

INDICE

RIASSUNTO	pag. 2
INTRODUZIONE	pag. 6
SCOPO DEL LAVORO	pag. 28
MATERIALI E METODI	pag. 29
RISULTATI	pag. 32
DISCUSSIONE	pag. 34
CONCLUSIONI	pag. 37
BIBLIOGRAFIA	pag. 38

RIASSUNTO

Introduzione: la cirrosi, epatica in stadio terminale, secondaria all'infezione cronica da virus dell'epatite C, rappresenta una delle principali indicazioni al trapianto di fegato. La recidiva dell'infezione dopo trapianto è la regola e la recidiva istologica supera il 90% dopo un anno. E' noto inoltre che la progressione dell'epatopatia causata dal virus C nei soggetti immunosoppressi procede più rapidamente verso la cirrosi rispetto ai soggetti immunocompetenti, raggiungendo il 30% a cinque anni.

La sindrome metabolica è una condizione clinica caratterizzata dalla presenza di un'insulino-resistenza, associata, secondo i criteri dell'ATPIII, ad obesità viscerale, ipertrigliceridemia, bassi livelli di colesterolo-HDL, diabete mellito ed ipertensione arteriosa. Dal punto di vista istologico può essere presente un quadro di semplice steatosi o di steatoepatite non alcolica con quadri istologici che vanno dalla semplice infiltrazione grassa del fegato (>5%) fino alla presenza di infiammazione lobulare con possibile evoluzione verso la fibrosi o la cirrosi.

La leptina è un ormone di natura proteica che viene codificato dal gene dell'obesità (OB), ed è coinvolto nella regolazione del metabolismo lipidico e del consumo energetico. Diversi studi hanno riportato un aumento dei livelli sierici di leptina nei pazienti con steatosi e/o NASH e hanno proposto che questo rialzo possa promuovere la steatosi epatica e la progressione a NASH.

Abbiamo valutato le caratteristiche metaboliche, istologiche e i livelli plasmatici di leptina in una coorte di pazienti sottoposti a trapianto di fegato, per cirrosi epatica terminale secondaria ad un'infezione cronica da virus dell'epatite C, senza altre cause eziologiche documentate, e seguiti presso la Clinica Medica 1 dell'Università di Padova,

Risultati: si è assistito nei pazienti, rispetto alle condizioni pre-trapianto, alla comparsa ex novo di alcuni quadri patologici caratteristici della sindrome metabolica quali: il diabete mellito, nel 39%, l'ipertensione arteriosa, nel 58%, l'ipertrigliceridemia, nel 32%, l'ipocolesterolemia-HDL, nel 32%, l'obesità nel 39%.

La valutazione istologica evidenziava in tutti i pazienti una recidiva di malattia, con gradi di attività infiammatoria e di fibrosi variabile da lieve ad elevata. La flogosi e la fibrosi non dipendevano dal genotipo virale, quanto piuttosto dal tempo trascorso dal trapianto.

Oltre alle alterazioni istologiche tipiche della malattia epatica virale, erano presenti anche alterazioni istologiche caratteristiche della NAFLD in zona 3, quali la steatosi (55%) e la fibrosi pericellulare (45%).

I livelli plasmatici di leptina, che già erano stati dimostrati elevati in pazienti non sottoposti a trapianto di fegato, ma con epatopatia HCV correlata, risultavano significativamente aumentati sia in relazione alla presenza che alla severità della steatosi all'esame istologico.

Conclusioni: dopo il trapianto di fegato, nei nostri pazienti si manifestano le caratteristiche cliniche della sindrome metabolica non evidenti prima del trapianto come il diabete mellito (39%), l'ipertensione arteriosa (58%), l'ipertrigliceridemia (32%), l'ipocolesterolemia-HDL (32%), l'obesità (39%) ed istologiche quali la steatosi (55%) e la fibrosi pericellulare (45%).

I livelli di leptina sono risultati significativamente più elevati nei pazienti con steatosi epatica.

Considerando che la leptina può indurre insulino-resistenza e quindi contribuire al primo "hit" del processo di danno metabolico epatico, i risultati da noi trovati, potrebbero confermare il suo ruolo patogenetico anche nei pazienti epatotraspiantati. Inoltre dal momento che i livelli di leptina non correlavano con le caratteristiche cliniche-biumorali della sindrome metabolica riteniamo che possa rappresentare un marker aggiuntivo per individuare quei pazienti che dovrebbero essere sottoposti a biopsia epatica per valutare l'iniziale danno metabolico cellulare.

Summary

Introduction: Terminal liver cirrhosis secondary to hepatitis C virus (HCV) infection represents one of the main indications to liver transplantation. Reactivation of the infection following the transplantation is the rule, and histological flares are greater than 90% after one year. It is known that progression of HCV liver disease is more rapid in immunosuppressed patients compared to immunocompetent individuals, approximating 30% in 5 years.

The metabolic syndrome is characterized by insulin resistance associated, according to the ATPIII criteria, with visceral obesity, hypertriglyceridemia, low levels of HDL cholesterol, diabetes mellitus and hypertension. From the histological standpoint, simple steatosis or non-alcoholic steatohepatitis (NASH) can be present with features ranging from simple fat liver infiltration (>5%) up to lobular inflammation with possible evolution towards fibrosis or cirrhosis.

Leptin is protein hormone coded by the obesity gene (OB) involved in the regulation of lipid metabolism and energy homeostasis. Several studies reported increased serum levels of leptin in patients with steatosis and/or NASH, suggesting that this protein may be promoting progression to NASH.

Methods: In the present investigation, we evaluated metabolic characteristics, histological patterns of liver biopsies and plasma levels of leptin in a cohort of patients followed at the Clinica Medica 1 of the University of Padua, who underwent liver transplantation for HCV-related terminal liver cirrhosis.

Results: The new onset of typical clinical features of the metabolic syndrome was observed in our patients compared to their pre-transplant status: diabetes mellitus (39%), hypertension (58%), hypertriglyceridemia (32%), HDL-hypercholesterolemia (32%), and obesity (39%). Liver histology showed presence of disease reactivation in all studied patients, with variable levels of inflammation and fibrosis ranging from mild to severe. These findings were associated with the time-from-transplantation rather than with a specific viral genotype. In addition, besides the histological features related to the viral hepatic disease, we detected typical lesions of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in zone 3, such as steatosis (55%) and pericellular fibrosis (45%). Leptin was previously shown to be elevated in

subjects with HCV liver disease not yet transplanted. In our cohort, higher plasma levels of leptin were significantly associated with the presence and severity of steatosis in the liver.

Conclusion: This study shows that the typical features of the metabolic syndrome tend to manifest in patients following liver transplantation, and that leptin levels are significantly elevated in subjects with liver steatosis. Since leptin can induce insulin resistance, our findings suggest that in liver transplant patients it may function as an initial trigger for metabolic liver damage. We suggest that this protein may represent an additional biomarker of the ongoing metabolic damage to the hepatocytes, and therefore may be useful to identify those patients who will benefit from an earlier diagnostic liver biopsy.

INTRODUZIONE

Fin dal 1980 sono comparse le prime descrizioni da parte di Ludwig e colleghi (1), relative a una entità clinico-patologica presente in soggetti sovrappeso o obesi con stigmati dell'obesità, come il diabete mellito, caratterizzata da lesioni comunemente associate all'abuso di alcol come l'infiltrazione di grassi, l'epatite lobulare e la fibrosi pericellulare. Solo alcuni anni più tardi, Reaven (2) descrisse la sindrome X ovvero l'associazione di uno stato di iperinsulinemia, iperglicemia, iperlipidemia, ipertensione arteriosa e steatosi epatica ad eziologia non alcolica ipotizzando che l'insulino-resistenza sia il comune meccanismo patogenetico. Successivamente l'eponimo di sindrome da insulino-resistenza, prese il nome di sindrome metabolica.

Dal 1998 Alberti e Zimmet (3) proposero il nome di sindrome metabolica a una condizione clinica caratterizzata da una serie di alterazioni metaboliche, i cui criteri diagnostici sono ancora argomento di discussione.

Nostante la maggior parte dei soggetti con sindrome metabolica abbia uno stato di insulino-resistenza, tuttavia non tutti i soggetti con insulino-resistenza hanno una sindrome metabolica. McLaughlin e colleghi (4) trovarono che il 78% di quelli con sindrome metabolica avevano una insulino-resistenza, mentre solo il 48% di quelli con insulino-resistenza rispondevano ai criteri per una sindrome metabolica.

Per la diagnosi di sindrome metabolica oggi, si fa per lo più riferimento al National Cholesterol Educational Program Adult Treatment Panel III (ATPIII) (5) basato su cinque variabili cliniche e bioumorali che sono poco costose e semplici da ottenere. Questi criteri suggeriscono, sulla scorta anche di quelli proposti dalla International Diabetes Federation (IDF) (6), come nodo centrale della sindrome, la presenza di grasso viscerale.

Confronto della diagnosi clinica della S. Metabolica secondo i criteri ATP III e IDF

	CRITERI ATP III	CRITERI IDF
	Presenza di almeno tre fattori	
Circonferenza addominale	> 102 cm (uomo) > 88 cm (donna)	> 94 cm (uomo) > 80 cm (donna)
		Presenza di almeno altri due fattori
Pressione arteriosa	>130/85 mmHg	>130/85 mmHg
Trigliceridi	>150 mg/dl	>150 mg/dl
Colesterolo-HDL	< 40 mg/dl (uomo) < 50 mg/dl (donna)	< 40 mg/dl (uomo) < 50 mg/dl (donna)
Glicemia	>110 mg/dl	>110 mg/dl

L'espressione epatica della sindrome metabolica è la steatosi epatica. La steatoepatite non alcolica (NASH) rappresenta la forma più severa di steatosi epatica non alcolica (NAFLD) e rappresenta l'epatopatia emergente clinicamente più importante nei paesi industrializzati (7,8). Recenti dati americani evidenziano una aumentata prevalenza di NAFLD e NASH nel corso degli ultimi anni (rispettivamente dal 17% al 33% e dal 5.7% al 17%) (9,10). Diversamente dalla semplice steatosi che appare un'entità benigna, la steatoepatite non alcolica progredisce a cirrosi nel 15-25% dei casi (11,12) e porta al decesso per malattia epatica nel 30-40% dei casi nel corso dei successivi 10 anni, tanto quanto le cirrosi correlate al virus C (13,14). La NASH viene attualmente considerata la principale causa delle cirrosi criptogenetiche (15), può progredire verso lo scompenso epatico richiedendo un trapianto di fegato (16,17) e complicarsi con l'insorgenza di epatocarcinoma (18). Oltre a questa forma definita "primitiva", vi sono diversi altri fattori (19) che possono causare una infiltrazione di grassi a livello epatico, come i farmaci, la nutrizione parenterale, alcune procedure chirurgiche e alcune sostanze tossiche.

