

## SINDROMUL DISMETABOLIC DE SUPRAÎNCĂRCARE CU FIER ȘI FICATUL GRAS NONALCOOLIC

IOANA GRIGORESCU, DAN LUCIAN DUMITRAȘCU

Departament Medicină Internă, Clinica Medicală II,  
UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca

### Rezumat

*Asocierea valorilor crescute ale sideremiei cu diverse entități nozologice de tipul ficatului gras nonalcoolic (FGNA), insulinorezistenței, diabetului zaharat, sindromului metabolic și afecțiunilor cardiovasculare creează așa-numitul sindrom dismetabolic de supraîncărcare cu fier (SDSF).*

*Mecanismul molecular nu este cunoscut exact, dar o patogeneză posibilă poate implica o dereglare în stresul oxidativ și o lezare a structurii ADN, în transportul celular al fierului (hepcidină) și în eliberarea deficitară a adipokinelor. Organele țintă în SDSF și tulburările induse sunt: pancreasul (rezistență la insulină, diabet zaharat), ficatul (steatoză severă, fibroză progresivă și transformare malignă), cordul (infarct miocardic acut) și arterele (aterogeneză). Localizarea histologică tipică în supraîncărcarea hepatică cu fier este spațiul sinusoidal. Răspunsul terapeutic la restricția dietetică și flebotomie include ameliorarea testelor metabolice și hepatice, scăderea riscului de fibroză progresivă hepatică, hepatocarcinom și mortalitate cardiovasculară.*

**Cuvinte cheie:** ficatul gras nonalcoolic, sindromul dismetabolic de supraîncărcare cu fier, rezistență la insulină, sindrom metabolic.

## DYSMETABOLIC IRON OVERLOAD SYNDROME AND NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE

### Abstract

*The involvement of high values of iron in different diseases, such as nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), insulin resistance, diabetes mellitus, metabolic syndrome and cardiovascular diseases, created the so called dysmetabolic iron overload syndrome (DIOS).*

*The molecular mechanism is not known exactly, but a possible pathogenesis might imply disturbances in oxidative stress and injury of the DNA-structure, in the cellular transport of iron (hepcidin), and in the defective release of adipokines. The target organs in DIOS and the induced disorders are: pancreas (insulin resistance, diabetes mellitus), liver (severe steatosis, progressive fibrosis and malignant transformation), heart (acute myocardial infarction) and arteries (atherogenesis). The typical histological location in hepatic iron overload is the sinusoidal space. Therapeutical response to dietary restriction and phlebotomy include decrease of hepatic and metabolic tests, lower risks of progressive fibrosis in liver and hepatocarcinoma and cardiovascular mortality.*

**Keywords:** nonalcoholic fatty liver disease, dysmetabolic iron overload syndrome, insulin resistance, metabolic syndrome.

Asocierea valorilor crescute ale sideremiei cu diverse entități nozologice de tipul diabetului zaharat (DZ) tip II, afecțiunilor cardiovasculare, ficatului gras nonalcoolic (FGNA) și insulinorezistenței (IR) - din cadrul sindromului metabolic (SM) și ovarelor polichistice - se decelează tot mai frecvent în ultimii ani. Se conturează astfel *sindromul*

*dismetabolic de supraîncărcare cu fier* (SDSF), acesta presupunând prezența: a două sau mai multe componente ale SM, steatoza, saturația transferinei în limite normale și supraîncărcarea moderată hepatică cu fier (afectarea predominant sinusoidală) [1].

Prima mențiune a SDSF, sub denumirea de “sindrom de supraîncărcare hepatică cu fier asociată insulino-rezistenței” datează din 1999 [2], ulterior decelându-se prezența SDSF la mai mult de 1/3 din pacienții cu FGNA [3].

Din punct de vedere clinico-biologic, există multe suprapuneri între SDSF și hiperferitinemia “metabolică” din FGNA și SM (Fig. 1): ficatul gras, elemente ale SM și hiperferitinemie cu saturația transferinei normală sau ușor crescută; datorită acestor similitudini cele două entități sunt privite de către unii autori [4] ca reprezentând două fațete ale aceleiași probleme.

