

# Fibrosis hepática 2022: Necesidades insatisfechas y un plan para el futuro

SCOTT L. FRIEDMAN<sup>1</sup> | MASSIMO PINZANI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Division of Liver Diseases, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, New York, USA

<sup>2</sup>Institute for Liver and Digestive Health, University College London, London, UK

## Correspondence

Scott L. Friedman, Division of Liver Diseases, Box 1123, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, 1425 Madison Ave, Room 1170C, New York, NY 10025, USA.  
Email: Scott.Friedman@mssm.edu

Massimo Pinzani, UCL Institute for Liver and Digestive Health, Royal Free Hospital, London NW32PF, UK.

Email: m.pinzani@ucl.ac.uk

## Funding information

National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Grant/Award Number: 1 R01 DK128289-01

## ABSTRACT

El progreso constante, durante cuatro décadas, dirigido hacia la comprensión de la patogenia y las consecuencias clínicas de la fibrosis hepática, ha llevado a la expectativa de fármacos antifibróticos efectivos, pero ninguno ha sido aprobado. Por lo tanto, una evaluación del campo es oportuna, para aclarar las prioridades y acelerar el progreso. Aquí destacamos los éxitos hasta la fecha, pero lo que es más importante, identificamos las lagunas y las necesidades insatisfechas, tanto experimental como clínicamente. Estos incluyen la necesidad de definir mejor las interacciones célula-célula y los elementos de la fibrogénesis específicos de la etiología y su vínculo con los impulsores de la hipertensión portal específicos de la enfermedad.

El éxito en el tratamiento de la hepatitis viral ha revelado la notable capacidad del hígado para degradar la cicatriz, al revertir la fibrosis; pero sabemos poco de los mecanismos subyacentes a esta respuesta. Por lo tanto, existe una necesidad apremiante de aclarar los mecanismos celulares y moleculares de la regresión de la fibrosis para que los tratamientos imiten la capacidad endógena del hígado. Modelos *in vitro* y en animales más refinados y más predictivos, acelerarán el desarrollo de los fármacos. Desde una perspectiva clínica, los diagnósticos actuales están mejorando, pero no siempre son biológicamente plausibles o lo suficientemente precisos para reemplazar a la biopsia. Los métodos digitales de la patología, que aprovechan el aprendizaje automático y la inteligencia artificial, deben urgentemente validarse, para capturar más información de pronóstico en las biopsias de hígado y cuantificar mejor la respuesta a las terapias. Para un tratamiento más refinado de NASH, los enfoques ortogonales que integran conjuntos de datos genéticos, clínicos y patológicos, pueden concluir en tratamientos para subfenotipos específicos de la enfermedad. En conjunto, estos y otros avances, fortalecerán y agilizarán los ensayos clínicos y vincularán mejor las respuestas histológicas con los resultados clínicos.

## INTRODUCCIÓN

El campo de la fibrosis está maduro hacia el éxito. Después de ~40 años de progreso constante en la investigación básica, traslacional y clínica, existe una gran apreciación de su patogenia y contribución a la enfermedad hepática en etapa terminal. Sin embargo, el éxito en el tratamiento de la fibrosis ha sido más difícil de lo que nadie había anticipado, y el optimismo inicial fue prematuro ya que todavía no existen terapias antifibróticas aprobadas para la enfermedad hepática. En este momento, es oportuno evaluar dónde nos encontramos en el camino hacia el éxito, qué hemos aprendido y cuáles son las necesidades actuales no satisfechas -tanto

clínicas como de investigación- que finalmente se traducirán en terapias efectivas. En esta revisión enmarcamos nuestra comprensión de la fibrosis hepática en el contexto de los conceptos actuales y las necesidades insatisfechas, destacando las áreas que requieren más investigación, con la esperanza de acelerar el éxito en el tratamiento de la fibrosis que retrasa o previene las complicaciones de la enfermedad hepática en etapa terminal y mejorar los resultados.

La fibrosis progresiva generalmente sigue al daño hepático prolongado debido a una agresión infecciosa (HBV y HCV), tóxica/inducida por fármacos (principalmente inducida por alcohol), metabólica (NAFLD), colestática o autoinmune. Eventualmente, la fibrosis puede conducir a cirrosis

clínicamente evidente e insuficiencia hepática. La cirrosis se define como una etapa avanzada de fibrosis, caracterizada por la formación de nódulos regenerativos del parénquima hepático que están separados y encapsulados en tabiques fibróticos.