Forme di Steatoepatite Secondaria

Sindromi da insulino-resistenza

- Familiare
- Lipodistrofia
- Sindrome nell'ovaio policistico

Nutrizionale

- Malnutrizione proteica
- Digiuno
- Nutrizione parentale totale
- Calo ponderale rapido
- Chirurgia bariatrica

Patologie eredo-metaboliche

- Abetalipoproteinemia
- Ipoabetalipoproteinemia
- Morbo di Wilson
- Tirosinemia
- Sindrome di Weber-Christian
- Malattia di Wolman
- Malattia da accumulo di esteri del colesterolo

Iatrogenica

- Amiodarone
- Diltiazem
- Tamoxifene
- Tetracicline
- Methotrexate
- Perixilene maleato
- Acido valproico
- Cocaina
- Terapia antiretrovirale (lipodistrofia acquisita)
- Calcioantagonisti
- Estrogeni sintetici

Tossici ambientali

- Fosforo
- Idrocarburi
- Solventi organici
- Tossici fungini

ASSOCIAZIONE DI NAFLD AI SINGOLI FATTORI DELLA SINDROME METABOLICA

Obesità

L'obesità è un importante fattore di rischio per NAFLD, in quanto è riscontrabile in più del 75% dei soggetti obesi o con obesità del tronco anche se il BMI è normale. La steatosi epatica è dimostrabile nei soggetti che abbiano solo il 10% in più del peso corporeo ideale e solo pochi individui con obesità patologica non presentano una NAFLD. Questo suggerisce che obesità e NAFLD sono la conseguenza di un meccanismo patogenetico comune (come ad esempio l'insulino-resistenza) o che l'obesità aumenta il rischio di NAFLD dopo esposizione a un secondo insulto specifico, come l'alcool (20). Molti studi hanno dimostrato l'importanza dell'obesità centrale e del grasso viscerale nella patogenesi della steatosi epatica. L'infiltrazione di grassi a livello epatico è associato ad un aumentato accumulo di grassi viscerali come dimostrato anche da studi di imaging o dal rapporto dello spessore del grasso presente in sede viscerale rispetto a quello presente nel sottocute (21). Lo spessore del grasso mesenterico misurato ecograficamente, viene riportato come il dato più specifico di deposito di grasso viscerale ed è un fattore predittivo indipendente di steatosi epatica. Il grasso mesenterico è un tipo specifico di tessuto adiposo viscerale che è drenato attraverso il circolo portale ed ha differenti caratteristiche metaboliche, come ad esempio una elevata attività di lipoproteine, rispetto ad altri tipi di tessuto adiposo, come il sottocutaneo o il retroperitoneale. La presenza di grasso intraddominale è stato dimostrato essere un fattore indipendente associato a tutti i criteri (secondo ATP III) della sindrome metabolica, all'insulino-resistenza, e alla NAFLD, suggerendone pertanto un ruolo fisiopatologico (22). La rimozione chirurgica di grasso viscerale, ma non di quello sottocutaneo, è in grado di migliorare la steatosi.

L'obesità di per sé è un fattore di rischio per l'epatopatia e per la progressione della steatosi a cirrosi criptogenica e alla fine ad epatocarcinoma. Valori anche modestamente alterati di alanina aminotransferasi (ALT) si sono trovati in più del 20% dei soggetti obesi che erano stati arruolati in un programma per ridurre il peso corporeo (23). Valori elevati di

ALT sono inoltre associati alla presenza di una sindrome metabolica e questa aumenta esponenzialmente il rischio di una severa epatopatia, avvallando pertanto l'ipotesi della NAFLD come una componente di una malattia metabolica complessa (24). La presenza di obesità in una coorte del National Health and Nutrition Examination Survey, è associato ad un aumento del rischio di morte per cirrosi epatica (25). L'obesità è associata a insulino-resistenza e a livelli elevati di insulin-like growth factor I, potente mitogeno che stimola la crescita cellulare; inoltre è associata ad elevati livelli di estrogeni circolanti, ed è fattore di rischio sia di adenoma epatico, sia di epatocarcinoma nei soggetti con NASH e cirrosi criptogenetica (26).

Diabete mellito tipo II

Il diabete mellito tipo II incrementa la prevalenza e la severità di NAFLD come dimostrato anche in uno studio che correlava la presenza ecografica di NAFLD in pazienti non diabetici (27%), in pazienti con intolleranza diabetica (43%), in pazienti con nuova diagnosi di diabete (62%) (27). In studi epidemiologici l'incremento dei livelli di aminotransferasi si associa a insulino-resistenza e predice lo sviluppo di diabete mellito (28). La presenza di diabete risulta un fattore di rischio per la progressione a fibrosi avanzata e cirrosi (29,30) e un fattore di rischio indipendente per epatocarcinoma indipendentemente dalla presenza di epatopatia ad eziologia virale o non (31). In uno studio Italiano nel quale venivano seguiti pazienti con diabete tipo II per cinque anni, la mortalità per cirrosi epatica risultava addirittura superiore a quella osservata per eventi cardiovascolari (32).

Ipertensione arteriosa

Pochi dati sono disponibili sull'associazione di epatopatia e ipertensione arteriosa e sono per lo più derivati da studi giapponesi nei quali l'associazione tra steatosi epatica e ipertensione arteriosa era presente nel 22% dei casi (33). Recentemente Donati e colleghi (34) hanno confermato l'elevata prevalenza di steatosi epatica in pazienti ipertesi anche in assenza di obesità, di diabete mellito, di alterazione delle transaminasi e di altri fattori di rischio per epatopatia. La steatoepatite era presente nel 30% dei casi, con prevalenza tre volte superiore

a quella osservata negli individui normotesi della stessa età e sesso. Nello stesso studio tuttavia i soggetti che risultavano ipertesi e avevano una diagnosi di steatosi epatica, risultavano avere anche livelli più elevati di glicemia, di BMI e di insulino-resistenza rispetto a quelli senza steatosi epatica.

Dislipidemia

Alterati valori di colesterolo e trigliceridi sono fattori di rischio ben noti per la steatosi epatica. In particolare la presenza di ipertrigliceridemia e diabete mellito correla con la gravità di infiltrazione di grassi a livello epatico (35). Nei pazienti con ipobetalipoproteinemia familiare (caratterizzati da bassi livelli di LDL o con valori di apolipoproteina B inferiore al quinto percentile), presentano una significativa steatosi epatica indipendentemente dalla presenza di insulino-resistenza, suggerendo una differente patogenesi a seconda dell'eziologia. L'accumulo di grassi a livello epatico in questo tipo di pazienti, può essere determinato dal difetto del gene Apo-B che renderebbe questi soggetti più suscettibili agli effetti dell'accumulo di trigliceridi e all'insulinoresistenza (37).

PROCESSI FISIOPATOLOGICI

Per quanto non siano ancora ben conosciuti i meccanismi fisiopatologici della NAFLD e della NASH, sono state apportate diverse evidenze a suffragio di alcuni meccanismi epatici e non epatici.

Come noto da evidenze epidemiologiche, l'incremento della massa adiposa è un fattore fisiopatologico essenziale per la comparsa di NAFLD. L'adipocita, alla pari di un organo endocrino, può secernere diverse proteine, chiamate adipochine, che hanno diversi effetti locali, periferici ed epatici, sulla risposta di fase acuta, sulla omeostasi energetica, sul sistema immunitario, sulla regolazione vascolare, sul metabolismo lipoproteico e sulla matrice extracellulare (38). Con l'aumento della massa grassa e la differenziazione degli adipociti, queste cellule possono aumentare la produzione di diverse citochine incluse la leptina (39-42), il tumor necrosis factor- α (43), l'angiotensina (44,45), mentre si riduce l'adiponectina (46-55). La leptina è aumentata nei soggetti con NAFLD ed è implicata oltre

che nello sviluppo di insulino-resistenza, anche nelle fibrogenesi (42). La leptina inattiva i substrati legati al recettore per l'insulina, determinando insulino-resistenza periferica ed epatica. Dati recenti suggeriscono che anche l'angiotensina (45,56) gioca un ruolo importante nella fibrogenesi in quanto antagonisti dell'angiotensina migliorano i livelli bioumorali di transaminasi nei soggetti con NAFLD e riducono la fibrosi in modelli animali. Il TNF è aumentato nei soggetti con NAFLD e obesità, ma non in quelli che sono normopeso, e nei diabetici (58). TNF provoca facilmente insulino-resistenza tramite un meccanismo di up-regulation di alcune citochine che legano JAK tirosina e ne riducono la capacità di fosforilazione dei substrati legati al recettore dell'insulina, inibendo la trasduzione del segnale e l'attivazione di proteine di trascrizione (59,60). Alla fine si attua una riduzione della capacità dell'insulina di attivare la cascata di segnali intracellulari. Inoltre il TNF aumenta l'apoptosi, aumentando a livello mitocondriale la permeabilità, alterando i processi di respirazione e riducendo il contenuto di citocromi (64-67). L'adiponectina (anche conosciuta come Acrp 30) riveste un ruolo importante come citochina metabolica. Bassi livelli di adiponectina precedono e predicono lo sviluppo di un diabete mellito tipo II (48), si ritrovano nei pazienti obesi, nei soggetti con NAFLD e in modelli animali sono associati a sviluppo di importante fibrosi epatica quando esposti a epatotossine (68,69); mentre aumentati livelli di adiponectina migliorano la sensibilità all'insulina incrementando l'ossidazione degli acidi grassi via AMP-chinasi e sopprimendo la gluconeogenesi (70).

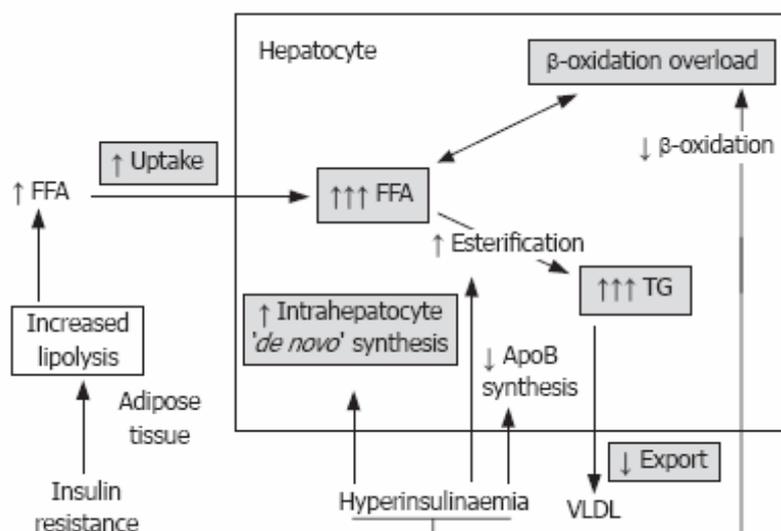
Meccanismi di insulino-resistenza

L'insulina legandosi ai suoi recettori sulla membrana plasmatica, determina una fosforilazione del recettore stesso e una attivazione dei substrati legati al recettore. Queste molecole formano dei complessi di trasduzione del segnale, come il fosfoinositolo-3-chinasi, che attraverso una cascata di eventi determinano la traslocazione di vescicole contenenti i trasportatori di glucosio (GLUT-4) verso la membrana cellulare con conseguente ingresso di glucosio nella cellula (70). Anche l'esercizio fisico stimola la traslocazione delle vescicole per una via diversa da quella del fosfoinositolo-3-chinasi.

L'alterato ingresso di glucosio nella cellula risulta da alcuni difetti nel segnale intracellulare come conseguenza di alcune condizioni acquisite quali l'iperinsulinemia, l'iperglicemia, l'aumento di TNF e di acidi grassi liberi (72,73).

Diversi studi hanno ipotizzato che la sindrome da insulino-resistenza possa essere anche un disordine infiammatorio. Il fattore nucleare kB (NF-kB) (il cui attivatore è IKK-beta) è un fattore di trascrizione nucleare che funziona, durante il processo flogistico, come l'“interruttore generale” dell'infiammazione aumentando la trascrizione a livello genico di un ampio range di mediatori infiammatori (74). E' stato dimostrato che l'aumentata attività del NF-kB nei fegati di modelli animali è associata con un'aumentata espressione di citochine infiammatorie, incluso il TNF- α , IL6 e IL-1 β e con l'attivazione delle cellule del Kupffer. In uno studio veniva dimostrato come l'inibizione sistemica di IKK-beta migliorava il controllo glicemico, la sensibilità all'insulina, l'iperlipidemia nei soggetti affetti da diabete mellito tipo II (74). Come il fegato, anche il tessuto adiposo dei soggetti obesi è caratterizzato da infiltrazione di macrofagi e infiammazione (75). La produzione di citochine pro infiammatorie dei macrofagi del tessuto adiposo determina, attraverso effetti paracrini sul tessuto adiposo stesso e sul muscolo, insulino-resistenza come avviene a livello epatico in relazione alla produzione di citochine in quel distretto (75).

L'alterata capacità da parte delle cellule muscolari di utilizzare il glucosio e di sopprimere la lipolisi, comporta uno stato iperinsulinemico e un incrementato afflusso di acidi grassi liberi al fegato.



La steatosi è alla fine conseguente a tre processi metabolici: la riduzione dell'ossidazione epatica degli acidi grassi liberi, l'aumento della lipogenesi epatica de novo, la riduzione dell'efflusso di lipidi dal fegato (76-78). La steatosi epatica è essa stessa causa di insulino-resistenza (79,80).

