

AGGIORNAMENTO

RIDOTTA ATTIVITÀ DELLA LIPASI ACIDA LISOSOMIALE: UN POSSIBILE RUOLO PATOGENETICO NELLA NAFLD?

Reduced activity of lysosomal acid lipase: a possible role in the pathogenesis of NAFLD?

MARIA DEL BEN, LICIA POLIMENI, FRANCESCO BARATTA²,
SIMONA BATTAGLIA, DANIELE PASTORI², FRANCESCO ANGELICO³

¹Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche;

²Dipartimento di Scienze Anatomiche, Istologiche, Medico Legali e dell'Apparato Locomotore;

³Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Sapienza Università, Roma

SUMMARY

Lysosomal Acid Lipase (LAL) is a hydrolase that plays a key role in intra-cellular cholesterol trafficking. A reduced LAL activity promotes an increased lysosomal cholesterol esters storage, as observed in two recessive autosomal genetic diseases. Wolman disease is characterized by total LAL deficiency and has an early onset phenotype with rapid multi-organ failure. Cholesterol ester storage disease (CESD) may develop during childhood and adulthood and has a less severe phenotype characterized by accelerated atherosclerosis, dyslipidemia and fatty liver rapidly progressing to fibrosis and cirrhosis.

The natural history of LAL deficiency in adults is not well defined and the diagnosis is often incidental. LAL deficiency has been suggested as a possible unrecognized cause of dyslipidemia and fatty liver. Therefore, non-obese patients with unexplained persistent elevation of serum liver enzymes and LDL cholesterol should be tested for LAL deficiency.

Recently, a reduced LAL activity was reported in adult subjects with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) suggesting a possible role of LAL in the pathogenesis and progression of the disease. However, whether low LAL activity contributes to liver damage progression, or is itself a consequence of liver failure is still unknown. A better knowledge of the role of LAL may provide new insights in the pathogenesis and progression of NAFLD.

Key words: *Lysosomal Acid Lipase, Wolman disease, Cholesterol ester storage disease, Dyslipidemia, Non-alcoholic fatty liver disease.*

Indirizzo per la corrispondenza

Francesco Angelico
Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie
Infettive
Sapienza Università di Roma
I Clinica Medica, Policlinico Umberto I
Viale del Policlinico, 155 - 00161 Roma
E-mail: francesco.angelico@uniroma1.it

I difetti di attività della Lipasi Acida Lisosomiale (LAL)

Il difetto di LAL è una rara malattia genetica autosomica-recessiva causata da mutazioni a carico del gene della lipasi acida lisosomiale (gene LIPA): essa si caratte-

rizza per la presenza di accumulo di esteri del colesterolo e trigliceridi in numerosi tessuti (1). La mutazione più comune è la variante E8SJM, che nell'unico studio condotto nella popolazione generale, presenta una frequenza allelica combinata stimata di 0,00025 nella popolazione tedesca, ovvero 1 portatore ogni 200 individui (2). Il difetto di LAL è alla base di un disordine eterogeneo che si può presentare con due fenotipi differenti: la malattia di Wolman e la malattia da accumulo degli esteri di colesterolo (CESD) (3, 5) (Figura 1).

La malattia di Wolman esordisce precocemente durante il sesto o settimo mese di vita e porta rapidamente a morte, tanto che solo raramente i piccoli pazienti riescono a sopravvivere oltre il primo anno di età. I neonati con difetto di LAL mostrano una crescita ritardata, associata a segni di malassorbimento, epatosplenomegalia, severa disfunzione epatica, anemia rapidamente progressiva ed insufficienza multi-organo; le calcificazioni surrenaliche sono il segno patognomonico della malattia di

Wolman. In questi pazienti, l'attività della LAL è quasi nulla.

La CESD è la forma clinica che insorge più tardivamente, potendosi manifestare durante l'infanzia, l'adolescenza o in età adulta, con un'età, alla presentazione clinica della malattia, che può variare da 5 a 44 anni o anche più. Si presenta con steatosi epatica, elevati livelli di aminotransferasi, epatomegalia e dislipidemia. Quest'ultima, caratterizzata da elevati livelli di colesterolo LDL e da bassi valori di colesterolo HDL, con o senza rialzo dei trigliceridi, è di comune riscontro, e spesso i pazienti già alla diagnosi, presentano un'aterosclerosi clinicamente evidente. Poiché le manifestazioni cliniche della CESD sono poco caratteristiche, la diagnosi è spesso occasionale (6). Il fenotipo clinico e la severità della malattia, sono molto variabili e dipendono dall'attività enzimatica residua che di solito è inferiore al 12%.