Históricamente, la fibrosis hepática se consideró durante mucho tiempo un proceso pasivo e irreversible resultante del colapso del parénquima hepático y su reemplazo gradual con tejido rico en colágeno, pero innumerables estudios han subrayado la importancia de la fibrogénesis activa que conduce a la acumulación de matriz extracelular (EMC; cicatriz). Sorprendentemente, la patogenia de la fibrosis hepática recibió poca atención hasta la década de 1980, cuando las HSC (células hepáticas estelares), antes conocidas como células de Ito, lipocitos o células almacenadoras de grasa, se identificaron como la fuente celular dominante de ECM o cicatriz. El desarrollo de métodos reproducibles para aislar estas células de roedores y humanos con una alta pureza facilitó su investigación, inicialmente en HSC aisladas luego de su “activación” en cultivo y posteriormente mediante análisis “in vivo”.

La fibrogénesis, o la generación de cicatriz, es un proceso dinámico a una la lesión crónica que se caracteriza por la acumulación continua de MEC fibrilar, asociada con la degradación y remodelación simultáneas de la matriz. Al igual que los trastornos fibrogénicos en otros órganos y tejidos, la fibrosis es una respuesta de curación de heridas bien orquestada. La respuesta a una lesión crónica difiere sustancialmente de una lesión tisular aguda, en la que no hay cicatrización progresiva. Desde una perspectiva evolutiva, la fibrogénesis es una respuesta lógica al daño tisular, al encapsular la lesión y mantener la integridad del tejido durante un tiempo suficiente para permitir la reparación de la especie. Sin embargo, con el tiempo, la respuesta fibrótica deteriora la regeneración hepática y acorta la esperanza de vida, aunque en un marco de tiempo que ya no pone en peligro la reproducción de la especie. En términos clínicos, la fibrosis tisular moderada generalmente no se asocia con signos clínicos significativos o disminución de la función de los órganos, pero es un determinante importante del pronóstico durante décadas y, a veces, en intervalos más cortos.

## PRINCIPIOS BÁSICOS

Las HSCs activadas son los efectores clave de la fibrogénesis a través del aumento del depósito de ECM fibrilar y la liberación de citocinas, quimiocinas y otros mediadores que establecen, junto con las células inflamatorias, un entorno profibrogénico, que afecta negativamente la regeneración del parénquima hepático.

Aunque las HSC son la fuente principal de miofibroblastos en el hígado, otros tipos de células contribuyen al conjunto de miofibroblastos fibrogénicos en la enfermedad hepática crónica. En particular, los miofibroblastos portales, que se ubican alrededor de los conductos biliares y generan fibrosis biliar. Los miofibroblastos derivados de la médula ósea también se han implicado en pequeño grado en el proceso de fibrosis.

La activación de HSC es estimulada por hepatocitos dañados y apoptóticos a través de varias vías convergentes.

Estos incluyen (1) alteración de la ECM normal en el espacio de Disse como consecuencia del daño de los hepatocitos y la infiltración inflamatoria; (2) liberación de especies reactivas de oxígeno y otros mediadores fibrogénicos/proinflamatorios; y (3) reclutamiento de células inmunitarias, que a su vez mantienen la activación de HSC.

La atención se ha centrado en el microambiente profibrótico del hígado, con un interés creciente en el papel de las células inmunitarias y subconjuntos específicos de macrófagos que regulan la progresión o la regresión de la fibrosis (ver más abajo) y el papel de la microbiota intestinal. Otros estímulos fibrogénicos incluyen la hipoxia tisular con el establecimiento de un ambiente proinflamatorio anaerobio y la influencia de las modificaciones epigenéticas en el condicionamiento la progresión de la fibrosis.

La fibrogénesis durante una lesión crónica aumenta la cantidad, composición y distribución de diferentes componentes de la ECM. En el hígado sano, la ECM en el espacio de Disse, el espacio entre las células endoteliales y los hepatocitos, se compone principalmente de colágeno IV y laminina. Durante la fibrosis progresiva, los colágenos fibrilares, especialmente los colágenos I y III, reemplazan estas estructuras similares a membranas basales de baja densidad. Los éxitos recientes en la descelularización del tejido hepático humano normal y fibrótico han arrojado conocimientos sobre el “matrisoma” hepático sano y específico de la enfermedad (es decir, las propiedades bioquímicas y biomecánicas de la ECM) y ha aclarado nuestra comprensión de, cómo las células interactúan y responden a un microambiente tisular sano o patológico. En particular, el entorno único de ECM específico de la enfermedad afecta tanto la diferenciación como la función de los hepatocitos y ayuda a explicar los procesos que promueven la progresión de la cirrosis y el desarrollo del Hepatocarcinoma (HCC).

