'equazione di Jackson-Pollock $[1.0994921 - (0.0009929 \times \text{SUM}) + (0.0000023 \times \text{SUM}^2) - (0.0001392 \times \text{età})]$, che nel sesso femminile si basa sulla somma (SUM) delle 3 pliche cutanee tricipitale, soprailiaca e della coscia (213). Applicando l'equazione di Siri, si è calcolata la percentuale di massa grassa (FAT) $[(4,95/\text{densità corporea}) - 4,50]$ che viene anche trasformata in massa grassa in kg $[\text{massa corporea (kg)} \times (\text{percentuale di grasso}/100)]$ (214). È stata ricavata infine la massa priva di grasso (kg) sottraendo la massa grassa (kg) alla massa corporea

totale (kg). L'obesità tronculare è stata definita come rapporto tra plica sottoscapolare e plica tricipitale >1.32 nel sesso femminile (215,216).

Esistono differenti tecniche di valutazione della composizione corporea, tra queste l'assorbimetria dei raggi X a doppia energia (DEXA – Dual Energy X-Ray Absorptiometry), la tomografia computerizzata (CT), la risonanza magnetica (MRI), la bioimpedenziometria (BIA - Bioelectrical Impedance Analysis) (217) e la bioimpedenziometria vettoriale (BIVA - Bioelectrical Impedance Vector Analysis) (218). La DEXA, la CT e la MRI risultano essere molto precise nella determinazione dei compartimenti corporei, ma sono costose, richiedono preparazione specifica degli operatori ed espongono il paziente ai raggi X (DEXA e CT). La BIA e la BIVA possono essere delle valide alternative alle altre modalità di indagine per il miglior rapporto costo/beneficio, per la loro facile applicabilità ambulatoriale e velocità di esecuzione che consentono la ripetibilità durante i follow up (217,218).

La bioimpedenziometria misura l'impedenza delle strutture biologiche, cioè la loro capacità di offrire resistenza al passaggio di una corrente (800 μ A) ad una frequenza prefissata (50 kHz) e dipende quindi dalle proprietà elettriche dei tessuti. L'esame permette di valutare lo stato di idratazione e la massa-struttura dei tessuti molli e si esegue applicando quattro elettrodi, due in posizione metacarpale e due a livello metatarsale, i quali attraversati da una corrente alternata, permettono la rilevazione di due parametri detti resistenza (R_z) e reattanza (X_c). La resistenza (in Ohm) è la capacità dei tessuti di opporsi al passaggio di una corrente elettrica ed è inversamente proporzionale al contenuto idrico mentre la reattanza, o resistenza capacitativa, è la forza che si oppone al passaggio di una corrente elettrica a causa di una capacità (condensatore) ed è una misura indiretta delle membrane cellulari

integre e rappresentative della massa cellulare. Dalla loro relazione si ricava l'Angolo di fase (PA) un importante indice non solo di integrità delle membrane cellulari, di funzione cellulare e del rapporto dei liquidi extracellulari ed intracellulari (ECW/ICW) ma anche dello stato nutrizionale, della mortalità e verosimilmente alla qualità e alla quantità del tessuto muscolare (219). Inoltre la Rx e la Xc, insieme ad età, sesso e peso del soggetto, vengono successivamente utilizzati all'interno di equazioni predittive capaci di stimare il valore della FFM (217). Utilizzando la BIVA l'impedenza (z) viene tracciata come un vettore delle sue componenti Rz (asse x) e Xc (asse y), dopo essere stati standardizzati per altezza. La pendenza vettoriale determina l'angolo di fase (PA). La rappresentazione sul grafico RXc, con le relative ellissi di tolleranza sesso ed etnia specifiche della popolazione di riferimento, consente di ottenere simultaneamente informazioni sulle variazioni della massa cellulare e dello stato di idratazione del soggetto, indipendentemente dal peso corporeo senza necessità di ricorrere a formule predittive in assenza di vincoli o assunzioni sull'idratazione come nella BIA (220). In questo studio lo stato di idratazione, la composizione corporea e le loro variazioni sono state stimate utilizzando la bioimpedenziometria vettoriale. L'esame è stato eseguito sul soggetto in posizione supina con gli arti leggermente divaricati a 30-45°, a digiuno, con la vescica vuota ed adeguatamente idratato. Lo strumento è stato adeguatamente calibrato prima dell'utilizzo e gli elettrodi in buono stato di conservazione sono stati posizionati sul corpo del soggetto dopo un'adeguata pulizia della zona di applicazione con alcol. La temperatura ambientale era compresa tra i 24 e i 34°C per non determinare vasocostrizione o vasodilatazione nell'organismo del soggetto, che possono alterare il valore dell'impedenza (217).

4.2.5 Valutazione dei parametri vitali

La misurazione della pressione arteriosa (PA) è stata effettuata con sfigmomanometro elettronico da braccio AND (modello UA-767 Plus, A&D Company, Tokyo, Japan) validato dalla British Hypertension Society (A/A grading) (221) e basato sulla metodica oscillometrica (rilevazione dell'onda sfigmica). Sono stati misurati i valori pressori utilizzando un adeguato bracciale (12-13 cm di altezza x 24 cm di lunghezza per circonferenza braccio entro 31 cm, e 15x35 cm per circonferenza >32 cm) posizionato a livello del cuore. Il centro della camera gonfiabile del bracciale è stato posizionato al di sopra del polso dell'arteria brachiale nella fossa antecubitale con il suo bordo inferiore a 2-3 cm sopra la fossa antecubitale e con una tenuta moderata sovrapponibile sia nella parte superiore che inferiore (222). La misurazione è stata eseguita in posizione seduta, in clinostatismo e in ortostatismo in pazienti a digiuno, che non avevano assunto caffeina, fumato sigarette ed eseguito attività fisica nei 30 minuti precedenti la misurazione. Al tempo 0 la prima misurazione della PA sistolica e diastolica è stata ottenuta in entrambe le braccia per poi continuare le seguenti rilevazioni nel braccio in cui la pressione era maggiore. Le misurazioni sono state effettuate in triplicato ed è stata considerata la media delle misurazioni ai fini dell'analisi, per ridurre al minimo gli effetti da camice bianco. Anche la frequenza cardiaca (in battiti per minuto, bpm) e la sua ritmicità a livello del polso radiale sono state rilevate tre volte per poi calcolare la media.

4.2.6 Valutazione della forza muscolare

La forza isometrica massima dell'arto superiore è stata valutata con l'handgrip strenght test (HST) mediante l'utilizzo di un dinamometro. Il soggetto in posizione seduta, con la schiena appoggiata ad uno

schienale, spalle addotte e ruotate in modo neutro, gomito flesso a 90°, avambraccio in posizione neutra e polso tra 0 e 30° di dorsiflessione viene invitato a stringere con la massima forza possibile il dinamometro digitale che registra le variazioni di forza e le quantifica (51). Il test è stato eseguito per ogni lato a partire dall'emilato dominante in triplicato per poi calcolare la media delle misurazioni.

4.2.7 Esami laboratoristici e strumentali

Sono stati eseguiti dosaggi bioumorali a digiuno sia a T0 che a T6 comprensivi di emocromo con formula, ALT, AST, gGT, ferritina, ferro, colesterolo totale, HDL e LDL, trigliceridi, glucosio, insulina, emoglobina glicata, acido urico, creatinina con eGFR, sodio, potassio, calcio, fosforo, magnesio, vitamina D, TSH, FSH e LH. Per ogni soggetto sono stati calcolati le lipoproteine a bassa densità (LDL) (in mg/dL) con la seguente formula di Friedewald (224) [*colesterolo totale (mg/dL) – HDL (mg/dL) - (trigliceridi (mg/dL)/5)*]. La stima della resistenza all'insulina è calcolata con il metodo “Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance – HOMA-IR” che si basa su un modello matematico che considera la glicemia e l'insulinemia a digiuno [*glucosio a digiuno (mg/dl) x insulinemia a digiuno (mg/dl) / 405*] (225). Valori >2,5 indicano soggetti insulino resistenti. Un nuovo indicatore di IR molto sensibile e correlato con patologie metaboliche e cardiovascolari è l'indice trigliceridi-glucosio. Il TyG secondo la formula [*Ln[fasting triglycerides(mg/dL) × fasting glucose(mg/dL)/2]*] è stato calcolato facendo prima il logaritmo del prodotto tra trigliceridi e glicemia e poi dividendo per due. Il valore finale dovrebbe rimanere inferiore 4.5 per essere considerato nella norma (226).

La presenza di steatosi epatica è stata rilevata tramite tecniche di imaging (ecografia epatica o fibroscan). Inoltre è stata valutata la

presenza di alterazioni degli enzimi epatici (ALT, AST e γ GT) ed è stato calcolato il rapporto AST/ALT, indice di danno epatico e solitamente <1 nella NAFLD. Infine sono stati calcolati il Fatty Liver Index (FLI) secondo la formula $FLI = [e^{0.953 \cdot \log_e(\text{trigliceridemia}) + 0.139 \cdot BMI + 0.718 \cdot \log_e(\gamma GT) + 0.053 \cdot \text{circonferenza vita} - 15.745} / (1 + e^{0.953 \cdot \log_e(\text{trigliceridemia}) + 0.139 \cdot BMI + 0.718 \cdot \log_e(\gamma GT) + 0.053 \cdot \text{circonferenza vita} - 15.745}) * 100]$. Il valore di taglio di 60 di FLI predice la presenza di steatosi epatica (specificità dell'86%) (165) e il FIB-4, un markers surrogato di fibrosi secondo la formula $[Et\grave{a} (\text{anni}) \times AST (U/L) / [PLT(10^9/L) \times ALT^{1/2} (U/L)]]$, dove punteggi >2,67 indicano un'elevata probabilità di fibrosi epatica avanzata (227).

In un sottogruppo di pazienti, in base alla disponibilità dei devices dedicati (ecografo apparecchio Aplio i800 Canon Medical System con sonda Convex i8CX1 con preset Abdominal) presso l'Ambulatorio di ecografia epato-splancnica della UOC Clinica Medica V, oltre alla valutazione morfologica del fegato e dell'ecogenicità del parenchima epatico in scala di grigi e la distinzione sulla base dei parametri ecografici in gradi per definire la severità della steatosi come lieve (grado 1), moderata (grado 2) e severa (grado 3) è stato misurato il valore di Attenuation Imaging (ATI) in dB/cm/MHz e il valore di stiffness epatica in kPa. Le misurazioni sono state eseguite a digiuno da almeno 6 ore tramite scansione intercostale destra obliqua. Per ottenere l'ATI durante l'esame è stato attivato il software su immagine B-mode con posizionamento del ROI a profondità massima di 7 cm evitando gli artefatti, e poi all'interno il box di 30x3x30 mm sono state eseguite tre rilevazioni ed è stata calcolata la media delle misurazioni (161). Valori di ATI <0,63 escludono la presenza di steatosi (S0), ATI tra 63-70 indica un grado di steatosi lieve (S1), ATI >0,70 un grado di steatosi moderato (S2) e ATI >0,75 un grado di steatosi severa. L'elastografia è stata eseguita utilizzando la tecnologia 2D shear wave di Canon

Medical System. Sono state eseguite tre rilevazioni a profondità massima di 7 cm e ed è stato utilizzato un rapporto intervallo interquartile/media (IQR/M) <30%. La quantificazione veniva con secondo valori di cutoff standardizzati per l'apparecchio utilizzato e il grado di fibrosi definito in base alla correlazione a score istologici di riferimento (F1: 7.1kPa, F2: 7.8kPa, F3 8.0 kPa e F4 11.5 kPa).

Nei soggetti a rischio di fibrosi (FIB-4 >1.30) (168) e in caso di difficile accesso all'ecografia è stata eseguita l'elastografia transiente (Fibroscan Expert 630) e si è ottenuta la misura quantitativa di attenuazione (CAP, parametro di attenuazione controllata in dB/m), che correla con la presenza di grasso steatosi e la misurazione della stiffness epatica (kPa) per la valutazione indiretta della rigidità del parenchima epatico. È stata eseguita in soggetti a digiuno da almeno 8 ore con una sonda (M per i pazienti normopeso e in sovrappeso o XL per i pazienti obesi) poggiata sulla parete toracica, tipicamente tra il nono e l'undicesimo spazio intercostale, la vibrazione genera onde di taglio la cui velocità viene rilevata ed elaborata da un calcolatore per ricavare una stima a livello di sezioni cilindriche di tessuto epatico di 4 cm di lunghezza e di 1 cm di diametro ad una profondità di 2,5 cm al di sotto della superficie cutanea. I valori di CAP 248 dB/m, 268 dB/m e 280 dB/m sono rispettivamente indicativi di steatosi epatica di grado I, II e III. L'elasticità (liver-Stiffness) normale ha uno score < a 5,1 kPa, uno score superiore a 7,6 kPa indica la presenza di fibrosi significativa (160).

4.2.8 Valutazione delle abitudini alimentari e schema dietetico

Il protocollo di studio CAR-PREDIME prevede la valutazione delle abitudini alimentari delle pazienti secondo tre differenti metodi: la storia dietetica, il questionario di frequenza di assunzione degli alimenti ed il diario alimentare settimanale. In questo studio la valutazione delle abitudini alimentari per ogni soggetto è stata raccolta tramite la storia dietetica che consente di valutare le abitudini alimentari delle pazienti permettendo di indagare non solo la tipologia, la frequenza e la quantità di cibo assunto, ma anche altri dettagli, come per esempio i metodi di preparazione utilizzati e la combinazione di alimenti nel pasto. È stata svolta in ambito ambulatoriale un'intervista in cui si indagano le abitudini sulla composizione dei diversi pasti della giornata, la tipologia, la qualità e la quantità di cibo assunto, la modalità di preparazione dello stesso, e la frequenza di assunzione in un tempo ideale di una settimana. Per quanto riguarda la corretta identificazione della quantità viene utilizzato l'atlante fotografico delle porzioni degli alimenti dell'Istituto Scotti Bassani. I dati raccolti sono stati elaborati utilizzando un software nutrizionale (Metadieta 4.5, Italia).

Una dieta ipocalorica nutrizionalmente bilanciata è stata consegnata a ciascuna donna in base al fabbisogno energetico, stimato sulla base del metabolismo basale e del livello di attività fisica. Il deficit calorico è di circa di 500-700 kcal/giorno rispetto al fabbisogno energetico totale stimato e in tutti casi è stato garantito il mantenimento di un'assunzione calorica nel tempo $\geq 110\%$ rispetto al metabolismo basale stimato. Ogni schema dietetico è suddiviso in cinque pasti giornalieri (colazione, pranzo, cena e due spuntini) con il peso degli alimenti espresso in grammi, sono riportate eventuali sostituzioni e indicate le frequenze di consumo per ciascun alimento. La composizione in macronutrienti

raccomandata dello schema dietetico è la seguente: carboidrati 49%, proteine 19% (di cui oltre il 50% da proteine di origine vegetale), grassi totali 32% (di cui grassi saturi inferiori al 7% e colesterolo inferiore a 300 mg al giorno) e 16 g di fibre per 1000 kcal. È stato inoltre consigliato di limitare l'assunzione di zuccheri semplici (bevande zuccherate, snack e il consumo di alcolici), degli alimenti processati e di consumare la carne rossa a non più di due volte a settimana e il pesce almeno due volte a settimana, e infine di evitare il consumo di sale aggiunto, preferendo l'utilizzo di erbe e spezie per insaporire i cibi. Al fine di garantire un adeguato apporto di calcio e il mantenimento della salute delle ossa, erano raccomandati un adeguato consumo di alimenti ricchi di calcio (latte e derivati, noci e semi, fagioli e verdure a foglia verde) oltre ad un allenamento aerobico minimo settimanale. Infine, veniva spiegata l'importanza di assumere quotidianamente almeno 2 litri di acqua. Tali diete sono state elaborate utilizzando un software nutrizionale (Metadieta 4.5, Italia).

4.3 Analisi statistica

Per la gestione del database e l'analisi statistica è stato utilizzato il software R Studio versione 4.1.3. I dati sulla composizione corporea e quelli relativi alla composizione alimentare (assunzione di energia; valori assoluti e percentuale di carboidrati, grassi e proteine) sono stati analizzati utilizzando il software Metadieta 4.5.

Dopo aver eseguito una sensitivity analysis si è svolta un'analisi descrittiva ed esplorativa dei dati. I risultati delle statistiche descrittive sono espressi come media \pm deviazione standard mentre come percentuale per le variabili categoriche. Tutte le variabili quantitative sono state testate per la distribuzione della normalità utilizzando il test di Kolmogorov-Smirnov. Per determinare se vi è una differenza significativa nelle medie delle misurazioni di variabili continue fra visita basale e rivalutazione a sei mesi, abbiamo utilizzato il t-test di Student per dati appaiati. Per tutte le analisi, un valore $p < 0.05$ basato su un test a due code è stato considerato statisticamente significativo. Per le variabili categoriche si è usato il test del Chi Quadro.

4.4 Risultati

Ad oggi il 76.9% (n=83) delle 108 donne in menopausa reclutate nel protocollo di studio CARPREDIME, è stato sottoposto alla valutazione della steatosi epatica mediante tecniche di imaging. Le caratteristiche generali delle pazienti reclutate sono riassunte nelle tabelle I e II, che mostrano i valori confrontati con quelli del campione preso in esame in questo studio. Nessuna delle variabili è risultata diversa nel sottogruppo sottoposto ad indagini strumentali per la diagnosi di NAFLD, e questo ci permette di affermare che il campione di 83 partecipanti analizzato non è difforme dal campione di 108 partecipanti arruolate. La scelta del campione è stata casuale ed è dipesa della disponibilità di devices dedicati in ragione dell'emergenza COVID 19.