La relazione tra il deficit di LAL e le corrispettive alterazioni istologiche è stata, finora, studiata solo in soggetti con dia-

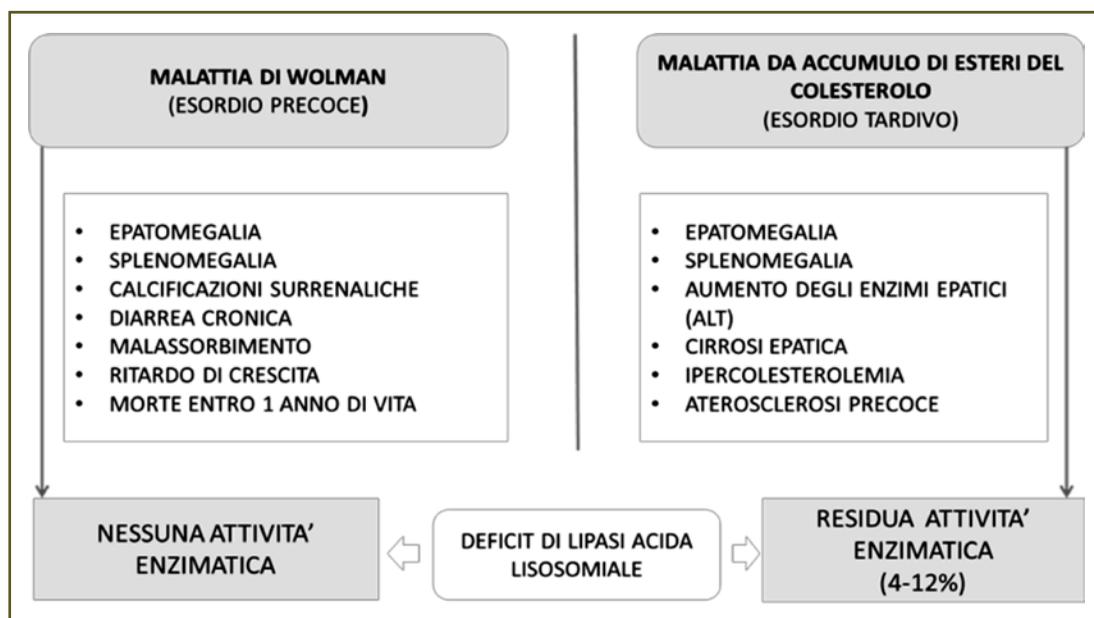


Figura 1 - Fenotipi di deficit genetici di lipasi acida lisosomiale.

gnosi di CESD o di malattia di Wolman. I campioni istologici, fissati in paraffina, si caratterizzano principalmente per una diffusa e omogenea steatosi prevalentemente microvescicolare (6). Carattere distintivo di CESD è il reperto di cristalli di esteri di colesterolo, visibili con luce polarizzata in campioni congelati. La presenza di catepsina D luminale e di markers di membrana lisosomiale (quali le proteine LAMP 1 e LAMP 2 associate alla membrana lisosomiale e la proteina integrale di membrana lisosomiale di tipo 2 intorno ai vacuoli lipidici), conferma l'accumulo lipidico intraliosomiale (7). Un altro reperto istologico comune nella CESD è la presenza di macrofagi con accumulo intracellulare di sostanza ceroidale. La presenza di quest'ultimo reperto nei lisosomi dei macrofagi, ma non in quelli degli epatociti, conferma la diagnosi di CESD.

La LAL è un enzima chiave per il metabolismo intracellulare dei lipidi; essa è responsabile dell'idrolisi intra-lisosomiale degli esteri di colesterolo e dei trigliceridi a colesterolo libero ed acidi grassi (8). Di conseguenza, la riduzione dell'attività enzimatica determina un accumulo intra-lisosomiale di lipidi e, quindi, una riduzione di colesterolo libero nel citosol (9). Questa situazione può incrementare l'attività del fattore di trascrizione SREBPs (sterol regulatory element binding protein), che ha il compito di promuovere la lipogenesi e la sintesi del colesterolo e delle VLDL. Contemporaneamente, si verifica anche una riduzione dell'espressione dei recettori X epatici (LXR), determinando così una riduzione dell'efflusso di colesterolo e della produzione di HDL (Figura 2).