Las LSEC (células sinusoidales hepáticas) tienen características únicas, incluida la presencia de poros, o fenestras, que generalmente se pierden a medida que se acumula la ECM subendotelial, en un proceso denominado capilarización. Las LSEC están implicadas en el mantenimiento de la mitosis de las HSC inactivas, la interferencia celular y en el soporte para la regeneración del hígado.

Aunque algunos estudios han comenzado a definir las respuestas de las LSEC mediante métodos unicelulares, pocos han identificado las características fenotípicas de las LSEC en la función hepática normal y cómo contribuyen en la lesión hepática, a la progresión y regresión de la fibrosis.

Los importantes avances técnicos en la captura de transcriptomas unicelulares tanto en tejidos como “in situ” ya están proporcionando una claridad sin precedentes sobre la función de las células individuales, su heterogeneidad y su evolución durante la progresión de la enfermedad, tanto en modelos animales, como en el hígado humano (ver a continuación, “Descubrimiento y Validación de Objetivos”).

## Necesidades no satisfechas

Con base en el progreso de los últimos 40 años, las nuevas oportunidades pueden proporcionar una comprensión más

profunda y precisa de la fibrogénesis en la enfermedad hepática humana.

1. A pesar del amplio conocimiento sobre los mecanismos celulares de la fibrosis hepática, este conocimiento se centra principalmente en las HSC. Los análisis transcriptómicos de células individuales pueden proporcionar información sin precedente sobre las interacciones entre todos los tipos de células involucradas en una respuesta fibrogénica y un microambiente en evolución en la progresión de la enfermedad. El "Santo Grial" es aprovechar estas herramientas para comprender mejor las relaciones íntimas entre el daño tisular, la regeneración, la fibrogénesis y el cáncer.
2. Muchos principios de la fibrogénesis se extraen de modelos bidimensionales en los que las HSC se activan y se cultivan en "plástico", lo que puede llevar a conclusiones erróneas sobre su comportamiento "in vivo". Un mayor refinamiento y estandarización de los modelos tridimensionales (3D) "in vitro", que recapitulan fielmente el microambiente de las enfermedades hepáticas humanas, acelerará el progreso.
3. La biología celular y molecular de la fibrogénesis hepática debe distinguir entre los mecanismos "centrales" (es decir, comunes a las enfermedades fibrogénicas que afectan a diferentes órganos y que se caracterizan por un papel evolutivo) y los mecanismos "reguladores", que son más específicos del tejido y específico de la enfermedad.
4. Ahora hay herramientas disponibles para la caracterización molecular y funcional en profundidad de los subconjuntos de macrófagos y LSEC en lesiones hepáticas, fibrosis y cáncer de hígado. Es probable que los esfuerzos para vincular estos tipos de células con respuestas de tejidos específicos, descubrirán vías importantes y objetivos terapéuticos.