La popolazione presa in esame è rappresentata da donne in menopausa con un'età media di 56.4 ± 4.6 anni, il 96.4% presenta menopausa spontanea con un'età media di insorgenza della menopausa di 51.7 ± 3.9 anni e il 6% ha seguito una terapia ormonale sostitutiva precedentemente all'arruolamento. Al momento della prima visita il BMI delle partecipanti è 29.4 ± 3.4 kg/m² (range 24-37.1 kg/m²) e il 41% sono obese (BMI > 30 mg/kg²). Il 90.4% presenta un'obesità addominale (circonferenza vita ≥ 80 cm) di cui il 57.4% con valori ≥ 88 cm e il 13.3% un'obesità troncolare (rapporto spessore plica sottoscapolare/spessore plica tricipitale ≥ 1.32). Dal punto di vista metabolico, il 14.5% dei soggetti presenta ipertrigliceridemia, il 26.5% intolleranza glucidica ed il 67.5% ipercolesterolemia (inclusi 23 partecipanti in terapia ipolipemizzante). La percentuale di ipertese è del 51.8% e di queste il 72.1% è in terapia anti-ipertensiva. I criteri per la definizione di sindrome metabolica (94) (obesità addominale, ipertrigliceridemia, bassi livelli di colesterolo HDL, ipertensione arteriosa, iperglicemia) risultano quindi soddisfatti nel 44.6% delle partecipanti. Il 62.7%

consuma alcolici con un introito medio di alcol di 3.5 g/die (range tra 0 e 18.2 g/die) e il 10.8% dichiara abitudine al fumo di sigaretta. Il 30.1% pratica regolarmente attività sportiva e dal questionario IPAQ emerge un'attività fisica complessiva media di 3609.8 METs-min a settimana. L'intake calorico giornaliero, stimato mediante il recall settimanale, risulta in media di 1540.2±280.2 kcal con un apporto glucidico del 45.5%, un apporto lipidico del 34.8% con valori di colesterolo alimentare medio giornaliero di circa 187.6 mg/die, apporto proteico del 19.3%, un apporto di fibra giornaliero di 21.4 g, e un introito giornaliero di fruttosio aggiunto di 9,4 g. Inoltre emerge una moderata aderenza alla Dieta Mediterranea valutato con il Mediterranean Dietary Score (MEDAS=6.8±1.5) (tabella II).

Nei casi indagati con tecniche non invasive di imaging (n=75 con ecografia e n=8 con valutazione del CAP tramite Fibroscan), si è osservato un quadro di steatosi epatica nel 66.3% al reclutamento. In particolare nei casi indagati ecograficamente si è osservato un quadro di steatosi epatica nel 62.7% (n=52) delle pazienti, e nei casi (n=47) in cui è stata eseguita una stadiazione sulla base dell'ecogenicità del fegato il 45% presenta una steatosi di grado I, il 34.5 % di grado II e il 10.9% di grado III. Mentre la totalità delle pazienti sottoposte a Fibroscan (n=8) presenta valori di CAP>248 dB/m (valori medi 279.5±29.4 dB/m) indicativi di steatosi epatica, nel 25% dei casi di grado 3 (CAP >280 Db/m). I valori medi di stiffness epatica sono simili nelle rilevazioni con entrambe con le metodiche utilizzate per l'elastografia, rispettivamente di 4.4 kPa con Shear Wave e di 5.3 kPa con Fibroscan, ed inferiori a 8 kPa, escludendo la presenza di fibrosi epatica.

All'analisi statistica stratificata per presenza di steatosi epatica (tabella III), le donne con NAFLD presentano un'età significativamente

maggiore rispetto a quelle senza NAFLD ma anche un'età alla menopausa più avanzata, con intervallo di tempo trascorso dalla menopausa all'arruolamento rispettivamente di 5 e 3.8 anni. Differenze significative sono state riscontrate anche percentuale dei soggetti che presentano sovrappeso/obesità, nella distribuzione delle classi di BMI, nella percentuale di soggetti con obesità addominale, con intolleranza glucidica e con sindrome metabolica. Nessuna differenza significativa nell'incidenza di ipertensione arteriosa ma nella percentuale delle donne ipertese che seguivano una terapia antipertensiva, maggiore in quelle con NAFLD (72.1% vs 50%). Nessuna differenza neanche nella percentuale dei pazienti con ipercolesterolemia e con livelli di HDL < 50 mg/dl (figura 2).

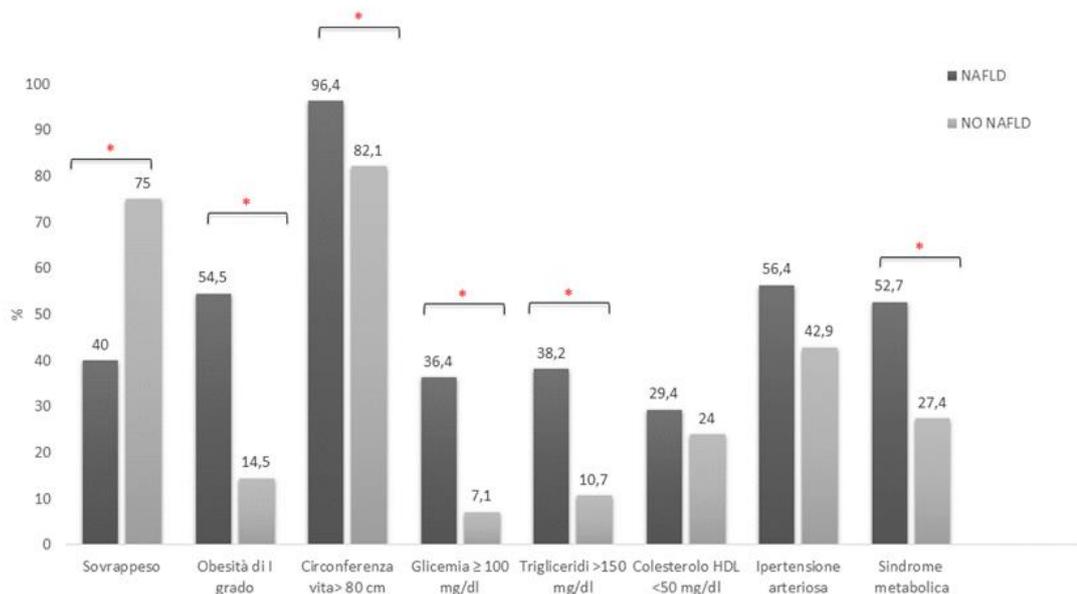


Figura 2. Percentuali di presenza di fattori di rischio cardiometabolici nelle partecipanti con e senza NAFLD (* $p \leq 0.03$).

Oltre al BMI e al peso ($\Delta = +5$ kg, $p = 0.04$) le donne in menopausa con NAFLD rispetto a quelle senza steatosi presentano valori significativamente maggiori di circonferenza vita ($\Delta = +8.5$ cm,

p=0.0001), di circonferenza collo ($\Delta=+1.2$ cm, p=0.02), di rapporto vita/fianchi ($\Delta=-0.05$, p<0.0001), di rapporto vita/altezza ($\Delta=-0.06$, p<0.0001), di spessore delle pliche sottoscapolare ($\Delta=+4.5$ mm, p=0.03) e sovrailiaca ($\Delta=+4.9$ mm, p=0.005). La composizione corporea delle partecipanti è stata valutata attraverso la plicometria e la bioimpedenziometria (BIA). I valori assoluti di massa magra (MM) ($\Delta=+2.9$ kg, p=0.03) così come quelli di massa grassa (MG) ($\Delta=+3.7$ kg, p=0.01) ottenuti con la plicometria sono risultati significativamente maggiori nelle donne con NAFLD rispetto alle altre. Vista la differenza di peso corporeo riscontrata tra i due gruppi si è analizzata la MM in termini percentuali che è risultata ridotta in modo significativo nelle donne con steatosi ($\Delta=-2.2\%$, p=0.05). Anche i valori percentuali di MM ottenuti con la BIA ($\Delta=-4\%$, p=0.05) confermano questo dato seppur con le ben note differenze ascrivibili alle metodiche di riferimento. Inoltre dalla BIA sono risultati valori di MG assoluti ($\Delta=+3.7$ kg, p=0.05) e percentuali maggiori ($\Delta=+4\%$, p=0.007) nelle donne con NAFLD (tabella IV). Non si sono osservate differenze nei valori di pressione arteriosa sistolica e diastolica e nella frequenza cardiaca (tabella V). Mentre differenze significative sono state riscontrate nei livelli di glicemia a digiuno ($\Delta=+5.6$ mg/dl, p<0.05), insulinemia a digiuno ($\Delta=+4.5$ uU/mL, p=0.001), emoglobina glicata ($\Delta=+2.4$ mmol/mol, p=0.01), trigliceridemia ($\Delta=+33.4$ mg/dl, p=0.008) e ALT ($\Delta=+7.7$ U/L, p=0.02) così come nei valori ottenuti dal rapporto AST/ALT ($\Delta=-0.24$, p=0.002). Allo stesso modo sia i valori calcolati di HOMA-IR ($\Delta=+1.3$, p=0.0002), Tyg Index ($\Delta=-0.2$, p=0.003) e di FLI ($\Delta=+26.8$, p=0.0001) sia la percentuale di soggetti con NAFLD che presentavano valori superiori ai cut-off per la determinazione

rispettivamente dell'IR/rischio cardiovascolare e della steatosi epatica (tabella V) sono maggiori nelle donne con NAFLD.

Infine, come riportato in tabella VI, fra le donne con NAFLD e quelle senza non si osservano differenze né negli introiti giornalieri di macronutrienti e micronutrienti, se non in quella dei carboidrati significativamente superiore nel secondo gruppo ($\Delta=+21.7$ g/die, $p=0.01$) che non corrisponde ad una differenza nella loro percentuale rispetto all'introito calorico giornaliero totale ma giustifica la differenza media di circa 80 kcal/die nei due gruppi.

4.4.1 Confronto in base all'indice ATI

Nel gruppo dei soggetti (n=46) sottoposti ad ecografia con apparecchio Aplio i800 Canon Medical System grazie alla tecnologia ATI è stato possibile quantificare la steatosi epatica. Nelle donne con NAFLD, ATI era significativamente maggiore ($\Delta=+0.21$ dB/cm/MHz, $p<0.0001$) che nelle donne senza NAFLD, con un valore medio di 0.76 ± 0.14 dB/cm/MHz. Nel 95.7% dei casi un ATI >0.63 corrisponde con la presenza di steatosi epatica valutata secondo l'ecogenicità, sono state escluse dalla successiva analisi le donne in cui non è stata trovata corrispondenza. Rispetto al grading basato sull'ecogenicità quello con ATI mostra una percentuale maggiore di donne con una steatosi di III grado ($\Delta=+15.9\%$, $p=0.03$). Andando a stratificare il campione per ATI >0.63 (tabelle VII e VIII), si sono confermate le differenze tra i due gruppi nei valori di BMI ($\Delta=+3.4$ kg/m², $p=0.007$), circonferenza vita ($\Delta=+10$ cm, $p=0.006$), circonferenza collo ($\Delta=+1.9$ cm, $p=0.03$), rapporto vita/fianchi ($\Delta=+0.05$, $p=0.02$), rapporto vita/altezza ($\Delta=+0.06$, $p=0.001$), spessore delle pliche sottoscapolare ($\Delta=+8.8$ mm, $p=0.02$) e sovrailiaca ($\Delta=+5.4$ mm, $p=0.01$); inoltre anche lo spessore delle pliche tricipitale ($\Delta=+3.2$ mm, $p=0.04$) e femorale ($\Delta=+6.7$ mm,

p=0.03) sono risultati maggiori nei soggetti con ATI>0.63 rispetto a quelle con ATI<0.63. Anche i valori assoluti ($\Delta=+7.4$ kg, p=0.005) e percentuali ($\Delta=+5.5\%$, p=0.01) di MG sono risultati maggiori nel gruppo con ATI>0.63, mentre ridotti quelli percentuali di MM ($\Delta=-5.5\%$, p=0.01). Anche le differenze dei valori percentuali di MM ottenuti con la BIA ($\Delta=-4.5\%$, p=0.04), di MG assoluti ($\Delta=+5.7$ kg, p=0.03) e percentuali ($\Delta=+3.5\%$, p=0.007) sono state confermate alla BIA nei soggetti con ATI>0.63. Come riportato in tabella IX si confermano anche le differenze significative riscontrate nei livelli di insulinemia a digiuno ($\Delta=+5.5$ uU/mL, p=0.0005), emoglobina glicata ($\Delta=+3.6$ mmol/mol, p=0.02), trigliceridemia ($\Delta=+34.3$ mg/dl, p=0.03) e di ALT ($\Delta=+6.8$ U/L, p=0.02). Allo stesso modo sia i valori calcolati di HOMA-IR, Tyg Index e di FLI sia la percentuale di soggetti con ATI>0.63 che presentavano valori superiori ai cut-off per la determinazione rispettivamente dell'IR/rischio cardiovascolare e della steatosi epatica. Interessante notare che rispetto alla stratificazione precedente, non solo la percentuale di coloro che presenta valori di FLI ≥ 60 è più elevata ma anche che nessuna delle pazienti con ATI <0.63 presenta valori di FLI ≥ 60 . Si sono confermate anche le differenze nell'introito giornaliero di carboidrati nei due gruppi che non corrisponde ad una differenza nella loro percentuale rispetto all'introito calorico giornaliero totale ma giustifica la differenza media di circa 150 kcal/die nei due gruppi (tabella IX).

4.4.2 Risultati dello studio di intervento

Ad oggi, 26 delle 55 partecipanti con NAFLD sono state rivalutate a distanza di 6 mesi. Nel 50% dei casi è stata osservata la risoluzione della steatosi epatica, il decremento significativo della percentuale di partecipanti che presentano steatosi di grado I ($\Delta=-26.8\%$, p=0.05) e la

riduzione percentuale di quelle con steatosi di grado II ($\Delta=-15.4\%$) e di grado III ($\Delta=-7.7\%$) (figura 3).

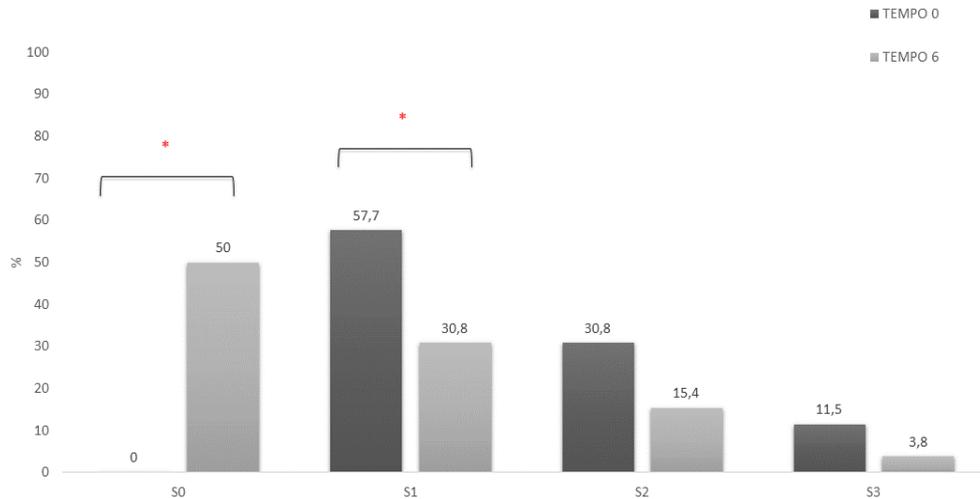


Figura 3. Percentuali di partecipanti con steatosi di grado 0 (S0), I (S1), II (S2) e III (S3) alla prima visita e al follow up a 6 mesi (* $p \leq 0.05$).

In una analisi statistica con t-test di Student per dati appaiati si è vista una riduzione non significativa del BMI ($\Delta=-1.3 \text{ kg/m}^2$, $p=0.2$) ma con variazione delle percentuali dei soggetti che presentavano normopeso, sovrappeso e obesità rispetto alla prima visita (figura 4).

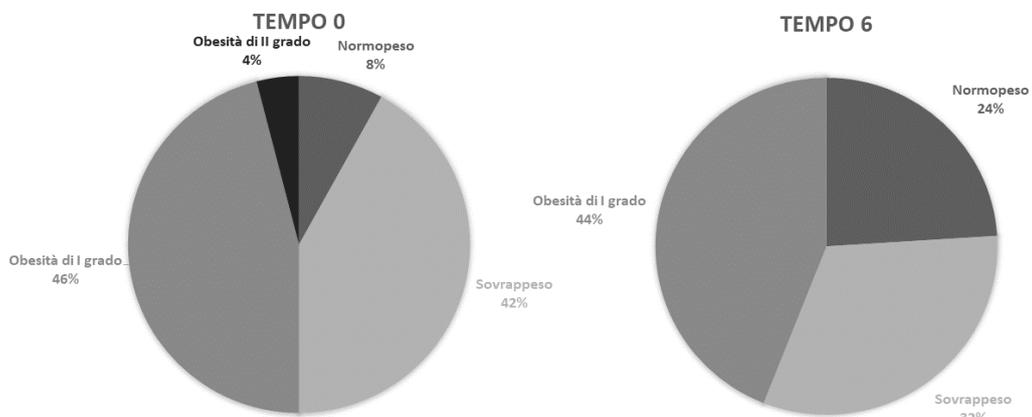


Figura 4. Distribuzione percentuale delle partecipanti in base a classi di BMI alla prima visita, a 6 mesi.

Il 77% (n=20) delle donne ha mostrato una riduzione del peso corporeo a T6 ($\Delta=-3.3$ kg, $p=0.3$). Nel 11.5% dei casi non si è osservata nessuna variazione e nel restante 11.5% un aumento $<3\%$ rispetto al peso iniziale (figura 5).

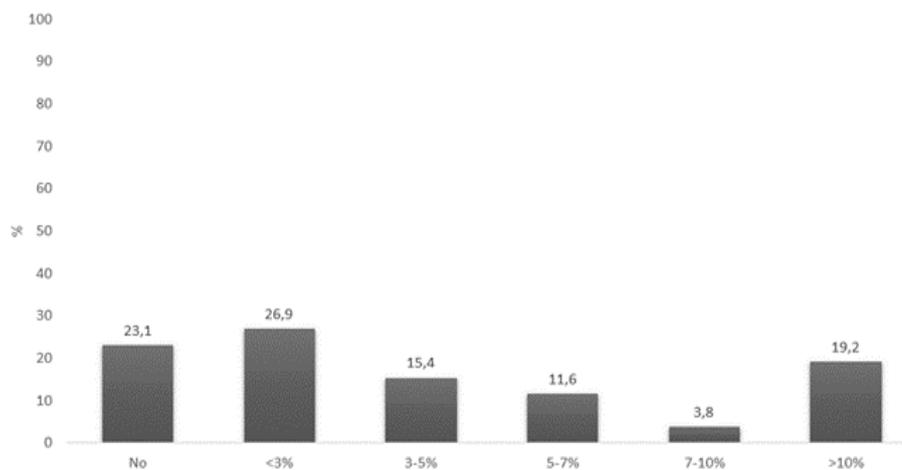


Figura 5. Suddivisione percentuale delle partecipanti in base alla percentuale del peso corporeo perso a sei mesi.