Le alterazioni dei lipidi plasmatici sono state inizialmente descritte nei pazienti con alterazioni del gene LIPA in omozigosi. Le più evidenti modifiche del profilo lipoproteico consistono nella presenza

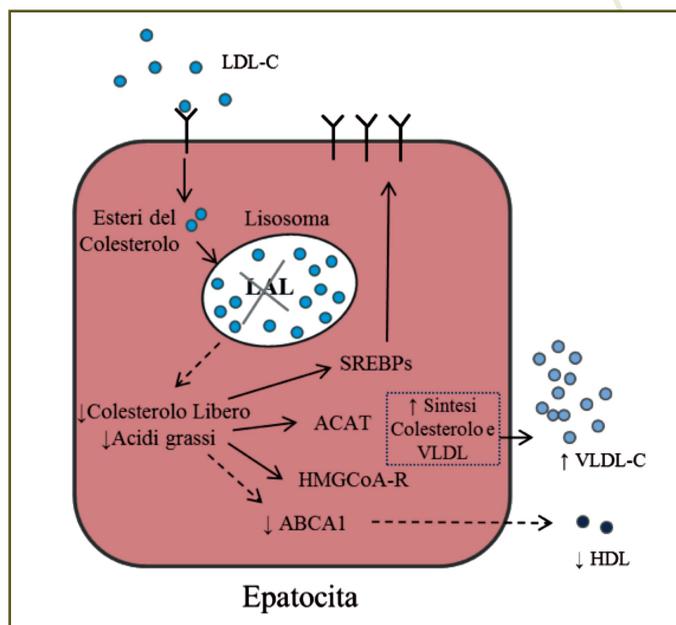


Figura 2 - Metabolismo lipidico intracellulare nel deficit di LAL. In presenza di deficit di attività della LAL, si verifica un accumulo di esteri di colesterolo all'interno dei lisosomi, con conseguente diminuzione del colesterolo libero citosolico. Ciò stimola l'attività della HMGCoA-R (con conseguente sintesi di colesterolo) e l'aumento dell'espressione dei recettori LDL e dell'attività dell'ACAT (con conseguente aumento della produzione di VLDL-C). Si ha inoltre una riduzione della sintesi di ABCA1 con diminuita produzione di HDL nascenti.

di una dislipidemia di tipo IIa o di tipo IIb associata a riduzione dei valori del colesterolo HDL. In questi pazienti, la dislipidemia si associa ad un accelerato processo di aterosclerosi. Pertanto, in presenza di una dislipidemia di tipo IIa, è molto importante ma non sempre facile, porre la diagnosi differenziale con l'ipercolesterolemia familiare eterozigote. Una storia familiare positiva per malattie cardiovascolari precoci e/o per ipercolesterolemia familiare; al contrario, in assenza di criteri diagnostici per l'ipercolesterolemia familiare, si potrebbe sospettare un difetto di LAL (Tabella 1).

Le alterazioni dei lipidi sierici sono state descritte anche nei pazienti eterozigi-

Tabella I - Diagnosi differenziale tra deficit di LAL e altre condizioni cliniche.

	Deficit di LAL*	Malattia di Wilson	NAFLD/NASH**	Sindrome metabolica	FCH***	HeFH#
LDL-c	↑				↑	↑
HDL-c	↓			↓	↓	
ALT	↑	↑	↑			
Altro	Steatosi epatica (microvescicolare o mista)	Interessamento del sistema nervoso centrale ↑ Rame nel fegato ↓ Ceruloplasmina	Steatosi epatica	↑ BMI§ ↑ Glicemia ↑ Trigliceridi ↓ HDL-C ↑ Pressione arteriosa	Fenotipo variabile nel tempo	Mutazione genetica confermata

*LAL: Lipasi acida lisosomiale

**NAFLD/NASH: Steatosi epatica non alcolica/steatoepatite non alcolica

***FCH: Iperlipidemia familiare combinata

#HeFH: Ipercolesterolemia familiare eterozigote

§BMI: Indice di Massa Corporea

goti per la mutazione del gene LIPA. Una recente pubblicazione in pazienti con differenti mutazioni ha confermato un incremento del colesterolo LDL e una riduzione del colesterolo HDL (6); In alcuni pazienti inoltre veniva documentato un processo di aterosclerosi precoce.

È stato ipotizzato che variazioni di attività della LAL possano contribuire all'aterosclerosi. È noto infatti che l'eccesso di esteri di colesterolo assunti dai macrofagi a seguito di processi di ossidazione lipidica può produrre un accumulo di colesterolo libero all'interno dei lisosomi con conseguente inibizione della LAL e deposito citoplasmatico di esteri di colesterolo (10, 11). Recentemente, in uno studio condotto in Messico, è stata descritta l'associazione di due polimorfismi del gene LIPA con suscettibilità per malattia coronarica precoce (12).

Una riduzione di attività della LAL dovrebbe essere sospettata sempre nei soggetti non obesi, con una diagnosi di NAFLD e/o cirrosi criptogenetica, inspiegabili livelli persistentemente elevati di transaminasi e/o con alti livelli di colesterolo LDL e basso colesterolo HDL. È importante, inoltre, che venga effettuata un'accurata anamnesi

per escludere potenziali fattori che contribuiscono alla steatosi, come infezioni virali, abuso alcolico e la presenza di ipercolesterolemia familiare (7).