Dall'insulino-resistenza alla steatosi epatica

Per spiegare lo sviluppo della NAFLD viene proposta l'ipotesi dei due "hit" teorizzata nel 1998 da Day e James (81). Il primo "hit" è costituito dall'accumulo di grasso (acidi grassi e trigliceridi) all'interno degli epatociti, risultante dall'insulino-resistenza. La steatosi è considerata avere un decorso benigno (82), tuttavia non si trova in uno stato di quiescenza: si possono notare attivazione delle cellule stellate, stimolazione di proteine apoptotiche, up-regolazione di proteine-2 uncoupling, che potenzialmente possono causare fibrosi, morte di cellule e riduzione di ATP intracellulare(85-87). Nonostante questi processi, la funzione epatica e l'esame istologico, a parte la presenza di steatosi, sono normali. A questo punto non è ben chiaro perché solo un sottogruppo di soggetti con NAFLD progredisca verso la NASH. Quel che è certo che gli epatociti sovraccaricati di lipidi sono più facilmente esposti al secondo "hit" (88), ovvero allo stress ossidativo causato da alcune molecole come le endotossine, le citochine e i radicali liberi (89). Oltre alle citochine, sono stati identificati tre meccanismi che possono intervenire nello stress ossidativo: l'iperinsulinemia, l'accumulo epatico di ferro, la perossidazione lipidica.

L'insulina ha un effetto diretto nel generare stress ossidativo o nell'up-regulation di proteine lipogenetiche, come le proteine leganti il sistema regolatorio degli steroli (SREBP) (90-93). Inoltre ha effetti diretti profibrogenetici, stimolando fattori di crescita connettivali, e intervenendo direttamente nello stress a livello del reticolo endoplasmatico provocando apoptosi (94).

Il ruolo del ferro come fattore pro-ossidante non è chiaro. Solo pochi studi suggeriscono la sua importanza nel precipitare i radicali liberi dell'ossigeno e di conseguenza la perossidazione lipidica (95,96). Bisogna notare che circa il 30% dei soggetti con NAFLD presentano elevati livelli di ferritina e che è ben descritta l'associazione tra insulino-

resistenza e deposito di ferro a livello epatico (97-100). Inoltre la salassoterapia migliora l'istologia dei pazienti con NAFLD (101) e migliora l'insulino-resistenza in quelli che presentano anche un diabete mellito (102). Infine è nota la sua azione pro-ossidante con effetti deleteri sui mitocondri.

Soggetti con NASH presentano livelli di stress ossidativo più elevati in confronto a quelli con semplice steatosi (103,104). Gli acidi grassi liberi rappresentano una facile fonte per lo stress ossidativo all'interno del fegato in quanto agendo come ligandi per la famiglia dei recettori nucleari che inducono la trascrizione di molecole che regolano il metabolismo lipidico (PPAR-alfa) (105), provocano un aumento della loro ossidazione a livello dei mitocondri, microsomi e perossisomi (106), con conseguente produzione di superossido, perossido di idrogeno e perossidi lipidici in grado di attivare stress ossidativo e conseguente perossidazione lipidica.

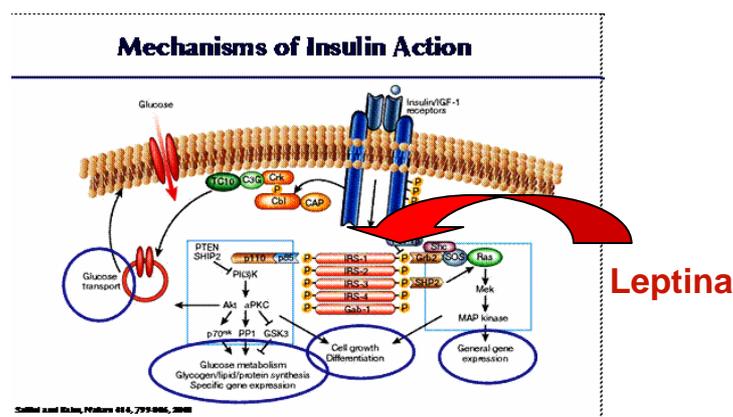
Due prodotti della perossidazione lipidica l'idrossinonenale e la malondialdeide determinano chemiotassi neutrofila con conseguente infiammazione, necrosi e stimolazione delle cellule stellate epatiche con produzione di fibrosi, oltre che un'up-regulation di citochine, TGF-beta nei macrofagi (107). Lo stress ossidativo stimola inoltre il rilascio di TNF dagli epatociti, dai lipociti e dai mitocondri (107). Il TNF- α altera la respirazione mitocondriale, aumenta la permeabilità mitocondriale e riduce la quantità di citocromi C mitocondriali. I ROS inoltre inducono l'attività di FAS ligand con conseguente induzione di apoptosi. I corpi apoptotici che così si formano stimolano anch'essi la fibrogenesi. La combinazione della perossidazione lipidica, dell'attivazione di FAS ligand e delle citochine, determina le caratteristiche istologiche tipiche di questa epatopatia(108-110).

Recenti dati apportano evidenze sulla stretta relazione tra la progressione da semplice steatosi a steatoepatite e l'attivazione di NF-kB attraverso una via lisosomiale catapepsina dipendente: la traslocazione di fattori proapoptotici nei lisosomi con conseguente destabilizzazione e rilascio di proteasi della cisteina (catapepsina B) all'interno del citosol, determinerebbe l'attivazione di NF-kB via IKK-beta e conseguente aumentata espressione di TNF- α (111).

RUOLO DELLA LEPTINA NELLA NAFLD

La leptina è un ormone di natura proteica, scoperto nel 1994 da Friedman. Viene codificato dal gene dell'obesità (OB), ha un peso molecolare di 16 KDa ed è coinvolto nella regolazione del metabolismo lipidico e del consumo energetico. I suoi recettori sono localizzati nell'ipotalamo dove sono presenti anche i centri regolatori del senso della fame e della sete, della temperatura corporea. La leptina ha un effetto anoressizzante e aumenta il consumo energetico, favorendo la riduzione del peso corporeo e della massa grassa. In condizioni normali i livelli di leptina aumentano dopo il pasto e si riducono nel digiuno prolungato. Sono proporzionali alla massa grassa presente nell'organismo (livelli più elevati negli obesi, minore nei soggetti magri) (112).

Diversi studi hanno riportato un aumento dei livelli sierici di leptina nei pazienti con steatosi e/o NASH e hanno proposto che questo rialzo possa promuovere la steatosi epatica e la progressione a NASH (113,114). La leptina contribuisce a promuovere e/o aggravare la steatosi epatica tramite multiple interazioni con l'insulina, provocando uno stato di insulino-resistenza, determinando un accumulo intracellulare di acidi grassi (114).



Inoltre può influenzare lo sviluppo di una NASH attraverso la regolazione delle risposte infiammatorie (115), partecipando alla cascata degli eventi del secondo “hit”. Oltre a promuovere uno stato di insulino-resistenza, sembra infatti che la leptina possa indurre le cellule del Kupffer a produrre citochine, come il TNF- α , IL-6 e IL-12 e a creare uno stato infiammatorio incrementando i livelli di radicali liberi, e inducendo pertanto uno stress ossidativo. In un recente lavoro, è stato inoltre dimostrato che si verrebbe a creare anche uno

stato di leptino-resistenza dove gli elevati livelli di leptina circolanti si assocerebbero a più ridotti livelli dei propri recettori di membrana (OB-r) riducendo pertanto la sua sensibilità a livello degli epatociti (116). In un modello animale in cui veniva indotto un aumento di disponibilità dei recettori (OB-r), si osservava una riduzione del peso corporeo indotto dall'infusione di leptina esogena (117). Pertanto anche la leptino-resistenza potrebbe partecipare direttamente nel promuovere una NAFLD.

ASPETTI ANATOMOPATOLOGICI DELLA NAFLD

Dopo le prime descrizioni di Ludwig nel 1980 (1), Matteoni e colleghi (82) evidenziarono nel 1999 come i soggetti che presentavano istologicamente oltre all'accumulo di grasso tipico della steatosi, anche la presenza di degenerazione balloniforme degli epatociti, corpi ialini di Mallory o fibrosi avevano una elevata incidenza di sviluppare cirrosi e morte per scompenso epatico rispetto ai soggetti nei quali era presente solo steatosi e infiammazione lobulare. Pertanto nello stesso periodo Brunt e colleghi (118) introdussero un sistema semiquantitativo di grading e staging basato sulla presenza di alcune tipiche lesioni, sulla loro associazione e severità: steatosi, degenerazione balloniforme, infiammazione lobulare e portale per quanto riguarda il grading; dalla fibrosi pericellulare/perisinusoidale in zona centro lobulare, alla fibrosi portale fino alla cirrosi per quanto riguarda lo staging. I criteri minimi necessari per far diagnosi di NASH sono: la steatosi epatica, la degenerazione balloniforme e l'infiammazione lobulare.

Dal momento che nessuna modalità di imaging riesce a distinguere tra semplice steatosi e steatoepatite, la biopsia epatica rimane il gold standard per la diagnosi. L'iniziale deposizione di collagene nelle NAFLD o nelle NASH ha un pattern diverso rispetto alle altre forme di epatopatia (virali, autoimmuni, colestatiche) in quanto inizia dalla zona centrolobulare come fibrosi perivenulare e/o pericellulare (119). Esiste infatti una eterogenea popolazione di cellule stellate che vengono attivate in varie condizioni di epatopatia rispondendo con la fibrogenesi agli insulti dell'acino (120). Allo stadio di cirrosi diventa difficile poter giungere ad una diagnosi eziologica in quanto alcune caratteristiche

tipiche quali i corpi ialini di Mallory, i nuclei glicogenati e la distribuzione tipica della fibrosi possono essere difficili da reperire e altre come la steatosi, l'infiammazione lobulare e la degenerazione balloniforme possono essere scomparse a causa del rimodellamento che avviene durante la cirrosi (121).

Nel 2003 il Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network (122) sviluppò e validò uno score istologico, valido per l'intero spettro delle malattie incluse nella NAFLD. Viene pertanto proposto uno score di attività (NAS) in base a tre caratteristiche: steatosi (0-3), infiammazione lobulare (0-3), degenerazione balloniforme (0-2). La maggior parte dei soggetti con diagnosi di NASH presentano uno score NAS uguale o superiore a 5, mentre uno score uguale o inferiore a 2 lo esclude con assoluta certezza. La definizione minima per NAFLD istologica risulta definita, arbitrariamente, dalla presenza di una steatosi almeno del 5%.

STEATOSI EPATICA E HCV

Diversamente da quanto osservato nell'infezione cronica da virus B e nell'epatiti autoimmuni, in cui rappresenta un reperto occasionale, la steatosi epatica si associa all'epatite C in una percentuale significativamente elevata (123,124). Dal 50 al 70% delle forme croniche da epatite C (125) è presente un modesto grado di steatosi macrovescicolare che non è tuttavia presente solo in zona 3. Nel genotipo 3 la steatosi è di grado marcato e correla strettamente con i gradi di replicazione virale intraepatica, suggerendo l'effetto steatosico come conseguenza diretta dell'effetto citopatico diretto del virus (126). Un'altra evidenza a questo favore è l'effetto "antisteatosico" che si osserva a seguito della risposta virologica sostenuta con l'utilizzo di interferone (127). Una caratteristica peculiare dei pazienti con genotipo 3 è anche l'assenza di fattori di rischio metabolici identificabili, nonché la presenza di bassi livelli di colesterolo, trigliceridi e ApoB (a differenza dei soggetti con NAFLD) (128). Tuttavia i meccanismi fisiopatogenetici che soggiacciono al rapporto causa-effetto HCV-insulino-resistenza non sono ancora del tutto chiari.

Evidenze sperimentali lascerebbero ipotizzare che proteine del virus HCV possano indurre steatosi interferendo con l'assemblaggio delle lipoproteine. E' stato dimostrato infatti che la

proteina NS5A e la proteina core di HCV, co-localizzano sulla superficie di goccioline lipidiche e sono in grado di interagire con apolipoproteine (129,130). In cellule epatiche transfettate, inoltre, la proteina core causa un accumulo di trigliceridi a livello citoplasmatico e in vivo, sembra ridurre l'esportazione dei trigliceridi dal fegato, causando steatosi epatica nei topi transgenici (131,132).