**Mecanismele moleculare din SDSF** nu se cunosc cu exactitate. În SDSF se întâlnesc dezechilibre ale mecanismelor de reglare ale diverselor molecule implicate în transportul fierului la nivel celular (*ceruloplasmina*, *hepcidina*) și în sindromul inflamator (*feroportina-1*).

S-au emis diverse ipoteze privind cauzele acumulării fierului în organism în steatohepatita nonalcoolică (SHNA), cuprinzând: nivele scăzute de *ceruloplasmină* [5], dereglări în stresul oxidativ [6] și în metabolismul cuprului - nivele scăzute de cupru [7], creșterea IR și a citokinelor (CK) la copii [8], sindromul inflamator subclinic cu necroză hepatocelulară și eliberarea feritinei de către leucocitele activate, eritrofagocitoza celulelor Kupffer [9].

*Hepcidina* este privită ca și hormonul reglator al

homeostaziei fierului. Corelația directă dintre hepcidină, feritină (la pacienții cu SM), LDL-colesterol, IR și indirectă cu HDL-colesterolul (în FGNA), alături de lipsa unei asocieri cu gradul de încărcare hepatică cu fier, sunt sugestive pentru legătura existentă între inflamație și metabolismul lipic și glucidic din FGNA [10].

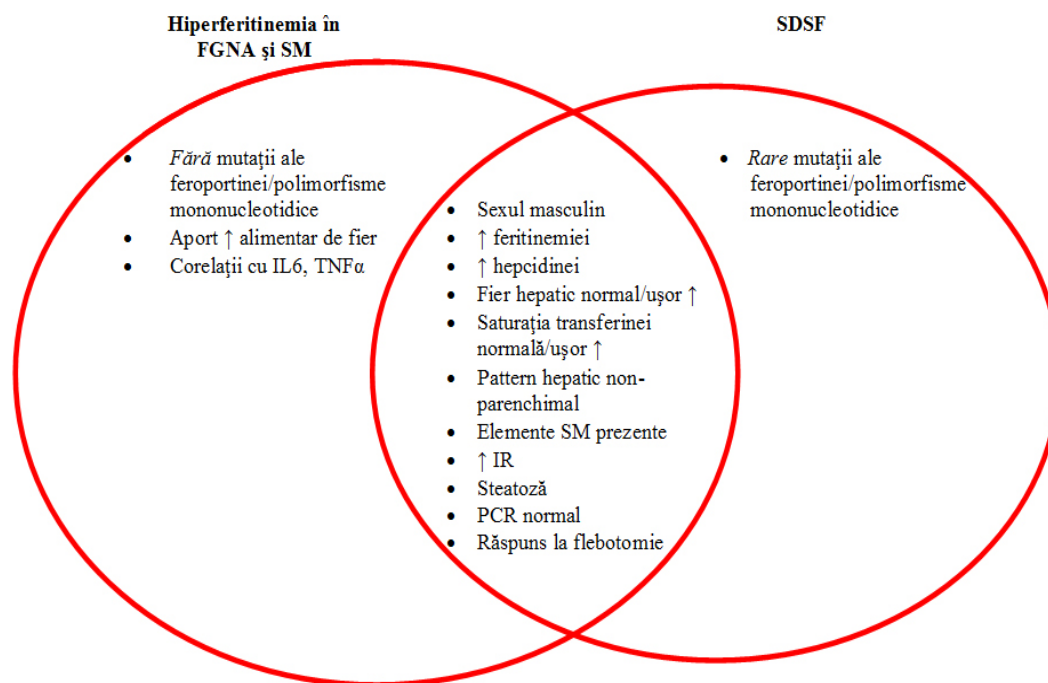
În steatohepatita alcoolică (SHA) există două mecanisme care cresc supraîncărcarea hepatică cu fier: creșterea absorbției intestinale de fier (prin scăderea hepcidinei) și creșterea preluării fierului în hepatocite (prin creșterea receptorului transferinei-1 (TfR-1) [11].

În evoluția FGNA de la steatoză la fibroză, se pot distinge două etape: IR și stresul oxidativ [12].