In questi soggetti, è possibile misurare l'attività della LAL usando il dried blood spot (DBS) test, un test semplice e poco costoso che determina l'attività enzimatica su spot ematico, sottraendo all'attività della lipasi totale quella ottenuta dopo l'aggiunta di uno specifico inibitore della LAL (Lalistat 2) (13). Tutti i pazienti con una marcata riduzione dell'attività della LAL ($\leq 0,4$ nmol/spot/h) al test DBS andrebbero studiati per la ricerca delle mutazioni del gene LIPA.

La steatosi epatica non alcolica

Con il termine di steatosi epatica non alcolica (NAFLD) si indica un insieme di patologie accomunate dalla presenza di accumulo eccessivo di grasso epatico, in assenza di infezione virale cronica e abuso di alcool. La NAFLD è la più comune patologia epatica. Si stima che la prevalenza nella popolazione generale sia circa il 20-30%, giungendo sino a valori del 70-90%

nella popolazione obesa o diabetica (14).

La NAFLD, nelle fasi iniziali, si presenta con un quadro di steatosi semplice, il cui principale reperto istologico è la presenza di steatosi prevalentemente macrovescicolare in almeno il 5% degli epatociti; in alcuni casi, la steatosi semplice evolve in steato-epatite non alcolica (NASH), nella quale al quadro istologico di steatosi, si aggiungono segni di degenerazione palloniforme degli epatociti e di infiammazione con progressivo aumento della fibrosi. In passato, la NAFLD era considerata una condizione benigna; tuttavia, recenti evidenze suggeriscono una prognosi meno favorevole, a causa della possibile evoluzione in cirrosi, epatocarcinoma ed insufficienza epatica (15). Oggi, la NAFLD è ritenuta la principale causa di cirrosi criptogenetica, la cui prevalenza sta crescendo negli ultimi anni, soprattutto in pazienti con storia di obesità e di diabete di tipo II. La NAFLD è la terza indicazione per il trapianto di fegato negli USA e si prevede che nei prossimi anni supererà per frequenza l'epatite da virus C e l'epatite alcolica, diventando la prima causa di trapianto di fegato (16).

Alla NAFLD concorrono numerosi fattori patogenetici che favoriscono l'accumulo di lipidi negli epatociti e, in una quota di pazienti, lo sviluppo di processi fibrotici (17, 18). Tra di essi, l'insulino-resistenza, lo stress ossidativo e l'infiammazione di basso grado sostenuta dalla produzione di citochine derivanti dal grasso viscerale. Tuttavia, i meccanismi patogenetici alla base della progressione della steatosi semplice verso la NASH e la cirrosi non sono ancora del tutto chiariti, né si hanno a disposizione strumenti per poter predire l'evoluzione della NAFLD.

Studi prospettici suggeriscono che la prima causa di morte nei pazienti con diagnosi di NAFLD sia rappresentata dalle patologie cardiovascolari (19). L'ateroscle-

rosi è molto frequente in questi soggetti e molti di loro, prima ancora del sopraggiungere delle complicanze epatiche, sviluppano in particolare la malattia coronarica (20). La relazione tra NAFLD e rischio cardiovascolare è stata a lungo indagata (21, 22); tra i vari meccanismi patogenetici proposti, è stato suggerito che la NAFLD, soprattutto nella sua fase più avanzata, possa essere di per sé uno stimolo per il rilascio di fattori pro-aterogeni responsabili dell'insorgenza di malattie cardiovascolari (23).

Un'altra possibile spiegazione dell'elevato rischio cardiovascolare di questi pazienti, potrebbe essere la frequente associazione esistente tra la steatosi e molte condizioni pro-aterogene. Tra i markers strumentali di aterosclerosi presenti nei pazienti con NAFLD, spiccano l'aumentato spessore medio-intimale carotideo e la disfunzione endoteliale (24).

Altro elemento da considerare è la frequente associazione della steatosi semplice, e in particolare della NASH, con disordini metabolici, quali la dislipidemia, il diabete di tipo II e l'obesità centrale (25, 27). L'accumulo di grasso a livello epatico sembra essere la principale conseguenza di una condizione di insulino-resistenza strettamente correlata alla sindrome metabolica, condizione altamente pro-aterogena, che coinvolge circa il 20% della popolazione non diabetica (28).