Dati sperimentali suggeriscono una diretta interferenza del virus HCV con la via dell'insulina attraverso la degradazione proteosomica di IRS-1 e IRS-2 (substrati del recettore insulinico) (133). Il recettore per l'insulina ha un'attività chinasi intrinseca innescata dal legame con l'ormone nella sua porzione extracellulare. Questo legame dà il via a una cascata di reazioni che porta all'espressione di un trasportatore di membrana specifico per il glucosio (GLUT-4) andando quindi ad interferire con la trasduzione del segnale e di conseguenza con gli effetti biologici attribuiti all'insulina stessa.

E' stato dimostrato che un difetto funzionale in questa via può avvenire anche a seguito di un aumento dei livelli di citochine pro infiammatorie, quali il TNF- α . Tale dato è avvalorato dal fatto che la sensibilità all'insulina viene ripristinata in seguito alla somministrazione di anticorpi anti TNF- α . E' stato inoltre documentato che livelli più elevati di TNF- α si ritrovano in circolo, nel fegato e nelle cellule mononucleate del sangue periferico di soggetti con epatopatia cronica HCV rispetto a soggetti sani e che i livelli di TNF- α correlano anche con l'indice HOMA dei pazienti cirrotici (134).

Studi recenti hanno dimostrato che l'infezione da HCV induce un aumento dell'espressione di proteine codificate da geni denominati con l'acronimo SOCS (suppressor of cytokine signaling) (135). Sarebbe che membri di questa famiglia (SOCS-1 e SOCS-3) inibiscono l'attività di STAT-1, fattore chiave nella trasduzione del segnale dell'interferone- α a livello cellulare, permettendo la persistenza dell'infezione. SOCS-3 sarebbe in grado di sopprimere i segnali mediati dall'insulina aumentando la degradazione proteosomica di IRS-1 con conseguente sviluppo di insulino-resistenza. E' interessante notare come soggetti infettati con HCV di genotipo 1 mostrino una sovra espressione di SOCS-3.

Un altro meccanismo proposto, secondo alcuni lavori condotti sia su modelli animali che su soggetti affetti da epatite cronica HCV, potrebbe essere l'inibizione, da parte della proteina

core di HCV, dell'attività di trasporto di uno dei più importanti enzimi coinvolti nel metabolismo lipidico del fegato: la proteina microsomiale di trasporto dei trigliceridi (MTP) (136). Sono inoltre stati osservati la presenza di due meccanismi diversi in grado di regolare l'espressione genica di MTP nei pazienti infettati con HCV a genotipo diverso: nei soggetti con genotipo non-3, i livelli di mRNA che codificano per MTP correlano con l'iperinsulinemia, mentre nei pazienti con genotipo 3, l'espressione genica correla solo con la replicazione virale.

Dal punto di vista anatomo-patologico, le forme legate al virus C tendono ad avere un maggior processo infiammatorio a carico del tratto portale, piuttosto che del lobulo, generalmente non sono presenti epatociti con degenerazione balloniforme e manca la caratteristica fibrosi pericellulare/perivenulare.

TRAPIANTO DI FEGATO NEI PAZIENTI CON INFEZIONE DA EPATITE C E RECIDIVA DI MALATTIA

Il trapianto ortotopico di fegato (OLT: orthotopic liver transplantation), è oramai un'opzione terapeutica di elezione per il trattamento delle numerose patologie metaboliche, congenite e per le epatopatie acute e croniche in fase terminale, le cosiddette End-stage Liver Diseases. Nel 1963 Thomas Starzl, effettuò il primo tentativo di trapianto di fegato, su un bambino affetto da atresia biliare, senza riuscirci e nel 1967 invece, portò a termine, con successo, il primo trapianto ortotopico di fegato umano. A partire dagli anni '80 l'affinamento delle tecniche chirurgiche, la progressione delle conoscenze dei meccanismi che regolano la risposta immune, le nuove conoscenze in materia di immunosoppressione, l'ottimizzazione del supporto anestesilogico e rianimatorio, hanno fatto sì che la sopravvivenza ad un anno, a cinque anni e a dieci anni si attestasse nei centri d'esperienza rispettivamente sul 90%, 80% e 70%, rendendo questo tipo di approccio una terapia efficace (137). Nella maggior parte delle casistiche, la più frequente indicazione al trapianto è rappresentata dalla cirrosi epatica ad eziologia virale (57,4%), difatti attualmente circa un terzo dei pazienti che vanno al trapianto è affetto da cirrosi da virus C non più controllabile clinicamente. Tra le altre indicazioni di maggiore riscontro rientrano l'epatopatia alcolica (9,2%), le epatopatie

autoimmuni (0,8%), la steatoepatite non alcolica, le epatopatie colestatiche (cirrosi biliare primitiva, colangite sclerosante primitiva, atresia biliare), l'insufficienza epatica acuta post-epatitica o tossica, le malattie genetiche (emocromatosi, malattia di Wilson, amiloidosi, etc.). Il numero dei trapianti epatici ha subito negli ultimi anni un notevole incremento, superando negli anni '90 i 4000 interventi negli USA e i 3000 interventi in Europa. (138).

La recidiva di HCV nel post trapianto avviene nel 100% dei pazienti che giungono all'intervento con viremia rilevabile. Dopo il trapianto, i livelli di HCV-RNA aumentano rapidamente dalla seconda settimana al quarto mese e la viremia al quarto mese è un indicatore sensibile e specifico dell'attività istologica e del grado di fibrosi. A 6 mesi dal trapianto nel 75% dei pazienti trapiantati con recidiva di HCV si riscontra una epatite lobulare acuta alla biopsia; a 5 anni dal trapianto circa l'80% dei pazienti sviluppa un quadro istologico di danno cronico HCV mediato e più del 30 % sviluppa cirrosi (contro il 5% dei non trapiantati) (139,140). Recenti studi hanno dimostrato che l'HCV-RNA è presente in circolo già 48 ore dopo il trapianto, l'espressione degli antigeni virali è invece dimostrabile 10 giorni dopo l'intervento. Inoltre si è visto che già al momento della reperfusion del graft avverrebbe il primo episodio di reinfezione (139).

Si calcola che il rischio attuale di scompenso epatico a 1 e 3 anni nei pazienti trapiantati con recidiva è rispettivamente del 42% e 62%, comparato a <5% a 1 anno e <20% a 5 anni dei pazienti non trapiantati con virus C.

La storia naturale della recidiva è più rapida e più aggressiva nel post trapianto che nei pazienti non trapiantati, anche il decorso dalla cirrosi allo scompenso e all'insufficienza epatica è più rapido che nell'immunocompetente; la sopravvivenza a lungo termine nei trapiantati per virus C è significativamente inferiore rispetto a quella dei pazienti senza virus C (140-143).

La diagnosi di recidiva di HCV avviene tramite biopsia. Deve essere eseguita sia nel caso di sospetto clinico sia che il paziente presenti valori normali di AST e ALT; infatti il 30-50% dei pazienti sono viremici anche in assenza di alterazione della funzione epatica. Va tuttavia ricordato che le transaminasi sono dei marcatori aspecifici in quanto possono risultare

alterati per motivi non legati all'epatite. Il frequente dosaggio dell' HCV non è in genere utile se non per il monitoraggio della terapia.

Dal punto di vista istologico si può parlare di tre forme di danno epatico da recidiva di HCV:

recidiva acuta: epatite lobulare, vari gradi di necrosi epatocitaria e steatosi;

recidiva cronica: significativi infiltrati portalì e lobulari, fibrosi porto-portale;

epatite colestatica fibrosante (rara).

Nel 2003 sono stati stabiliti e classificati dal "First International Liver Transplant Society consensus panel group for the diagnosis and management of post-LT HCV" (141) i principali fattori di rischio associati alla ricorrenza da HCV, che si possono così riassumere: per quanto riguarda i fattori legati al ricevente, sono stati individuati come fattori di rischio l'età avanzata del paziente, la gravità della patologia prima del trapianto, la razza non bianca e una ridotta risposta immune HCV-specifica. Dal punto di vista del donatore l'età avanzata, il sesso femminile, l'insulto ischemico del graft e la presenza di mutazioni genetiche. Il matching dell'HLA tra donatore e ricevente ha un effetto modesto sull'andamento della recidiva. Tra i fattori virologici sono stati considerati come fattore di rischio la coinfezione da CMV, soprattutto se il genotipo HCV è l'1a, la coinfezione da HBV, alta viremia, alto tasso di replicazione intraepatica. Inoltre si è osservato che l'infezione con genotipi 1 e 4 si associa ad un più alto rischio di recidiva. E' stato dimostrato infine che l'uso di boli di steroidi e l'utilizzo di OKT3 per il controllo del rigetto acuto sono fattori che influenzano negativamente la frequenza e severità della recidiva da HCV (144,145).

La migliore strategia per prevenire gravi ricadute post-trapianto è quella di eliminare il virus prima del trapianto. Tuttavia in questa situazione la terapia antivirale con interferone e ribavirina è difficile da tollerare e si associa a scarsi tassi di risposta nei pazienti con cirrosi scompensata. Nei pochi studi eseguiti il tasso di risposta virale sostenuta è del 20-24% a fronte di un elevato dropout e di frequenti eventi avversi come citopenie, infezioni, scompenso della malattia epatica. Secondo il Consensus Conference dell'International Liver Transplant, i pazienti con cirrosi con MELD inferiore a 18 dovrebbero essere sottoposti a

terapia antivirale (141). Dopo il Trapianto ci sono due possibili approcci: utilizzare interferone e ribavirina prima dell'identificazione biochimica o istologica della malattia o dopo identificazione bioumorale e istologica della recidiva. La terapia di prevenzione (146) avrebbe il vantaggio di prevenire la ricomparsa della malattia prima che l'epatopatia abbia raggiunto uno stadio avanzato. Tuttavia in questo periodo la terapia è più difficile da tollerare con maggiori effetti collaterali (condizioni generali condizionate dal perioperatorio, trattamento con dosi ancora elevate di immunosoppressori). I risultati di studi controllati dimostrano risposte virologiche sostenute tra 0 e 17% (147). Di fatto il trattamento antivirale delle recidiva viene praticato più tardi, quando anche i livelli di immunosoppressore sono più ridotti. Questo approccio ha il vantaggio di selezionare il sottogruppo di pazienti con malattia progressiva, evitando di sottoporre al trattamento i soggetti senza progressione della malattia. In genere a questo punto, i pazienti presentano grado di fibrosi più avanzata (stadio 2 o più). Le percentuali di risposta sostenuta a questo punto, variano tra il 12 e il 34%.

IMMUNOSOPPRESSIONE DOPO IL TRAPIANTO E RISCHIO METABOLICO

La terapia immunosoppressiva nell'ambito del periodo post-OLT ha un ruolo cruciale per la sopravvivenza del paziente e del graft dopo il trapianto. Il notevole miglioramento della sopravvivenza nei pazienti nel post trapianto è dovuto, tra l'altro, allo sviluppo di nuovi farmaci immunosoppressori, e all'adozione di schemi di terapia immunosoppressiva combinata, i quali, prevedendo farmaci con differenti meccanismi d'azione e con un diverso profilo di effetti collaterali, hanno reso il trattamento più efficace e sicuro.

Gli immunosoppressori possono essere classificati in cinque categorie (148):

corticosteroidi;

inibitori della Calcineurina (IC) quali tacrolimus (Tac) e ciclosporina (CsA);

inibitori della biosintesi delle purine, quali azatioprina (AZA) e micofenolato mofetile (MMF);

inibitori del recettore mammario della rapamicina, quali sirolimus (Sir) ed everolimus (RAD);

anticorpi monoclonali o policlonali (OKT3, anticorpi anti-CD25, globuline antitimocita).

I principali farmaci immunosoppressori utilizzati in ambito epatico, per prevenire il rigetto dell'organo trapiantato rimangono comunque i corticosteroidi, la ciclosporina, il tacrolimus e il micofenolato mofetile.