Nel 73.1% dei casi si è osservata una riduzione della circonferenza vita ($\Delta=-3.8$ cm, $p=0.2$), ma soltanto nell'8.3% si è registrata una riduzione al di sotto degli 80 cm. Ridotti anche se non significativamente il rapporto vita/fianchi ($\Delta=-0.1$, $p=0.4$) e vita/altezza ($\Delta=-0.2$, $p=0.1$) mentre sono risultate significative le riduzioni della plica sottoscapolare ($\Delta=-5.06$ mm 95%CI [-0.1, 10.22], $t_{26}=1.96$, $p=0.05$) e della plica femorale ($\Delta=-5.62$ mm 95%CI [0.32, 10.92], $t_{26}=1.96$, $p=0.04$). Nonostante la variazione del peso corporeo riscontrata non sia risultata significativa, dal punto di vista della composizione corporea derivata dalla plicometria si è osservato un aumento della percentuale della massa magra (MM) ($\Delta=+3.19\%$ 95%CI [0.09, 6.29], $t_{26}=2.07$, $p=0.04$) e una riduzione delle

percentuali di massa grassa (MG) ($\Delta=-2.94\%$ 95%CI [-5.92, 0.04], $t_{26}=-1.98$, $p=0.05$). Non è stata ottenuta una conferma ulteriore alla valutazione della composizione corporea analizzata con la bioimpedenziometria (tabella X). Nessuna variazione significativa per quanto riguarda i livelli di attività fisica in termini di consumo energetico settimanale (Mets-min/sett) e la valutazione della forza muscolare mediante handgrip a 6 mesi anche se con valori medi di partenza (17.5 ± 4.8 kg) particolarmente bassi in una coorte di soggetti considerati sani, anche se confrontabile con dati presenti in letteratura. Neanche per quanto riguarda i parametri vitali e biumorali sono state osservate differenze significative (tabella XI).

Invece si è evidenziato un introito calorico giornaliero significativamente ridotto ($\Delta=-123.0$ kcal/die, 95%CI [-246.8, 0.7], $t_{26}= 2.0$, $p=0.05$), in particolare quello derivante dalla quota lipidica ($\Delta=-6.23$ g/die 95%CI [-12.46, 0.04], $t_{26}=-2.0$, $p=0.05$) e da quella proteica ($\Delta=-6.45$ g/die 95%CI [-11.91, -0.98], $t_{26}=-2.38$, $p=0.02$) non associata riduzione significativa della quota proteica pro/kg/die ($\Delta=-0.4$ g/kg/die, $p=0.4$); mentre non si è osservata alcuna differenza significativa negli introiti giornalieri carboidrati anche come ripartizione percentuale rispetto all'introito calorico giornaliero totale (tabella XII). La variazione osservata a sei mesi nello score di aderenza alla dieta Low Fat ($\Delta=+ 0.73$ g/die 95%CI [0.01, 1.47], $t_{26}=-1.98$, $p=0.05$) rispecchia le variazioni degli introiti. Nessuna variazione nella percentuale delle donne che dichiarava consumo di bevande alcoliche, zuccherate e caffè.

Prendendo in considerazione soltanto il gruppo di donne ($n=17$) in cui il quadro di steatosi è migliorato o si è risolto è stata riscontrata una riduzione significativa dei valori di ATI ($\Delta=-0.11$ 95%CI [-0.16, -

0.06], $t_{17}=4.5$, $p=0.0001$) e di CAP ($\Delta=-53.5$ 95%CI [-102.76, -4.23], $t_4=2.7$, $p=0.003$). Mentre la riduzione del peso corporeo ($\Delta=-4$ kg, $p=0.3$) non è risultata significativa all'analisi per dati appaiati, la differenza del peso perso nelle donne con risoluzione del quadro di steatosi, mediamente di 5.2 ± 4.3 kg, è risultata significativamente maggiore rispetto a quella nel gruppo in cui non c'è stato alcun miglioramento ($\Delta=-3.3$ kg, $p=0.04$). Nessuna differenza significativa per la circonferenza vita ($\Delta=-4.8$ cm, $p=0.2$) ma anche in questo caso la differenza in cm della diminuzione media della circonferenza vita (5.4 ± 4.1 cm) nelle donne con risoluzione del quadro di steatosi è risultata significativamente maggiore rispetto a quella nel gruppo in cui non c'è stato miglioramento ($\Delta=-3.4$ cm, $p=0.04$). Dal punto di vista della composizione corporea si sono confermate significative la riduzione della plica femorale ($\Delta=-8.43$ mm 95%CI [-14.48, -2.38], $t_{17}=2.84$, $p=0.007$), l'aumento della percentuale della MM ($\Delta=+4.01\%$ 95%CI [0.04, 7.99], $t_{17}=2.07$, $p<0.05$) e la riduzione della percentuale MG ($\Delta=-3.62\%$ 95%CI [-7.37, 0.11], $t_{17}=-1.98$, $p=0.05$). Dal punto di vista bioumorale, all'analisi per dati appaiati non si sono osservate variazioni significative ma soltanto nei soggetti in cui la steatosi si è risolta o ridotta si è osservata una riduzione del 7.9% della trigliceridemia ($p=0.003$). In questo gruppo di donne non è risultata significativa la riduzione dell'intake calorico ($\Delta=-98.5$ kcal/die, $p=0.2$), mentre si sono confermate quella dei lipidi ($\Delta=-8.72$ g/die 95%CI [-16.89, 0.56], $t_{17}=2.18$, $p=0.03$) e della quota proteica ($\Delta=-7.87$ g/die 95%CI [-14.81, 0.93], $t_{17}=-2.18$, $p<0.03$) in questo caso associati ad un aumento percentuale della quota dei carboidrati ($\Delta=+4.34$ g/die 95%CI [-8.44, -0.25], $t_{17}=-2.17$, $p<0.04$) con cambiamento nella ripartizione percentuale in macronutrienti dell'introito calorico giornaliero (figura 6).

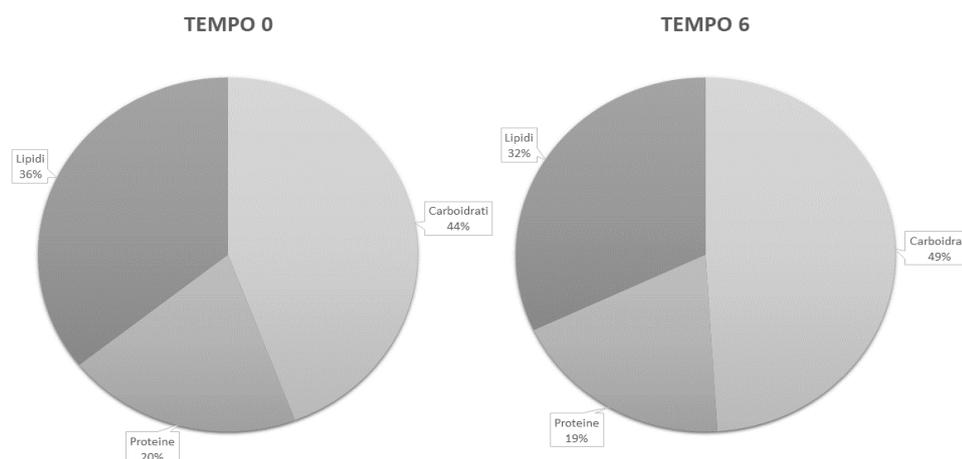


Figura 6. Ripartizione percentuale in macronutrienti all'introito calorico giornaliero totale al basale e a sei mesi nelle donne con risoluzione o riduzione del grado della steatosi.

Nessuna delle variabili prese in esame differiva in maniera significativa nei soggetti in cui il quadro di steatosi è rimasto stabile.

Analizzando nel dettaglio, si è osservata una riduzione significativa del consumo di proteine di origine animale sia in termini percentuali ($\Delta=-9.35\%$ 95%CI [1.78, 16.92], $t_{17}=2.52$, $p=0.02$) che assoluti ($\Delta=-11.9$ g/die 95%CI [5.17, 18.65], $t_{17}=3.6$, $p=0.001$) con relativo aumento percentuale del consumo di proteine di origine vegetale ($\Delta=+11.42\%$ 95%CI [-18.71, -3.20], $t_{17}=-3.2$, $p=0.003$), accompagnati da una riduzione di lipidi di origine animale ($\Delta=-6.7$ g/die 95%CI [1.44, 11.98], $t_{17}=2.63$, $p=0.01$) e nessuna variazione significativa nell'intake giornaliero di colesterolo ($\Delta=-31$ mg/die, $p=0.1$). Risulta dai dati raccolti sulla frequenza di consumo degli alimenti, una riduzione del consumo dei prodotti da forno salati ($p=0.02$), delle carni processate ($p=0.01$), del latte intero ($p=0.05$), dei prodotti caseari ad alto contenuto di grasso a breve e media stagionatura ($p=0.0006$) e del burro ($p=0.03$) mentre è risultato aumentato il consumo di formaggi a basso contenuto di grassi (es. ricotta) ($p=0.02$). Siamo andati ad analizzare gli apporti giornalieri medi di acidi grassi di origine

alimentare e abbiamo osservato a sei mesi una riduzione significativa del consumo di acidi grassi saturi (SFA) ($\Delta=-3.61$ g/die 95%CI [0.72, 6.49], $t_{17}=2.58$, $p=0.02$), dei monoinsaturi (MUFA) ($\Delta=-4.85$ g/die 95%CI [0.29, 9.41], $t_{17}=2.17$, $p=0.04$), nessuna variazione significativa per quanto riguarda la quota di polinsaturi (PUFA), omega 3, omega 6 e nel loro rapporto (figura 7). Al tempo 0 i grassi totali rappresentano il 35.4% dell'energia totale, gli SFA il 9,3%, i MUFA il 17.9%, i PUFA il 5,6% (il 4,6% come $\omega 6$) mentre al T6 i grassi totali rappresentano il 32.4% dell'energia totale, gli SFA il 7,7%, i MUFA il 16 %, i PUFA il 5% (il 4% come $\omega 6$).

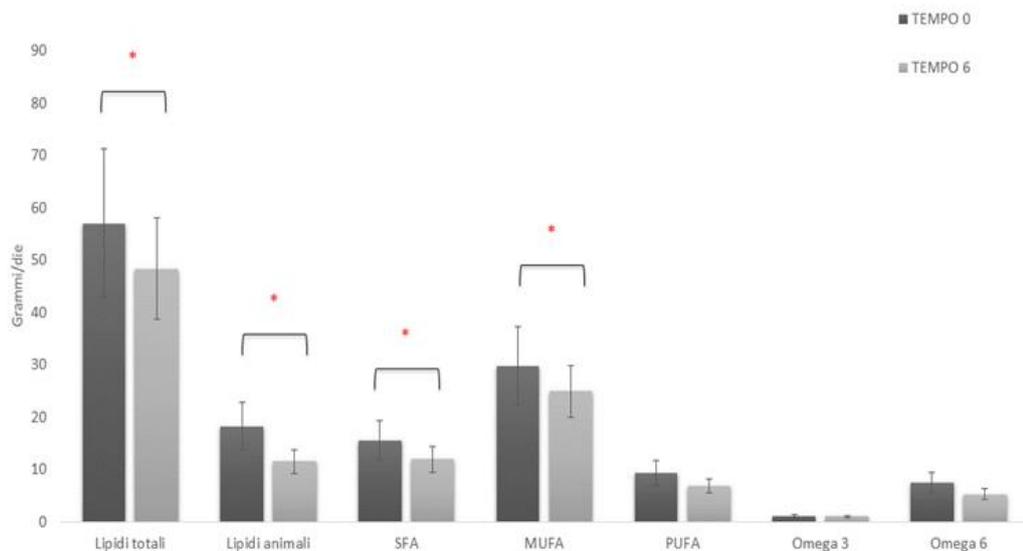


Figura 7. Variazioni nell'intake di lipidi totali, animali e di acidi grassi alla prima visita e al follow up a 6 mesi (* $p \leq 0.05$).

4.5 Discussione

Ad una prima osservazione del campione esaminato l'età media di insorgenza della menopausa è superiore rispetto a quella indicata dai precedenti studi epidemiologici (4, 5) questo dato potrebbe confermare il trend osservato nei Paesi Occidentali negli ultimi decenni di cui le ragioni sono ancora poco chiare oppure dipendere soltanto dalla scarsa numerosità campionaria. Andando a valutare le variabili stratificate per presenza o assenza di NAFLD sia l'età che l'età alla menopausa sono significativamente maggiori nel primo gruppo, è noto che l'invecchiamento, con le alterazioni metaboliche ad esso associate, sia un fattore di rischio per lo sviluppo della NAFLD (228) mentre non sembra esserci nessuna associazione tra l'età alla menopausa e la prevalenza di NAFLD (OD per anno=1.01) (229). Interessante notare che la durata della menopausa (definita retrospettivamente come assenza dei cicli mestruali nei dodici mesi precedenti) all'esecuzione della valutazione della steatosi epatica tramite imaging è mediamente di 5 anni nel gruppo NAFLD e di 3.9 anni nel gruppo senza NAFLD. Uno studio coreano ha dimostrato che la prevalenza di NAFLD incrementa nella fase tardiva della transizione menopausale e nelle fasi postmenopausali definite secondo classificazione STRAW (2), richiamando l'attenzione sulla necessità di attuare delle strategie di prevenzione primaria ancora prima della transizione menopausale (230). Un ampio studio epidemiologico ha mostrato un'associazione tra l'età del menarca e la prevalenza di NAFLD nelle età successive, nel nostro campione non è emersa una differenza significativa dell'età al menarca nei due gruppi, che in entrambi i casi risulta inferiore ai 15 anni, da precedenti studi associata ad una maggiore prevalenza di NAFLD (231). Non è stata riscontrata alcuna differenza neanche nella

percentuale delle donne che presentano sintomi vasomotori, che sembrano essere associati alla prevalenza della NAFLD e ad alterazioni del profilo epatico anche nelle donne sane (143). Recentemente è stata confermata da diversi studi l'aumentata prevalenza di NAFLD nelle donne con storia di diabete gestazionale (232), oltre a quella di altri fattori di rischio cardiometabolici, nel nostro campione la percentuale di donne con storia di GDM è maggiore, anche se non in maniera significativa. Alcuni autori hanno trovato un'associazione negativa tra i livelli di FSH e NAFLD, perché correlati all'adiposità centrale e all'IR diversamente da quanto emerge dai nostri dati (233). Queste ultime osservazioni molto probabilmente sono legate alla ristrettezza del campione esaminato in questo studio. Quest'ultima potrebbe spiegare anche la più alta percentuale di donne in menopausa obese rispetto a studi precedenti (38), oltre all'alta percentuale di donne che soddisfano almeno tre dei cinque criteri della sindrome metabolica. A questo proposito c'è da dire che la maggior parte delle donne sono state reclutate nell'ambito dell'ambulatorio della UOC di Dietetica e Nutrizione Clinica, al quale afferivano per problematiche relative al sovrappeso e all'obesità. Nel presente studio il BMI era maggiore nelle donne con NAFLD nonostante nessuna differenza sia stata riscontrata nell'introito calorico giornaliero. Durante la transizione menopausale si assiste ad un aumento di peso di circa 2-2.5 kg nell'arco di 3 anni che sembra essere legato al normale processo di invecchiamento e non alla menopausa di per sé (234). L'aumento ponderale è un noto fattore di rischio per lo sviluppo di steatosi epatica nella popolazione generale, ma non sembra essere alla base dell'aumento del rischio nelle donne in menopausa rispetto a quelle in età fertile (235). L'obesità (definita da $BMI > 30 \text{ kg/m}^2$) è associata ad un aumento della prevalenza di NAFLD nelle donne di ogni fascia di età (32). Inoltre il BMI non fornisce

informazioni metaboliche e nemmeno sui cambiamenti strutturali, come l'aumento della prevalenza dell'obesità addominale quando si è vicini all'età della menopausa (236). Prendendo in considerazione la circonferenza vita come indicatore di obesità addominale nella popolazione in studio abbiamo notato valori significativamente superiori nelle donne con NAFLD, con una più alta percentuale di soggetti che presentavano valori ≥ 80 cm (associati a rischio cardio-metabolico aumentato nella donna) e di quelli con valori ≥ 88 cm (associati a rischio cardio-metabolico molto aumentato) (211). La circonferenza vita è associata in maniera indipendente dal BMI all'incidenza di NAFLD e indica che la presenza di adiposità centrale, anche in soggetti non obesi, espone ad un maggior rischio di sviluppo e progressione di steatosi, probabilmente per la sua più forte associazione con l'insulino-resistenza (237). Un recente studio ha individuato la circonferenza vita e l'IR come i più forti predittori di rischio di steatosi e fibrosi epatiche, indipendentemente dall'eccesso ponderale, a sottolineare l'importanza della rilevazione di questo parametro nello screening della popolazione generale e nella stratificazione del rischio (238). Inoltre è stato anche ipotizzato il suo utilizzo nella valutazione degli effetti di regimi dietetici differenti, in quanto la circonferenza vita sembra essere un forte mediatore della relazione tra modelli alimentari e fegato grasso (239). Nel nostro studio il rapporto vita/fianchi e vita/altezza risultano aumentati nelle donne con NAFLD, recenti studi hanno dimostrato l'accuratezza del secondo come indice di screening per la NAFLD nelle donne in menopausa (240) mentre è nota da tempo la loro associazione con la presenza di fattori di rischio cardio-metabolici e con la prevalenza di CVD anche in questa specifica popolazione (241, 242). Inoltre, in accordo con i dati presenti in letteratura, i soggetti con NAFLD del nostro campione presentano

valori significativamente maggiori di circonferenza del collo, che riflettono l'accumulo di tessuto adiposo sottocutaneo nella parte superiore del corpo che sembra essere associato a dislipidemia, insulino-resistenza e alterata glicemia a digiuno soprattutto nel sesso femminile (243). Queste evidenze sottolineano l'utilità dei parametri e degli indici antropometrici nello screening nelle donne in menopausa, in quanto non invasivi, di semplice esecuzione e a basso costo. Tuttavia nella pratica clinica risulta molto più importante la valutazione della composizione corporea, poiché permette la stima della quantità di grasso e la sua localizzazione, che in questa specifica categoria di soggetti sono indicatori più utili di rischio di NAFLD. I nostri dati sulla composizione corporea ottenuti sia con la plicometria che con l'esame bioimpedenziometrico ci hanno permesso di osservare nel gruppo di donne con steatosi, una maggiore rappresentazione della massa grassa sia in termini assoluti che percentuali e una ridotta percentuale di massa magra. In linea con i dati di precedenti ampi studi che hanno evidenziato un'associazione positiva tra una percentuale di massa grassa al di sopra del 26,7% nella donna e il rischio di NAFLD (244). Nel nostro studio più del 50% delle donne con NAFLD soddisfano i criteri per la SM, la maggior parte presenta ridotta tolleranza glucidica e l'HOMA index più elevato ad indicare una condizione di resistenza all'insulina e ipertrigliceridemia o comunque livelli di trigliceridi più elevati rispetto alle donne senza steatosi. Diversi autori hanno sottolineato la necessità di valutare questi parametri, in quanto la NAFLD nel sesso femminile rispetto a quello maschile si associa più spesso ad alterazioni metaboliche e questo potrebbe essere alla base non solo di meccanismi fisiopatologici differenti ma potrebbe indicare anche la necessità di attuare delle misure specifiche volte alla loro correzione (245). Alla valutazione delle abitudini alimentari non sono emerse differenze

significative né nell'introito calorico giornaliero né nella ripartizione dei macronutrienti, questo potrebbe dipendere dalla numerosità esigua del campione ma ci permette di escludere dei bias di partenza nella valutazione degli effetti dell'intervento dietetico.

