

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

*TESI DI DOTTORATO:*  
MORFOLOGIA CLINICA E PATOLOGICA  
*XXI CICLO (2005-2008)*

*Coordinatrice:*  
Prof.a Stefania Montagnani

*DIPARTIMENTO:*  
*SCIENZE BIOMORFOLOGICHE E FUNZIONALI*

Direttore: Prof. Marco Salvatore

## TESI

Eccesso di ferro lobulare epatico in  
pazienti con epatocarcinoma su cirrosi  
correlata a steatoepatite-non alcolica.

Dottorando:

Dr. Paolo Sorrentino

Relatrice:

Prof.a Raffaella Vecchione

## Sommario

Introduzione: La presenza di ferro lobulare epatico è frequente in pazienti con steatoepatite non alcolica (NASH), ma il suo ruolo non è ben definito. L'obiettivo della ricerca è stato quello di indagare l'associazione dell'eccesso di ferro lobulare sulla prevalenza di epatocarcinoma (HCC) in pazienti con cirrosi correlata a NASH.

Metodi: Il ferro lobulare epatico è stato valutato retrospettivamente con metodo semiquantitativo in biopsie di fegato di 153 pazienti con cirrosi correlata a NASH: 51 pazienti erano affetti da HCC e 102 erano i controlli corrispondenti per età, sesso e stadio di malattia epatica, senza HCC. Il punteggio totale del ferro (0-60) costituiva la somma di tre tipi di valutazione: il ferro epatocitario (0-36), il ferro sinusoidale (0-12) ed il ferro di portale (0-12). Il punteggio corretto del ferro totale era ottenuto dalla somma di queste 3 valutazioni, e dalla moltiplicazione del risultato per 3/3, 2/3 o 1/3 a seconda della distribuzione rispettivamente più o meno omogenea del metallo nei noduli della cirrosi.

Risultati: All'analisi di regressione logistica si è dimostrato che il sovraccarico marziale lobulare epatico (punteggio di ferro totale corretto  $> 0$ ) era più frequente in pazienti con HCC che nei controlli. Tale sovraccarico era inoltre quantitativamente maggiore nei pazienti con HCC che nei controlli. La localizzazione più significativa del sovraccarico di ferro nel lobulo epatico era a livello sinusoidale, rispetto alla localizzazione portale ed epatocitaria.

Conclusioni: Il sovraccarico marziale epatico è più frequente e maggiormente rappresentato nei pazienti con cirrosi NASH correlata ed HCC, rispetto ai pazienti di controllo senza HCC. Il sovraccarico del metallo nel lobulo epatico è associato a sviluppo di HCC in pazienti con cirrosi secondaria a NASH.

## Introduzione

Con la prevalenza crescente di obesità, adiposità addominale, diabete e sindrome metabolica nel mondo occidentale, la malattia grassa epatica di tipo non alcolico <sup>1</sup> (non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) è diventata la causa principale di epatopatia cronica.<sup>2</sup> Nella maggior parte dei casi, in riferimento al tipo di progressione del danno epatico, la NAFLD è una condizione benigna; raramente la condizione progredisce a steatoepatite non alcolico (non-alcoholic steatohepatitis: NASH), e di conseguenza ancor più raramente a cirrosi ed epatocarcinoma (HCC). La frequenza di HCC non è diversa tra pazienti con cirrosi correlata ad epatite C rispetto a pazienti con epatopatia cronica correlata a NASH.<sup>3-7</sup> I corrispettivi clinici della NAFLD, obesità e diabete <sup>4-6</sup> sono associati a un rischio aumentato di sviluppare HCC in pazienti con NAFLD ed inoltre contribuiscono ad aumentare lo stesso rischio in pazienti con epatite virale.<sup>8</sup> Il chiarimento di delle caratteristiche epidemiologiche, biologiche e genetiche che caratterizzano pazienti a più alto rischio di sviluppare HCC aiuterebbe a scegliere i candidati che richiedono monitoraggio più

serrato<sup>9</sup>. Inoltre, l'identificazione di altri fattori associati di rischio potrebbe portare a sviluppare terapie preventive mirate.<sup>10</sup> Diversi fattori di rischio aggiuntivi per HCC sono stati identificati in pazienti infettati dal virus C: sesso maschile, età crescente, ecc.<sup>11,12-14</sup> Inoltre, il sovraccarico di ferro epatico, che è frequente in pazienti con infezione da virus C,<sup>15-17</sup> è dimostrato avere un effetto carcinogenetico per lo sviluppo di HCC.<sup>18-20</sup> Generalmente si pensa che la produzione, correlata al ferro, di stress ossidativo, attraverso la produzione di radicali attivi dell'ossigeno, è il meccanismo principale alla base della progressione da fibrosi, cirrosi e HCC nell'emocromatosi genetica.<sup>21,22</sup> Ma, il sovraccarico di ferro può avere un effetto dannoso anche in malattie epatiche croniche non correlate all'emocromatosi.<sup>23</sup> Alla luce di queste considerazioni, abbiamo realizzato uno studio di tipo caso-controllo per valutare lo stato del sovraccarico marziale e la possibile associazione tra lo stesso e lo sviluppo di HCC in pazienti con cirrosi correlata a NASH.

## Materiali e metodi

Il consenso informato è stato ottenuto da ogni paziente incluso nello studio; il protocollo di studio si conforma alle direttive etiche della Dichiarazione del 1975 di Helsinki ed avallato dal comitato etico dell' istituzione.

## Pazienti

Questo studio è stato praticato in collaborazione con l'istituto per la cura delle malattie infettive Cotugno di Napoli, l'Unità Fegato, dell'ospedale S.G. Moscati di Avellino e il Dipartimento di scienze Biomorfologiche e funzionali dell'Università di Napoli Federico II.