I corticosteroidi continuano a far parte del regime immunosoppressivo iniziale. La loro attività immunosoppressiva è caratterizzata dal ridurre la sintesi di citochine (IL-1,IL-2,IL-3,IL-6) attraverso l'interazione con la trascrizione genica, inibiscono la migrazione e la fagocitosi dei macrofagi ed incrementano la stabilità di membrana.

La ciclosporina, antibiotico a struttura ciclica, è una molecola lipofila costituita da 11 aminoacidi, mentre il tacrolimus è un antibiotico appartenente alla famiglia dei macrolidi. Entrambi agiscono esercitando effetti immuno-soppressori di tipo cellulo-mediato ed umorale, attraverso un legame ad alta affinità con una famiglia di proteine citoplasmatiche presenti in molte cellule, costituite dalla ciclofillina per la ciclosporina e dal "FK binding proteins" per il tacrolimus. La ciclosporina inibisce, legandosi alla ciclofillina, in modo specifico e competitivo, la calcineurina, una fosfatasi dipendente dal complesso calcio-calmodulina. Con tale meccanismo, la ciclosporina inibisce la traslocazione di una famiglia di fattori di trascrizione all'interno del nucleo, il NF-AT (fattore nucleare delle cellule T attivate), riducendo in questo modo la trascrizione di geni per le citochine, quali IL-2, IL-3, IL-4, CD40L, TNF- α , IFN- γ . Le principali cellule bersaglio di questi farmaci sono le cellule T- helper, ma anche i linfociti T-citotossici. Inoltre, sia la ciclosporina che il tacrolimus sono potenti inibitori del gene della prolattina, ormone che agisce stimolando il sistema immunitario, e l'attivazione dei geni per le citochine.

Il micofenolato mofetile è un profarmaco, somministrato per via orale, ha un elevato assorbimento, superiore al 90% (149). L'acido micofenolico, il metabolita attivo (MPA) che risulta dall'idrolisi a livello delle cellule epiteliali della mucosa gastrointestinale, agisce come potente inibitore non competitivo e reversibile della inositolo-monofosfato-deidrogenasi (IMPHD) un enzima critico nella sintesi de novo delle purine durante la proliferazione cellulare. I linfociti T e B utilizzano di preferenza la via de novo per la sintesi delle purine e perciò sono particolarmente sensibili all'azione del farmaco rispetto alle altre

popolazioni cellulari che sono in grado di sintetizzare la purine anche attraverso vie biochimiche alternative.

I corticosteroidi e gli inibitori della calcineurina presentano diversi effetti collaterali essendo in grado nel lungo termine, di far insorgere de novo o accentuare alterazioni metaboliche come il diabete, la dislipidemia, l'ipertensione arteriosa e l'osteoporosi e l'insufficienza renale (150-157).

L'ipertensione si sviluppa nel 65-70 % dei trapiantati entro un anno dal trapianto. Può accadere inoltre che alcuni pazienti perdano il normale ritmo circadiano pressorio e sviluppino ipertensione notturna. La causa dell'ipertensione è multifattoriale, ma è maggiormente correlata all'utilizzo degli inibitori della calcineurina rispetto a quello dei corticosteroidi. Gli inibitori della calcineurina agiscono incrementando le resistenze vascolari renali e sistemiche. Il meccanismo che sta alla base di tale fenomeno non è ancora completamente chiarito, ma un importante ruolo è esercitato da un incremento del rilascio di sostanze vasocostrittrici, in particolare l'endotelina. A ciò potrebbe aggiungersi l'effetto ipertensivo esercitato dai corticosteroidi, la cui somministrazione di solito viene interrotta entro il sesto mese. Vi sono dati contrastanti sulla frequenza dell'ipertensione indotta da ciclosporina e tacrolimus. Alcuni trials a lungo termine non rivelano sostanziali differenze tra i due farmaci, mentre altri dimostrano una maggior incidenza di ipertensione tardiva con tacrolimus. L'iniziale trattamento prevede una dieta a basso contenuto di sodio, una riduzione del dosaggio di ciclosporina o tacrolimus e la più precoce sospensione dello steroide, associando quindi una terapia antiipertensiva con calcio-antagonisti poiché contrasta l'effetto vasocostrittivo esercitato a livello renale. L'insufficienza renale è una complicanza reversibile che si verifica frequentemente e precocemente dopo il trapianto, infatti la ciclosporina (o il tacrolimus) esercita un'azione tossica che si manifesta attraverso la necrosi tubulare acuta, a causa dell'effetto vasocostrittivo esercitato dalla ciclosporina stessa.

Tuttavia i farmaci immunosoppressori possono determinare anche un quadro di insufficienza renale cronica ed è quindi necessario monitorare costantemente la concentrazione plasmatica della creatinina. Uno studio ha dimostrato che in una coorte di 37.000 pazienti

sottoposti a trapianto, l'incidenza dell' insufficienza renale cronica (definita da una GFR \leq 29 ml/ min per 1.73 m²) era del 14 % a tre anni e del 18 % a 5 anni dal trapianto. I principali fattori di rischio per lo sviluppo di un'insufficienza renale cronica sono la terapia immunosoppressiva, l'età avanzata, una ridotta funzionalità renale pre-trapianto, il sesso femminile, un episodio di insufficienza renale acuta nel post-trapianto, la presenza di diabete o ipertensione, l'infezione da HCV e l'epoca del trapianto antecedente il 1998. E' importante controllare adeguatamente i livelli di pressione arteriosa, non utilizzare FANS o aminoglicosidici e mantenere un'adeguata idratazione.

L'utilizzo di prednisone, ciclosporina, tacrolimus e l'aumento di peso predispongono allo sviluppo di diabete dopo il trapianto e tale rischio, sembra aumentare nei pazienti trapiantati per infezione da epatite C. I pazienti affetti dal diabete prima del trapianto richiedono spesso un trattamento insulinico dopo il trapianto ed il 13-30% dei soggetti trapiantati sviluppa un diabete de novo e questo si verifica più spesso con un regime immunosoppressivo con tacrolimus piuttosto che con ciclosporina. Lo sviluppo della malattia diabetica non ha effetti rilevanti sulla sopravvivenza nel primo anno dopo il trapianto. Tuttavia un incremento della mortalità è stato riportato nei diabetici nel secondo anno post-trapianto. La prevalenza del diabete tende a ridursi con la riduzione del dosaggio dello steroide. Per quanto riguarda il trattamento del diabete, si è visto che gli ipoglicemizzanti orali hanno un'efficacia limitata nel paziente post-trapiantato, pertanto spesso è necessario ricorrere al trattamento insulinico.

Un'altra complicanza metabolica frequente dopo il trapianto è l'obesità. Infatti, il miglioramento del performance status del paziente stesso e il trattamento col prednisone predispongono all'aumento di peso. In genere il peso aumenta nei primi due anni dopo il trapianto, poi si stabilizza. Tuttavia dal 20 al 40% di pazienti risulta obesa. Il dosaggio di prednisone è stato identificato come fattore predittivo indipendente di obesità, tuttavia, quando l'obesità si è stabilizzata, potrebbe non essere sufficiente una riduzione del dosaggio di tale farmaco. Risulta importante pertanto prevenire l'eccessivo aumento di peso attraverso una dieta equilibrata e un'adeguata attività fisica.

Anche la dislipidemia è comune dopo il trapianto. L'ipercolesterolemia si sviluppa nel 16-43% dei pazienti e l'ipertrigliceridemia nel 40-47% e spesso si osserva anche una riduzione dei valori di HDL. L'ipertrigliceridemia si osserva già entro il primo mese dal trapianto e rimane stabile nel primo anno; i valori di colesterolo invece aumentano in modo graduale e raggiungono un plateau al sesto mese dal trapianto. E' ovvio che pazienti con elevati livelli di colesterolo prima del trapianto, siano maggiormente predisposti a sviluppare ipercolesterolemia dopo l'intervento. La dislipidemia nei pazienti trapiantati è correlata all'assunzione di corticosteroidi, tacrolimus e soprattutto ciclosporina. Il trattamento consiste nel modificare le abitudini dietetiche e se possibile ridurre le dosi di corticosteroidi, nonché sostituire eventualmente gli inibitori di calcineurina con micofenolato mofetile. La terapia medica con statine è prescritta più raramente.

Alterazioni a carico dell' apparato cardiovascolare sono comuni nei pazienti trapiantati, soprattutto in coloro che presentano ulteriori fattori di rischio, quali ipertensione, diabete mellito, obesità e iperlipidemia.

SCOPO DEL LAVORO

Valutare la presenza di un danno metabolico visibile istologicamente e i livelli della leptina in pazienti sottoposti a trapianto di fegato per cirrosi terminale HCV-correlata e con recidiva attiva di malattia su graft, seguiti presso la Clinica Medica 1 dell'Università degli Studi di Padova.

MATERIALI E METODI

I dati clinici, bioumorali e strumentali sono stati ottenuti dal database relativo a 143 pazienti seguiti presso la Clinica Medica 1, dal 1991 al 2007, sottoposti a trapianto di fegato per cirrosi epatica terminale. I soggetti con eziologia virale HCV, senza altre concause, erano 31, 25 maschi e 6 femmine, di età compresa tra i 30 e i 65 anni al momento del trapianto. I pazienti sono stati seguiti nel primo anno dal trapianto con cadenza trimestrale, salvo complicanze e dal secondo anno con cadenza almeno semestrale. Gli accertamenti eseguiti per il follow-up prevedevano l'esecuzione di esami bioumorali (emocromo con formula, indici di flogosi, funzionalità epatica, renale, coagulazione, assetto lipidico, glicemia ed emoglobina glicata nei pazienti diabetici, profilo proteico, markers relativi al metabolismo osseo, livelli di immunosoppressione, esame urine), sierologici (HBV+HBV-DNA, HCV+HCV-RNA e genotipo, CMV, EBV), e strumentali (ecodoppler del fegato e dei vasi splanchnici, EGDS al terzo mese, visita oculistica al primo mese e al compimento dell'anno, MOC al primo mese e quindi annualmente) nonché la visita epatologica con raccolta di dati clinici, incluse le abitudini voluttuarie, e al momento della biopsia anche con registrazione del peso corporeo, della circonferenza addominale e del BMI. Veniva in questa occasione effettuato un prelievo anche per dosaggio della leptina. Altri accertamenti venivano stabiliti di volta in volta a seconda delle evidenze cliniche. La biopsia epatica veniva eseguita nelle prime settimane in relazione ad un sospetto di rigetto acuto o di recidiva di HCV; successivamente quando vi era un'alterazione delle transaminasi persistente per almeno un mese. In tutti i pazienti le biopsie epatiche sono state eseguite a distanza di almeno un anno dall'intervento di trapianto e in 26 pazienti sono state ripetute tra il 2004 e il 2007. Il regime di immunosoppressione prevedeva una duplice terapia con ciclosporina e steroidi o tacrolimus e steroidi. Gli steroidi, tranne in 7 pazienti sottoposti a trapianto prima del 1997 e in un paziente, che seguiva un protocollo immunosoppressivo diverso, sottoposto a trapianto nel 2003, venivano sospesi entro il sesto mese. Il tempo intercorso tra l'epoca del trapianto e la biopsia esaminata in questo studio, variava tra i 12 mesi e i 13 anni. Al

momento della biopsia solo 5 pazienti mantenevano un basso dosaggio di steroidi (5 mg di prednisone). Il dosaggio della ciclosporina e del tacrolimus venivano aggiustati in modo da mantenere un livello plasmatico tra i sei mesi e l'anno rispettivamente di (C₀) 140-160 ng/ml e 7-8 ng/ml, mentre dopo l'anno rispettivamente di 100 ng/ml e 5 ng/ml.

Abbiamo utilizzato come criteri per la sindrome metabolica quelli proposti dall'ATPIII: circonferenza del giro vita maggiore o uguale a 102 cm negli uomini e 88 cm nelle donne; livelli di trigliceridi superiori o uguali a 150 mg/dl (1.7mmol/l); livelli di colesterolo HDL inferiore a 40mg/dl (1.03mmol/l) negli uomini e a 50mg/dl (1.3mmol/l) nelle donne; pressione arteriosa superiore o uguale a 130 mmHg per la pressione sistolica e 85 mmHg per la pressione diastolica; glicemia a digiuno superiore o uguale a 110 mg/dl. Per quanto riguarda il BMI (peso corporeo [kg]/altezza in [m²]), veniva considerato patologico un valore superiore a 25.