Nel nostro studio il modesto calo ponderale osservato in sei mesi con miglioramento della steatosi epatica è leggermente maggiore a quello riscontrato in precedenti studi (246) e corrisponde in media al 6% del peso iniziale. Dai dati ottenuti mediante plicometria la riduzione del peso sembra essere attribuibile principalmente ad una perdita di massa grassa con mantenimento della massa muscolare, come auspicato da un corretto approccio nutrizionale. Questi dati sono supportati dagli invariati livelli di attività fisica complessiva e dall'assenza di cambiamenti nelle misurazioni della forza muscolare. Il calo della circonferenza vita ci fa ipotizzare una riduzione del grasso addominale, anche alla luce dei risultati di uno studio di intervento che ha evidenziato come un calo del 6-7% del peso corporeo conseguente a modesta riduzione dell'intake calorico sia associato a riduzione del grasso addominale nelle donne in menopausa. In particolare quello ottenuto con la dieta combinata con l'esercizio fisico porta a riduzione del grasso sottocutaneo, mentre quello ottenuto con la sola restrizione calorica porta a riduzione del grasso intra-addominale (247). Nel nostro studio essendo rimasta stabile l'attività fisica, la perdita di peso è attribuibile alla seppur minima riduzione dell'intake calorico associata ad una modifica nella ripartizione percentuale in macronutrienti della dieta.

Abbiamo stimato una diminuzione dell'introito calorico giornaliero al recall settimanale di circa 98.5 kcal/die, mentre la riduzione di massa grassa osservata in sei mesi è stata di 3.8 kg ossia 26600 kcal in sei mesi corrispondente ad un ridotto introito giornaliero di circa 145 kcal

seguendo lo schema dietetico ipocalorico equilibrato. Questa restrizione calorica è ascrivibile per lo più alla riduzione della quota lipidica, soprattutto di lipidi di origine animale e quindi degli acidi grassi saturi mediamente del 23% e questo dato può spiegare la riduzione del grasso epatico, come riportato in studi precedenti (184). Inoltre nel nostro studio abbiamo osservato anche una significativa riduzione dell'introito di MUFA, senza tuttavia una riduzione al di sotto dei valori compresi tra il 10% e il 15% dell'introito calorico giornaliero raccomandati dalla Società Italiana di Nutrizione Umana (SINU 2014). Studi di lipidomica hanno recentemente mostrato che i soggetti con steatosi rispetto ai controlli sani tendono ad avere una maggiore concentrazione sia di SFA che di MUFA nel plasma e nel fegato (248).

La riduzione dell'introito di grassi rispecchia la riduzione del consumo dei prodotti da forno salati delle carni processate, del latte intero, dei prodotti caseari ad alto contenuto di grasso a breve e media stagionatura e del burro con preferenza per i formaggi a basso contenuto di grassi (es. ricotta) e legumi. La riduzione della quota proteica non ha portato una riduzione sostanziale nella quota proteica pro/kg giornaliera raccomandata per sesso e per età (LARN SINU 2014) di circa 0.9 pro/kg/die né alla riduzione della percentuale raccomandata rispetto all'introito calorico giornaliero.

Le migliorate abitudini alimentari si riflettono sulla composizione in macronutrienti più vicina a quelle indicate per la dieta mediterranea. Un recente studio italiano ha dimostrato come un'elevata aderenza alla DM sia associata a minore incidenza di NAFLD in donne in menopausa sovrappeso e obese, indipendentemente dalla restrizione calorica (249).

TABELLA I. Caratteristiche generali, parametri e indici antropometrici e parametri vitali della popolazione CARPREDIME a confronto con quella oggetto di studio. Le variabili continue sono espresse come media \pm deviazione standard. Le variabili categoriali sono in %.

Variabili	Popolazione CARPREDIME (n=108)	Popolazione in studio (n=83)
Età (anni)	55.6 \pm 4.5	56.4 \pm 4.6
Età menopausa (anni)	51.4 \pm 3.7	51.7 \pm 3.9
Età menarca (anni)	12.6 \pm 1.6	12.4 \pm 1.6
Menopausa fisiologica (%)	95	96.4
Terapia ormonale sostitutiva (%)	10.2	6.0
Peso (kg)	77.6 \pm 10.9	78.1 \pm 10.7
Indice di massa corporea (kg/m ²)	29.8 \pm 3.4	29.4 \pm 3.4
Circonferenza: vita (cm)	93.4 \pm 9.8	92.1 \pm 9.8
fianchi (cm)	109.6 \pm 9.9	109.1 \pm 7.7
collo (cm)	36.5 \pm 2.2	36.7 \pm 2.3
braccio (cm)	33.2 \pm 2.9	33.1 \pm 2.9
Rapporto circonferenze vita/fianchi	0.85 \pm 0.06	0.84 \pm 0.05
Rapporto circonferenza vita/altezza	0.58 \pm 0.06	0.57 \pm 0.06
Plica cutanea: tricipitale (mm)	31.3 \pm 7.3	30.0 \pm 5.8
sottocapolare (mm)	31.6 \pm 10.0	30.4 \pm 9.0
sovrailiaca (mm)	22.2 \pm 8.3	21.2 \pm 7.7
coscia (mm)	48.9 \pm 9.6	47.9 \pm 8.8
Resistenza (ohm)	497.5 \pm 54.7	503.6 \pm 53.2
Reattanza (ohm)	52.5 \pm 7.6	51.7 \pm 6.3
Angolo di fase	6.0 \pm 0.7	5.9 \pm 0.6
Normopeso (%)	5.6	7.2
Sovrappeso (%)	44.4	51.8
Obesità (%)	50.0	41.0
obesità di I grado	41.7	36.1
obesità di II grado	8.3	4.8
Obesità tronculare (%)	13.9	13.3
Circonferenza vita \geq 80 cm (%)	91.6	90.4
di cui \geq 88 cm (%)	64.8	57.4
Pressione arteriosa sistolica (mmHg)	132.7 \pm 16.2	129.2 \pm 15.3
diastolica (mmHg)	87.3 \pm 10.5	80.1 \pm 7.6

Frequenza cardiaca (bpm)	66.9±9.0	65.7±8.5
Ipertensione arteriosa (%)	50.9	51.8
di cui in terapia antipertensiva (%)	61.8	72.1
Pulse wave velocity (m/s)	6.1±2.5	6.3±2.3
Forza muscolare braccio dx	16.7±5.7	17.3±4.9
braccio sx	16.2±5.5	16.6±5.0
Fumo (%)	12.0	10.8
Alcool (%)	63.0	62.7
Attività sportiva (%)	29.6	30.1
Attività fisica (Met-min/settimana)	3843.5±3623.9	3609.8±3000.0
Intolleranza glucidica (%)	22.2	26.5
Ipertrigliceridemia (%)	11.1	14.5
Ipercolesterolemia (%)	62.0	67.5
Di cui in terapia ipolipemizzante (%)	24.7	27.7
Sindrome metabolica (%)	51.9	44.6

Tabella II. Valori medi nell'assunzione di introito calorico e di nutrienti e scores di aderenza nella popolazione CARPREDIME e nel campione in studio. Le variabili continue sono espresse come media \pm deviazione standard. Le variabili categoriali sono in %. I=introito calorico totale.

Variabili	Popolazione CARPREDIME (n=108)	Popolazione in studio (n=83)
Introito calorico giornaliero (kcal/die)	1594.0 \pm 300.1	1540.2 \pm 280.2
Proteine (g/die)	72.8 \pm 13.6	70.3 \pm 11.2
Proteine (% I)	19.3 \pm 3.1	19.3 \pm 2.7
Carboidrati (g/die)	180.2 \pm 47.4	178.1 \pm 40.5
Carboidrati (% I)	44.1 \pm 7.2	45.5 \pm 6.9
Grassi (g/die)	61.7 \pm 16.1	57.5 \pm 16.0
Grassi (% I)	36.3 \pm 6.5	34.8 \pm 6.6
Colesterolo (mg/die)	201.7 \pm 65.3	187.6 \pm 74.7
Fibre (g/die)	20.7 \pm 5.7	21.4 \pm 5.3
Alcool (g/die)	4.6 \pm 7.7	3.5 \pm 5.2
Fruttosio (g/die)	9.1 \pm 5.0	9.4 \pm 4.7
Aderenza dieta Mediterranea	6.6 \pm 1.7	6.8 \pm 1.5
Aderenza dieta Low Fat	5.2 \pm 1.7	5.6 \pm 1.9

Tabella III. Caratteristiche generali della popolazione suddivisa in base alla presenza di NAFLD. Le variabili continue sono espresse come media \pm deviazione standard. Le variabili categoriali sono in %.

Variabili	NAFLD (n=55)	NO NAFLD (n=28)	P value
Età (anni)	57.3 \pm 4.0	54.4 \pm 5.3	0.006
Età menopausa (anni)	52.3 \pm 3.0	50.5 \pm 5.3	0.05
Età menarca (anni)	12.4 \pm 1.8	12.5 \pm 1.2	0.7
Gravidanze	2.4 \pm 2.0	2.2 \pm 1.0	0.6
Gravidanza (%)	89	96.4	0.3
Menopausa fisiologica (%)	92.7	89.3	0.6
Diabete gestazionale (%)	22.4	7.4	0.09
Terapia ormonale sostitutiva (%)	9.1	10.7	0.8
Sintomi vasomotori (%)	77.4	85.7	0.4
Cardiopalmo (%)	32.1	35.7	0.7
Iperensione arteriosa (%)	56.4	42.9	0.3
Di cui in terapia antipertensiva (%)	82.9	50.0	0.04
Intolleranza glucidica (%)	36.4	7.1	0.004
Ipercolesterolemia (%)	69.1	64.3	0.7
Di cui in terapia ipocolesterolemizzante (%)	42.1	38.9	0.8
Ipertrigliceridemia (%)	36.4	10.7	0.01
Sindrome metabolica (%)	52.7	21.4	0.007
Normopeso (%)	5.5	10.7	0.4
Sovrappeso (%)	40.0	75.0	0.003
Obesità (%)	54.5	14.3	0.0005
Obesità di I grado	49.1	10.7	0.0006
Obesità di II grado	5.5	3.6	0.7
Obesità addominale (%)	96.4	82.1	0.03
Obesità tronculare (%)	16.4	3.6	0.09
Fumo (%)	10.9	14.3	0.7
Alcool (%)	69.1	50	0.09
Scolarità (anni)	13.2 \pm 3.4	12.3 \pm 3.7	0.3
Attività lavorativa sì (%)	72.7	75	0.8
Attività sportiva (%)	29.1	17,9	0.3
Attività fisica (Met-min/settimana)	3221.9 \pm 2182.9	4040.6 \pm 3848.7	0.2

Tabella IV. Parametri e indici antropometrici del campione suddiviso in base alla presenza di NAFLD. Le variabili continue sono espresse come media \pm deviazione standard. Le variabili categoriali sono in %.

Variabili	NAFLD (n=55)	NO NAFLD (n=28)	P value
Indice di massa corporea (kg/m ²)	30.3 \pm 3.4	27.6 \pm 2.5	0.0004
Peso (kg)	78.3 \pm 10.8	73.3 \pm 9.6	0.04
Circonferenza:			
vita (cm)	95.0 \pm 9.8	86.5 \pm 6.8	0.0001
fianchi (cm)	110.2 \pm 7.7	106.9 \pm 7.1	0.06
collo (cm)	37.1 \pm 2.5	35.9 \pm 1.5	0.02
braccio (cm)	33.5 \pm 3.0	32.4 \pm 2.9	0.1
Waist to hip ratio	0.86 \pm 0.06	0.81 \pm 0.03	<0.0001
Waist to height ratio	0.59 \pm 0.06	0.53 \pm 0.03	<0.0001
Plica cutanea:			
tricipitale (mm)	30.4 \pm 6.0	29.2 \pm 5.6	0.4
sottocapolare (mm)	31.9 \pm 9.0	27.4 \pm 8.4	0.03
sovrailiaca (mm)	22.8 \pm 8.1	17.9 \pm 5.5	0.005
femorale (mm)	48.1 \pm 8.6	47.5 \pm 9.3	0.8
Plicometria massa grassa (kg)	29.8 \pm 6.7	26.1 \pm 5.2	0.01
massa grassa (%)	37.6 \pm 4.9	35.6 \pm 4.3	0.07
massa magra (kg)	48.6 \pm 5.9	45.7 \pm 5.4	0.03
massa magra (%)	62.2 \pm 5.1	64.4 \pm 4.2	0.05
Resistenza (Ohm)	499.8 \pm 49.6	495.7 \pm 56.4	0.4
Reattanza (Ohm)	51.5 \pm 6.6	52.1 \pm 5.9	0.7
Angolo di fase	5.9 \pm 0.5	5.8 \pm 0.7	0.5
Bioimpedenziometria massa grassa (kg)	28.8 \pm 7.7	25.1 \pm 8.8	0.005
massa grassa (%)	36.3 \pm 6.4	32.3 \pm 6.0	0.007
massa magra (kg)	49.5 \pm 5.8	49.2 \pm 4.3	0.8
massa magra (%)	63.7 \pm 6.4	67.7 \pm 6.0	0.007
Forza muscolare			
braccio dx (kg)	16.7 \pm 4.4	18.4 \pm 5.6	0.1
braccio sx (kg)	15.8 \pm 5.0	17.5 \pm 5.8	0.2
Metabolismo basale (kcal/die)	1439.6 \pm 112.7	1414.9 \pm 100.0	0.3

Tabella V. Parametri vitali e biomorali, FLI e FIB-4 del campione suddiviso in base alla presenza di NAFLD. Le variabili continue sono espresse come media \pm deviazione standard. Le variabili categoriali sono in %.

Variabili		NAFLD (n=55)	NO NAFLD (n=28)	P value
Pressione arteriosa	sistolica (mmHg)	129.5 \pm 13.5	128.6 \pm 18.6	0.8
	diastolica (mmHg)	80.8 \pm 7.1	78.7 \pm 8.4	0.2
Frequenza cardiaca (bpm)		66.7 \pm 8.6	63.7 \pm 8.1	0.1
Pulse wave velocity (m/s)		6.3 \pm 2.3	6.4 \pm 2.4	0.9
FSH (IU/L)		80.0 \pm 27.3	90.3 \pm 7.8	0.2
Glicemia a digiuno (mg/dL)		97.2 \pm 13.5	91.6 \pm 7.0	0.05
Insulinemia a digiuno (uU/mL)		11.9 \pm 5.6	7.4 \pm 2.5	0.001
Emoglobina glicata (mmol/mol)		38.8 \pm 4.0	36.4 \pm 3.1	0.01
HOMA-IR		2.9 \pm 1.4	1.6 \pm 0.6	0.0002
HOMA-IR >2.5 (%)		50	5	0.0001
Colesterolemia	totale (mg/dl)	214.8 \pm 40.6	203 \pm 32.2	0.2
	HDL (mg/dl)	59.0 \pm 14.2	61.3 \pm 18.4	0.6
	LDL (mg/dl)	133.6 \pm 34.9	127.7 \pm 36.0	0.5
Trigliceridemia (U/L)		115.8 \pm 58.7	82.4 \pm 32.4	0.008
TyG Index		4.6 \pm 0.3	4.4 \pm 0.2	0.003
TyG Index > 4.5 (%)		62.7	33.3	0.01
Uricemia (mg/dl)		5.1 \pm 1.2	4.8 \pm 1.0	0.3
AST (U/L)		24.3 \pm 12.5	22.4 \pm 6.2	0.5
ALT (U/L)		27.4 \pm 16.1	19.7 \pm 5.5	0.02
Rapporto AST/ALT		0.96 \pm 0.3	1.2 \pm 0.3	0.002
γ GT (U/L)		26.0 \pm 19.5	20.3 \pm 17.7	0.2
Pastrine (10^9 /L)		273 \pm 66.6	248.1 \pm 57.0	0.1
Fatty Liver Index		51.8 \pm 24.8	25.0 \pm 16.3	0.0001
Fatty Liver Index \geq 60		34.7	4.2	0.005
FIB-4		1.03 \pm 0.4	1.2 \pm 0.4	0.09

Tabella VI. Valori medi nell'assunzione di introito calorico totale e nutrienti del campione suddiviso in base alla presenza di NAFLD. Le variabili continue sono espresse come media \pm deviazione standard. Le variabili categoriali sono in %. I=introito calorico totale.

Variabili	NAFLD (n=55)	NO NAFLD (n=28)	P value
Introito calorico giornaliero (kcal/die)	1512.9 \pm 275.3	1593.8 \pm 287.0	0.2
Proteine (g/die)	70.0 \pm 10.1	71.0 \pm 13.4	0.7
Proteine (% I)	19.6 \pm 2.8	18.6 \pm 2.4	0.1
Carboidrati (g/die)	170.9 \pm 38.2	192.6 \pm 41.5	0.01
Carboidrati (% I)	44.8 \pm 6.5	46.9 \pm 5.0	0.1
Grassi (g/die)	57.2 \pm 17.1	58.0 \pm 13.9	0.8
Grassi (% I)	35.2 \pm 7.3	33.9 \pm 5.0	0.4
Colesterolo (mg/die)	186.4 \pm 64.7	189.8 \pm 92.6	0.8
Fibre (g/die)	21.2 \pm 4.8	21.7 \pm 6.1	0.7
Alcool (g/die)	3.8 \pm 5.5	3.1 \pm 4.6	0.6
Fruttosio (g/die)	9.0 \pm 4.1	10.7 \pm 5.4	0.1
Caffè (n/die)	2.3 \pm 1.1	2.7 \pm 1.1	0.1
Bevande zuccherate (%)	27.3	25	0.8
Caffè (%)	87	89.3	0.8
Aderenza dieta Mediterranea	7.0 \pm 1.6	6.4 \pm 1.4	0.09
Aderenza dieta Low Fat	5.9 \pm 1.9	5.7 \pm 1.9	0.7

Tabella VII. Parametri e indici antropometrici del campione suddiviso in base alla presenza di ATI>0.63. Le variabili continue sono espresse come media \pm deviazione standard. Le variabili categoriali sono in %.