Secondo la più tradizionale "two hit hypothesis", ovvero la "teoria dei due insulti", la steatosi semplice e la NASH vengono considerate come un *continuum* nosologico ed istologico, con progressivo aumento della gravità della fibrosi epatica. In particolare, secondo questa teoria, il "primo insulto" sarebbe rappresentato dalla condizione di insulino-resistenza, responsabile dell'accumulo di lipidi a livello epatico, mentre il "secondo insulto", da cui deriverebbe il passaggio da NAFLD a

NASH, dipenderebbe dallo stress ossidativo (29). Più recentemente, è stata proposta un'interpretazione patogenetica più complessa (*"multiple parallel hits hypothesis"*), secondo la quale molti insulti, tra i quali principalmente l'insulino-resistenza, la presenza di varianti geniche, lo stress ossidativo e l'alterazione del microbiota intestinale, agiscono contemporaneamente sul fegato, determinando infiltrazione lipidica e infiammazione (Figura 3) (30).

Resta ancora da chiarire se sia la sindrome metabolica a promuovere la steatosi mediante l'insulino-resistenza, o se sia la NAFLD ad indurre iperinsulinemia tramite un difettoso meccanismo di degradazione dell'insulina. L'opinione corrente suggerisce un legame bidirezionale tra la NAFLD e la sindrome metabolica (22).

Tuttavia, non tutti i casi di NAFLD sono caratterizzati da insulino-resistenza; infatti, non tutti i soggetti con sindrome metabolica sviluppano la NAFLD, così come non tutti i soggetti con NAFLD svilupperanno la sindrome metabolica.

Stato attuale della ricerca sul ruolo della LAL nella NAFLD

Pochi studi hanno valutato finora l'attività della LAL in campioni rappresentativi di soggetti sani o di pazienti con la NAFLD; pertanto, la prevalenza delle mutazioni del gene LIPA nei soggetti con la NAFLD è sconosciuta. Il nostro gruppo ha, recentemente, dimostrato per la prima volta una ridotta attività della LAL nei pazienti con la NAFLD (31). L'attività della

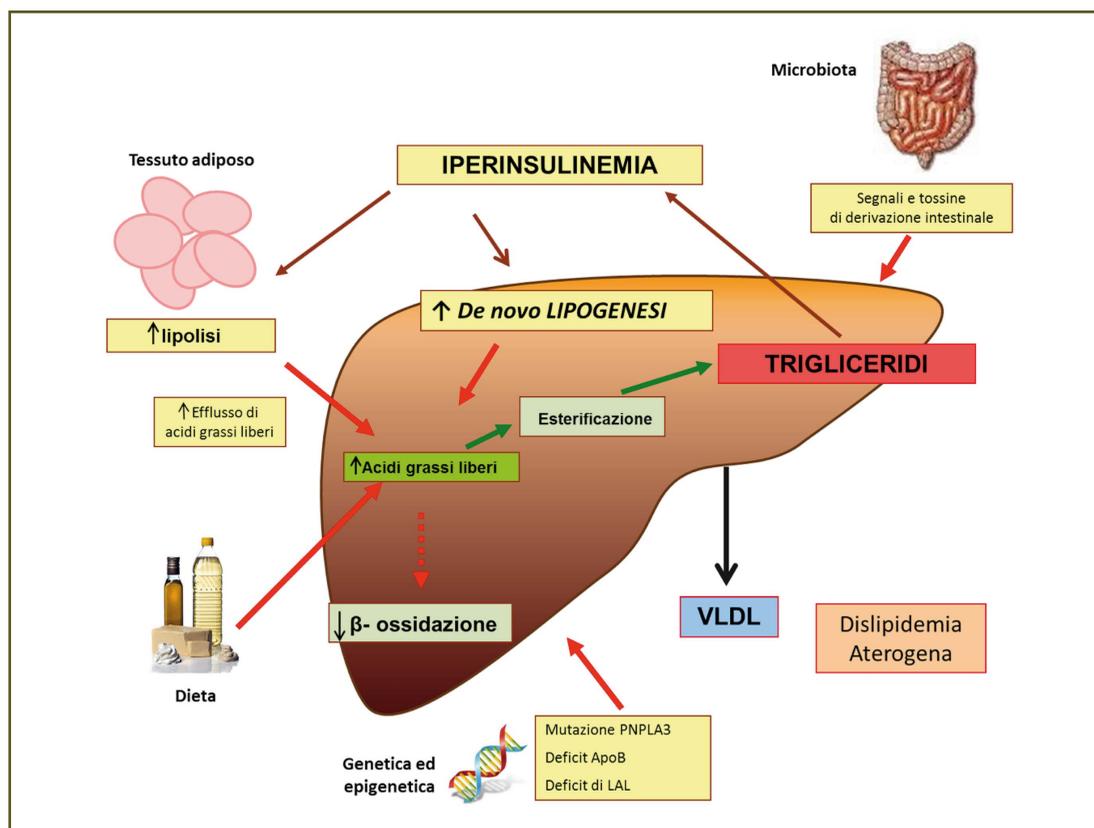


Figura 3 - Principali meccanismi fisiopatologici nella NAFLD.