Valori di aspartato e alanina amino transferasi (AST e ALT) superiori a 40 UI/L, venivano considerati patologici.

I livelli della leptina venivano misurati con metodica RIA.

Tutte le biopsie sono state revisionate da un unico anatomopatologo con elevata esperienza in ambito epatologico. Tutte le biopsie venivano fissate in formalina, colorate con ematossilina-eosina e rosso sirio per la valutazione della fibrosi. Per la descrizione del grading e dello staging dell'epatopatia cronica, è stato utilizzato lo score METAVIR. La steatosi epatica è stata classificata con valutazione semiquantitativa (0, >5%; +, 5-30%; ++, 30-60%; +++, >60%). La fibrosi pericellulare è stata valutata se presente (S) o assente (N).

Sono stati selezionati per questo studio solo i pazienti sottoposti a biopsia epatica dopo 12 mesi dall'intervento di trapianto, allo scopo di escludere elementi clinico-strumentali di rigetto acuto o cronico o alterazioni vascolari secondari a stenosi dell'arteria epatica. Non era stata iniziata nessuna terapia antivirale con interferone associata o meno a ribavirina, al momento della biopsia.

Tutte le analisi sono state eseguite utilizzando il Statistical Package for the Social Sciences. I livelli di leptina sono stati analizzati in relazione a: steatosi (assente/presente), gravità

della steatosi (assente, +, ++ o +++), fibrosi pericellulare (assente/presente), sindrome metabolica (assente/presente), indice di massa corporea (normopeso/sovrappeso) con il test non parametrico di Wilcoxon o di Kruskal-Wallis. La relazione tra steatosi (assente/presente) e fibrosi pericellulare (assente/presente) è stata analizzata con il test chi-quadrato. I confronti sono stati condotti ad un livello di significatività del 5% bilaterale.

RISULTATI

I pazienti sottoposti a trapianto di fegato dal 1991 al 2007 per cirrosi HCV-relata erano 31 (22%). Il tempo intercorso dall'epoca dell'intervento al momento della biopsia epatica variava dai 13 ai 256 mesi, 13 (42%) seguivano terapia immunosoppressiva con ciclosporina, 18 (58%) con tacrolimus, solo 5 (20%) erano in terapia con steroidi a basso dosaggio (5 mg/die).

I pazienti con diabete mellito prima del trapianto erano 8 (26%) e quelli con ipertensione arteriosa erano 5 (16%). Non erano presenti al momento del trapianto parametri che potessero orientare verso una sindrome metabolica secondo i criteri ATP III, tuttavia 1 (4%) paziente presentava due criteri associati (diabete mellito e ipertensione arteriosa).

Dopo il trapianto i pazienti con diabete mellito erano 16 (52%) anche se il controllo glicemico, farmacologicamente indotto, risultava in tutti, tranne uno, adeguato, con valori di emoglobina glicata tra 4,2 e 6.9%; quelli con ipertensione arteriosa erano 21 (68%); quelli con ipertrigliceridemia e ipocolesterolemia-HDL erano 10 (32%), quelli con obesità erano 12 (39%). Così 14 pazienti (45%) presentavano almeno tre criteri, secondo ATP III, per la diagnosi di sindrome metabolica.

Caratteristiche istologiche, localizzate in zona centrolobulare, di steatosi erano presenti in 17 pazienti (55%) e quelle di fibrosi pericellulare in 14 pazienti (45%), e l'associazione delle due caratteristiche era presente in ben 10 pazienti (32%).

Dei pazienti con steatosi epatica 10 (59%) presentavano i criteri per una sindrome metabolica. Tra i pazienti con steatosi 5 (30%) presentavano una infiltrazione lipidica >30%. Dei 20 pazienti con fibrosi pericellulare e/o steatosi, 10 (50%) seguivano un regime immunosoppressivo con tacrolimus, mentre 10 (50%) erano in terapia con ciclosporina.

Al momento della biopsia 21 pazienti (68%) presentavano alterazione delle transaminasi, ma tutti avevano una recidiva di epatite HCV documentabile sia dalla presenza di marcatori virali nel siero, sia da caratteristiche istologiche, con variabile grading e staging (1-3 e 0-4 rispettivamente). La gravità istologica della recidiva non correlava con la presenza di

steatosi o fibrosi pericellulare. I genotipi virali erano 1b (48%), 2a/2c (48%), 4c/4d (4%). Non erano presenti genotipi 3.

I livelli di leptina sono risultati significativamente (14 vs 8.1 ng/L, p 0.001) più elevati nei pazienti che presentavano una steatosi in zona 3 all'esame istologico. Inoltre vi era anche una correlazione significativa con il grado di steatosi (p 0.002) (vedi grafico pag. 51)

I pazienti che presentavano almeno tre criteri diagnostici, secondo ATP III, per una sindrome metabolica non presentavano livelli significativamente più elevati di leptina, anche se veniva tenuto conto solo del BMI.

DISCUSSIONE

La cirrosi, epatica allo stadio terminale, secondaria all'infezione cronica da virus dell'epatite C, rappresenta una delle principali indicazioni al trapianto di fegato. La recidiva dell'infezione dopo trapianto è la regola ed avviene già dalle prime ore dopo la riperfusione dell'organo e la recidiva istologica supera dopo un anno il 90%. E' noto inoltre che la progressione dell'epatopatia causata dal virus C nei soggetti immunosoppressi procede più rapidamente verso la cirrosi rispetto ai soggetti immunocompetenti, raggiungendo il 30% a cinque anni. Sono stati identificati alcuni fattori di rischio, quali il tipo e i livelli di immunosoppressione, la dose di corticosteroidi, gli episodi di rigetto, l'infezione da cytomegalovirus, l'età del donatore che accelerano l'evoluzione verso la cirrosi in modo variabile.

Tuttavia il trapianto induce anche un nuovo stato metabolico, che comporta alterazioni sistemiche ed istologiche che potrebbero contribuire all'aumento della morbilità e della mortalità dei soggetti sottoposti a trapianto per cirrosi HCV-correlata .

La sindrome metabolica è una condizione clinica caratterizzata dalla presenza di un'insulino-resistenza, associata, secondo i criteri dell'ATPIII, ad obesità viscerale, ipertrigliceridemia, bassi livelli di colesterolo-HDL, diabete mellito ed ipertensione arteriosa. Dal punto di vista istologico può essere presente un quadro di semplice steatosi o di steatoepatite non alcolica con quadri istologici che vanno dalla semplice infiltrazione grassa del fegato (>5%) fino alla presenza di infiammazione lobulare con possibile evoluzione verso la fibrosi o la cirrosi. E' noto che nei soggetti trapiantati per cirrosi criptogenetica e fenotipo istologico compatibile con NASH il rischio per steatosi epatica a 5 anni dopo il trapianto si avvicina al 100 %, contro il 25 % nel gruppo di controllo ¹⁴⁵. E' stato inoltre dimostrato come la steatoepatite ¹⁴⁶⁻¹⁴⁹ e la sindrome metabolica ¹⁵⁰ possano recidivare dopo trapianto epatico, con progressione a cirrosi entro un anno dal trapianto che può arrivare al 12-13% dei casi.

D'altra parte è stato riportato che l'uso di corticosteroidi e di altri farmaci immunosoppressori, possono contribuire all'insorgenza dei classici fattori di rischio

associati alla sindrome metabolica e alla steatosi/steatoepatite non alcolica, quali l'incremento ponderale, il diabete mellito, la dislipidemia, l'ipertensione arteriosa.

Nei 31 pazienti valutati in questo lavoro, abbiamo assistito alla comparsa ex novo di alcune caratteristiche che definiscono la sindrome metabolica quali: il diabete mellito (39%), l'ipertensione arteriosa (58%), l'ipertrigliceridemia (32%), l'ipocolesterolemia-HDL (32%), l'obesità (39%). E' tuttavia da rilevare che alcuni parametri, propri della sindrome metabolica, non potevano essere valutati correttamente prima del trapianto, in quanto profondamente e significativamente alterati dalla malattia epatica avanzata, che come è noto determina una grave compromissione metabolica generale, con ridotto accumulo di glicogeno nel fegato e marcata riduzione della sintesi di alcune frazioni proteiche e lipidiche, tanto da realizzare frequentemente uno stato simil-cachettico. Non vi erano differenze significative nei parametri della sindrome metabolica, rispetto al tipo di terapia immunosoppressiva assunta o alla durata della terapia con steroidi.

La valutazione istologica evidenziava in tutti i pazienti una recidiva di malattia, con gradi di attività infiammatoria e di fibrosi variabile da lieve a elevata, correlando con il tempo trascorso dall'intervento di trapianto, piuttosto che con il genotipo virale.

Oltre alle alterazioni istologiche tipiche della malattia epatica virale, erano presenti anche alterazioni istologiche caratteristiche della NAFLD in zona centrolobulare, quali la steatosi (55%) e la fibrosi pericellulare (45%). Dal momento che non erano presenti genotipi virali 3, che, come è noto, comportano la comparsa di steatosi epatica, e che non vi erano elementi clinici di sospetto per assunzione abituale di alcol, abbiamo ritenuto che la presenza contemporanea di steatosi e di fibrosi pericellulare potesse essere considerata come caratteristica di una possibile evoluzione verso la steatoepatite, riscontrabile pertanto nel 35% dei pazienti esaminati.

I livelli plasmatici di leptina, che già diversi studi, eseguiti in pazienti non sottoposti a trapianto di fegato ma con epatopatia HCV correlata, segnalavano elevati in presenza di steatosi epatica, sono risultati significativamente aumentati in relazione alla presenza e alla severità della steatosi all'esame istologico. Dopo il trapianto l'aumento della leptina, probabilmente indotto dal cambiamento dello stato nutrizionale e mantenuto

successivamente anche dagli effetti dei farmaci (sono state riportate correlazioni positive con i livelli di cortisolo in corso di utilizzo degli steroidi) determina, nel tempo, uno stato di leptinoresistenza che contribuisce all'instaurarsi di un quadro di insulino-resistenza. In questo modo la leptina contribuisce al primo "hit" del processo di danno metabolico portando allo sviluppo di steatosi e, successivamente inducendo il rilascio di citochine da parte delle cellule del Kupffer, potrebbe contribuire anche alla necrosi cellulare e alla successiva attivazione della fibrogenesi. I risultati da noi trovati confermerebbero il suo ruolo patogenetico anche nei pazienti epatotrapiantati.

CONCLUSIONI

Dall'analisi dei risultati emersi nel nostro studio, possiamo concludere che:

- 1) dopo trapianto di fegato si manifestano le caratteristiche cliniche ed istologiche della sindrome metabolica non presenti prima del trapianto;
- 2) tali caratteristiche si esprimono con comparsa ex novo di diabete mellito (39%), ipertensione arteriosa (58%), ipertrigliceridemia (32%), ipocolesterolemia-HDL (32%), obesità (39%) ed alterazioni istologiche caratteristiche quali la steatosi (55%) e la fibrosi pericellulare (45%);
- 3) le cause della comparsa delle caratteristiche clinico-istologiche riconducibili alla sindrome metabolica possono essere ricondotte a:
 - a) preesistenti condizioni metaboliche associate all'eziologia virale, responsabili di una possibile preesistenza di sindrome metabolica non rilevata nella fase pre-trapianto per le gravi condizioni cliniche e metaboliche dei pazienti;
 - b) l'influenza di fattori farmacologici quali la ciclosporina, il tacrolimus o gli steroidi responsabili dell'alterato metabolismo glucidico e lipidico;
 - c) un nuovo equilibrio metabolico sostenuto dal fegato trapiantato responsabile di uno stato ipermetabolico paragonabile alla condizione della rapida rialimentazione del soggetto denutrito;
- 4) i più elevati livelli di leptina possono identificare, al di là delle caratteristiche cliniche, la presenza di un danno metabolico cellulare e pertanto possono individuare quei pazienti da sottoporre a biopsia epatica per meglio caratterizzare la gravità di tale danno.