Variabili	ATI>0.63 (n=34)	ATI<0.63 (n=10)	P value
ATI (dB/cm/MHz)	0.76 \pm 0.14	0.55 \pm 0.07	<0.0001
SWE (kPa)	5.1 \pm 1.6	4.4 \pm 0.6	0.2
Indice di massa corporea (kg/m ²)	30.3 \pm 3.4	26.9 \pm 3.4	0.007
Peso (kg)	79.1 \pm 10.6	72.2 \pm 10.9	0.08
Circonferenza:			
vita (cm)	94.3 \pm 9.9	84.3 \pm 7.9	0.006
fianchi (cm)	110.6 \pm 7.8	105.5 \pm 7.9	0.07
collo (cm)	37.1 \pm 2.6	35.2 \pm 1.6	0.03
braccio (cm)	33.8 \pm 3.1	32.5 \pm 3.6	0.3
Waist to hip ratio	0.85 \pm 0.06	0.80 \pm 0.03	0.02
Waist to height ratio	0.58 \pm 0.06	0.52 \pm 0.04	0.001
Plica cutanea:			
tricipitale (mm)	31.0 \pm 5.7	26.8 \pm 5.0	0.04
sottocapolare (mm)	31.6 \pm 8.5	22.8 \pm 8.3	0.02
sovrailiaca (mm)	21.2 \pm 5.6	15.8 \pm 5.7	0.01
femorale (mm)	47.9 \pm 8.3	41.2 \pm 9.0	0.03
Plicometria massa grassa (kg)	30.5 \pm 7.4	23.1 \pm 4.6	0.005
massa grassa (%)	38.2 \pm 6.0	32.7 \pm 4.3	0.01
massa magra (kg)	48.4 \pm 5.9	48.2 \pm 4.8	0.9
massa magra (%)	61.8 \pm 6.0	67.3 \pm 4.3	0.01
Resistenza (Ohm)	501.6 \pm 59.8	529.8 \pm 48.4	0.2
Reattanza (Ohm)	51.2 \pm 6.4	50.2 \pm 4.6	1.0
Angolo di fase	5.9 \pm 0.5	5.7 \pm 0.9	0.4
Bioimpedenziometria massa grassa (kg)	29.4 \pm 7.2	23.7 \pm 7.5	0.03
massa grassa (%)	36.7 \pm 6.1	32.2 \pm 5.6	0.04
massa magra (kg)	49.8 \pm 6.2	48.5 \pm 4.4	0.5
massa magra (%)	63.3 \pm 6.1	67.8 \pm 5.6	0.04
Forza muscolare			
braccio dx (kg)	17.1 \pm 4.5	16.5 \pm 5.3	0.7
braccio sx (kg)	16.5 \pm 4.5	16.2 \pm 5.5	0.9
Metabolismo basale (kcal/die)	1451.9 \pm 113.0	1421.3 \pm 97.5	0.4

Tabella VIII. Parametri vitali e biomorali, FLI e FIB-4 del campione suddiviso in base alla presenza di ATI>0.63. Le variabili continue sono espresse come media \pm deviazione standard. Le variabili categoriali sono in %.

Variabili		ATI>0.63 (n=34)	ATI<0.63 (n=10)	P value
Pressione arteriosa	sistolica (mmHg)	130.7 \pm 14.5	124.3 \pm 14.3	0.2
	diastolica (mmHg)	80.9 \pm 7.0	75.1 \pm 8.9	0.09
Frequenza cardiaca (bpm)		66.7 \pm 8.7	65.7 \pm 7.2	0.7
Pulse wave velocity (m/s)		6.5 \pm 2.1	7.3 \pm 1.2	0.3
Glicemia a digiuno (mg/dL)		96.2 \pm 13.3	87.8 \pm 4.8	0.07
Insulinemia a digiuno (uU/mL)		11.0 \pm 4.2	5.5 \pm 1.4	0.0005
Emoglobina glicata (mmol/mol)		38.4 \pm 4.2	34.8 \pm 3.0	0.02
HOMA-IR		2.6 \pm 1.1	1.2 \pm 0.2	0.0003
HOMA-IR >2.5 (%)		40.7	-	0.009
Colesterolemia	totale (mg/dl)	224.5 \pm 37.3	202.4 \pm 29.6	0.1
	HDL (mg/dl)	63.6.0 \pm 14.9	66.9 \pm 23.9	0.6
	LDL (mg/dl)	139.5 \pm 35.3	120.2 \pm 37.4	0.2
Trigliceridemia (U/L)		111.0 \pm 41.5	76.7 \pm 40.5	0.03
TyG Index		4.6 \pm 0.3	4.4 \pm 0.2	0.008
TyG Index > 4.5 (%)		63.3	11.1	0.004
Uricemia (mg/dl)		5.2 \pm 1.2	4.6 \pm 0.9	0.2
AST (U/L)		23.9 \pm 8.7	22.7 \pm 7.6	0.7
ALT (U/L)		27.1 \pm 14.6	20.3 \pm 3.8	0.02
Rapporto AST/ALT		0.97 \pm 0.3	1.1 \pm 0.3	0.1
γ GT (U/L)		28.0 \pm 20.1	21.4 \pm 20.0	0.4
Fatty Liver Index		52.1 \pm 24.0	17.9 \pm 11.3	0.0002
Fatty Liver Index \geq 60		46.4	-	0.009

Tabella IX. Valori medi nell'assunzione di introito calorico totale e nutrienti suddivisa in base alla presenza di ATI>0.63. Le variabili continue sono espresse come media \pm deviazione standard. Le variabili categoriali sono in %. I=introito calorico totale.

Variabili	ATI>0.63 (n=32)	ATI<0.63 (n=10)	P value
Introito calorico giornaliero (kcal/die)	1518.5 \pm 282.7	1671.4 \pm 296.7	0.1
Proteine (g/die)	70.1 \pm 10.	75.1 \pm 12.4	0.2
Proteine (% I)	19.5 \pm 2.8	19.0 \pm 2.8	0.6
Carboidrati (g/die)	170.2 \pm 39.1	202.5 \pm 49.6	0.04
Carboidrati (% I)	44.8 \pm 7.3	46.7 \pm 10.9	0.1
Grassi (g/die)	57.4 \pm 17.6	58.3 \pm 12.2	0.9
Grassi (% I)	35.1 \pm 7.8	32.8 \pm 3.7	0.4
Colesterolo (mg/die)	190.6 \pm 69.3	200.9 \pm 65.1	0.7
Fibre (g/die)	21.0 \pm 4.4	24.0 \pm 7.7	0.7
Alcool (g/die)	3.4 \pm 5.1	5.5 \pm 5.6	0.3
Fruttosio (g/die)	9.0 \pm 3.5	11.6 \pm 6.7	0.1
Aderenza dieta Mediterranea	6.9 \pm 1.4	6.1 \pm 1.4	0.1
Aderenza dieta Low Fat	5.6 \pm 2.0	4.9 \pm 1.7	0.3

Tabella X. ATI, CAP, caratteristiche antropometriche, parametri vitali e FLI alla prima visita e a 6 mesi. Le variabili continue sono espresse come media \pm deviazione standard. Le variabili categoriali sono in %.

Variabili	TEMPO 0 (n=26)	TEMPO 6 (n=26)	P value
ATI (dB/cm/MHz) (n=20)	0.58 \pm 0.35	0.51 \pm 0.30	0.0001
CAP (dB/m) (n=4)	283.2 \pm 21.4	227.8 \pm 31.6	0.003
Indice di massa corporea (kg/m ²)	29.7 \pm 3.2	28.4 \pm 3.5	0.2
Peso (kg)	76.8 \pm 10.9	73.5 \pm 11.8	0.3
Circonferenza:			
vita (cm)	93.7 \pm 10.6	89.9 \pm 9.4	0.2
fianchi (cm)	108.5 \pm 7.3	105.8 \pm 7.3	0.2
braccio (cm)	33.5 \pm 3.0	32.4 \pm 3.0	0.2
Waist to hip ratio	0.86 \pm 0.05	0.85 \pm 0.06	0.4
Waist to height ratio	0.58 \pm 0.06	0.56 \pm 0.05	0.1
Plica cutanea:			
tricipitale (mm)	31.0 \pm 6.2	27.3 \pm 7.4	0.06
sottocapolare (mm)	34.0 \pm 9.0	29.0 \pm 9.5	0.05
sovrailiaca (mm)	22.0 \pm 6.2	19.6 \pm 7.2	0.2
femorale (mm)	48.4 \pm 8.6	42.8 \pm 10.3	0.04
Plicometria massa grassa (kg)	29.1 \pm 6.5	25.9 \pm 7.5	0.1
massa grassa (%)	37.6 \pm 4.6	34.6 \pm 6.0	0.05
massa magra (kg)	47.9 \pm 6.1	47.6 \pm 5.7	0.8
massa magra (%)	62.2 \pm 5.1	65.4 \pm 6.0	0.04
Resistenza (Ohm)	505.1 \pm 58.3	524.8 \pm 62.9	0.3
Reattanza (Ohm)	52.5 \pm 6.4	51.5 \pm 7.0	0.6
Angolo di fase	5.9 \pm 0.5	5.6 \pm 0.7	0.1
Bioimpedenziometria massa grassa (kg)	27.3 \pm 7.2	25.6 \pm 7.5	0.4
massa grassa (%)	35.1 \pm 6.0	34.2 \pm 6.4	0.6
massa magra (kg)	49.6 \pm 6.0	47.8 \pm 6.2	0.3
massa magra (%)	64.9 \pm 5.9	65.8 \pm 6.4	0.6
Forza muscolare			
braccio dx (kg)	16.2 \pm 4.6	17.7 \pm 3.5	0.2
braccio sx (kg)	14.7 \pm 5.3	15.7 \pm 5.0	0.5
Metabolismo basale (kcal/die)	1428.6 \pm 112.2	1382.9 \pm 112.5	0.1

Tabella XI. Caratteristiche della composizione corporea e dei parametri vitali alla prima visita e a sei mesi. Le variabili continue sono espresse come media \pm deviazione standard. Le variabili categoriali sono in %.

Variabili		TEMPO 0 (n=26)	TEMPO 6 (n=26)	P value
Pressione arteriosa	sistolica (mmHg)	131.3 \pm 14.0	125.3 \pm 13.3	0.1
	diastolica (mmHg)	80.3 \pm 7.9	77.5 \pm 7.5	0.09
Frequenza cardiaca (bpm)		66.3 \pm 9.6	64.7 \pm 7.7	0.5
Glicemia a digiuno (mg/dL)		86.4 \pm 28.7	84.2 \pm 25.8	0.7
Insulinemia a digiuno (uU/mL)		7.6 \pm 5.1	7.6 \pm 6.0	0.9
Emoglobina glicata		31.2 \pm 16.0	30.6 \pm 15.7	0.9
HOMA-IR		1.8 \pm 1.7	1.3 \pm 1.4	0.9
Colesterolemia	totale (mg/dl)	224.5 \pm 37.3	202.4 \pm 29.6	0.1
	HDL (mg/dl)	55.5 \pm 22.3	56.1 \pm 21.3	0.9
	LDL (mg/dl)	118.7 \pm 52.1	116.0 \pm 52.2	0.6
Trigliceridemia (mg/dL)		95.5 \pm 49.0	91.3 \pm 48.7	0.8
TyG Index		4.0 \pm 1.5	4.0 \pm 1.5	0.9
Uricemia (mg/dl)		5.2 \pm 1.2	4.6 \pm 0.9	0.2
AST (U/L)		19.5 \pm 10.7	20.1 \pm 10.7	0.7
ALT (U/L)		21.3 \pm 13.6	21.2 \pm 11.5	0.9
Rapporto AST/ALT		0.91 \pm 0.5	0.91 \pm 0.6	0.1
γ GT (U/L)		20.1 \pm 18.0	19.3 \pm 19.0	0.9
Fatty Liver Index		37.4 \pm 28.5	31.2 \pm 25.4	0.4

Tabella XII. Valori medi nell'assunzione di introito calorico totale e nutrienti nella popolazione alla 1 visita e al 1 FU. Le variabili continue sono espresse come media \pm deviazione standard. Le variabili categoriali sono in %. I=introito calorico totale; 1FU= follow up. *p<0.01

Variabili	TEMPO 0 (n=26)	TEMPO 6 (n=26)	P value
Introito calorico giornaliero (kcal/die)	1522.0 \pm 239.5	1399.4 \pm 202.9	0.05
Proteine (g/die)	69.5 \pm 7.1	63.1 \pm 11.9	0.02
Proteine (% I)	19.2 \pm 2.5	18.8 \pm 3.2	0.7
Proteine pro/kg (g/die)	0.92 \pm 0.1	0.88 \pm 0.2	0.4
Carboidrati (g/die)	173.7 \pm 34.0	165.7 \pm 38.3	0.4
Carboidrati (% I)	45.6 \pm 6.4	47.3 \pm 5.6	0.1
Grassi (g/die)	56.1 \pm 12.9	49.9 \pm 9.0	0.05
Grassi (% I)	34.3 \pm 6.2	33.4 \pm 4.3	0.6
Colesterolo (mg/die)	179.7 \pm 54.9	164.4 \pm 56.1	0.7
Fibre (g/die)	22.8 \pm 4.3	24.6 \pm 6.8	0.3
Alcool (g/die)	2.7 \pm 4.8	1.2 \pm 1.9	0.1
Fruttosio (g/die)	10.1 \pm 3.6	10.3 \pm 4.0	0.9
Aderenza dieta Mediterranea	7.2 \pm 1.6	7.0 \pm 1.3	0.1
Aderenza dieta Low Fat	5.9 \pm 1.6	6.7 \pm 1.6	0.05

Conclusioni

La menopausa appare caratterizzata dall'aumentata incidenza di steatosi e dal rischio di progressione della NAFLD, da modificazioni della composizione corporea e da alterazioni metaboliche che sono responsabili dell'aumentato rischio cardiovascolare. I risultati dello studio confermano nelle donne con NAFLD un aumento della massa grassa, in particolare dall'adiposità centrale e delle alterazioni ad essa connesse e dimostrano la loro utilità nella pratica clinica. Essendo questi fattori modificabili con interventi sullo stile di vita appare chiara la necessità di un approccio specifico e multidisciplinare. Lo studio d'intervento rappresenta un primo tentativo di identificare i possibili modelli dietetici errati che aumentano il rischio di steatosi epatica e cardio-metabolico durante e dopo la menopausa e di valutare l'efficacia di un intervento dietetico sulla progressione della NAFLD e sulla prevenzione delle malattie cardiovascolari e metaboliche nelle donne in menopausa. In futuro tali possibili linee di indirizzo e di intervento precoce su specifici gruppi alimentari o pattern dietetici o altre abitudini di vita potranno promuovere la prevenzione delle malattie cardiovascolari e metaboliche nelle donne in menopausa.

Bibliografia

1. Lazarus, J.V., Mark, H.E., Anstee, Q.M. et al. Advancing the global public health agenda for NAFLD: a consensus statement. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 19, 60–78 (2022).
2. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016; 64: 73-84.
3. Riazi K, Azhari H, Charette JH, Underwood FE, King JA, Afshar EE, Swain MG, Congly SE, Kaplan GG, Shaheen AA. The prevalence and incidence of NAFLD worldwide: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2022 Sep;7(9):851-861.
4. Grajower MM. Nonalcoholic Steatohepatitis. *JAMA*. 2020;324(9):899.
5. Harrison, Stephen A. et al. Prospective evaluation of the prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis in a large middle-aged US cohort. *Journal of Hepatology*, Volume 75, Issue 2, 284 – 291.
6. Iqbal U, Perumpail BJ, Akhtar D, Kim D, Ahmed A. The Epidemiology, Risk Profiling and Diagnostic Challenges of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Medicines (Basel)*. 2019;6(1):41.
7. Perumpail RB, Wong RJ, Ahmed A, Harrison SA. Hepatocellular Carcinoma in the Setting of Non-cirrhotic Nonalcoholic Fatty Liver Disease and the Metabolic Syndrome: US Experience. *Dig Dis Sci*. 2015 Oct;60(10):3142-8.
8. Allen AM, Therneau TM, Ahmed OT, Gidener T, Mara KC, Larson JJ, Canning RE, Benson JT, Kamath PS. Clinical course of non-alcoholic fatty liver disease and the implications for clinical trial design. *J Hepatol*. 2022 Nov;77(5):1237-1245.
9. Kasper P, Martin A, Lang S, Kütting F, Goeser T, Demir M, Steffen HM. NAFLD and cardiovascular diseases: a clinical review. *Clin Res Cardiol*. 2021 Jul;110(7):921-937.
10. Targher G, Byrne CD, Lonardo A, Zoppini G, Barbui C. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: a meta-analysis. *J Hepatol* 2016;65:589-600.
11. Michelle T. Long , Xiaoyu Zhang, Hanfei Xu, Ching-Ti Liu, Kathleen E. Corey , Raymond T. Chung, Rohit Loomba, Emelia J. Benjamin. Hepatic Fibrosis Associates With Multiple Cardiometabolic Disease Risk Factors: The Framingham Heart Study. *Hepatology* 2021; 73: 548-559.
12. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero-Gomez M, Zelber-Sagi S, Wai-Sun Wong V, Dufour JF, Schattenberg JM, Kawaguchi T, Arrese M, Valenti L, Shiha G, Tiribelli C, Yki-Järvinen H, Fan JG, Grønbaek H, Yilmaz Y, Cortez-Pinto H, Oliveira CP, Bedossa P, Adams LA, Zheng MH, Fouad Y, Chan WK, Mendez-Sanchez N, Ahn SH, Castera L, Bugianesi E, Ratziu V, George J. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol*. 2020 Jul;73(1):202-209.