LAL risultava significativamente ridotta in 240 pazienti con la NAFLD rispetto a quella di 100 soggetti sani [0,78 (0,61-1,01) vs 1,15 (0,94-1,72) nmol/spot/h, $p < 0,001$]. Una riduzione ancor più marcata si osservava nei pazienti con la NASH diagnosticata istologicamente [0,67 (0,51-0,77) nmol/spot/h, $p < 0,001$ vs soggetti sani; $p < 0,001$, tra i gruppi]. Inoltre, i pazienti con NAFLD che presentavano l'attività enzimatica al di sotto della mediana avevano valori più elevati di colesterolo totale sierico ($p < 0,05$) e colesterolo LDL ($p < 0,05$), e più alti livelli di transaminasi e gamma-GT (ALT, $p < 0,001$; AST, $p < 0,01$; GGT, $p < 0,01$) (Figura 4).

Pertanto, la riduzione di attività della LAL, anche in assenza di malattie genetiche, sembra associarsi allo sviluppo di dislipidemia e soprattutto di steatosi epatica con andamento progressivo. Inoltre, sulla base delle nostre osservazioni, è possibile ipotizzare che la riduzione dell'attività della LAL, oltre che un fattore predisponente per lo sviluppo della NAFLD, possa essere considerata come un ulteriore meccanismo fisiopatologico per la progressione verso la NASH e la cirrosi criptogenetica. In ogni caso, il riscontro di steatosi epatica e di NASH in soggetti non obesi con associata dislipidemia, dovrebbe indurre ad effettuare la diagnosi differenziale tra difetti genetici di LAL e le altre cause metaboliche di NAFLD, quali la sindrome metabolica, il diabete di tipo II, l'ipertrigliceridemia e l'obesità centrale.

Al momento non ci sono dati certi sulla modulazione dell'attività della LAL in vivo ed in particolare, non sono ancora noti i fattori epigenetici e metabolici in grado di regolarne l'attività nei soggetti che non presentano mutazioni omozigoti del gene LIPA. Non è noto, ad esempio, se un intervento su fattori di rischio cardio-metabolici modificabili, tipicamente associati alla NAFLD, come la sindrome metabolica, il

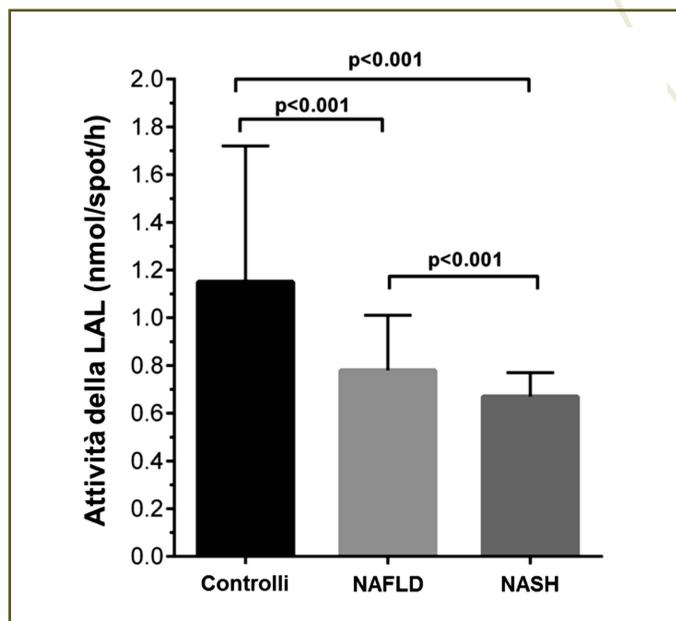


Figura 4 - Attività della LAL in soggetti sani di controllo ed in pazienti con NAFLD o con NASH (da Ref. 31).

sovrappeso, o lo stress ossidativo, possa incidere in modo favorevole sulla modulazione dell'attività di LAL. Infine, rimane ancora da chiarire se l'eventuale miglioramento dell'attività enzimatica possa tradursi in una riduzione del grasso epatico nei pazienti con NAFLD.

Recentemente, Burton e collaboratori (32) hanno dimostrato come, in pazienti con deficit genetico di LAL, il trattamento con terapia enzimatica sostitutiva (Sebelipase-alfa) per 20 settimane sia in grado di ridurre il grasso epatico valutato con la risonanza magnetica. È interessante osservare che, i pazienti trattati mostravano anche un miglioramento degli enzimi epatici e dell'assetto lipidico.