### Genetica

Numeroase studii asupra posibilei implicări a mutațiilor genei *HFE* din hemocromatoza ereditară au avut rezultate contradictorii [13]. SDSF se definește clasic în absența mutațiilor genei pentru hemocromatoză, existând 3 elemente ce-l diferențiază de hemocromatoza ereditară: supraîncărcarea cu fier inomogenă în spațiul periportal, distribuția intralobulară a fierului sinusoidal și dezvoltarea fibrozei la un nivel mult mai scăzut de fier intrahepatic (vs. hemocromatoză) [14]. Heterozigoții pentru mutația C282YHFE (cu rol în încărcarea ușoară cu fier) sunt mai susceptibili în dezvoltarea FGNA [3]. Prezența mutațiilor HFE nu se asociază cu afectarea cardiovasculară.

Prevalența crescută a mutațiilor  $\alpha$ 1-antitripsinei (*AAT*) în FGNA a condus la ipoteza modulării metabolismului fierului prin inducerea stresului la nivelul reticulului endoplasmic [15,16].



**Fig. 1.** Suprapuneri între SDSF și hiperferitinemia din FGNA și SM (modificat după Dongiovanni [4]).

Deoarece variabilitatea fenotipică nu putea fi explicată în totalitate prin mutațiile HFE și AAT, s-au efectuat studii asupra  $\beta$ -globinei cu scopul de a obține o predictibilitate mai bună în SDSF și progresia fibrozei [17]. Rezultatele au relevat prezența mutațiilor HFE și  $\beta$ -globinei ca un posibil marker al riscului crescut de lezare hepatică [17].

Analizând genele asociate metabolismului fierului, s-au observat corelații între supraexprimarea receptorului pentru transferina-2 (*TfR-2*) - creșterea fierului intrahepatic (SHNA), proteinei de legare celulară retinoidă (CRBP1) - hemojuvelinei (HJV), alcooldehidrogenazei 1 (ADH1), TfR2 și a citocromului P450 26A1 - feroportina (FNP) [18].

### Relația IR - SDSF

Mecanismele moleculare care stau la baza acestei asocieri nu se cunosc.

Rolul fierului în patogeneza IR poate fi argumentat clinic prin alterarea secreției insulinei după acumularea fierului în celulele  $\beta$  pancreatice [19] și protecția față de DZ prin dietă restrictivă în fier/chelatori de fier [20]. Deficitul secretor relativ al insulinei este încă insuficient în a explica toate tulburările metabolice din SDSF.

Supraîncărcarea alimentară cu fier determină IR la șoareci, mecanismul posibil fiind acumularea fierului în grăsimea periviscerală și eliberarea defectuoasă a adipokinelor [21]. Alte studii experimentale au relevat apariția IR la tratarea izolată a adipokinelor. Confirmarea *in vivo* a acestor tulburări metabolice a evidențiat că acestea produc IR, cresc riscul de steatoză și DZ tip II [22], unii autori [22,23] emițând ipoteza inducerii IR de către supraîncărcarea cu fier prin intermediul speciilor de radicali liberi de oxigen.

Un studiu experimental italian pe șoareci [21] a arătat că aportul crescut de fier alimentar produce IR prin acumularea fierului în țesutul adipos perivisceral și implicit dereglarea eliberării de adipokine.

### Legătura fier - țesut adipos

Se cunoaște faptul că secreția inadecvată de adipokine (AK) din FGNA deține un rol important în evoluția spre SHNA, DZ tip II și boli cardiovasculare.

Printre principalele AK se numără adiponectina, leptina, resistina și visfatina. *Adiponectina* este principalul mediator antisteatozic și antiinflamator. Valori serice scăzute întâlnim în obezitate, DZ tip II, IR și FGNA, iar glitazonele și scăderea ponderală îi cresc concentrația [24]. *Leptina*-rezistența și implicit valori crescute ale leptinei s-au observat în obezitate [25]. Această AK deține un rol important în reglarea greutății (prin inhibarea aportului alimentar) și în progresia SHNA spre fibroză și hepatocarcinom (HCC) [26]. Nivele crescute de hepcidină, posibil asociate cu hiperleptinemia, ar putea reprezenta veriga de legătură între obezitate și SDSF [27], neexistând însă dovezi privind corelația leptină - depozite de fier în

FGNA și SM. *Resistina* se corelează cu stresul oxidativ, administrarea vitaminei C scăzând nivelele sale serice independent de inflamație. *Visfatina* se corelează cu acumularea țesutului adipos perivisceral în IR, fiind reglată pozitiv de către depozitele crescute de fier.