Pazienti con cirrosi istologicamente provata NASH-correlata sono stati consecutivamente arruolati nello studio. I casi corrispondevano a pazienti con HCC e i controlli (2 controlli per ogni caso) erano pazienti comparabili per sesso, età (5 anni  $\pm$ ) e stadio di malattia. I controlli arruolati presentavano un esame ecografico epatico negativo per focalità e una concentrazione sierica di alfafetoproteina  $< 40$  ng/ml. Per ogni caso arruolato abbiamo praticato una biopsia epatica su tessuto non tumorale, distante almeno 4 cm dal nodulo di HCC; ciò è stato praticato nel giro di poco

tempo (1-4 settimane) dall'avvenuta diagnosi di HCC. Abbiamo utilizzato, per praticare la biopsia su porzione non tumorale di fegato, un ago con calibro 16 Gauge. L'HCC è stato invece campionato con un ago di calibro 21 Gauge; tutta la parte operativa dei prelievi è stata eseguita sotto guida ecografica. I criteri di esclusione in entrambi i gruppi erano: campione di fegato lungo non meno di 0.8 cm, biopsie multiframmentate ed inconcludenti per la diagnosi istologica; una storia familiare di emocromatosi o una presentazione clinica classica orientante per emocromatosi (iperpigmentazione, insufficienza cardiaca, diabete, ipogonadismo e artrosi). Sia i pazienti che i controlli hanno praticato ricerca genetica per emocromatosi, valutando le mutazioni del gene HFE - C282Y e H63A con metodica in polymerase chain reaction (PCR).

I pazienti con presenza di mutazione C282Y o H63Y in eterozigosi o omozigosi sono stati esclusi dallo studio. Abbiamo ovviamente escluso pazienti con emocromatosi genetica o clinica per minimizzare l'eterogeneità nella popolazione. Altri criteri di esclusione erano patologie epatiche concomitanti del tipo porpiria cutanea tarda, trasfusioni di sangue e patologie emolitica; indagini

di laboratorio sono state effettuate per escludere patologie del tipo: epatite B, epatite C, epatite e colangite autoimmune; inoltre sono state debitamente escluse con test appropriati la malattia di Wilson e il deficit di  $\alpha_1$ -antitripsina. Il consumo di alcool è stato valutato con un questionario autosomministrato. Abbiamo calcolato l'apporto di alcool medio giornaliero e la durata dell'introito, espressi come grammi di etanolo al giorno, per tutti i pazienti. Un apporto superiore ai 20 g/die per uomini e per donne per il passato e per il presente è stato considerato un criterio di esclusione. La storia di consumo alcolico riferita dai pazienti è stata confrontata con l'intervista ai famigliari e in alcuni casi con il medico di famiglia. Abbiamo scelto questo livello soglia di apporto alcolico giornaliero così basso per ridurre le possibilità di errata classificazione delle steatoepatiti alcoliche in non alcoliche. Non abbiamo praticato il dosaggio di marcatori sierici che testimoniano l'entità dell'introito alcolico. Abbiamo inoltre raccolto i seguenti dati clinici e laboratoristici: età, sesso, presenza di varici esofagee, (gradi I,II,III) e grado di funzionalità epatica stimato utilizzando il punteggio Child-Pugh (basato sulla concentrazione sierica dell'albumina, la

presenza di ascite ed encefalopatia porto-sistemica, bilirubina, attività protrombinica). Abbiamo anche valutato l'indice di massa corporea (BMI), la presenza di ipertensione sistemica ed il diabete mellito, le transaminasi (AST; ALT), la glutamil-transferasi (GGT). Il diabete mellito è stato diagnosticato in accordo con l'Associazione Americana di diabetologia.<sup>24</sup> Il BMI è stato calcolato dividendo il peso (in kg) del paziente per la sua altezza (in metri) elevata al quadrato. L'ipertensione è stata diagnosticata in pazienti che erano già in terapia per tale patologia o se i pazienti avevano pressione ematica > di 145/95 mm/Hg, riscontrata in due occasioni separate.

#### Dati patologici

Un singolo osservatore, inconsapevole circa i dati clinico-laboratoristici dei pazienti, ha esaminato le sezioni istologiche di campioni epatici tumorali e non tumorali. La diagnosi istologica di cirrosi è stata basata su criteri internazionalmente accettati.<sup>25</sup> La diagnosi di HCC è stata formulata secondo i criteri stipulati dal Congresso Mondiale di Gastroenterologia,<sup>26</sup> e successivamente modificati.<sup>27</sup> La cirrosi è stata correlata a NASH attraverso (1) caratteristiche istologiche della steatoepatite, (2) assenza di

consumo di alcool clinicamente significativo e (3) laboratorio e genetica negativa per cause alternative di cirrosi. Abbiamo arruolato solo pazienti con cirrosi completa di tipo istologico micronodulare e con le seguenti caratteristiche tipiche per la NASH: steatosi, degenerazione balloniforme, infiltrato lobulare misto con o senza corpi Mallory e/o fibrosi pericellulare/perivenulare. La steatosi è stata quantizzata come segue: lieve, di grado 1 (> il 10% e < il 33% degli epatociti interessati), moderata, di grado 2 (33-66% degli epatociti interessati), grave, di grado 3 (> del 66% degli epatociti interessati). L'attività infiammatoria è stata valutata secondo la classificazione Brunt.<sup>28</sup> I pazienti con cirrosi criptogenica senza associati segni istologici riferibili a NASH sono stati esclusi dallo studio per minimizzare l'eterogeneità nella popolazione. I campioni sono stati fissati in soluzione alcoolica di Bouin, inseriti in paraffina e tagliati in fette spesse 5- $\mu$ m; sono stati colorati con l'ematossilina-eosina, la tricromica di Masson, il rosso Sirius ed il metodo di Perls. I campioni sono stati inoltre esaminati anche alla ricerca di displasia. Il contenuto istologico in ferro è stato classificato secondo Deugnier e colleghi<sup>29</sup> nelle tre aree del lobulo di Rappaport. I