BIBLIOGRAFIA

1. Ludwig J, Viggiano T, McGill DB, et al. Nonalcoholic steatohepatitis. Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980;55:434–8.
2. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human diabetes. *Diabetes* 1988;37(12):1595–607.
3. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998;15(7):539–53.
4. McLaughlin T, Abbasi F, Cheal K, et al. Use of metabolic markers to identify overweight individuals who are insulin resistant. *Ann Intern Med* 2003;139(10):802–9.
5. Expert Panel on Detection Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285(19):2486–97.
6. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome: a new worldwide definition. *Lancet* 2005;366(9491):1059–62.
7. Chitturi S, Farrell G, George J. Non-alcoholic steatohepatitis in the Asia-pacific region: future shock? *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19:368–74.
8. Chitturi C, George J. NAFLD/NASH is not just a “Western” problem: some perspectives on NAFLD/NASH from the East. In: Farrell GC, George J, Hall P, et al, editors. *Fatty liver disease: NASH and related disorders*. Oxford (UK): Blackwell Publishing; 2005. p. 219–28.
9. McCullough AJ. The epidemiology and risk factors of NASH. In: Farrell GC, George J, Hall P, et al, editors. *Fatty liver disease: NASH and related disorders*. Oxford (UK): Blackwell Publishing; 2005. p. 23–37.
10. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004;40:1387–95.
11. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, et al. Non-alcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994;107:1103–9.
12. Lee RG. Non-alcoholic steatohepatitis: a study of 49 patients. *Hum Pathol* 1989;20:594–8.
13. Hui JM, Kench JG, Chitturi S, et al. Long-term outcomes of cirrhosis in nonalcoholic steatohepatitis compared with hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:420–7.

14. Rratziu V, Bonyhay L, DiMartino V, et al. Survival, liver failure, and hepatocellular carcinoma in obesity-related cryptogenic cirrhosis. *Hepatology* 2002;35:1485–93.
15. Caldwell SH, Oelgner DH, Jezzoni JC, et al. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology* 1999;32:689–92.
16. Caldwell SH, Hespeneide EE. Subacute liver failure in obese women. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2058–67.
17. Ong J, Younossi ZM, Reddy V, et al. Cryptogenic cirrhosis and post-transplantation nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Transpl* 2001;7:707–801.
18. Bugianesi E, Leone A, Vanni E, et al. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2002; 123:134–40.
19. Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, et al. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndrome. *Semin Liver Dis* 2001;21:17–26.
20. Marchesini G, Marzocchi R. Metabolic Syndrome and NASH. *Clin Liver Dis* 2007;11:105–117.
21. Sabir N, Sermez Y, Kazil S, et al. Correlation of abdominal fat accumulation and liver steatosis: importance of ultrasonographic and anthropometric measurements. *Eur J Ultrasound* 2001;14(2–3):121–8.
22. Carr DB, Utzschneider KM, Hull RL, et al. Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome. *Diabetes* 2004;53(8):2087–94.
23. Marchesini G, Avagnina S, Barantani EG, et al. Aminotransferase and gamma-glutamyltranspeptidase levels in obesity are associated with insulin resistance and the metabolic syndrome. *J Endocrinol Invest* 2005;28(4):333–9.
24. Marceau P, Biron S, Hould FS, et al. Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(5):1513–7.
25. Ioannou GN, Weiss NS, Kowdley KV, et al. Is obesity a risk factor for cirrhosis-related death or hospitalization? A population-based cohort study. *Gastroenterology* 2003;125(4):1053–9.
26. Marchesini G, Forlani G, Bugianesi E. Is liver disease a threat to patients with metabolic disorders? *Ann Med* 2005;37(5):333–46.

27. Jimba S, Nakagami T, Takahashi M, et al. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its association with impaired glucose metabolism in Japanese adults. *Diabet Med* 2005;22(9):1141–5.
28. Vozarova B, Stefan N, Lindsay RS, et al. High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51(6):1889–95.
29. Angulo P, Keach JC, Batts KP, et al. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999;30(6):1356–62.
30. Adams LA, Sanderson S, Lindor KD, et al. The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. *J Hepatol* 2005;42(1):132–8.
31. Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, et al. Diabetes increases the risk of hepatocellular carcinoma in the United States: a population based case control study. *Gut* 2005; 54(4):533–9.
32. De Marco R, Locatelli F, Zoppini G, et al. Cause-specific mortality in type 2 diabetes. The Verona Diabetes Study. *Diabetes Care* 1999;22(5):756–61.
33. Ikai E, Ishizaki M, Suzuki Y, et al. Association between hepatic steatosis, insulin resistance and hyperinsulinaemia as related to hypertension in alcohol consumers and obese people. *J Hum Hypertens* 1995;9(2):101–5.
34. Donati G, Stagni B, Piscaglia F, et al. Increased prevalence of fatty liver in arterial hypertensive patients. Role of insulin resistance. *Gut* 2004;53(7):1020–3.
35. Assy N, Kaita K, Mymin D, et al. Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients. *Dig Dis Sci* 2000;45(10):1929–34.
36. Lonardo A, Lombardini S, Scaglioni F, et al. Hepatic steatosis and insulin resistance: does etiology make a difference? *J Hepatol* 2006;44(1):190–6.
37. Tanoli T, Yue P, Yablonskiy D, et al. Fatty liver in familial hypobetalipoproteinemia: roles of the ApoB defects, intra-abdominal adipose tissue, and insulin sensitivity. *J Lipid Res* 2004; 45(5):941–7.
38. Rajala MW, Scherer PE. The adipocyte at the crossroads of energy, homeostasis, inflammation and atherosclerosis. *Endocrinology* 2003;144:3765–73.

39. Li Z, Diehl AM. Cytokines and inflammatory recruitment in NASH: experimental and human studies. In: Farrell GC, George J, Hall PDL, et al, editors. Fatty liver disease, NASH and related disorders. Oxford (UK): Blackwell Publishing; 2005. p. 123–31.
40. Uygun A, Kadayifci A, Yesilova Z, et al. Serum leptin levels in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3584–9.
41. LeClercq IA, Farrell GC, Schriemer R, et al. Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J Hepatol* 2002;37:206–13.
42. Chalasani N, Crabb DW, Cummings OW, et al. Does leptin play a role in the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis? *Am J Gastroenterol* 2003;98:2771–6.
43. Yamakawa T, Tanaka SI, Yamakawa Y, et al. Augmented production of tumor necrosis factor- α in obese mice. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;75:51–6.
44. Aihand G, Teboul M, Massiera F. Angiotensinogen, adipocyte differentiation and fatty mass enlargement. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002;5:385–9.
45. Yokohama S, Yoneda M, Haneda M, et al. Therapeutic efficacy of angiotensin II receptor antagonist in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2004;40: 1222–5.
46. Berg AH, Combs TP, Du X, et al. The adipocyte secreted protein ACRP 30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 2001;7:947–53.
47. Pajvani UB, Scherer PE. Adiponectin: systemic contributor to insulin sensitivity. *Curr Diab Rep* 2003;3:207–13.
48. Spranger J, Kruke A, Mohlig M, et al. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 2003;361:226–8.
49. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 2001;7: 941–6.
50. Tomas E, Tsao TS, Saha AK, et al. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:16300–13.
51. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002;8:1288–95.
52. Xu A, Wang Y, Keshaw H, et al. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003;112:91–100.

53. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, et al. Beyond insulin resistance in NASH: TNF- α or adiponectin? *Hepatology* 2004;40:46–54.
54. Soodini GR, Hamdy O. Adiponectin and leptin in relation to insulin sensitivity. *Metab Syn Rel Dis* 2004;2:114–23.
55. Kaser S, Moschen A, Cayon A, et al. Adiponectin and its receptors in nonalcoholic steatohepatitis. *Gut* 2005;54:117–21.
56. Wei YH, Jun L, Qiang CJ. Effect of losartan, an angiotensin II antagonist, on hepatic fibrosis induced by CCl₄ in rats. *Dig Dis Sci* 2004;49:1589–94.
57. Crespo J, Cayon A, Fernandez-Gil P, et al. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF receptors, p55 and p75 in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001;34:1158–63.
58. Katsuki A, Sumida Y, Murashima S, et al. Serum levels of tumor necrosis factor- α are increased in obese patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:859–62.
59. Ueki K, Kondo T, Tseng YH, et al. Central role of suppressors of cytokine signalling proteins in hepatic steatosis, insulin resistance and the metabolic syndrome of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:10422–7.
60. Ueki K, Kondo T, Kahn CR. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol* 2004;24:5434–46.
61. Samuel VT, Liu ZX, Qu X, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 2004;279:32345–53.
62. Hotamisligil GS, Peraldi A, Budavari A, et al. IRS-1 mediated kinase activity in TNF- α and obesity induced insulin resistance. *Science* 1996;272:665–8.
63. Shepherd PR, Kahn SK. Glucose transporters and insulin action. *N Engl J Med* 1999;341:248–57.
64. Tafani M, Schneider TG, Pastorino JG, et al. Cytochrome dependent activation of caspase 3 by tumor necrosis factor requires induction of the mitochondrial permeability transition. *Am J Pathol* 2000;156:2111–21.
65. Pastorini JG, Simbula G, Yamamoto K, et al. Cytotoxicity of TNF depends on induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biochem* 1996;271:29792–8.

66. Li L, Thomas RM, Suzuki H, et al. A small molecule Smac mimic potentiates trail and TNF α -mediated cell death. *Science* 2004;305:1471–4.
67. Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, et al. Hepatocyte apoptosis and FAS expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003;125: 437–43.
68. Combs TP, Berg AH, Obici S, et al. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 2001;108:1875–81.
69. Kamada Y, Tamura S, Kiso S, et al. Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. *Gastroenterology* 2003;125:1796–807.
70. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002;8: 1288–95.
71. Shepherd PR, Kahn SK. Glucose transporters and insulin action. *N Engl J Med* 1999;341: 248–57.
72. Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR. Protein-interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 1999;103:931–43.
73. Combettes-Souverain M, Issad T. Molecular basis on insulin action. *Diabetes Metab* 1998; 24:477–89.
74. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, et al. IKK-B links inflammation to obesity induced insulin resistance. *Nat Med* 2005;11:191–8.
75. Day CP. From fat to inflammation. *Gastroenterology* 2006;130:207–10.
76. Diraison F, Moulin P, Beylot M. Contribution of hepatic de novo lipogenesis and re-esterification of plasma nonesterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab* 2003;29:478–85.
77. Charlton M, Sreekumar R, Rasmussen D, et al. Apolipoprotein synthesis in non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2002;35:898–904.
78. Miele L, Grieco A, Armuzzi A, et al. Hepatic mitochondrial-beta-oxidation in patients with nonalcoholic steatohepatitis assessed by ¹³C-octanoate breath test. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2335–6.
79. Kim JK, Fillmore JJ, Chen Y, et al. Tissue specific overexpression of lipoprotein lipase cause tissue specific insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:7522–7.