## LAS CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE LA ETIOLOGÍA DE LA FIBROSIS HEPÁTICA Y LA CIRROSIS

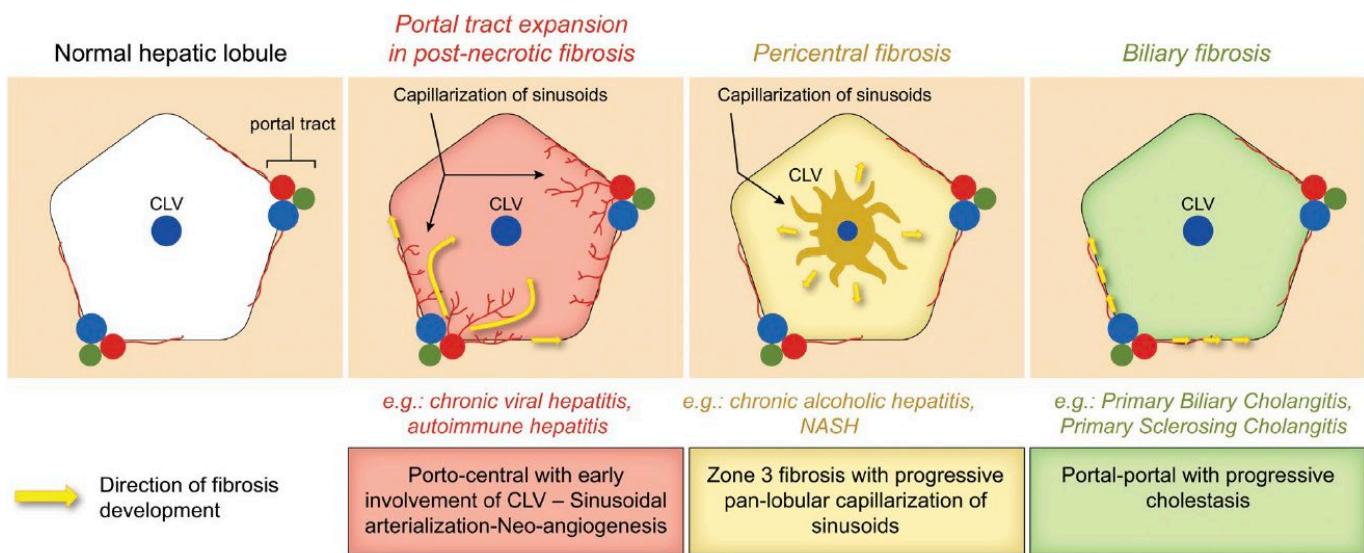
Existen distintos patrones de fibrosis relacionados con la etiología subyacente, que conducen a la cirrosis (Figura 1). Por ejemplo, la fibrosis biliar, que resulta de la doble proliferación de conductos biliares reactivos y células similares a miofibroblastos periductulares en la interfase portalparenquimatosa, conduce al desarrollo de fibrosis en una dirección portal-portal que genera nódulos con tabiques portal-portal que rodean el hígado y donde la vena central y sus conexiones con el tracto porta se conservan hasta etapas tardías. Por el contrario, en la hepatitis viral crónica, el patrón de fibrosis (denominado postnecrótico) resulta de la necrosis del puente portal-central (vena), creando así tabiques portal-centrales caracterizados por una neoangiogénesis evidente, lo que conduce a un trastorno de la conexión entre el sistema portal y la vena hepática. Esta desconexión vascular subyace a la hipertensión portal precoz, observada en este tipo de evolución fibrogénica. La llamada evolución fibrogénica de centro a central (vena) se observa típicamente en la obstrucción del flujo venoso (p. ej., insuficiencia cardíaca crónica) y se caracteriza por el desarrollo de tabiques de

centro a centro y "lobulación inversa". Finalmente, la fibrosis pericelular y perisinusoidal son típicas de las enfermedades del hígado graso alcohólico y no alcohólico, en las que el depósito de matriz fibrilar se concentra alrededor de las sinusoides (capilarización) y alrededor de grupos de hepatocitos (patrón de alambre de gallinero). Estos diferentes patrones de evolución fibrogénica están relacionados con: (1) la localización topográfica del daño tisular, (2) la relativa concentración de factores profibrogénicos, y (3) el (los) mecanismo(s) profibrogénico(s) predominante(s). Además, estos diferentes patrones pueden indicar la participación de diferentes efectores celulares de la fibrogénesis o al menos diferentes subtipos de células fibrogénicas, como lo sugieren modelos animales recientes, que utilizan secuenciación de RNA de una sola célula. Los diferentes patrones zonales de fibrosis y etiologías también pueden dictar la tasa de progresión de la enfermedad hepática, la dinámica del infiltrado necroinflamatorio, y el inicio y progresión de la hipertensión portal.

La progresión de la fibrosis hepática a cirrosis, se caracteriza por cambios estructurales importantes que incluyen la capilarización de los sinusoides, la formación de septos fibrosos que rodean las regiones del parénquima hepático y una neoangiogénesis extensa con la formación de cortocircuitos vasculares intrahepáticos, entre el los sistemas portal y de venas hepáticas. Además, la extensión de la neoangiogénesis, depende de los diferentes patrones de evolución fibrogénica, con la más alta expresión en la forma postnecrótica, después de la infección crónica por VHC.