depositi di ferro sono stati valutati con tre punteggi: il punteggio di ferro epatocitario (HIS; 0-36), quello sinusoidale (SIS; 0-12), ed il ferro a localizzazione portale (PIS;0-12). Il punteggio di ferro totale (TIS) (0-60) corrispondeva alla somma di questi tre punteggi (TIS=HIS+SIS+PIS). Per quantificare il diverso grado di omogenea/disomogenea distribuzione del ferro, abbiamo determinato un coefficiente di eterogeneità (valutato con ingrandimento 4 x) secondo quanto descritto da Turlin e colleghi<sup>30</sup>. Il coefficiente di eterogeneità era 1/3 quando la distribuzione del ferro era molto eterogenea (depositi in circa 1/3 dei noduli), 2/3 quando la distribuzione era meno eterogenea ( depositi in circa 1/3 - 2/3 dei noduli) e 3/3 quando ferro risultava distribuito omogeneamente (depositi stimati in più dei 2/3 dei noduli). Il grado di siderosi epatica era infine quantificato nel punteggio di ferro totale, corretto per il coefficiente di eterogeneità:  $cTIS = \text{coefficiente di eterogeneità} \times TIS$ . Questo sistema semiquantitativo descritto è stato vagliato in 25 campioni di fegato provenienti da un gruppo separato di pazienti cirrotici ove è stata stabilita la misura quantitativa diretta di tipo biochimico di ferro epatico

(determinazione colorimetrica come descritta da Barry-Sherlock).<sup>31</sup>

Le stime semiquantitative e quelle biochimica dirette risultavano correlare bene in questi pazienti : ( $r = 0.71$ ); ( $p = 0.0005$ ). Il grado di displasia cellulare è stato valutato secondo i criteri proposti da Anthony e colleghi.<sup>32</sup>

### Analisi statistica

Tutti i dati sono stati trasferiti su un personal computer e analizzati utilizzando il programma Vista Stat 5.0. I risultati sono espressi come media e deviazione (SD); mediana e range nel caso di dati non distribuiti in maniera gaussiana o come percentuali nel caso di dati di tipo ordinale-qualitativo non continuo. I confronti tra i gruppi sono stati praticati con il test t di Student per variabili quantitative che avevano una distribuzione gaussiana e con il test di Kruskal-Wallis e lo Spearman per quelli con una distribuzione non Gaussiana. Il test del Chi quadro ( $\div 2$ ) il test esatto di Fisher sono stati utilizzati per confrontare variabili qualitative. Abbiamo utilizzato un'analisi di regressione logistica per identificare fattori significativamente associati allo sviluppo di HCC. I fattori che all'analisi univariata risultavano significativamente associati allo

sviluppo di HCC sono stati inclusi successivamente in un'analisi di regressione logistica di tipo 'stepwise' con correzione dei fattori associati confondenti. Gli Odds-Ratio ed i rispettivi limiti di confidenza al 95% sono stati calcolati ed un valore di  $p < 0.05$  è stato considerato statisticamente significativo.

## Risultati

### Caratteristiche dei pazienti

Abbiamo arruolato 482 pazienti in maniera consecutiva con cirrosi NASH-correlata. Di questi, 71 avevano ricevuto diagnosi di HCC; 35/71 di questi pazienti definiti casi avevano una diagnosi istologicamente confermata di HCC. I 36 casi restanti con HCC hanno ricevuto diagnosi utilizzando criteri non invasivi come descritto da Bruix et al.<sup>27</sup> I 71 pazienti con HCC hanno praticato indagine genetica per il gene dell' emocromatosi. Sei (l'8%) dei 71 casi risultarono eterozigoti per il la mutazione C282Y e sono stati pertanto esclusi dall' studio. Quattordici (il 19%) era eterozigote per il la mutazione H63D e sono stati anch'essi esclusi dalla studio. Così, 51 pazienti risultati valutabili come casi per lo studio. Quattrocentoundici pazienti senza HCC, con cirrosi NASH-correlata erano candidati al gruppo di controllo. Secondo i criteri di inclusione ed i risultati genetici, abbiamo consecutivamente valutato 135 pazienti: di questi abbiamo escluso 11 (l'8%) pazienti che erano eterozigoti per la mutazione C282Y e 22 (il 16%) che era

eterozigote per H63D. Quindi, il gruppo di controllo risultava formato da 102 pazienti.

I dati clinici-laboratoristici dei due gruppi di pazienti con cirrosi NASH-correlata con e senza HCC vengono mostrati nella tabella 1.

Tabella 1  
Caratteristiche dei pazienti con HCC e dei controlli.

	Casi (n 51)	Controlli (n 102)	p
Età (y) <sup>a</sup>	68.1 (8.5) [48-88]	65.6 (11.5) [46-88]	//
Rapporto sessi (M/F)	39/12	78/24	//
Classe di Child-Pugh <sup>b</sup>	A 24 (47.05) B 10 (19.6) C 17 (33)	A 53 (51.9) B 24 (23.52) C 25 (24.50)	0.441
Varici esofegee ampie (III grado) <sup>b</sup>	20 (39.21)	49 (48.03)	0.342
Displasia a grandi cellule <sup>b</sup>	16 (31.3)	26 (25.5)	0.253
Grado di steatosi (grado 1 / grado 2 / grado 3) <sup>b</sup>	15 (29.4) / 20 (39.2) / 16 (31.3)	34(33)/45(44.1)/23(22.5)	0.115
Grado di infiammazione (grade 1 / grade 2 / grade 3) <sup>b</sup>	19 (37.2) / 24 (47) / 8 (15,6)	59 (58) / 30 (29.4) / 13 (12.7)	0.03
Diabete-mellito <sup>b</sup>	44 (86.27)	53 (51.96)	0.015
Ipertensione <sup>b</sup>	15 (29.41)	22 (21.56)	0.91
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	31.8 ± 4.5	29.9 ± 6.8	0.534
Attività di protrombina (%) <sup>a</sup>	59.8 ± 14.8	61.3 ± 13.8	0.696
Bilirubina (mol/L) <sup>a</sup>	19.3 ± 9.1	17.8 ± 8.4	0.432
Albumina (g/L) <sup>a</sup>	37.8 ± 4.0	40.3 ± 5.7	0.278
Piastrine (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>	134.8 ± 72.7	142.0 ± 58.4	0.466
AST (ULN) <sup>a</sup>	2.3 ± 1.5	2.1 ± 0.8	0.411
ALT (ULN) <sup>a</sup>	1.3 ± 0.8	2.7 ± 1.7	0.331
GGT (ULN) <sup>a</sup>	2.1 ± 3.5	2.0 ± 2.1	0.316
Ferritina (mg/L) <sup>a</sup>	698.3 ± 452.6	499.2 ± 488.9	0.04