La terapia enzimatica sostitutiva potrà essere impiegata in primo luogo nei pazienti con malattia di Wolman e con CESD nei quali il trattamento risulta essere salvavita. Tuttavia, alla luce dei risultati del recente trial clinico con la Sebelipase-alfa, si può ipotizzare che la modulazione dell'attività della

LAL possa diventare in futuro un possibile nuovo target terapeutico anche in condizioni di meno gravi riduzioni di attività della LAL. Ciò potrebbe riguardare soprattutto i pazienti con forme più avanzate di NAFLD, come quelli con la NASH o la cirrosi criptogenetica per i quali, attualmente, non vi

sono terapie efficaci (33). Infine, la misurazione dell'attività della LAL nei pazienti con NAFLD potrebbe avere importanza, non solo ai fini di un possibile trattamento, ma anche per una migliore identificazione di pazienti con un maggiore rischio di progressione della malattia epatica.

Glossario

ACAT: acilCoA-colesterolo acil transferasi.

ABCA1: ATP-binding cassette transporter A1.

CESD: cholesterol ester storage disease

DBS: dried blood spot.

Gene LIPA: gene per la lipasi acida lisosomiale.

HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol

HMG-CoA-R: hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase.

LAL: lysosomal acid lipase.

LAMP: proteina associata alla membrana lisosomiale.

LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol.

LDLR: low-density lipoprotein receptor.

NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease.

NASH: non-alcoholic steatohepatitis.

PNPLA3: patatin like phospholipase domain containing 3.

SREBPs: sterol regulatory element binding proteins.

VLDL-C: very-low-density lipoprotein cholesterol.

RIASSUNTO

La lipasi acida lisosomiale (LAL) è un enzima coinvolto nel metabolismo intracellulare dei lipidi. Una riduzione di attività della LAL causa un accumulo in eccesso di esteri di colesterolo e di trigliceridi nei lisosomi, come si osserva in due malattie genetiche autosomiche recessive. La malattia di Wolman, caratterizzata da attività enzimatica nulla, presenta un esordio molto precoce con una grave compromissione multi-organo. La malattia da accumulo di esteri di colesterolo (CESD) può manifestarsi durante l'infanzia e l'età adulta con un fenotipo meno grave, caratterizzato dalla presenza di dislipidemia, arteriosclerosi accelerata e steatosi epatica in rapida evoluzione verso la fibrosi e la cirrosi.

La storia naturale della deficienza di attività della LAL è poco definita e la diagnosi è spesso casuale. Il difetto di attività della LAL è stato indicato come una possibile causa non riconosciuta di dislipidemia e di steatosi epatica. Pertanto, l'attività della LAL dovrebbe essere misurata nei soggetti non-obesi che presentano una inspiegabile e persistente elevazione degli enzimi epatici e della colesterolemia. Recentemente, una riduzione di attività della LAL è stata osservata in soggetti adulti con steatosi epatica non-alcolica (NAFLD) suggerendo un possibile ruolo della LAL nella patogenesi e progressione del fegato grasso. Tuttavia, non è ancora chiaro se la bassa attività della LAL è una condizione che favorisce la progressione del danno epatico o piuttosto una conseguenza del danno stesso.

Parole chiave: *Lipasi acida lisosomiale, Malattia di Wolman, Malattia da accumulo di esteri di colesterolo, Dislipidemia, Steatosi epatica non-alcolica.*

Bibliografia

1. Thelwall PE, Smith FE, Leavitt MC, et al. Hepatic cholesteryl ester accumulation in lysosomal acid lipase deficiency: Non-invasive identification and treatment monitoring by magnetic resonance. *J Hepatol.* 2013; 59: 543-549.
2. Muntoni S, Wiebusch H, Jansen-Rust M, et al. Heterozygosity for lysosomal acid lipase E8SJM mutation and serum lipid concentrations. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2013; 23: 732-736.
3. Porto AF. Lysosomal acid lipase deficiency: diagnosis and treatment of Wolman and Cholesteryl Ester Storage Diseases. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2014; 12: (Suppl. 1): 125-132.
4. Pisciotta L, Fresa R, Bellocchio A, et al. Cholesteryl ester storage disease (CESD) due to novel mutations in the LIPA gene. *Mol Genet Metab.* 2009; 97: 143-148.
5. Bernstein DL, Hulkova H, Bialer MG, et al. Cholesteryl ester storage disease: Review of the findings in 135 reported patients with an underdiag-