13. Lee C, Kim J, Jung Y. Potential Therapeutic Application of Estrogen in Gender Disparity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis. *Cells*. 2019 Oct 15;8(10):1259.
14. Velarde-Ruiz Velasco JA, García-Jiménez ES, García-Zermeño KR, Morel-Cerda EC, Aldana-Ledesma JM, Castro-Narro GE, Cerpa-Cruz S, Tapia-Calderón DK, Mercado-Jauregui LA, Contreras-Omaña R. Extrahepatic complications of non-alcoholic fatty liver disease: Its impact beyond the liver. *Rev Gastroenterol Mex*. 2019 Oct-Dec;84(4):472-481.
15. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc*. 1980 Jul;55(7):434-8.
16. Shaheen M, Schrode KM, Pan D, Kermah D, Puri V, Zarrinpar A, Elisha D, Najjar SM, Friedman TC. Sex-Specific Differences in the Association Between Race/Ethnicity and NAFLD Among US Population. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Dec 2;8:795421.
17. Non-alcoholic Fatty Liver Disease Study Group, Lonardo A, Bellentani S, Argo CK, Ballestri S, Byrne CD, Caldwell SH, Cortez-Pinto H, Grieco A, Machado MV, Miele L, Targher G. Epidemiological modifiers of non-alcoholic fatty liver disease: Focus on high-risk groups. *Dig Liver Dis*. 2015 Dec;47(12):997-1006.
18. Yang, J.D., Abdelmalek, M.F., Pang, H., Guy, C.D., Smith, A.D., Diehl, A.M. and Suzuki, A. Gender and menopause impact severity of fibrosis among patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 2014 Apr; 59(4): 1406-1414.
19. Balakrishnan M, Patel P, Dunn-Valadez S, Dao C, Khan V, Ali H, El-Serag L, Hernaez R, Sisson A, Thrift AP, Liu Y, El-Serag HB, Kanwal F. Women Have a Lower Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease but a Higher Risk of Progression vs Men: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2021 Jan;19(1):61-71.
20. Paik JM, Henry L, De Avila L, Younossi, E, Racila A, Younossi ZM. Mortality related to nonalcoholic fatty liver disease is increasing in the United States. *Hepatol Commun*. 2019;3(11):1459-1471.
21. Wong VW, Chu WC, Wong GL, et al. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and advanced fibrosis in Hong Kong Chinese: a population study using proton-magnetic resonance spectroscopy and transient elastography. *Gut*. 2012;61:409–415.
22. PJ, Lou HP, Zhu YN. Identification of Hepatic Steatosis in Premenopausal and Postmenopausal Women Based on Phenotypes Combining Triglyceride Levels and Anthropometric Indices: A Cross-Sectional Study. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2021 Mar 23;14:1339-1347.
23. Lee SM, Ryu KJ, Son S, Lee YJ, Park H, Kim T. Body fat distribution and insulin resistance among Korean middle-aged women: a Korean National Health and Nutrition Examination Survey. *Obstet Gynecol Sci*. 2022 Sep;65(5):468-476.

24. Pan HJ, Chang HT, Lee CH. Association between tamoxifen treatment and the development of different stages of nonalcoholic fatty liver disease among breast cancer patients. *J Formos Med Assoc.* 2016 Jun;115(6):411-7.
25. Carulli L, Lonardo A, Lombardini S, et al. Gender, fatty liver and GGT. *Hepatology.* 2006;44:278–9.
26. Arshad T, Golabi P, Paik J, Mishra A, Younossi ZM. Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in the Female Population. *Hepatol Commun.* 2018;3(1):74-83..
27. Summart U, Thinkhamrop B, Chamadol N, Khuntikeo N, Songthamwat M, Kim CS. Gender differences in the prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the Northeast of Thailand: A population-based cross-sectional study. *F1000Res.* 2017 Sep 4;6:1630.
28. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, George J, Bugianesi E. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018 Jan;15(1):11-20.
29. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology.* 2005 Jul;42(1):44-52.
30. Xiong Xiao, Yang Liu, Yan Wei, Li He. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in postmenopausal woman: systematic review and meta-analysis. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 2021, 48(1), 24–30.
31. Bambha K, Belt P, Abraham M, Wilson LA, Pabst M, Ferrell L, Unalp-Arida A, Bass N; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network Research Group. Ethnicity and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2012 Mar;55(3):769-80.
32. Wang Z, Xu M, Hu Z, Shrestha UK. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its metabolic risk factors in women of different ages and body mass index. *Menopause.* 2015 Jun;22(6):667-73.
33. Ascha MS, Hanouneh IA, Lopez R, Tamimi TA, Feldstein AF, Zein NN. The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2010;51(6):1972–1978.
34. Nouredin M, Vipani A, Bresee C, et al. NASH Leading Cause of Liver Transplant in Women: Updated Analysis of Indications For Liver Transplant and Ethnic and Gender Variances. *The American journal of gastroenterology.* 2018;113(11):1649–1659.
35. Khalid YS, Dasu NR, Suga H, Dasu KN, Reja D, Shah A, McMahon D, Levine A. Increased cardiovascular events and mortality in females with NAFLD: a meta-analysis. *Am J Cardiovasc Dis.* 2020 Aug 15;10(3):258-271.
36. Narayanan P, Mara K, Izzy M, et al. Recurrent or De Novo Allograft Steatosis and Long-term Outcomes After Liver Transplantation. *Transplantation.* 2019;103(1):e14–e21.

37. Marchisello S, Di Pino A, Scicali R, Urbano F, Piro S, Purrello F, Rabuazzo AM. Pathophysiological, Molecular and Therapeutic Issues of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Overview. *Int J Mol Sci.* 2019 Apr 20;20(8):1948.
38. J. K. Dowman, J.W. Tomlinson, P.N. Newsome, Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease, *QJM: An International Journal of Medicine*, Volume 103, Issue 2, February 2010, Pages 71–83.
39. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology.* 1998 Apr;114(4):842-5.
40. Palma R, Pronio A, Romeo M, Scognamiglio F, Ventriglia L, Orlando VM, Lamazza A, Pontone S, Federico A, Dallio M. The Role of Insulin Resistance in Fueling NAFLD Pathogenesis: From Molecular Mechanisms to Clinical Implications. *J Clin Med.* 2022 Jun 24;11(13):3649.
41. Matthew J Watt, Paula M Miotto, William De Nardo, Magdalene K Montgomery, The Liver as an Endocrine Organ—Linking NAFLD and Insulin Resistance, *Endocrine Reviews*, Volume 40, Issue 5, October 2019, Pages 1367–1393.
42. Rada P, González-Rodríguez Á, García-Monzón C et al. Understanding lipotoxicity in NAFLD pathogenesis: is CD36 a key driver? *Cell Death Dis* 11, 802 (2020).
43. Del Ben M, Baratta F, Loffredo L, Angelico F. Oxidative stress: physiopathological role and possible therapeutic target in non-alcoholic fatty liver disease and in cardiovascular diseases. *Giornale Italiano dell'Arteriosclerosi* 2017; 8 (4): 3-13.
44. Guo B, Li Z. Endoplasmic reticulum stress in hepatic steatosis and inflammatory bowel diseases. *Front Genet.* 2014 Jul 25;5:242.
45. Arrese M, Cabrera D, Kalergis AM, Feldstein AE. Innate Immunity and Inflammation in NAFLD/NASH. *Dig Dis Sci.* 2016 May;61(5):1294-303.
46. Wang, J., He, W., Tsai, PJ. et al. Mutual interaction between endoplasmic reticulum and mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis* 19, 72 (2020)
47. Sookoian S., Pirola CJ. Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2011; 53: 1883-94.
48. Aragonès G, Auguet T, Armengol S, Berlanga A, Guiu-Jurado E, Aguilar C, Martínez S, Sabench F, Porrás JA, Ruiz MD, Hernández M, Sirvent JJ, Del Castillo D, Richart C. PNPLA3 Expression Is Related to Liver Steatosis in Morbidly Obese Women with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci.* 2016 Apr 27;17(5):630.
49. Wegermann K, Garrett ME, Zheng J, Coviello A, Moylan CA, Abdelmalek MF, Chow SC, Guy CD, Diehl AM, Ashley-Koch A, Suzuki A. Sex and Menopause Modify the Effect of Single Nucleotide Polymorphism Genotypes on Fibrosis in NAFLD. *Hepatology Commun.* 2021 Jan 18;5(4):598-607.
50. Meenakshi Vachher, Savita Bansal, Bhupender Kumar, Sandeep Yadav, Archana Burman. Deciphering the role of aberrant DNA methylation in NAFLD and NASH. *Elyon.* 2022 Oct 18;8(10):e11119.

51. Francisco V, Sanz MJ, Real JT, Marques P, Capuozzo M, Ait Eldjoudi D, Gualillo O. *Adipokines in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Are We on the Road toward New Biomarkers and Therapeutic Targets?* *Biology (Basel)*. 2022 Aug 19;11(8):1237.
52. Pezzino S, Sofia M, Faletra G, Mazzone C, Litrico G, La Greca G, Latteri S. *Gut-Liver Axis and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Vicious Circle of Dysfunctions Orchestrated by the Gut Microbiome*. *Biology (Basel)*. 2022 Nov 6;11(11):1622.
53. Hydes T, Alam U, Cuthbertson DJ. *The Impact of Macronutrient Intake on Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): Too Much Fat, Too Much Carbohydrate, or Just Too Many Calories?* *Front Nutr*. 2021 Feb 16;8:640557.
54. Lonardo A, Nascimbeni F, Ballestri S, Fairweather D, Win S, Than TA, Abdelmalek MF, Suzuki A. *Sex Differences in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: State of the Art and Identification of Research Gaps*. *Hepatology*. 2019 Oct;70(4):1457-1469.
55. Yuan L, Kardashian A, Sarkar M. *NAFLD in women: Unique pathways, biomarkers and therapeutic opportunities*. *Curr Hepatol Rep*. 2019 Dec;18(4):425-432.
56. Tom, S. E. & Mishra, G. D. *Current Topics in Menopause: a Life Course Approach to Reproductive Aging* (Bentham Science Publishers Ltd., 2013).
57. Avis NE, McKinlay SM. *The Massachusetts Women's Health Study: an epidemiologic investigation of the menopause*. *J Am Med Womens Assoc* (1972). 1995 Mar-Apr;50(2):45-9, 63.
58. Duffy, O. K., Iversen, L., Aucott, L. & Hannaford, P. C. *Factors associated with resilience or vulnerability to hot flushes and night sweats during the menopausal transition*. *Menopause* 20, 383–392 (2013).
59. Pachman DR, Jones JM, Loprinzi CL. *Management of menopause-associated vasomotor symptoms: Current treatment options, challenges and future directions*. *Int J Womens Health*. 2010 Aug 9;2:123-35.
60. Patni R, Mahajan A. *The Metabolic Syndrome and Menopause*. *J Midlife Health*. 2018;9(3):111-112.
61. Monteleone P, Mascagni G, Giannini A, Genazzani AR, Simoncini T. *Symptoms of menopause - global prevalence, physiology and implications*. *Nat Rev Endocrinol*. 2018 Apr;14(4):199-215.
62. Wegermann K, Suzuki A, Mavis AM, Abdelmalek MF, Diehl AM, Moylan CA. *Tackling Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Three Targeted Populations*. *Hepatology*. 2021 Mar;73(3):1199-1206.
63. Tikhonoff V, Casiglia E, Gasparotti F, Spinella P. *The uncertain effect of menopause on blood pressure*. *J Hum Hypertens*. 2019 Jun;33(6):421-428.
64. Ballestri S, Lonardo A, Bonapace S, et al. *Risk of cardiovascular, cardiac and arrhythmic complications in patients with non-alcoholic fatty liver disease*. *World J Gastroenterol*. 2014;20:1724–45.
65. Minqian Shen, Haifei Shi. *Sex Hormones and Their Receptors Regulate Liver Energy Homeostasis*. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:294278.

66. Brady CW. Liver disease in menopause. *World J Gastroenterol.* 2015;21(25):7613-7620.
67. Ministrini S, Montecucco F, Sahebkar A, Carbone F. Macrophages in the pathophysiology of NAFLD: The role of sex differences. *Eur J Clin Invest.* 2020 Jun;50(6):e13236.
68. Florentino GS, Cotrim HP, Vilar CP et al. "Nonalcoholic fatty liver disease in menopausal women." *Arq Gastroenterol.* 2013;50:180–185.
69. McKenzie J, Fisher BM, Jaap AJ, Stanley A, Paterson K, Sattar N. Effects of HRT on liver enzyme levels in women with type 2 diabetes: a randomized placebo-controlled trial. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;65:40–44.
70. Florentino G, Cotrim HP, Florentino A, Padilha C, Medeiros-Neto M, Bragagnol G, Schwingel P. Hormone replacement therapy in menopausal women: risk factor or protection to nonalcoholic fatty liver disease? *Ann Hepatol.* 2012 Jan-Feb;11(1):147-9.
71. Bruno S, Maisonneuve P, Castellana P, Rotmensz N, Rossi S, Maggioni M, et al. Incidence and risk factors for non-alcoholic steatohepatitis: prospective study of 5408 women enrolled in Italian tamoxifen chemoprevention trial. *BMJ* 2005; 330: 932–937.
72. Zhu, L.; Martinez, M.N.; Emfinger, C.H.; Palmisano, B.T.; Stafford, J.M. Estrogen signaling prevents diet-induced hepatic insulin resistance in male mice with obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2014, 306, E1188–E1197.
73. Camporez, J.P.; Jornayvaz, F.R.; Lee, H.Y.; Kanda, S.; Guigni, B.A.; Kahn, M.; Samuel, V.T.; Carvalho, C.R.; Petersen, K.F.; Jurczak, M.J.; et al. Cellular mechanism by which estradiol protects female ovariectomized mice from high-fat diet-induced hepatic and muscle insulin resistance. *Endocrinology* 2013, 154, 1021–1028.
74. Meda C, Barone M, Mitro N, Lolli F, Pedretti S, Caruso D, Maggi A, Della Torre S. Hepatic ERα accounts for sex differences in the ability to cope with an excess of dietary lipids. *Mol Metab.* 2020 Feb;32:97-108.
75. Lu G, Shimizu I, Cui X et al. Antioxidant and antiapoptotic activities of idoxifene and estradiol in hepatic fibrosis in rats. *Life Sci.* 2004;74:897–907.
76. Kamada Y, Kiso S, Yoshida Y, Chatani N, Kizu T, Hamano M, Tsubakio M, Takemura T, Ezaki H, Hayashi N, Takehara T. Estrogen deficiency worsens steatohepatitis in mice fed high-fat and high-cholesterol diet. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011 Dec;301(6):G1031-43.
77. Turola E, Petta S, Vanni E, Milosa F, Valenti L, Critelli R, Miele L, Maccio L, Calvaruso V, Fracanzani AL, Bianchini M, Raos N, Bugianesi E, Mercorella S, Di Giovanni M, Craxì A, Fargion S, Grieco A, Cammà C, Ex Cotelli F, Villa E. Ovarian senescence increases liver fibrosis in humans and zebrafish with steatosis. *Dis Model Mech.* 2015 Sep;8(9):1037-46.
78. Klair JS, Yang JD, Abdelmalek MF, Guy CD, Gill RM, Yates K, Unalp-Arida A, et al. A longer duration of estrogen deficiency increases fibrosis risk among postmenopausal women with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2016;64:85–91.

79. Ge S, Xie J, Liu F, He J, He J. *MicroRNA-19b reduces hepatic stellate cell proliferation by targeting GRB2 in hepatic fibrosis models in vivo and in vitro as part of the inhibitory effect of estradiol.* *J Cell Biochem.* 2015 Nov;116(11):2455-64.
80. Della Torre S. *Non-alcoholic Fatty Liver Disease as a Canonical Example of Metabolic Inflammatory-Based Liver Disease Showing a Sex-Specific Prevalence: Relevance of Estrogen Signaling.* *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020 Sep 18;11:572490.
81. Johanna K Di Stefano, *NAFLD and NASH in Postmenopausal Women: Implications for Diagnosis and Treatment.* *Endocrinology.* 2020 Oct 1;161(10):bqaa134.
82. Veronese N, Notarnicola M, Osella AR, Cisternino AM, Reddavid R, Inguaggiato R, Guerra V, Rotolo O, Zinzi I, Chiloiro M, Leandro G, Correale M, Tutino V, Misciagna G, Bonfiglio C, Caruso MG. *Menopause Does Not Affect Fatty Liver Severity In Women: A Population Study in a Mediterranean Area.* *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2018;18(5):513-521.
83. Chung GE, Yim JY, Kim D, Lim SH, Yang JI, Kim YS, Yang SY, Kwak MS, Kim JS, Cho SH. *The influence of metabolic factors for nonalcoholic Fatty liver disease in women.* *Biomed Res Int.* 2015;2015:131528.
84. Janssen I, Powell LH, Crawford S, Lasley B, Sutton-Tyrrell K. *Menopause and the metabolic syndrome: the Study of Women's Health Across the Nation.* *Arch Intern Med.* 2008 Jul 28;168(14):1568-75.
85. Hevener AL, Clegg DJ, Mauvais-Jarvis F. *Impaired estrogen receptor action in the pathogenesis of the metabolic syndrome.* *Mol Cell Endocrinol.* 2015 Dec 15;418 Pt 3(Pt 3):306-21.
86. Hirschberg AL. *Sex hormones, appetite and eating behaviour in women.* *Maturitas.* 2012 Mar;71(3):248-56.
87. Guthrie JR, Dennerstein L, Dudley EC. *Weight gain and the menopause: a 5-year prospective study.* *Climacteric* 1999;2:205–11 10.
88. Zhu D, Chung HF, Pandeya N, Dobson AJ, Kuh D, Crawford SL, et al. *Body mass index and age at natural menopause: An international pooled analysis of 11 prospective studies.* *Eur J Epidemiol.* 2018;33:699–710.
89. Davis SR, Castelo-Branco C, Chedraui P, Lumsden MA, Nappi RE, Shah D, Villaseca P; Writing Group of the International Menopause Society for World Menopause Day 2012. *Understanding weight gain at menopause.* *Climacteric.* 2012 Oct;15(5):419-29.
90. Ambikairajah A, Walsh E, Tabatabaei-Jafari H, Cherbuin N. *Fat mass changes during menopause: a metaanalysis.* *Am J Obstet Gynecol.* 2019 Nov;221(5):393-409.e50.
91. Karvonen-Gutierrez C, Kim C. *Association of Mid-Life Changes in Body Size, Body Composition and Obesity Status with the Menopausal Transition.* *Healthcare (Basel).* 2016;Jul 13;4(3):42.
92. Molina-Molina E, Furtado GE, Jones JG, Portincasa P, Vieira-Pedrosa A, Teixeira AM, Barros MP, Bachi ALL, Sardão VA. *The advantages of physical exercise as a preventive strategy against NAFLD in postmenopausal women.* *Eur J Clin Invest.* 2022 Mar;52(3):e13731.