La lunghezza mediana del prelievo bioptico era di 18 mm (range 9-26) nei pazienti con HCC e di 19 mm (gamma 9-26) nei controlli. Nell'analisi univariata praticata utilizzando le caratteristiche clinico-laboratoristiche di ingresso, l'entità della necro-infiammazione (valutata come  $> 1$ ), il deposito complessivo corretto di ferro lobulare (cTIS  $> 0$ ), la concentrazione sierica di ferritina ( $> 500$  mg/L), il diabete mellito (presenza) sono risultati significativamente associati alla presenza di HCC. Specificatamente, la presenza istologica di ferro (cTIS  $> 0$ ) è risultata essere presente in 43 (l'84.3%) dei pazienti con HCC rispetto a 44 (il 43.13%) dei pazienti senza HCC (controlli); ( $p = 0.0001$ ). Il cTIS, l'entità di deposito del ferro parenchimale e di quello mesenchimale (SIS, PIS) presentavano valori significativamente maggiori in pazienti con HCC rispetto ai controlli (tabella 2).

Tabella 2

Punteggi istologici del ferro (mediana (intervallo)) nei pazienti con HCC rispetto ai controlli

Punteggio	Pazienti con HCC (n=51)	Controlli (n=102)	p
cTIS	9.7 (0-33)	2.1 (0-20)	0.001
HIS	7 (0-20)	2 (1-19)	0.035
SIS	5 (0-10)	1 (0-6)	0.001
PIS	2 (0-6)	1 (0-6)	0.034

cTIS, punteggio totale corretto del ferro; HIS, punteggio epatocitario del ferro; SIS, punteggio sinusoidale del ferro; PIS, punteggio portale del ferro.

Queste variabili sono state introdotte in un modello logistico di regressione secondo una procedura del tipo 'stepwise' assieme al grado steatosi (> 2), alla necroinfiammazione (> 1) alla ferritina (> 500 mg/L), al diabete-mellito, al BMI (>30), ed al grado di displasia epatica al fine di annullare eventuali fattori confondenti di valutazione. Come mostrato in tabella 3, la prevalenza dei depositi di ferro (cTIS > 0) ed il diabete mellito rimanevano gli unici fattori significativamente associati alla presenza di HCC.

Tabella 3

Analisi multivariata: variabili significativamente associate in maniera indipendente (predittive) alla presenza di HCC

Variabili	Odds Ratio	95% intervalli di confidenza	p
Ferritina (>500 mg/L)	1.36	0.78-3.14	0.136
Grado di steatosi (>2)	1.02	0.51-2.77	0.811
Necro-infiammazione (>1)	1.89	0.86-4.17	0.169
Body mass index (>30)	0.89	0.51-1.86	0.643
Displasia a grandi cellule (presenza)	1.33	0.56-3.17	0.667
cTIS (0 or >0).	7.08	2.77-18.07	0.0001
Diabete-mellito (presenza)	6.04	2.29-15.91	0.0009

Abbiamo inoltre aggiunto il valore di cTIS mediano all'analisi multivariata ed abbiamo trovato che il cTIS mediano rimaneva significativamente associato alla presenza di HCC nei casi rispetto ai controlli ( $p = 0.043$  ; Odds-Ratio 1.45; 95% intervallo di confidenza 1.08-3.29). Quando i tre punteggi erano stati introdotti nel modello, SIS si mostrava significativamente più elevato in pazienti con HCC rispetto ai controlli ( $p = 0.002$ ; Odds-Ratio 6.1; 95% intervallo di confidenza 1.81-17.12 ). Nei tre modelli, solamente il cTIS e la presenza di diabete mellito rappresentavano i fattori di rischio indipendenti per lo sviluppo di HCC (Tabella 3). Alla stessa analisi multivariata, i valori di necroinfiammazione e di ferritina sierica non risultavano predittori indipendenti per lo sviluppo di HCC. Al fine di comprendere le relazioni tra ferro lobulare epatico ed altri parametri clinico-laboratoristici, in un nuovo modello statistico di regressione abbiamo considerato il cTIS ( $> 0$ ) come variabile dipendente e come variabili indipendenti: il grado di steatosi ( $> 2$ ), il grado di necro-infiammazione ( $> 1$ ), il diabete mellito e la concentrazione sierica di ferritina ( $> 500$  mg/L ). L'analisi univariata ha mostrato un'associazione solo tra il grado di necro-

infiammazione e l'entità di deposito del ferro lobulare epatico (cTIS>0); ciò è stato confermato dall'analisi multivariata ( $p = 0.048$ ; Odds-Ratio 1.58; 95% dell'intervallo di confidenza 1.38-3.99). Inoltre un'altra analisi di regressione ha mostrato che maggiori concentrazioni di ferritina sierica si correlano significativamente con la presenza di diabete mellito ( $r^2: 0.035$ ;  $p: 0.039$ ) e con un BMI maggiore ( $r^2: 0.033$ ;  $p: 0.045$ ) ma non con l'entità della necro-infiammazione.