În concluzie, tulburările metabolice, hepatice și cardiovasculare pot fi datorate în SDSF și funcției endocrine anormale a AK și țesutului adipos.

### Implicarea fierului în bolile cardiovasculare din SM și FGNA

Alături de SDSF, afecțiunile aparatului cardiovascular reprezintă o altă entitate cu care se asociază FGNA, fiind și prima cauză de mortalitate la acești pacienți [28]. Unul din markerii de risc cardiovascular constă în depozitele crescute de fier (inclusiv în macrofagele pereților arteriali), acestea din urmă crescând stresul oxidativ; se presupune că hepcidina este responsabilă de aterogeneza indusă de fier [29]. În FGNA, însă, nu există dovezi clare în prezent privind asocierea supraîncărcării cu fier cu riscul crescut al evenimentelor cardiovasculare și SM.

Nivele scăzute de colesterol la cei cu  $\beta$ -talasemie și de LDL-colesterol la cei cu mutații C282Y-HFE implică un risc cardiovascular redus [30,31].

La pacienții fără genotip HFE sau mutații ale  $\beta$ -globinei, asociate cu scăderea hepcidinei, s-a descoperit că feritina și hepcidina serică ar reprezenta factori predictivi ai afectării cardiovasculare în FGNA [32].

### Asocierea supraîncărcarea cu fier - afectarea hepatică

Deși asocierea purtătorilor de fier parenchimal cu un risc crescut de hepatopatie progresivă este controversată, acumularea fierului intrahepatocitar (spre deosebire de extraparenchimal) se asociază cu un risc crescut de fibroză [33]. Pe de altă parte, la un lot de pacienți italieni cu ciroză asociată SHNA, s-a observat o asociere între supraîncărcarea sinusoidală cu fier și HCC [34]; literatura menționează și alte corelații privind mutațiile  $\beta$ -globinei (predictorul optim al supraîncărcării parenchimale cu fier în zona Mediteraneană) - fibroza severă [17] și mutațiile HFE - fibroza asociată SHNA la pacienții caucazieni din SUA [35].

*Mecanismele implicate.* Progresia lezării hepatice din FGNA, independent de IR, s-a dovedit a fi determinată de supraîncărcarea hepatică moderată cu fier, prin mecanismul de creștere a stresului oxidativ și implicit a lezării ADN. Pornind de la această ipoteză s-a demonstrat că 8-oxo-2'-deoxiguanozina (8-oxodG) - un produs genic modificat - se corelează cu SHNA, supraîncărcarea cu fier, IR și severitatea steatozei hepatice [36].

Fibrogeneza poate fi accelerată și în mod direct de către fier, hepatocitele putând fi activate de către speciile de radicali liberi ai oxigenului, iar feritina (acționând ca și CK) și stimularea apoptozei reglează acest proces [37].

Deoarece fibroza este o componentă inconstantă în SDSF, se presupune că anumite predispoziții genetice/condiții dobândite (nutriționale) sunt necesare în progresia de la simpla steatoză spre fibroză [38]. Fierul accelerează procesul de transformare malignă spre HCC prin lezarea ADN dependent de reacțiile oxidative. Lipogeneza hepatică crescută, determinată de încărcarea cu fier, a fost demonstrată recent, susținând rolul fierului în FGNA [39]. Creșterea feritinei serice peste de 1.5 ori valorile superioare ale normalului se asociază semnificativ cu: sexul masculin, creșterea transaminazelor, sideremiei, saturației transferinei, depozitelor de fier, trombocitopenia, trăsăturile histologice severe și un scor mare de activitate FGNA [40]. Comparând loturi de pacienți japonezi cu steatoză - SHNA, s-a observat concentrația crescută a feritinei în SHNA, independent de mutațiile HFE [41]. De asemenea, comparând pacienți cu hiperferitinemie în SHNA și hepatite cronice virale s-au observat valori crescute ale sideremiei și saturației transferinei la cei cu hepatite cronice virale vs. SHNA [12]. Au existat controverse și privind rolul încărcării hepatice cu fier în fibrogeneză la pacienții cu SHNA [42], în final demonstrându-se o puternică asociere între cele două [43].