- nosed disease. *J Hepatol.* 2013; 58: 1230-1243.
6. Reiner Z, Guardamagna O, Nair D et al. Lysosomal acid lipase deficiency-an under-recognized cause of dyslipidaemia and liver dysfunction. *Atherosclerosis.* 2014; 235: 21-30.
 7. Hulkova H, Elleder M. Distinctive histopathological features that support a diagnosis of cholesterol ester storage disease in liver biopsy specimens. *Histopathology.* 2012; 60: 1107-1113.
 8. Fasano T, Pisciotta L, Bocchi L, et al. Lysosomal lipase deficiency: molecular characterization of eleven patients with Wolman or cholesteryl ester storage disease. *Mol Genet Metab.* 2012; 105: 450-456.
 9. Dubland JA, Francis GA. Lysosomal acid lipase: At the crossroads of normal and atherogenic cholesterol metabolism. *Front Cell Dev Biol.* 2015; 3: 1-11.
 10. Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004; 84: 1381-1478.
 11. Hakala JK, Oksjoki R, Laine P, et al. Lysosomal enzymes are released from cultured human macrophages, hydrolyze LDL in vitro, and are present extracellularly in human atherosclerotic lesions. *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 1430-1436.
 12. Vargas-Alarcón G, Posadas-Romero C, Villarreal-Molina T et al. Single Nucleotide Polymorphisms within LIPA (Lysosomal Acid Lipase A) gene are associated with susceptibility to premature coronary artery disease. Replication in the Genetic of Atherosclerotic Disease (GEA) Mexican Study. *PLoS One.* 2013; 17: 8: e74703.
 13. Hamilton J, Jones I, Srivastava R, Galloway P. A new method for the measurement of lysosomal acid lipase in dried blood spots using the inhibitor lalistat 2. *Clin Chim Acta.* 2012; 413: 1207-1210.
 14. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: The epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011; 34: 274-285.
 15. Kawano Y, Cohen DE. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol.* 2013; 48: 434-441.
 16. Kemmer N, Neff GW, Franco E, et al. Non-alcoholic fatty liver disease epidemic and its implications for liver transplantation. *Transplantation.* 2013; 96: 860-862.
 17. Takaki A, Kawai D, Yamamoto K. Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Int J Mol Sci.* 2013; 14: 20704-20728.
 18. Pastori D, Baratta F, Carnevale R, et al. Similar reduction of cholesterol-adjusted vitamin E serum levels in simple steatosis and non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Transl Gastroenterol.* 2015; 6: e113.
 19. Soderberg C, Stal P, Askling J, et al. Decreased survival of subjects with elevated liver function tests during a 28-year follow-up. *Hepatology* 2010; 51: 595-602.
 20. Ballestri S, Lonardo A, Bonapace S, et al. Risk of cardiovascular, cardiac and arrhythmic complications in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology.* 2014; 20: 1724-1745.
 21. Bhatia LS, Curzen NP, Calder PC, Byrne CD. Non-alcoholic fatty liver disease: A new and important cardiovascular risk factor? *Eur Heart Journal.* 2012; 33: 1190-1200.
 22. Del Ben M, Baratta F, Polimeni L, Angelico F. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease: Epidemiological, clinical and pathophysiological evidences. *Int Emerg Med.* 2012; 7: (Suppl. 3), 291-296.
 23. Sookoian S, Castano GO, Burgueno AL, et al. Circulating levels and hepatic expression of molecular mediators of atherosclerosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis.* 2010; 209: 585-591.
 24. Pastori D, Loffredo L, Perri L, et al. Relation of nonalcoholic fatty liver disease and Framingham risk score to flow-mediated dilation in patients with cardiometabolic risk factors. *Am J Cardiol.* 2015; 115: 1402-1406.
 25. Targher G, Bertolini L, Padovani R, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2007; 30: 1212-1218.
 26. Targher G, Marra F, Marchesini G. Increased risk of cardiovascular disease in non-alcoholic fatty liver disease: Causal effect or epiphenomenon? *Diabetologia.* 2008; 51: 1947-1953.
 27. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, et al. Non-alcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology.* 2003; 37: 917-923.
 28. Angelico F, Del Ben M, Conti R, et al. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and non-alcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90: 1578-1582.
 29. Day CP, James OF. Steatohepatitis: A tale of two "hits"? *Gastroenterology.* 1998; 114: 842-845.
 30. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology.* 2010; 52: 1836-1846.
 31. Baratta F, Pastori D, Del Ben M, et al. Reduced lysosomal acid lipase activity in adult patients with non-alcoholic fatty liver disease. *EBioMedicine.* 2015; 2: 750-754.
 32. Burton BK, Balwani M, Feillet F, et al. A phase 3 trial of Sebelipase Alfa in lysosomal acid lipase deficiency. *N Engl J Med.* 2015; 373: 1010-1020.
 33. Del Ben M, Polimeni L, Baratta F, et al. Modern approach to the clinical management of non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014; 20: 8341-8350.