## Discussione

In un ampio gruppo di studio di pazienti con cirrosi secondaria a NASH, abbiamo osservato che il sovraccarico marziale epatico, documentato istologicamente, è riscontrato con maggiore frequenza e quantità in pazienti con HCC rispetto ai pazienti senza HCC. Abbiamo anche trovato che l'eccesso di ferro epatico era di tipo prevalentemente sinusoidale e che la presenza di diabete mellito era l'unica altra condizione clinica indipendentemente associata alla presenza di HCC. Gli studi clinici precedenti hanno mostrato che il sovraccarico di ferro epatico è un fattore di rischio per lo sviluppo di HCC in pazienti con emocromatosi,<sup>33</sup> in pazienti con HCC sviluppati su fegato non cirrotico,<sup>34</sup> in pazienti con cirrosi alcolica<sup>35</sup> e in pazienti che subiscono un trapianto di fegato.<sup>36</sup> In pazienti con epatopatia cronica l'età, il genere maschile e la gravità di malattia sono fattori di rischio già epidemiologicamente consolidati<sup>11,12-14</sup> per lo sviluppo di HCC. A loro volta, questi stessi fattori di rischio sono associati a maggiore sovraccarico marziale. Di conseguenza, è difficile valutare isolatamente il peso fisiopatologico del ferro nella carcinogenesi epatica rispetto ai già noti fattori di rischio per lo

sviluppo dell'HCC. In effetti, uno studio caso-controllo con pazienti comparabili per sesso, età e stadio di malattia epatica, poteva essere utile per determinare se il sovraccarico di ferro epatico è un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di HCC. Siamo stati in grado di effettuare un'analisi del genere, grazie alla sufficiente numerosità di casi che abbiamo identificato.

L'accumulo del ferro epatico è causa di un eccessivo stress ossidativo in pazienti con emocromatosi genetica. Gradi minori di sovraccarico marziale sono frequenti in altre forme di epatopatia cronica, in particolare nella NAFLD, nell'epatopatia alcolica e nell'epatite cronica HCV correlata. Deve essere ancora stabilito se mai l'accumulo di ferro contribuisce o meno nella patologia epatica alla sua progressione a cirrosi ed allo sviluppo di HCC.<sup>37,38</sup> Inoltre, i meccanismi fisiopatologici che sono alla base dell'accumulo del ferro nella NAFLD e nelle altre epatopatie croniche, non è completamente compreso. Un'associazione tra sovraccarico di ferro e mutazione del gene HFE in pazienti con l'epatite cronica C è stato identificato in alcuni studi,<sup>39,40</sup> ma non altri.<sup>41,42</sup> Questi risultati contraddittori suggeriscono che altri fattori genetici o ambientali

partecipano all' accumulo del metallo nel fegato. Nel nostro studio abbiamo riscontrato che l'eccesso di ferro lobulare epatico, fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di HCC, era associato, dopo correzione per fattori quali diabete mellito, ferritinemia e steatosi al grado istologico di necro-infiammazione. È stato suggerito che il sovraccarico di ferro epatico già osservato nel corso di epatite cronica HCV correlata potrebbe essere conseguenza della necrosi epatocitaria che conduce al rilascio di ferro e al suo successivo uptake da parte dei macrofagi.<sup>43,44</sup> È ipotizzabile che questo meccanismo operi anche in pazienti con NAFLD. Inoltre, come mostrato nell'epatopatia alcolica,<sup>45,46</sup> uno squilibrio indotto dall'etanolo tra sistemi ossidanti ed antiossidanti potrebbe avere un ruolo aggiuntivo nell'accumulo del ferro e nello sviluppo dell' HCC attraverso un aumento nella produzione di perossido di idrogeno da parte dei sistemi detossificanti (citocromi contenenti ferro) mitocondriali indotti.<sup>45,46</sup> Quindi nella NAFLD, l'accumulo di ferro epatico potrebbe essere non solo causa, ma anche conseguenza dello stress ossidativo, attraverso l'induzione di un circolo vizioso.

Nella NAFLD, il rapporto tra depositi di ferro lobulare epatico, la necro-infiammazione, i livelli sierici di ferritina e la resistenza insulinica è complessa e non ancora del tutto compresa. Nella nostra esperienza l'entità della necro-infiammazione epatica e la concentrazione di ferritina sierica risultavano significativamente maggiori nei casi che nei controlli, ma dopo la correzione per fattori confondenti, né la necroinfiammazione né la ferritinemia risultavano essere indipendentemente associati alla presenza di HCC. Interessante è risultata la correlazione fra livelli di ferritinemia, il diabete mellito ed il BMI. Questo suggerirebbe che, nella sindrome metabolica, la ferritina correli meglio con la resistenza insulinica tipica della NAFLD che con il sovraccarico marziale epatico. Inoltre, questa correlazione può essere bidirezionale: i depositi di ferro possono contribuire alla resistenza di insulina<sup>47,48</sup> e questa stessa può contribuire all'accumulo del ferro nel tessuto.<sup>49</sup> Probabilmente, le maggiori concentrazioni di ferritina sierica in corso di NAFLD sono un'espressione di uno sconvolgimento metabolico e/o di un danno epatico perché l'estesa attivazione di citochine infiammatorie aumenterebbe la trascrizione del RNA messaggero della ferritina

nei macrofagi.<sup>50</sup> Inoltre è possibile che lo sconvolgimento metabolico nei pazienti con NAFLD può influenzare indirettamente i depositi di ferro epatico, attraverso l'induzione intra-epatica di un circolo vizioso tra necro-infiammazione e stress ossidativo.

Nei nostri pazienti come in altri con NASH,<sup>51</sup> la concentrazione sierica di ferritina non risultava correlata con la concentrazione di ferro nel tessuto epatico. Quindi, in pazienti con NASH, è necessario valutare il sovraccarico di ferro attraverso una biopsia epatica utilizzando procedure semiquantitative di valutazione o attraverso la quantificazione diretta del ferro. Noi abbiamo misurato il ferro epatico utilizzando il metodo semiquantitativo descritto da Deugnier e colleghi<sup>18</sup> piuttosto che attraverso una quantificazione diretta. Nel nostro studio ed anche in altre esperienze<sup>29</sup> si è osservata una buona correlazione tra i risultati ottenuti con la procedura di valutazione semi-quantitativa rispetto al metodo di valutazione quantitativo. Al contrario, Ludwig e colleghi<sup>52</sup> hanno riferito che nei casi di epatopatia non severa la misura semi-quantitativa del ferro può dare luogo a risultati falsamente negativi: in particolare ciò avverrebbe nei casi di epatopatia fibrotica, non

cirrotica; d'altra parte tutti i nostri pazienti erano affetti da cirrosi e non da fibrosi semplice. Inoltre, un vantaggio del metodo semi-quantitativo è che esso fornisce una misura della distribuzione lobulare del ferro.