80. Kim SP, Ellmerer M, VanCrittters GW, et al. Primary of hepatic insulin resistance in the development of the metabolic syndrome induced by an isocaloric moderate fat diet in the dog. *Diabetes* 2003;52:2453–60.
81. Day CP, James UF. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology* 1998;114:842–5.
82. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999;116:1413–9.
83. Teli MR, James OFW, Burt AD, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver. A follow-up study. *Hepatology* 1995;22:1714–9.
84. Dam-Larsen S, Franzmann M, Anderson IB, et al. Long term prognosis of fatty liver disease and death. *Gut* 2004;53:750–5.
85. Washington K, Wright K, Shyr Y, et al. Hepatic stellate cell activation in nonalcoholic steatohepatitis and fatty liver. *Hum Pathol* 2000;31:822–8.
86. Yang S, Zhu H, Li Y, et al. Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress. *Arch Biochem Biophys* 2000;378:259–68.
87. Chavin KD, Yang S, Lin HZ, et al. Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion. *J Biol Chem* 1999;274:5692–700.
88. Day CP, James OF. Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party? *Hepatology* 1998;27:1463–6.
89. Dong W, Simeonova PP, Gallucci R, et al. Cytokine expression in hepatocytes: role of oxidative stress. *J Interferon Cytokine Res* 1998;18:629–38.
90. Goldstein BJ, Kalyankar M, Wu X. Insulin action is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets. *Diabetes* 2005;54:311–21.
91. Wanless JR, Bargman JM, Oreopoulos DG, et al. Subcapsular steatonecrosis in response to peritoneal insulin delivery: a clue to the pathogenesis of steatonecrosis in obesity. *Mod Pathol* 1989;2:69–74.
92. Khalili K, Lan FP, Hanbidge AE, et al. Hepatic subcapsular steatosis in response to intraperitoneal insulin delivery: CT findings and prevalence. *AJR Am J Roentgenol* 2003;180:1601–4.
93. Li XL, Man K, Ng KT, et al. Insulin in UW solution exacerbates hepatic ischemia/reperfusion injury by energy depletion through the IRS-2/SREBP-1c pathway. *Liver Transpl* 2004;10:1172–82.

94. Paradis V, Perle G, Bonvoust F, et al. High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: a potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2001;74:738–44.
95. George DK, Goldwurm S, MacDonald G, et al. Increased Hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology* 1998; 114:311–8.
96. Bonkovsky HL, Jawaid Q, Tortorelli K, et al. Nonalcoholic steatohepatitis and iron increased prevalence of mutations of the HFE gene in nonalcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 1999;31:421–9.
97. Fargion S, Mattioli M, Fracanzani AL, et al. Hyperferritinemia, iron overload, and multiple metabolic alterations identify patients at risk for nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2448–55.
98. Fernandez Real JM, Casamitjana-Abella R, Ricart-Engel W, et al. Serum ferritin as a component of the insulin resistance syndrome. *Diabetes Care* 1998;21:62–8.
99. MacDonald GA, Powell LW. More clues to the relationship between hepatic iron and steatohepatitis: an association with insulin resistance? *Gastroenterology* 1999;117:1241–4.
100. Dinneen SF, Silverberg JD, Batts K, et al. Liver iron stores in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Mayo Clin Proc* 1994;69:13–5.
101. Riquelme A, Soza A, Nazal L, et al. Histological resolution of steatohepatitis after iron depletion. *Dig Dis Sci* 2004;49:1012–5.
102. Fernandez-Real JM, Penarroja G, Castro A, et al. Blood letting in high-ferritin type 2 diabetes: effects on vascular reactivity. *Diabetes Care* 2002;25:2249–55.
103. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120:1183–92.
104. Koruk M, Taysi S, Savas MC, et al. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Clin Lab Sci* 2004;34:57–62.
105. Mavretis PG, Ammon HV, Gleysteen JJ, et al. Hepatic free fatty acids in alcoholic liver disease and obesity. *Hepatology* 1983;3:226–31.
106. Clarke SD. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. I. Molecular mechanism for polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G865–9.

107. Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: the role of oxidative stress. *Mol Aspects Med* 2000;21:49–98.
108. Pastorini JG, Simbula G, Yamamoto K, et al. Cytotoxicity of TNF depends on induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biochem* 1996;271:29792–8.
109. Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, et al. Hepatocyte apoptosis and FAS expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003;125:437–43.
110. Rashid A, Wu TC, Huang GC, et al. Mitochondrial protein that regulate apoptosis and necrosis are induced in mouse fatty liver. *Hepatology* 1999;29:1131–8.
111. Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Sola S, et al. Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1708–17.
112. Stenvinkel P, Lönnqvist F, Schalling M. Molecular studies of leptin: implications for renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 1999 May;14(5):1103-12.
113. Uygun A, Kadayifci A, Yesilova Z, Erdil A, Yaman H, Saka M, Deveci MS, Bagci S, Gulsen M, Karaeren N, Dagalp K. Serum leptin levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 3584-3589
114. Giannini E, Botta F, Cataldi A, Tenconi GL, Ceppa P, Barreca T, Testa R. Leptin levels in nonalcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 2422-2425
115. Kaplan LM. Leptin, obesity, and liver disease. *Gastroenterology* 1998; 115: 997-1001
116. Huang XD, Fan Y, Zhang H, Wang P, Yuan JP, Li MJ, Zhan XY. Serum leptin and soluble leptin receptor in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14(18): 2888-2893
117. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Healy D, Hecht R, Winters D, McCaleb M. Efficacy of exogenous recombinant murine leptin in lean and obese 10- to 12-mo-old female CD-1 mice. *Am J Physiol* 1998; **275**: R950-R959
118. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol*. 1999;94:2467-2474. 122. Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis*. 2004;24:3-20.
119. Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Semin Liver Dis*. 2001;21:3-16.

120. Washington K, Wright K, Shyr Y, et al. Hepatic stellate cell activation in nonalcoholic steatohepatitis and fatty liver. *Hum Pathol.* 2000;31:822-828.
121. Yeh MM, and. Brunt EM. Pathology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease *Am J Clin Pathol* 2007;128:837-847
122. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005;41:1313-1321.
123. Malhotra V, Sakhuja P, Gondal R, Sarin SK, Siddhu M, Dutt N. Histological comparison of chronic hepatitis B and C in an Indian population. *Trop Gastroenterol.* 2000 Jan-Mar;21(1):20-1.
124. Loria P, Lonardo A, Leonardi F, Fontana C, Carulli L, Verrone AM, Borsatti A, Bertolotti M, Cassani F, Bagni A, Muratori P, Ganazzi D, Bianchi FB, Carulli N. Non-organ-specific autoantibodies in nonalcoholic fatty liver disease: prevalence and correlates. *Dig Dis Sci.* 2003 Nov;48(11):2173-81.
125. Sanyal AJ, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Stravitz RT, Mills AS. Nonalcoholic fatty liver disease in patients with hepatitis C is associated with features of the metabolic syndrome. *Am J Gastroenterol.* 2003 Sep;98(9):2064-71.
126. Rubbia-Brandt L, Quadri R, Abid K, Giostra E, Malé PJ, Mentha G, Spahr L, Zarski JP, Borisch B, Hadengue A, Negro F. Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *J Hepatol.* 2000 Jul;33(1):106-15.
127. Kumar D, Farrell GC, Fung C, George J. Hepatitis C virus genotype 3 is cytopathic to hepatocytes: Reversal of hepatic steatosis after sustained therapeutic response. *Hepatology.* 2002 Nov;36(5):1266-72.
128. Hofer H, Bankl HC, Wrba F, Steindl-Munda P, Peck-Radosavljevic M, Osterreicher C, Mueller C, Gangl A, Ferenci P. Hepatocellular fat accumulation and low serum cholesterol in patients infected with HCV-3a. *Am J Gastroenterol.* 2002 Nov;97(11):2880-5.
129. Shi ST, Poiyak SJ, Tu H, et al. Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. *Virology* 2002; 292: 198-210.
130. Barba G, Harper F, Harada T, et al. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid Storage droplets. *Proc Nati Acad Sci U. S. A.* 1997; 94: 1200-1205.
131. Moriya K, Fujie H, Shintani Y, et al. The core protein of hepatitis C virus induces

hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 1998; 4: 1065-1070.

132. Lerat H, Honda M, Beard MR, *et al.* Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and non structural proteins of hepatitis C virus. *Gastroenterology* 2002; 122: 352-365.

133. Kawaguchi T, Yoshida T, Harada M, *et al.* Hepatitis C virus down-regulates insulin receptor substrates 1 and 2 through up-regulation of suppressor of cytokine signaling 3. *Am J Pathol* 2004; 165:1499-1508.

134. Maeno T, Okumura A, Ishikawa T, *et al.* Mechanisms of increased insulin resistance in non-cirrhotic patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18:1358-1363.

135. Krebs DL, Hilton DJ. SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J Cell Sci* 2000; 113:2813-2819.

136. Perlemuter G, Sabile A, Letteron P, *et al.* Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related Steatosis. *FASEB J* 2002; 16: 185-194

137. Neuhaus P, Klupp J, Langrehr JM, *et al.* Quadruple tacrolimus-based induction therapy including azathioprine and ALG does not significantly improve outcome after liver transplantation compared with a standard induction with tacrolimus and steroids: Results of prospective randomized trial. *Transplantation* 2000; 69: 2343.

138. Arrojo V, Bosch J, Broguera M, *et al.* Treatment of liver diseases. Masson S.A, 1999, Barcellona: 153.

139. Rodriguez-Luna H, Vargas H E: Natural history of hepatitis C and outcomes following liver transplantation. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2004; 50: 51-9.

140. A.I.S.F.: Trattamento della epatite da HCV, 2004

141. Wiesner RH, Sorrel M, Villamil F: Report of the first International Liver Transplantation Society expert panel consensus conference on liver transplantation and hepatitis C. *Liver Transpl* 2003; 9:S1-9.

142. Boker KH, Dalley G, Bahr MJ, Maschek H, Tillmann HL, *et al.* Long-term outcome of hepatitis C virus infection after liver transplantation. *Hepatology* 1997; 25:203-10.

143. Guerrero RB, Batts KP, Burgart LJ, Barret SL, Germer JJ, Poterucha JJ, *et al.* Early detection of hepatitis C allograft reinfection after orthotopic liver transplantation: a

molecular and histologic study. *Mod Pathol* 2000; 13:229-37.

144. Papatheodoridis GV, et al: The role of different immunosuppression in the long-term histological outcome of HCV reinfection after liver transplantation for HCV cirrhosis. *Transplantation* 2001; 72:412-418.

145. Brillanti S, Vivarelli M, De Ruvo N, Aden AA, Camaggi V, D'Errico A, et al: slowly tapering off steroids protects the graft against hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Liver Transpl* 2002; 8:884-8.

146. Shergill AK, Kahalili M et al. Applicability, tolerability and efficacy of preemptive antiviral therapy in hepatitis C-infected patients undergoing liver transplantation. *Am J Transpl* 2005;5:118-124.

147. Chalasani N, Manzarbeitia C, Ferenci P et al. Peginterferon alfa-2a for hepatitis C after liver transplantation: two randomized controlled trials. *Hepatology* 2005;41:289-298.

148. Conti F, Morelon E, Calmusi Y. Immunosuppressive therapy in liver transplantation. *J Hepatol.* 2003; 39: 664.

149. Bullingham R, Monroe S, Nicholls A, et Al. Pharmacokinetics and bioavailability of mycophenolate mofetil in healthy subjects after single-dose oral and intravenous administration. *J Clin Pharmacol* 1996; 36: 315.

150. Randomised trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporin in prevention of liver allograft rejection. European FK506 Multicentre Liver Study Group. *Lancet* 1994; 344:423.

151. A comparison of tacrolimus (FK 506) and cyclosporine for immunosuppression in liver transplantation. The U.S. Multicenter FK506 Liver Study Group. *N Engl J Med* 1994; 331:1110.

152. Weir, MR, Fink, JC. Risk for posttransplant diabetes mellitus with current immunosuppressive medications. *Am J Kidney Dis* 1999; 34:1.

153. Neylan, JF, for the FK506 Kidney Transplant Study Group. Racial differences in renal transplantation after immunosuppression with tacrolimus versus cyclosporine. *Transplantation* 1998; 65:515.

154. Johnson, C, Ahsan, N, Gonwa, T, et al. Randomized trial of tacrolimus (Prograf) in combination with azathioprine or mycophenolate mofetil versus cyclosporine (Neoral) with

mycophenolate mofetil after cadaveric kidney transplantation. *Transplantation* 2000; 69:834.

155. First, MR, Gerber, DA, Hariharan, S, et al. Posttransplant diabetes mellitus in kidney allograft recipients: incidence, risk factors, and management. *Transplantation* 2002; 73:379.

156. Filler, G, Neuschulz, I, Vollmer, I, et al. Tacrolimus reversibly reduces insulin secretion in paediatric renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15:867.

157. Thiebaud, D, Krieg, MA, Gillard-Berguer, D, et al. Cyclosporine induces high bone turnover and may contribute to bone loss after heart transplantation. *Eur J Clin Invest* 1996; 26:549.