### Tratamentul depletiv al fierului

Studii experimentale pe șobolani au arătat creșterea sensibilității la insulină în țesuturile periferice în caz de anemie feriprivă [44] și scăderea aterogenezei [29]. Deficitul moderat de fier poate avea impact pozitiv pe IR.

Sensibilitatea la insulină a fost îmbunătățită în timp scurt și la pacienții cu SDSF și FGNA (cu/fără nivele crescute de feritină) prin tratamentul depletiv [45].

*Flebotomia* determină: scăderea HbA1c, 8-oxodG, transaminazelor [36]; creșterea sensibilității la insulină, nivelului de feritină, stabilizează greutatea [46] și încetinește progresia bolilor cardiovasculare. Avantajul acestei metode terapeutice este marcat în cazul pacienților cu hiperferitinemie (>320 ng/ml) [47]. *Donarea regulată de sânge* s-a asociat cu scăderea riscului infarctului miocardic acut și creșterea sensibilității la insulină [5]. Parametrii metabolici, testele funcționale hepatice și feritina au fost ameliorate prin *veneseție, dietă restrictivă* în fier la pacienții cu SDSF [48]. În cazul pacienților FGNA cu rezistență la tratamentul dietetic s-a observat că IR se reduce semnificativ, dacă modificării stilului de viață i se asociază tratamentul depletiv [47]. Aplicarea tratamentului depletiv are implicații benefice și în prevenția și progresia HCC [49], protecția față de transformarea malignă fiind independentă de progresia fibrozei. Administrarea de *Metformin* în sindromul ovarelor polichistice a determinat scăderea feritinei și creșterea sensibilității la insulină [50]. *Antioxidanții* (vitamina C etc.) blochează activarea celulei stelate hepatice și scade fibrogeneza [51].

Astfel dieta, chelatorii de fier și manipulările genetice pot influența IR, mecanismele exacte însă rămânând neclare [20].

### Concluzii

Asocierea între SDSF - SM - FGNA este privită ca o entitate curabilă și reprezintă un nou factor de risc în bolile hepatice și cardiovasculare. Numeroase procese de tipul progresiei bolilor cardiovasculare și a fibrozei hepatice, transformarea malignă și dezvoltarea DZ tip II sunt augmentate de SDSF. Pacienții cu FGNA cu risc crescut de a dezvolta SHNA și fibroză avansată se pot identifica prin creșterea feritinei serice.

Metodele terapeutice de scădere a sideremiei (mai ales flebotomia) determină reducerea sindromului hepatocitolic, a dezechilibrului metabolic în FGNA și au rol potențial de scădere a riscului cardiovascular.