Abbiamo escluso dal nostro studio pazienti affetti da mutazione del gene HFE dell'emocromatosi. Al contrario della patologia epatica tipica dell'emocromatosi genetica, l'eccesso di ferro nei nostri pazienti appariva di grado lieve o moderato con una distribuzione di tipo eterogeneo, essendo prevalentemente rappresentato all'interno delle cellule mesenchimali. Il ferro sinusoidale sembra avere un certo ruolo nelle malattie epatiche. Gli studi sperimentali indicano che il tipo di localizzazione epatica cellulare del ferro è determinante per il suo potenziale cancerogeno.<sup>53,54</sup> Il ferro introdotto con la dieta, in modelli animali di emocromatosi non genetica, con accumulo iniziale di tipo epatocitario, non ha avuto nessuna rilevanza in senso cancerogeno.<sup>53</sup> Al contrario, la somministrazione parenterale di ferro destrano conduce alla deposizione del metallo nella cellula reticolo-endoteliale; ciò sarebbe coinvolto nella epatocarcinogenesi

in modelli sperimentali di emocromatosi indotta su fegato di topo.<sup>54</sup>

Nel nostro studio, l'eccesso di ferro risulta localizzato principalmente all'interno di cellule reticoloendoteliali e ciò potrebbe confermare il potenziale cancerogeno di tale fenomeno. Il meccanismo per cui l'accumulo del ferro nel fegato può contribuire all'epatocarcinogenesi rimane ancora da chiarire. Una possibile ipotesi è che il ferro potrebbe agire innescando la produzione di radicali reattivi dell'ossigeno responsabili di un danno secondario di tipo perossidativo lipidico, ed ossidativo a proteine ed acidi nucleici promuovendo in definitiva la carcinogenesi.<sup>18,55</sup>

In conclusione, abbiamo riscontrato un'associazione tra i depositi non severi di ferro, non correlati ad emocromatosi genetica, e lo sviluppo di HCC in pazienti con cirrosi correlata a NASH. L'accumulo di ferro potrebbe quindi costituire un cofattore determinante nello sviluppo dell'HCC. Se confermati da studi prospettici, questi risultati potrebbero avere importanti implicazioni cliniche. La biopsia epatica dovrebbe essere praticata non solo per confermare una diagnosi di cirrosi ma anche per valutare i depositi intra-epatici del ferro. Inoltre è possibile che la mobilizzazione dei

deposti di ferro dal fegato (salassi o chelazione farmacologica del metallo) possa costituire una strategia terapeutica per evitare la comparsa dell'HCC nei pazienti con NAFLD.

## Abbreviazioni

Abbreviazioni utilizzate in questo documento: HCC, Carcinoma epatocellulare; HCV, epatite da virus C; HIS, punteggio ferro epatocitario; SIS, punteggio ferro sinusoidale; PIS, punteggio ferro portale; TIS, punteggio ferro totale; CTIS, punteggio ferro totale corretto. NAFLD, patologia grassa epatica di tipo non-alcolico; NASH: steato-epatite non-alcolica.

## Riferimenti Bibliografici

1) [Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ.](#) La sindrome metabolica. Lancetta. 2005; 365:1415-28.

2) [Marchesini G, Babini M.](#) Malattia di fegato grassa non alcolica e la sindrome metabolica.

Minerva Cardioangiol. 2006; 54:229-39.

3) [Ratziu V, Bonyhay L, Di Martino V, Charlotte F, Cavallaro L, Sayegh-Tainturier MH, Giral P, Grimaldi A, Opolon P, Poynard T.](#) Sopravvivenza, fallimento del fegato e carcinoma hepatocellular in cirrosi obesity-related cryptogenic. Hepatology. 2002; 35:1485-93

4) [Nair S, muratore A, Eason J la, perdita G, Perrillo RP.](#) Obesity è un fattore di rischio indipendente per carcinoma hepatocellular in cirrosi? Hepatology. 2002; 36:150-5.

5) [Marrero JA, Fontana RJ, Su GL, Conjeevaram HS, Emick DM, Lok come.](#)

NAFLD può essere una malattia di fegato sottostante comune in pazienti con carcinoma hepatocellular in lo Stati Uniti . Hepatology. 2002; 36:1349-54.

6) [El-Serag HB, Tran T, Everhart JE](#). Il diabete aumenta il rischio di malattia di fegato cronica e di carcinoma hepatocellular. *Gastroenterology*. 2004; 126:460-8.

7) [Anagnostopoulos GK, Arvanitidis D, Tsiakos S, Margantinis G, Grigoriadis K, Kostopoulos P](#).

È la parte di carcinoma hepatocellular della storia naturale di steatohepatitis non alcoolico?

*J Clin Gastroenterol*. 2003; 37:88-9.

8) [Yuan JM](#) , [Govindarajan S](#) , [Arakawa K](#) , [Yu MC](#) . [Cancro](#). il 2004; 101:1009-17 . .

Synergism di alcool, diabete ed epatite virale sul rischio di carcinoma hepatocellular in neri e in bianchi in lo U.S.

9) [Llovet JM, Fuster J, Bruix J; Gruppo di cancri di fegati Barcelona-Clínic](#). Lo Barcellona avvicinamento: diagnosi, messa in scena e trattamento di carcinoma hepatocellular. *Fegato Transpl*. 2004; 10:S115-20.

10) [Lodato F, Mazzella G, Festi D, Azzaroli F, Colecchia A, Roda E](#).

Prevenzione dei carcinomi Hepatocellular: Un'emersione universale tra l'opulenza di paesi sviluppati e i vincoli economici di nazioni in via di sviluppo. *Mondo J Gastroenterol.* 2006; 12:7239-49.

11) [Di Bisceglie sono.](#) Epatite C e carcinoma hepatocellular. *Hepatology.* 1997; 26:34S-38S.