93. Goossens G, H: *The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function*. *Obes Facts* 2017;10:207-215.
94. Gaspard U. *Hyperinsulinaemia, a key factor of the metabolic syndrome in postmenopausal women*. *Maturitas*. 2009;62:362–365.
95. Bilson J, Sethi JK, Byrne CD. *Non-alcoholic fatty liver disease: a multi-system disease influenced by ageing and sex, and affected by adipose tissue and intestinal function*. *Proc Nutr Soc*. 2022 May;81(2):146-161.
96. Hamaguchi M, Kojima T, Ohbora A, Takeda N, Fukui M, Kato T. *Aging is a risk factor of nonalcoholic fatty liver disease in premenopausal women*. *World J Gastroenterol*. 2012;18(3):237-243.
97. Park SH, Park YE, Lee J, Choi JH, Heo NY, Park J, Kim TO, Moon YS, Kim HK, Jang HJ, Park HY, Jeong CH, Suk KT, Kim DJ. *Lack of association between early menopause and non-alcoholic fatty liver disease in postmenopausal women*. *Climacteric*. 2020 Apr;23(2):173-177.
98. Kim D, Kim W, Joo SK, Kim JH, Harrison SA, Younossi ZM, Ahmed A. *Predictors of nonalcoholic steatohepatitis and significant fibrosis in non-obese fatty liver disease*. *Liver Int*. 2018 Oct 8.
99. Wang W, Ren J, Zhou W, Huang J, Wu G, Yang F, Yuan S, Fang J, Liu J, Jin Y, Qi H, Miao Y, Le Y, Ge C, Qiu X, Wang J, Huang P, Liu Z, Wang S. *Lean non-alcoholic fatty liver disease (Lean-NAFLD) and the development of metabolic syndrome: a retrospective study*. *Sci Rep*. 2022 Jun 29;12(1):10977.
100. Bondarev D, Laakkonen EK, Finni T, Kokko K, Kujala UM, Aukee P, Kovanen V, Sipilä S. *Physical performance in relation to menopause status and physical activity*. *Menopause*. 2018 Dec;25(12):1432-1441.
101. Juppi HK, Sipilä S, Cronin NJ, et al. *Role of Menopausal Transition and Physical Activity in Loss of Lean and Muscle Mass: A Follow-Up Study in Middle-Aged Finnish Women*. *J Clin Med*. 2020;9(5):1588
102. Ko J, Park YM. *Menopause and the Loss of Skeletal Muscle Mass in Women*. *Iran J Public Health*. 2021 Feb;50(2):413-414.
103. Petermann-Rocha F, Gray SR, Forrest E, Welsh P, Sattar N, Celis-Morales C, Ho FK, Pell JP. *Associations of muscle mass and grip strength with severe NAFLD: A prospective study of 333,295 UK Biobank participants*. *J Hepatol*. 2022 May;76(5):1021-1029.
104. Zurlo F, Larson K, Bogardus C, Ravussin E. *Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure*. *J Clin Invest*. 1990 Nov;86(5):1423-7.
105. Srikanthan P, Karlamangla AS. *Relative muscle mass is inversely associated with insulin resistance and prediabetes. Findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey*. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Sep;96(9):2898-903.
106. Altajar S, Baffy G. *Skeletal Muscle Dysfunction in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. *J Clin Transl Hepatol*. 2020 Dec 28;8(4):414-423.

107. Eckel J. *Myokines in metabolic homeostasis and diabetes. Diabetologia.* 2019 Sep;62(9):1523-1528.
108. Zhang Y, Lu D, Wang R, Fu W, Zhang S. *Relationship between Muscle Mass/Strength and Hepatic Fat Content in Post-Menopausal Women. Medicina (Kaunas).* 2019; Sep 24;55(10):629.
109. Wang J, Rennie KL, Gu W, Li H, Yu Z, Lin X. *Independent associations of body-size adjusted fat mass and fat-free mass with the metabolic syndrome in Chinese. Ann Hum Biol.* 2009 Jan-Feb;36(1):110-21.
110. Melpomeni P, Chrysi K and George D. *Body Composition as an Important Determinant of Metabolic Syndrome in Postmenopausal Women. Endocrinol Metabol Syndrome 2012, S:1.*
111. Targher G, Byrne CD, Lonardo A, Zoppini G, Barbui C. *Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: A meta-analysis. J Hepatol.* 2016 Sep;65(3):589-600.
112. Ma W, Wu W, Wen W, Xu F, Han D, Lyu J, Huang Y. *Association of NAFLD with cardiovascular disease and all-cause mortality: a large-scale prospective cohort study based on UK Biobank. Ther Adv Chronic Dis.* 2022 Sep 20;13:20406223221122478.
113. Stepanova M, Younossi ZM. *Independent association between nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease in the US population. Clin Gastroenterol Hepatol.* 2012 Jun;10(6):646-50.
114. Lu H, Liu H, Hu F, Zou L, Luo S, Sun L. *Independent Association between Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. Int J Endocrinol.* 2013;2013:124958.
115. Abdeldyem SM, Goda T, Khodeir SA, Abou Saif S, Abd-Elsalam S. *Nonalcoholic fatty liver disease in patients with acute ischemic stroke is associated with more severe stroke and worse outcome. J Clin Lipidol.* 2017 Jul-Aug;11(4):915-919.
116. Byrne CD, Targher G. *NAFLD: a multisystem disease. J Hepatol.* 2015 Apr;62(1 Suppl):S47-64.
117. Josloff K, Beiriger J, Khan A, Gawel RJ, Kirby RS, Kendrick AD, Rao AK, Wang RX, Schafer MM, Pearce ME, Chauhan K, Shah YB, Marhefka GD, Halegoua-DeMarzio D. *Comprehensive Review of Cardiovascular Disease Risk in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. J Cardiovasc Dev Dis.* 2022 Nov 26;9(12):419.
118. Ballestri S, Lonardo A, Bonapace S, et al. *"Risk of cardiovascular, cardiac and arrhythmic complications in patients with non-alcoholic fatty liver disease." World J Gastroenterol.* 2014;20:1724-45
119. Jichitu A, Bungau S, Stanescu AMA, Vesa CM, Toma MM, Bustea C, Iurciuc S, Rus M, Bacalbasa N, Diaconu CC. *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Cardiovascular Comorbidities: Pathophysiological Links, Diagnosis, and Therapeutic Management. Diagnostics (Basel).* 2021 Apr 12;11(4):689.

120. Lerner DJ, Kannel WB. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. *Am Heart J.* 1986 Feb;111(2):383-90.
121. Iorga A, Cunningham CM, Moazeni S, Ruffenach G, Umar S, Eghbali M. The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. *Biol Sex Differ.* 2017 Oct 24;8(1):33.
122. Zhu D, Chung HF, Dobson AJ, Pandeya N, Giles GG, Bruinsma F, Brunner EJ, Kuh D, Hardy R, Avis NE, Gold EB, Derby CA, Matthews KA, Cade JE, Greenwood DC, Demakakos P, Brown DE, Sievert LL, Anderson D, Hayashi K, Lee JS, Mizunuma H, Tillin T, Simonsen MK, Adami HO, Weiderpass E, Mishra GD. Age at natural menopause and risk of incident cardiovascular disease: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Public Health.* 2019 Nov;4(11):e553-e564.
123. Gohlke-Bärwolf C. Coronary artery disease--is menopause a risk factor? *Basic Res Cardiol.* 2000;95 Suppl 1:177-83.
124. Mehran R. et al. The Lancet Commission on women and cardiovascular disease: time for a shift in women's health. *Lancet* 2019; 393: 967-968.
125. Maas AHEM et al. Cardiovascular health after menopause transition, pregnancy disorders, and other gynaecologic conditions: a consensus document from European cardiologists, gynaecologists, and endocrinologists. *EHJ*, 2021; 42: 967-984.
126. El Khoudary SR, Aggarwal B, Beckie TM, Hodis HN, Johnson AE, Langer RD, Limacher MC, Manson JE, Stefanick ML, Allison MA; American Heart Association Prevention Science Committee of the Council on Epidemiology and Prevention; and Council on Cardiovascular and Stroke Nursing. Menopause Transition and Cardiovascular Disease Risk: Implications for Timing of Early Prevention: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation.* 2020 Dec 22;142(25):e506-e532.
127. Allen AM, Therneau TM, Mara KC, et al. Women With Nonalcoholic Fatty Liver Disease Lose Protection Against Cardiovascular Disease: A Longitudinal Cohort Study. *Am J Gastroenterol.* 2019;114(11):1764-1771.
128. Li X, Shi H, Wang Z, Chang L, Zhang M, Dong X. Arterial stiffness is increased in nondiabetic, nonhypertensive postmenopausal women with nonalcoholic fatty liver disease. *J Hypertens.* 2017 Jun;35(6):1226-1234.
129. Khalid YS, Dasu NR, Suga H, Dasu KN, Reja D, Shah A, McMahon D, Levine A. Increased cardiovascular events and mortality in females with NAFLD: a meta-analysis. *Am J Cardiovasc Dis.* 2020 Aug 15;10(3):258-271.
130. Kim MK, Ahn CW, Nam JS, Kang S, Park JS, Kim KR. Association between nonalcoholic fatty liver disease and coronary artery calcification in postmenopausal women. *Menopause.* 2015 Dec;22(12):1323-7.
131. Galassi A, Reynolds K, He J. Metabolic syndrome and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis. *Am J Med.* 2006 Oct;119(10):812-9.

132. Gami AS, Witt BJ, Howard DE, Erwin PJ, Gami LA, Somers VK, Montori VM. Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Am Coll Cardiol.* 2007 Jan 30;49(4):403-14.
133. Alshammary AF, Alharbi KK, Alshehri NJ, Vennu V, Ali Khan I. Metabolic Syndrome and Coronary Artery Disease Risk: A Meta-Analysis of Observational Studies. *Int J Environ Res Public Health.* 2021 Feb 11;18(4):1773.
134. Yan-Ci Zhao, Guo-Jun Zhao, Ze Chen, Zhi-Gang She, Jingjing Cai, Hongliang Li. Nonalcoholic Fatty Liver Disease An Emerging Driver of Hypertension Hypertension. 2020;75:275–284.
135. Li G, Peng Y, Chen Z, Li H, Liu D, Ye X. Bidirectional Association between Hypertension and NAFLD: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Int J Endocrinol.* 2022 Mar 24;2022:8463640.
136. Qian LY, Tu JF, Ding YH, et al. Association of blood pressure level with nonalcoholic fatty liver disease in nonhypertensive population: Normal is not the new normal. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(29):e4293.
137. Oikonomou D, Georgiopoulos G, Katsi V, Kourek C, Tsioufis C, Alexopoulou A, Koutli E, Tousoulis D. Non-alcoholic fatty liver disease and hypertension: coprevalent or correlated? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2018 Sep;30(9):979-985.
138. Xu S, Chen L, Hong D, Yang L, Li X, Wang X. Mean Arterial Pressure Is Related to Incident Nonalcoholic Fatty Liver Disease among the Nonobese Female with Normal Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels: A Large Cohort Study in China. *Gastroenterol Res Pract.* 2020;2020:3580840.
139. Lew J, Sanghavi M, Ayers CR, McGuire DK, Omland T, Atzler D, Gore MO, Neeland I, Berry JD, Khera A, Rohatgi A, de Lemos JA. Sex-Based Differences in Cardiometabolic Biomarkers. *Circulation.* 2017 Feb 7;135(6):544-555.
140. Elffers TW, de Mutsert R, Lamb HJ, de Roos A, Willems van Dijk K, Rosendaal FR, Jukema JW, Trompet S. Body fat distribution, in particular visceral fat, is associated with cardiometabolic risk factors in obese women. *PLoS One.* 2017 Sep 28;12(9):e0185403.
141. Srikanthan P, Horwich TB, Calton Press M, Gornbein J, Watson KE. Sex Differences in the Association of Body Composition and Cardiovascular Mortality. *J Am Heart Assoc.* 2021 Feb;10(5):e017511.
142. Carbone S, Kirkman DL, Garten RS, Rodriguez-Miguel P, Artero EG, Lee DC, Lavie CJ. Muscular Strength and Cardiovascular Disease: an updated state-of-the-art narrative review. *J Cardiopulm Rehabil Prev.* 2020 Sep;40(5):302-309.
143. Golabi P, Gerber L, Paik JM, Deshpande R, de Avila L, Younossi ZM. Contribution of sarcopenia and physical inactivity to mortality in people with non-alcoholic fatty liver disease. *JHEP Rep.* 2020;2(6):100171.

144. Han TS, Al-Gindan YY, Govan L, Hankey CR, Lean MEJ. Associations of body fat and skeletal muscle with hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2019 Feb;21(2):230-238.
145. Bai T, Fang F, Li F, Ren Y, Hu J, Cao J. Sarcopenia is associated with hypertension in older adults: a systematic review and meta-analysis. *BMC Geriatr*. 2020 Aug 6;20(1):279.
146. Tanaka KI, Kanazawa I, Sugimoto T. Reduced muscle mass and accumulation of visceral fat are independently associated with increased arterial stiffness in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 2016 Dec;122:141-147.
147. Kim HB, Lee YJ. Association of resting heart rate with non alcoholic fatty liver disease in postmenopausal women. *Medicine (Baltimore)*. 2020 Apr;99(14):e19529.
148. Thurston RC, Sutton-Tyrrell K, Everson-Rose SA, Hess R, Powell LH, Matthews KA. Hot flashes and carotid intima media thickness among midlife women. *Menopause* 2011;18:352–358.
149. Muka T, Oliver-Williams C, Colpani V, Kunutsor S, Chowdhury S, Chowdhury R, et al. Association of vasomotor and other menopausal symptoms with risk of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2016;11:e0157417.
150. Ryu KJ, Park H, Kim YJ, Yi KW, Shin JH, Hur JY, Kim T. Moderate to severe vasomotor symptoms are risk factors for non-alcoholic fatty liver disease in postmenopausal women. *Maturitas*. 2018 Nov;117:22-28.
151. Francque SM, Marchesini G, Kautz A, Walmsley M, Dorner R, Lazarus JV, Zelber-Sagi S, Hallsworth K, Busetto L, Frühbeck G, Dicker D, Woodward E, Korenjak M, Willemsse J, Koek GH, Vinker S, Ungan M, Mendive JM, Lionis C. Non-alcoholic fatty liver disease: A patient guideline. *JHEP Rep*. 2021 Sep 17;3(5):100322.
152. European Association for the Study of the Liver (EASL); European Association for the Study of Diabetes(EASD); European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO. "Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease." *J Hepatol* 2016; 64: 1388-1402.
153. Cusi K, Isaacs S, Barb D, Basu R, Caprio S, Garvey WT, Kashyap S, Mechanick JJ, Mouzaki M, Nadolsky K, Rinella ME, Vos MB, Younossi Z. American Association of Clinical Endocrinology Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Primary Care and Endocrinology Clinical Settings: Co-Sponsored by the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). *Endocr Pract*. 2022 May;28(5):528-562.
154. Basaranoglu M, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Clinical Features and Pathogenesis. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2006;2(4):282-291.
155. Chen LW, Huang MS, Shyu YC, Chien RN. Gamma-glutamyl transpeptidase elevation is associated with metabolic syndrome, hepatic steatosis, and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A community-based cross-sectional study. *Kaohsiung J Med Sci*. 2021 Sep;37(9):819-827.

156. Malakouti M, Kataria A, Ali SK, Schenker S. Elevated Liver Enzymes in Asymptomatic Patients - What Should I Do? *J Clin Transl Hepatol.* 2017 Dec 28;5(4):394-403.
157. Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Halpern Z, Oren R. NAFLD and hyperinsulinemia are major determinants of serum ferritin levels. *J Hepatol.* 2007 Apr;46(4):700-7.
158. McClain DA, Sharma NK, Jain S, Harrison A, Salaye LN, Comeau ME, Langefeld CD, Lorenzo FR, Das SK. Adipose Tissue Transferrin and Insulin Resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018 Nov 1;103(11):4197-4208.
159. Castera L, Friedrich-Rust M, Loomba R. Noninvasive Assessment of Liver Disease in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* 2019 Apr;156(5):1264-1281.e4.
160. Li Q, Dhyan M, Grajo JR, Sirlin C, Samir AE. Current status of imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol.* 2018;10(8):530-542.
161. Iijima, Dr. Hiroko. Assessment of non-alcoholic fatty liver disease with Attenuation Imaging (ATI). (2020).
162. Dioguardi Burgio M, Ronot M, Reizine E, Rautou PE, Castera L, Paradis V, Garteiser P, Van Beers B, Vilgrain V. Quantification of hepatic steatosis with ultrasound: promising role of attenuation imaging coefficient in a biopsy-proven cohort. *Eur Radiol.* 2020 Apr;30(4):2293-2301.
163. Ferraioli G, Maiocchi L, Savietto G, Tinelli C, Nichetti M, Rondanelli M, Calliada F, Preda L, Filice C. Performance of the Attenuation Imaging Technology in the Detection of Liver Steatosis. *J Ultrasound Med.* 2021 Jul;40(7):1325-1332.
164. Ferraioli G, Soares Monteiro LB. Ultrasound-based techniques for the diagnosis of liver steatosis. *World J Gastroenterol.* 2019 Oct 28;25(40):6053-6062.
165. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A, Tiribelli C. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol.* 2006 Nov 2;6:33.
166. Lonardo A, Ballestri S, Bedogni G, Bellentani S, Tiribelli C. The Fatty liver Index (FLI) 15 years later: a reappraisal. *Metabolism and Target Organ Damage.* 2021; 1(2):10.
167. Lee HJ, Jo HN, Kim YH, Kim SC, Joo JK, Lee KS. Predictive Value of Lipid Accumulation Product, Fatty Liver Index, Visceral Adiposity Index for Metabolic Syndrome According to Menopausal Status. *Metab Syndr Relat Disord.* 2018 Nov;16(9):477-482.
168. Associazione Italiana per lo Studio del Fegato (AISF), Società Italiana di Diabetologia (SID) and Società Italiana dell'Obesità (SIO). Non-alcoholic fatty liver disease in adults 2021: A clinical practice guideline of the Italian Association for the Study of the Liver (AISF), the Italian Society of Diabetology (SID) and the Italian Society of Obesity (SIO). *Eat Weight Disord.* 2022 Jun;27(5):1603-1619.
169. Kawaguchi T, Tsutsumi T, Nakano D, Torimura T. MAFLD: Renovation of clinical practice and disease awareness of fatty liver. *Hepatol Res.* 2022 May;52(5):422-432.
170. Ng C, Chan K, Ou K, et al. Mafld and nafld in lean individuals. A prospective analysis of 12,505 lean individuals *Gut* 2022;71:A50.