### Bibliografie

1. Riva A, Trombini P, Mariani R, et al. Reevaluation of clinical and histological criteria for diagnosis of dysmetabolic iron overload syndrome. *World J Gastroenterol* 2008; 14:4745-4752
2. Mendler MH, Turlin B, Moirand R, et al. **Insulin resistance-associated** hepatic iron overload. *Gastroenterology* 1999;117:1155-1163
3. Valenti L, Dongiovanni P, Fracanzani AL et al. Increased susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease in heterozygotes for mutation responsible for hereditary hemochromatosis. *Dig Liver Dis* 2003;35:172-178
4. Dongiovanni P, Fracanzani AL, Fargion S, Valenti L. Iron in fatty liver and in the metabolic syndrome: a promising therapeutic target. *J of Hepatology* 2012;55:920-932
5. Aigner E, Theuri I, Haufe H, et al. **Copper availability** contributes to iron perturbation in human nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2008;135:680-688
6. Sanyal AJ. Mechanisms of disease: pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005;2:46-53
7. Aigner E, strasser M, Haufe H, et al. **A role for low hepatic copper concentrations** in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 2010;105:1978-1985
8. Manco M, Alisi A, Real JM, et al. Early interplay of intrahepatic iron and insulin resistance in children with nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2011. in press [PMID:21168460]
9. Sumida Y, Yoshikawa T, Okanoue T. Role of hepatic iron in non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res* 2009; 39(3):213-222
10. Zimmermann A, Zimmermann T, Schattenberg J, et al. Alterations in lipid, carbohydrate and iron metabolism in patients with nonalcoholic fatty steatohepatitis (NASH) and metabolic syndrome. *Eur J Intern Med*. 2011;22(3):305-310
11. Kohgo Y, Ohtake T, Ikuta K, et al. Dysregulation of systemic iron metabolism in alcoholic liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23 Suppl 1:S78-81
12. Chitturi S, George J. Interaction of iron, insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis. *Curr Gastroenterol Rep* 2003;5(1):18-25
13. Neri S, Pulvirenti D, Signorelli S, et al. The HFE gene heterozygosis H63D: a cofactor for liver damage in patients with steatohepatitis? Epidemiological and clinical considerations. *Intern Med J* 2008;38:254-258
14. Cojocariu C, Trifan A, Stanciu C. Involvement and role of iron in nonalcoholic steatohepatitis. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2008;112(2):308-312
15. Valenti L, Dongiovanni P, Piperno A, et al. Alpha 1-antitrypsin



mutations in NAFLS: high prevalence and association with altered iron metabolism but not with liver damage. *Hepatology* 2006;44:857-864

16. Vecchi C, Montosi G, Zhang K, et al. ER stress controls iron metabolism through induction of hepcidin. *Science* 2009;325:877-880

17. Valenti I, Canavesi E, Galmozzi E, et al. Beta-globin mutations are associated with parenchymal siderosis and fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2012;53:827-933

18. Tsuchiya H, Ashla AA, Hoshikawa Y, et al. **Iron state** in association with retinoid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 2010;40(12):1227-1238

19. Cooksey RC, Jouihan HA, Ajioka Rs, et al. Oxidative stress, beta-cell apoptosis, and decreased insulin secretory capacity in mouse models of hemochromatosis. *Endocrinology* 2004;145:5305-5312

20. Cooksey RC, Jones D, Gabrielsen S, et al. Dietary iron restriction or iron chelation protects from diabetes and loss of beta-cell function in the obese mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;298:E1236-1243

21. Dongiovanni P, Ruscica M, Benedan L, et al. Dietary iron overload induces visceral adipose tissue insulin resistance associated with hyper-resistinemia, and synergizes with obesity and fatty liver in inducing systemic insulin resistance. *J Hepatol* 2012;54:S505

22. Fernandez-Real JM, Lopez-Bermejo A, Ricart W. Cross-talk between iron metabolism and diabetes. *Diabetes* 2002;51: 2348-2354

23. Houstis N, Rosen ED, Lander ES. **Reactive oxygen species** have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 2006;440:944-948

24. Lutchman G, Modi A, Kleiner DE, et al. **The effects** of discontinuing pioglitazone in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007;46:424-429

25. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, et al. **Leptin levels in human** and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1995;1:1155-1161

26. Kitade M, Yoshiji H, Kojima H, et al. **Leptin-mediated** neovascularization in a prerequisite for progression of nonalcoholic steatohepatitis in rats. *Hepatology* 2006;44:983-991

27. del Giudice EM, Santoro N, Amato A, et al. Hepcidin in obese children as a potential mediator of the association between obesity and iron deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:5102-5107

28. Jepsen P, Vilstrup H, Mellekjaer L, et al. **Prognosis** of patients with a diagnosis of fatty liver- a registry-based cohort study. *Hepatogastroenterology* 2003;50:2101-2104

29. Lapenna D, Pierdomenico SD, Ciofani G, et al. association of body iron stores with low leucocyte weight iron and oxidant damage of human atherosclerotic plaques. *Free Radic Biol Med* 2007;42:492-498

30. Adams PC, Pankow JS, Barton JC, et al. HFE C282Y homozygosity is associated with lower total and low density lipoprotein cholesterol: the hemochromatosis and iron overload screening study. *Circ Cardiovasc Genet* 2009;2:34-37