12) [Kew MC, Yu MC, Kedda MA, Coppin A, Sarkin A, Hodgkinson J.](#)

I ruoli relativi dell'epatite B e i virus C nel carcinoma etiology di hepatocellular in neri africani meridionali. *Gastroenterology.* 1997; 112:184-7.

13) [Ganne-Carrié N, Chastang C, F da cappella, Munz C, Pateron D, Sibony M, Dény P, Trinchet JC, Callard P, Guettier C, Beaugrand M](#) . Punteggio premonitore per lo sviluppo di carcinoma hepatocellular e valore aggiuntivo della grande di fegato cellula dysplasia in pazienti occidentali con cirrosi. *Hepatology.* 1996; 23:1112-8.

14) Brunetto MR, Oliveri F, Koehler M. Effettuare di interferon - «Su progressione di cirrosi a carcinoma hepatocellular: uno studio di coorte retrospettivo. *Lancetta* il 1998; 351:1535-1539

- 15) Di Bisceglie sono, Axiotis CA, Hoofnagle JH. Misura dello stato di ferro in pazienti con epatite cronica. Gastroenterology il 1992; 102:2108-2113
- 16) Piperno A, D ' Alba R, Fargion S. Concentrazione di ferro di fegato in epatite virale: uno studio di 98 pazienti. Eur J Gastroenterol Hepatol il 1995; 7:1203-1208
- 17) Smith BC, boschetto J, Guzail MA. Heterozygosity per hemochromatosis ereditario è associato a più fibrosis nell'epatite cronica C. Hepatology il 1998; 27:1695-1699
- 18) Deugnier Y, Turlin B, Loréal O. Ferro e neoplasia. J Hepatol il 1998; 28:21-25.
- 19) Turlin B, Juguet F, Moirand R. I magazzini di ferro di fegato aumentati in pazienti con carcinoma hepatocellular si sono sviluppati su un fegato noncirrhotic. Hepatology il 1995; 22:446-450
- 20) [Chapoutot C](#), [Esslimani M](#), [Joomaye Z](#), [Ramos J](#), [Perney P](#), [Laurent C](#), [Fabbro-Peray P](#), [Larrey D](#), [Domergue J](#), L'eccesso di ferro di fegato in pazienti con carcinoma hepatocellular si è sviluppato su cirrosi virale C. Sventrare 2000; 46:711-4 . .

21) [Houglum K, Ramm GA, Crawford DH, Witztum JL, Powell LW, Chojkier M.](#)

Ferro di eccesso produce la tensione hepatic oxidative e la crescita che trasforma scompongono beta1 in hemochromatosis genetico. Hepatology. 1997; 26:605-10.

22) [Britton RS.](#) Metal-induced hepatotoxicity. Fegato Semin Dis. 1996; 16:3-12.

23) Bonkovsky HL, [BF eccellenti, Lambrecht RW, Rubin RB.](#)

Stirate in malattie di fegato diverse da hemochromatosis. Fegato Semin Dis. 1996; 16:65-82.

24) [Associazione di diabete americana.](#) Diagnosi e classificazione del diabete mellitus.

Attenzione di diabete. 2004; 27: 5-10.

25) Anthony PP, Ishak K, Nayak NC . La morfologia di cirrosi. J Clin Pathol il 1978; 3:395-414.

26) Me Wanless, Callea F, jr. Craig. Terminologia di lesione nodular di fegato: raccomandazioni del Congresso di Mondiale di Gastroenterology gruppo di lavoro. Hepatology 1995; 16: 949-955

27) [Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, Christensen E, Pagliaro L, Colombo M, Rodés J. Commissione EASL di esperti su HCC.](#) Gestione clinica di carcinoma hepatocellular. Conclusioni della conferenza Barcelona-2000 EASL. Associazione europea per lo studio del fegato. J Hepatol. 2001; 35:421-30.

28) Sibille JC, Kondo H, Aisen P. Interazioni fra cellule isolate hepatocytes e Kupffer in metabolismo di ferro: un possibile ruolo per ferritin come una proteina di trasportatore di ferro. Hepatology il 1988; 8:296-301.

29) Deugnier Y, Loréal O, Turlin B. Patologia di fegato in hemochromatosis genetico: una revisione di 135 casi homozygous e delle loro correlazioni bioclinical. Gastroenterology il 1992; 102:2050-2059

30) Turlin B, Robert me, Maugendre S. Quantificazione histologique des hépatosidéroses hémochromatosiques et non hémochromatosiques. Ann Pathol il 1997; 5:329-332.

31) Barry M, Sherlock S. Misura di concentrazione di ferro di fegato in campioni needle-biopsy. Lancetta il 1971; 100-3.

32) Anthony PP, Vogel CL lo, imbonitore LF. Cellula di fegato dysplasia: una condizione premalignant. J Clin Pathol il 1973; 26:217-223

33) [Fargion S, Mandelli C, Piperno A, Cesana B, Fracanzani AL, Fraquelli M, Bianchi PA, Fiorelli G, Conte D.](#) Sopravvivenza e fattori prognostici in 212 pazienti italiani con hemochromatosis genetico. Hepatology. 1992; 15:655-9.

34) [Blanc JF, De Ledinghen V, Bernard PH, de Verneuil H, Winnock M, Le garantisce per B, Carles J, Saric J, Balabaud C, Bioulac-Sage P.](#) Aumento di incidenza di |(mutazione) HFE C282Y in pazienti con sovraccarico di ferro e con carcinoma hepatocellular si è sviluppato in fegato non-cirrhotic. J Hepatol. 2000; 32:805-11.

35) [Nahon P, Sutton A, Rufat P, Ziol M, Thabut G, Schischmanoff PO, Vidaud D, Charnaux N, Couvert P, Ganne-Carrie N, Trinchet JC, Gattegno L, Beaugrand M.](#) Ferro di fegato, |(mutazione) di gene e occorrenza di carcinoma hepatocellular HFE in pazienti con cirrosi. *Gastroenterology*. 2008; 134:102-10.