171. Fouad Y, Waked I, Bollipo S, Gomaa A, Ajlouni Y, Attia D. What's in a name? Renaming 'NAFLD' to 'MAFLD'. *Liver Int.* 2020 Jun;40(6):1254-1261.
172. Lin S, Huang J, Wang M, Kumar R, Liu Y, Liu S, Wu Y, Wang X, Zhu Y. Comparison of MAFLD and NAFLD diagnostic criteria in real world. *Liver Int.* 2020 Sep;40(9):2082-2089.
173. Kwak, Min-Sun, and Donghee Kim. Non-alcoholic fatty liver disease and lifestyle modifications, focusing on physical activity. *The Korean journal of internal medicine* vol. 33,1 (2018): 64-74.
174. Mirmiran P, Amirhamidi Z, Ejtahed HS, Bahadoran Z, Azizi F. Relationship between Diet and Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Review Article. *Iran J Public Health.* 2017 Aug;46(8):1007-1017.
175. Zelber-Sagi S, Lotan R, Shlomai A, Webb M, Harrari G, Buch A, Nitzan Kaluski D, Halpern Z, Oren R. Predictors for incidence and remission of NAFLD in the general population during a seven-year prospective follow-up. *J Hepatol.* 2012 May;56(5):1145-1151.
176. Wehmeyer, Malte H et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with excessive calorie intake rather than a distinctive dietary pattern. *Medicine* vol. 95,23 (2016): e3887.
177. Kechagias S, Ernersson Å, Dahlqvist O, et al. Fast-food-based hyper-alimentation can induce rapid and profound elevation of serum alanine aminotransferase in healthy subjects *Gut* 2008;57:649-654.
178. Carobbio S, Pellegrinelli V, Vidal-Puig A. Adipose Tissue Function and Expandability as Determinants of Lipotoxicity and the Metabolic Syndrome. *Adv Exp Med Biol.* 2017;960:161-196.
179. Fabbrini E, Yoshino J, Yoshino M, Magkos F, Tiemann Luecking C, Samovski D, Fraterrigo G, Okunade AL, Patterson BW, Klein S. Metabolically normal obese people are protected from adverse effects following weight gain. *The Journal of Clinical Investigation* 2015; 125:787–795.
180. Cortez-Pinto H, Jesus L, Barros H, Lopes C, Moura MC, Camilo ME. "How different is the dietary pattern in non-alcoholic steatohepatitis patients?" *Clin. Nutr.* 2006, 25, 816–823.
181. Eslamparast T, Tandon P, Raman M. Dietary Composition Independent of Weight Loss in the Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients.* 2017 Jul 26;9(8):800.
182. Basaranoglu M, Basaranoglu G, Bugianesi E. Carbohydrate intake and nonalcoholic fatty liver disease: fructose as a weapon of mass destruction. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2015 Apr;4(2):109-16.
184. Westerbacka J, Lammi K, Hakkinen AM, Rissanen A, Salminen I, Aro A. Dietary fat content modifies liver fat in overweight nondiabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* (2005) 90:2804–9.

185. Hydes T, Alam U, Cuthbertson DJ. *The Impact of Macronutrient Intake on Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): Too Much Fat, Too Much Carbohydrate, or Just Too Many Calories?* *Front Nutr.* 2021 Feb 16;8:640557.
186. Florentino GS, Cotrim HP, Vilar CP, Florentino AV, Guimarães GM, Barreto VS. *Nonalcoholic fatty liver disease in menopausal women.* *Arq Gastroenterol.* 2013 Jul-Sep;50(3):180-5.
187. Jegatheesan P, De Bandt JP. *Fructose and NAFLD: The Multifaceted Aspects of Fructose Metabolism.* *Nutrients.* 2017 Mar 3;9(3):230.
188. Jia Q, Xia Y, Zhang Q, Wu H, Du H, Liu L, Wang C, Shi H, Guo X, Liu X et al. *"Dietary patterns are associated with prevalence of fatty liver disease in adults."* *Eur. J. Clin. Nutr.* 2015, 69, 914–921.
189. Lang S, Martin A, Farowski F, Wisplinghoff H, Vehreschild MJGT, Liu J, Krawczyk M, Nowag A, Kretzschmar A, Herweg J, Schnabl B, Tu XM, Lammert F, Goeser T, Tacke F, Heinzer K, Kasper P, Steffen HM, Demir M. *High Protein Intake Is Associated With Histological Disease Activity in Patients With NAFLD.* *Hepatology Commun.* 2020 Mar 26;4(5):681-695.
190. Zeisel SH. *Choline: an important nutrient in brain development, liver function and carcinogenesis.* *J Am Coll Nutr* 1992;11:473–81.
191. Guerrerio AL, Colvin RM, Schwartz AK, Molleston JP, Murray KF, Diehl A, Mohan P, Schwimmer JB, Lavine JE, Torbenson MS, Scheimann AO. *Choline intake in a large cohort of patients with nonalcoholic fatty liver disease.* *Am J Clin Nutr.* 2012 Apr;95(4):892-900.
192. Armeni E, Lambrinoudaki I, Ceausu I, Depypere H, Mueck A, Pérez-López FR, Schouw YT, Senturk LM, Simoncini T, Stevenson JC, Stute P, Rees M. *Maintaining postreproductive health: A care pathway from the European Menopause and Andropause Society (EMAS).* *Maturitas.* 2016 Jul;89:63-72.
193. Koutoukidis DA, Koshiaris C, Henry JA, Noreik M, Morris E, Manoharan I, Tudor K, Bodenham E, Dunnigan A, Jebb SA, Aveyard P. *The effect of the magnitude of weight loss on non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis.* *Metabolism.* 2021 Feb;115:154455.
194. Wong VW, Wong GL, Chan RS, Shu SS, Cheung BH, Li LS, Chim AM, Chan CK, Leung JK, Chu WC, Woo J, Chan HL. *Beneficial effects of lifestyle intervention in non-obese patients with non-alcoholic fatty liver disease.* *J Hepatol.* 2018 Dec;69(6):1349-1356.
195. Romero-Gómez M, Zelber-Sagi S, Trenell M. *Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise.* *J Hepatol.* 2017 Oct;67(4):829-846
196. Suzuki A, Abdelmalek MF. *Nonalcoholic fatty liver disease in women.* *Womens Health (Lond).* 2009 Mar;5(2):191-203.
197. Chopra S, Sharma KA, Ranjan P, Malhotra A, Vikram NK, Kumari A. *Weight Management Module for Perimenopausal Women: A Practical Guide for Gynecologists.* *J Midlife Health.* 2019;10(4):165-172.

198. Stamatelopoulos K, Papavagelis C, Augoulea A, Armeni E, Karagkouni I, Avgeraki E, Georgiopoulos G, Yannakoulia M, Lambrinouadaki I. Dietary patterns and cardiovascular risk in postmenopausal women: Protocol of a cross-sectional and prospective study. *Maturitas*. 2018 Oct;116:59-65.
199. Sirola J, Rikkinen T, Tuppurainen M, Honkanen R, Jurvelin JS, Kröger H. Maintenance of muscle strength may counteract weight-loss-related postmenopausal bone loss--a population-based approach. *Osteoporos Int*. 2006;17(5):775-82.
200. Varady KA. Dietary strategies for weight loss in midlife women. *Menopause*. 2018 Jun;25(6):697-699.
201. Guasch-Ferré M, Willett WC. The Mediterranean diet and health: a comprehensive overview. *J Intern Med*. 2021 Sep;290(3):549-566.
202. Salomone F, Godos J, Zelber-Sagi S. Natural antioxidants for non-alcoholic fatty liver disease: molecular targets and clinical perspectives. *Liver Int*. 2016 Jan;36(1):5-20.
203. Abenavoli, L.; Milic, N.; Luzza, F.; Boccuto, L.; De Lorenzo, A. Polyphenols Treatment in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Transl. Int. Med*. 2017, 5, 144–147.
204. Yang J, Fernández-Galilea M, Martínez-Fernández L, González-Muniesa P, Pérez-Chávez A, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ. Oxidative Stress and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Effects of Omega-3 Fatty Acid Supplementation. *Nutrients*. 2019 Apr 18;11(4):872.
205. Galié S, García-Gavilán J, Papandreou C, Camacho-Barcía L, Arcelin P, Palau-Galindo A, Rabassa A, Bulló M. Effects of Mediterranean Diet on plasma metabolites and their relationship with insulin resistance and gut microbiota composition in a crossover randomized clinical trial. *Clin Nutr*. 2021 Jun;40(6):3798-3806.
206. WMA Declaration of Helsinki. <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects>.
207. Craig CL, Marshall AL, Sjöström M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, Pratt M, Ekelund U, Yngve A, Sallis JF, Oja P. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc*. 2003 Aug;35(8):1381-95.
208. Martínez-González MA, García-Arellano A, Toledo E, Salas-Salvadó J, Buil-Cosiales P, Corella D, et al. A 14-Item Mediterranean Diet Assessment Tool and Obesity Indexes among High-Risk Subjects: The PREDIMED Trial. Peiró C, curatore. *PLoS ONE*. 14 agosto 2012;7(8):e43134.
209. Entwistle TR, Green AC, Fildes JE, Miura K. Adherence to Mediterranean and low-fat diets among heart and lung transplant recipients: a randomized feasibility study. *Nutr J*. 2018 Feb 14;17(1):22.
210. Casadei, K. & Kiel, J. Anthropometric Measurement. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2020).
211. Waist circumference and waist-hip ratio: report of a WHO expert consultation, Geneva, 8-11 December 2008. (World Health Organization, 2011).

212. Bendavid I, Lobo DN, Barazzoni R, Cederholm T, Coëffier M, de van der Schueren M, Fontaine E, Hiesmayr M, Laviano A, Pichard C, Singer P. The centenary of the Harris-Benedict equations: How to assess energy requirements best? Recommendations from the ESPEN expert group. *Clin Nutr.* 2021 Mar;40(3):690-701.
213. Jackson AS, Pollock ML, Ward A. Generalized equations for predicting body density of women. *Med Sci Sports Exerc.* 1980;12(3):175-81.
214. SIRI WE. The gross composition of the body. *Adv Biol Med Phys.* 1956;4:239-80.
215. Okosun IS, Boltri JM, Hepburn VA, Eriksen MP, Davis-Smith M: Regional fat localizations and racial/ethnic variations in odds of hypertension in at-risk American adults. *J Hum Hyperten* 2006; 20: 362-371.
216. Sievenpiper JL, Jenkins DJ, Josse RG, Leiter LA, Vuksan V: Simple skinfoldthickness measurements complement conventional anthropometric assessments in predicting glucose tolerance. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 567-573.
217. Sergi G, De Rui M, Stubbs B, Veronese N, Manzato E. Measurement of lean body mass using bioelectrical impedance analysis: a consideration of the pros and cons. *Aging Clin Exp Res.* 2017 Aug;29(4):591-597.
218. Marini E, Buffa R, Saragat B, Coin A, Toffanello ED, Berton L, Manzato E, Sergi G. The potential of classic and specific bioelectrical impedance vector analysis for the assessment of sarcopenia and sarcopenic obesity. *Clin Interv Aging.* 2012;7:585-91.
219. Akamatsu Y, Kusakabe T, Arai H, Yamamoto Y, Nakao K, Ikeue K, Ishihara Y, Tagami T, Yasoda A, Ishii K, Satoh-Asahara N. Phase angle from bioelectrical impedance analysis is a useful indicator of muscle quality. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2022 Feb;13(1):180-189.
220. Nwosu AC, Mayland CR, Mason S, Cox TF, Varro A, Stanley S, Ellershaw J. Bioelectrical impedance vector analysis (BIVA) as a method to compare body composition differences according to cancer stage and type. *Clin Nutr ESPEN.* 2019 Apr;30:59-66.
221. Rogoza AN, Pavlova TS, Sergeeva MV. Validation of A&D UA-767 device for the self-measurement of blood pressure. *Blood Press Monit.* 2000 Aug;5(4):227-31.
222. G. S. Stergiou, P. Palatini, G. Paratic, Eoin O'Brien et al 2021-Linee guida Pratiche della Società Europea di Ipertensione per la Misurazione della Pressione Arteriosa Clinica ed Out-of-Office.
223. Elffers TW, de Mutsert R, Lamb HJ, de Roos A, Willems van Dijk K, Rosendaal FR, Jukema JW, Trompet S. "Body fat distribution, in particular visceral fat, is associated with cardiometabolic risk factors in obese women." *PLoS One.* 2017;12(9):e0185403.
224. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS: Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972; 18: 499-502.

225. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985 Jul;28(7):412-9.
226. Hong S, Han K, Park CY. The triglyceride glucose index is a simple and low-cost marker associated with atherosclerotic cardiovascular disease: a population-based study. *BMC Med*. 2020 Nov 25;18(1):361.
227. Lee J, Vali Y, Boursier J, Spijker R, Anstee QM, Bossuyt PM, Zafarmand MH. Prognostic accuracy of FIB-4, NAFLD fibrosis score and APRI for NAFLD-related events: A systematic review. *Liver Int*. 2021 Feb;41(2):261-270.
228. Huh Y, Cho YJ, Nam GE. Recent Epidemiology and Risk Factors of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Obes Metab Syndr*. 2022 Mar 30;31(1):17-27.
229. Park SH, Park YE, Lee J, Choi JH, Heo NY, Park J, Kim TO, Moon YS, Kim HK, Jang HJ, Park HY, Jeong CH, Suk KT, Kim DJ. Lack of association between early menopause and non-alcoholic fatty liver disease in postmenopausal women. *Climacteric*. 2020 Apr;23(2):173-177.
230. Ryu S, Suh BS, Chang Y, Kwon MJ, Yun KE, Jung HS, Kim CW, Kim BK, Kim YJ, Choi Y, Ahn J, Cho YK, Kim KH, Ahn Y, Park HY, Chung EC, Shin H, Cho J. Menopausal stages and non-alcoholic fatty liver disease in middle-aged women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2015 Jul;190:65-70.
231. Lu J, Zhang J, Du R, Wang T, Xu M, Xu Y, Wang W, Bi Y, Li D, Chen Y, Ning G. Age at menarche is associated with the prevalence of non-alcoholic fatty liver disease later in life. *J Diabetes*. 2017 Jan;9(1):53-60.
232. Kubihal S, Gupta Y, Shalimar, Kandasamy D, Goyal A, Kalaivani M, Goyal A, Kedia S, Kachhawa G, Ambekar S, Bhatia D, Garg V, Gupta N, Tandon N. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and factors associated with it in Indian women with a history of gestational diabetes mellitus. *J Diabetes Investig*. 2021 May;12(5):877-885.
233. Wang N, Li Q, Han B, Chen Y, Zhu C, Chen Y, Xia F, Lu M, Meng Y, Guo Y, Ye L, Sui C, Kuang L, Lin D, Lu Y. Follicle-stimulating hormone is associated with non-alcoholic fatty liver disease in Chinese women over 55 years old. *J Gastroenterol Hepatol*. 2016 Jun;31(6):1196-202.
234. Guthrie JR, Dennerstein L, Dudley EC. Weight gain and the menopause: a 5-year prospective study. *Climacteric* 1999;2:205–11 10.
235. Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H, Fujii K, Omatsu T, Nakajima T, Sarui H, Shimazaki M, Kato T, Okuda J, Ida K. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med*. 2005 Nov 15;143(10):722-8.
236. Greendale GA, Sternfeld B, Huang M, Han W, Karvonen-Gutierrez C, Ruppert K, Cauley JA, Finkelstein JS, Jiang SF, Karlamangla AS. Changes in body composition and weight during the menopause transition. *JCI Insight*. 2019 Mar 7;4(5):e124865.

237. Pang Q, Zhang JY, Song SD, Qu K, Xu XS, Liu SS, Liu C. Central obesity and nonalcoholic fatty liver disease risk after adjusting for body mass index. *World J Gastroenterol*. 2015 Feb 7;21(5):1650-62.
238. Claypool K, Long MT, Patel CJ. Waist Circumference and Insulin Resistance Are the Most Predictive Metabolic Factors for Steatosis and Fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2022 Jun 6:S1542-3565(22)00532-8.
239. Ghaemi A, Hosseini N, Osati S, Naghizadeh MM, Dehghan A, Ehrampoush E, Honarvar B, Homayounfar R. Waist circumference is a mediator of dietary pattern in Non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep*. 2018 Mar 19;8(1):4788.
240. Hong SH, Hwang SY, Kim JA, Lee YB, Roh E, Kim NH, Seo JA, Kim SG, Kim NH, Choi KM, Baik SH, Yoo HJ. Comparison of anthropometric indices for the screening of nonalcoholic fatty liver disease in pre- and postmenopausal women. *Menopause*. 2020 Jan;27(1):88-94.
241. Wing RR, Matthews KA, Kuller LH, Meilahn EN, Plantinga P. Waist to hip ratio in middle-aged women. Associations with behavioral and psychosocial factors and with changes in cardiovascular risk factors. *Arterioscler Thromb*. 1991 Sep-Oct;11(5):1250-7.
242. Lo K, Liu Q, Allison M, Feng YQ, Chan K, Phillips L, Manson J, Liu S. Prospective Associations of Waist-to-Height Ratio With Cardiovascular Events in Postmenopausal Women: Results From the Women's Health Initiative. *Diabetes Care*. 2019 Sep;42(9):e148-e149.
243. Shi J, Wang Z, Zhang W, Niu Y, Lin N, Li X, Zhang H, Ning G, Fan J, Qin L, Su Q, Yang Z. Neck circumference as an independent predictor for NAFLD among postmenopausal women with normal body mass index. *Nutr Metab (Lond)*. 2021 Mar 17;18(1):30.
244. Ariya M, Koohpayeh F, Ghaemi A, Osati S, Davoodi SH, Razzaz JM, Javedan G, Ehrampoush E, Homayounfar R. Assessment of the association between body composition and risk of non-alcoholic fatty liver. *PLoS One*. 2021 Apr 1;16(4):e0249223.
245. Lin IT, Lee MY, Wang CW, Wu DW, Chen SC. Gender Differences in the Relationships among Metabolic Syndrome and Various Obesity-Related Indices with Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a Taiwanese Population. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 Jan 20;18(3):857.
246. Zelber-Sagi S, Lotan R, Shlomain A, Webb M, Harrari G, Buch A, Nitzan Kaluski D, Halpern Z, Oren R. Predictors for incidence and remission of NAFLD in the general population during a seven-year prospective follow-up. *J Hepatol*. 2012 May;56(5):1145-1151.
247. van Gemert WA, Peeters PH, May AM, Doornbos AJH, Elias SG, van der Palen J, Veldhuis W, Stapper M, Schuit JA, Monninkhof EM. Effect of diet with or without exercise on abdominal fat in postmenopausal women - a randomised trial. *BMC Public Health*. 2019 Feb 11;19(1):174.
248. Kartsoli S, Kostara CE, Tsimihodimos V, Bairaktari ET, Christodoulou DK. Lipidomics in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol*. 2020 Aug 27;12(8):436-450.

249. Leone A, Bertoli S, Bedogni G, Vignati L, Pellizzari M, Battezzati A. Association between Mediterranean Diet and Fatty Liver in Women with Overweight and Obesity. *Nutrients*. 2022 Sep 13;14(18):3771.