31. Maioli M, Vigna GB, Tonolo G, et al. Plasma lipoprotein composition, apolipoprotein(a) concentration and isoforms in beta-thalassemia. *Atherosclerosis* 1997;131:127-690

32. Valenti L, Swinkels DW, Burdick L, et al. Serum ferritin levels are associated with vascular damage in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011;31:683-690

33. Valenti L, Fracanzani AL, Bugianesi E, et al. HFE genotype, parenchymal iron accumulation, and liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2010;138:905-912

34. Sorrentino P, D'Angelo S, Ferbo U, et al. Liver iron excess in

patients with hepatocellular carcinoma developed on nonalcoholic steato-hepatitis. *J Hepatol* 2009;50:351-357

35. Nelson JE, Bhattacharya R, Lindor KD, et al. HFE C282Y mutations are associated with advanced hepatic fibrosis in Caucasians with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007;46:723-729

36. Fujita N, Miyachi H, Tanaka H, et al. **Iron overload** is associated with hepatic oxidative damage to DNA in nonalcoholic steatohepatitis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18(2):424-432

37. Ruddell RG, Hoang-Le D, Barwood JM, et al. Ferritin functions as a proinflammatory cytokine via iron-independent protein kinase C zeta/nuclear factor kappaB-regulated signaling in rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 2009;49:887-900

38. Jiang R, Manson JE, Meigs JB, et al. **Body iron stores** in relation to risk of type 2 diabetes in apparently healthy women. *JAMA* 2004;291:711-717

39. O'Brien J, Powell LW. Non-alcoholic fatty liver disease: is iron relevant? *Hepatol Int* 2012 [Epub ahead of print]

40. Kowdley KV, Belt P, Wilson LA, et al. Serum ferritin is an independent predictor of histologic severity and advanced fibrosis in patients with nonalcoholic liver fatty disease. *Hepatology* 2012;55:77-85

41. Yoneda M, Nozaki Y, Endo H, et al. Serum ferritin is a clinical biomarker in Japanese patients with nonalcoholic steatohepatitis independent of HFE gene mutation. *Dig Dis Sci* 2010;55(3):808-814

42. Chitturi S, Weltman M, Farrell GC, et al. HFE mutations, hepatic iron and fibrosis: ethnic-specific association of NASH with C282Y but not with fibrotic severity. *Hepatology* 2002;36(1):142-149

43. George DK, Goldwurm S, MacDonald GA, et al. Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology* 1998;114:311-318

44. Borel MJ, Beard JL, Farrell PA, et al. Hepatic glucose production and insulin sensitivity and responsiveness in iron-deficient anemic rats. *Am J Physiol* 1993;264:E380-390

45. Facchini FS, Hua NW, Stoohs RA, et al. Effect of iron depletion in carbohydrate-intolerant patients with clinical evidence of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002;122:931-939

46. Fernandez-Real JM, Penarroja G, Castro A, et al. Blood letting in high-ferritin type 2 diabetes: effects on insulin sensitivity and beta-cell function. *Diabetes* 2002;51:1000-1004

47. Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, et al. Iron depletion by phlebotomy improves insulin resistance in patients with NAFLD and hyperferritinemia: evidence from a case-control study. *Am J Gastroenterol* 2007;102:1251-1258

48. Fujita N, Takei Y. Iron overload in nonalcoholic steatohepatitis. *Adv Clin Chem* 2011;55:105-132

49. Zacharski LR, Chow BK, Howes PS, et al. Decreased cancer risk after iron reduction in patients with peripheral arterial disease: results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:996-1002

50. Luque-Ramirez M, Alvarez-Blasco F, Botella-Carretero JJ, et al. Increased body iron stores of obese women with polycystic ovary syndrome are a consequence of insulin resistance and hyperinsulinism and are not a result of reduced menstrual losses. *Diabetes Care* 2007;30:2309-2313

51. Lee KS, Buck M, Houghum K, et al. Activation of hepatic stellate cells by TGF- $\alpha$  and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J Clin Invest* 1995;96:2461-2468