36) [Kowdley KV , Hassanein T , Kaur S , Farrell FJ , furgone Thiel DH , Keeffe EB ,](#) Cancro e sopravvivenza di fegato principali in pazienti che subiscono il fegato transplantation per haemochromatosis. [Fegato Transpl Surg.](#) il 1995; 1:237-41 .

37) [Bugianesi E, Manzini P, D ' Antico S, Vanni E, Longo F, Leone N, Massarenti P, Piga A, Marchesini G, Rizzetto M .](#) Contributo relativo di carico di ferro, di |(mutazione) HFE e resistenza di insulina a fibrosis in fegato grasso non alcoolico. *Hepatolog y*. 2004; 39:179-87.

38) [Bhattacharya R, Kowdley KV.](#) Ferro e |(mutazione) HFE in steatohepatitis non alcoolico: spettatori innocenti o accessori del reato? *Gastroenterology*. 2003; 125:615-6; discussione 617.

39) [Kazemi-Shirazi L](#) , [Datz C](#) , [Maier-Dobersberger T](#) , [Kaserer K](#) , [Hackl F](#) , [Polli C](#) , [Steindl PE](#) , La relazione dello stato di ferro e |(mutazione) di gene hemochromatosis in pazienti con l'epatite cronica C. [Gastroenterology](#). 1999;116:127-34. .

40) [Piperno ui\(A\)](#), [Vergani A](#), [Malosio me](#), [Parma L](#), [Fossati L](#), [Ricci A](#), [Bovo G](#), [Boari G](#), [Mancia G](#).

Hepatic stirano sovraccarico in pazienti con epatite virale cronica: ruolo di |(mutazione) di gene HFE.

Hepatology. 1998; 28:1105-9.

41) [Höhler T](#), [Leininger S](#), [Köhler HH](#), [Schirmacher P](#), [Galle PR](#).

Heterozygosity per il gene hemochromatosis in malattie di fegato - prevalenza ed effetti sull'istologia di fegato . Fegato. 2000; 20:482-6.

42) [Thorburn D](#) , [curry G](#) , [prendere con un cucchiaino R](#) , [Spence E](#) , [Oien K sale D](#) , [volpe R](#) Il ruolo di |(mutazione) di gene di ferro e di hemochromatosis nella progressione di malattia di fegato nell'epatite cronica C. [intestino](#) . il 2002; 50:248-52 .

43) [Boucher E, Bourienne A, Adams P, Turlin B, Brissot P, Deugnier Y.](#) Concentrazione e distribution di ferro di fegato nell'epatite cronica C prima di e dopo trattamento interferon. *Intestino*. 1997; 41:115-20.

44) [Hézode C, Cazeneuve C, Coué O, Roudot-Thoraval F, Lonjume, Bastie A, Duvoux C, Pawlotsky JM, Zafrani ES, Amselem S, Dhumeaux D.](#) Accumulazione di ferro di fegato in pazienti con l'epatite attiva cronica C: prevalenza e ruolo di  $\beta$ 2-microglobulina (mutazione) di gene hemochromatosis e rapporto con lesioni hepatic histological. *J Hepatol*. 1999; 31:979-84.

45) [Sutton ui\(A\), Nahon P, Pessayre D, Rufat P, Poiré ui\(A\), Ziol M, Cancro Res.](#) 2006;66:2844-52 .

I polimorfismi genetici in enzimi antioxidant modulano l'accumulazione di ferro hepatic e lo sviluppo di carcinoma hepatocellular in pazienti con cirrosi alcohol-induced.

46) [Nahon P, Sutton ui\(A\), Pessayre D, Rufat P, Ziol M, Ganne-Carrie N, Charnaux N](#) Il manganese superoxide dismutase dimorphism e sovraccarico di ferro, carcinoma e morte

hepatocellular nell'epatite C pazienti virus-infected. [Clin Gastroenterol Hepatol](#). il 2007; 630-5 .

47) [Guillygomarc ' h ui\(A\)](#) , [Mendler MH](#) , [Moirand R](#) , [Lainé F](#) , [Quentin V](#) , [David V](#) Terapia Venesection di insulina che resistance-associated hepatic stirano sovraccaricare. [J Hepatol](#). il 2001; 35:344-9

48) [Facchini FS](#), [Hua NW](#), [Stoohs RA](#). Effetto di esaurimento di ferro in pazienti carbohydrate-intolerant con prova clinica di malattia di fegato grassa non alcoolica. [Gastroenterology](#). 2002; 122:931-9.

49) [Viganò M](#), [Vergani A](#), [Trombini P](#), [Paleari F](#), [Piperno A](#). Metabolismo e di resistenza di insulina hepatic steatosis di ferro di influenza in diabete del tipo II. [Gastroenterology](#). 2000; 118:986-7.

50) Brunt Em, Janney CG, DI Bisceglie è, Neuschwander-Terri BA lo, prosciutto BR. Steatohepatitis non alcoolico J [Gastrol](#) sono il 1999; 94:2467-2474.

51) [MacGuill MJ](#) , [Barrett C](#) , [Ravi N](#) , [MacDonald G](#) , [Reynolds JV](#) . Le cellule di tumore isolate in linfonodi patologici node-negative

influiscono negativamente su prognosi in cancro dell'esofago o di  
congiunzione oesophagogastric. [J Clin Pathol](#). 2007; 60:1108-11 .

52) Ludwig J, Hashimoto E, Porayko MK. Hemosiderosis in cirrosi:  
uno studio di 447 fegati nativi. *Gastroenterology* il 1997; 112:882-  
888

53) [Stál P, Hultcrantz R, Möller L, Eriksson LC](#). Gli effetti di ferro  
dietetico su iniziazione e promozione in hepatocarcinogenesis  
chimico. *Hepatology*. 1995; 21:521-8.

54) Mb P, Nolan Carthew, Smith AG. Ferro promuove GST-P foci  
iniziato di tana in fegato di topo. *Carcinogenesis* il 1997; 18:599-603

55) Meneghini H. Stirate la tensione homeostasis, oxidative e il  
danno DNA. *Liberate Radic Biol Med* il 1997; 23:783-792