En conjunto estas observaciones sugieren que el tipo de cirrosis, basado en la etiología y el patrón, puede influir en el manejo clínico y los posibles objetivos antifibróticos. De hecho, el término cirrosis implica tradicionalmente un pronóstico adverso relacionado con las complicaciones de la hipertensión portal, el cáncer hepático y la insuficiencia orgánica. En términos clínicos generales, la cirrosis se define como "compensada" y "descompensada" según el grado de presión portal y la aparición de complicaciones clínicas. Sin embargo, esta clasificación dicotómica es una simplificación excesiva que pasa por alto eventos biológicos críticos, incluida la presencia y el vigor de la regeneración. Además, no refleja el continuo de progresión de la fibrosis, con una variedad de opciones terapéuticas específicas por etapa. En este contexto, existe la necesidad de definir criterios de valoración favorables y desfavorables y de una evaluación clínico-patológica integrada.

Dicha evaluación debe incluir la etiología, el grado de actividad, la comorbilidad, los factores de riesgo de malignidad y las características potencialmente sugestivas de enfermedad progresiva. De todos modos, la estratificación actual de la cirrosis, independientemente de la etiología, todavía se basa en la detección y seguimiento de la hipertensión portal. El estándar de oro para la evaluación de la hipertensión portal, es el gradiente de presión venosa hepática (HVPG), es decir, la diferencia entre las presiones venosas hepáticas en cuña (WHVP) y libres. HVPG es el gradiente entre las presiones en la vena porta y la porción intraabdominal de la vena cava inferior, mientras que WHVP en realidad refleja la presión



**FIGURA 1.** Diferentes patrones de evolución fibrótica en distintas hepatopatías crónicas. Se ilustran los tres patrones principales de evolución fibrótica. El patrón “postnecrótico” es típico de la hepatitis viral crónica y se caracteriza principalmente por una evolución portocentral con compromiso temprano de la vena centrolobulillar. La arterialización sinusoidal y la neoangiogénesis también son típicas de este patrón. La fibrogénesis que se origina en la zona lobulillar 3 (“fibrosis pericentral”) es una característica principal de la hepatitis alcohólica crónica y NASH. Aquí, la principal característica es la capilarización de los sinusoides en la zona 3 que progresivamente se vuelve panlobulillar. La fibrosis biliar, una característica clave de la colangitis biliar primaria y la colangitis esclerosante primaria, evoluciona principalmente de portal a portal con empeoramiento progresivo de la colestasis. CLV, vena centrolobulillar.

sinusoidal hepática y no la presión portal en sí. Mientras que el HPVG normal es de 1 a 5 mm Hg, los valores más altos indican la presencia de hipertensión portal, y el HPVG  $\geq 10$  mm (denominado hipertensión portal clínicamente significativa), predice el desarrollo de complicaciones de la cirrosis, que incluyen la muerte. La HVPG  $> 12$  mm Hg representa el nivel umbral de hipertensión portal que podría conducir a hemorragia por várices.

### Necesidades no satisfechas

- En base a los patrones divergentes de fibrosis entre etiologías, es posible que el desarrollo de hipertensión portal y sus características clínicas también dependan de la etiología. Dado que el HVPG es la única medida estándar directa en la que se basan las decisiones clínicas y los parámetros no invasivos, puede ser necesario “restablecer” los umbrales del HVPG según la etiología de la cirrosis. De hecho, datos recientes indican que los umbrales clásicos del HVPG, desarrollados principalmente en la cirrosis por VHC, no reflejan el riesgo de manifestaciones clínicas en la cirrosis por EHNA, en la que pueden desarrollarse complicaciones graves cuando el HVPG aún es  $<10$  mm Hg.
- El análisis de la composición de la MEC (matrisoma) en la cirrosis puede ser diferente según la etiología y, por lo tanto, se deben buscar las firmas de proteínas específicas según la etiología. Usando este enfoque, puede ser posible identificar fragmentos de desprendimiento de ECM específicos en plasma u orina para ser empleados como biomarcadores específicos de enfermedades, de estadificación y/o de pronóstico.

### REVERSIBILIDAD DE LA FIBROSIS HEPÁTICA Y DE LA CIRROSIS

La severidad de la fibrosis hepática se encuentra entre los predictores más fuertes de los resultados clínicos de las enfermedades hepáticas crónicas, especialmente NASH, y, por lo tanto, la investigación actual se centra en determinar, cuándo es posible la mejoría de la fibrosis y cuáles son sus mecanismos subyacentes. En comparación con las lesiones crónicas en otros órganos, la progresión de la fibrosis en el hígado es generalmente lenta y evoluciona durante décadas. Es probable que esta progresión más lenta, refleje la notable capacidad regenerativa del hígado y también puede explicar la mejora espectacular de la fibrosis que se observa cuando se elimina la causa subyacente. No obstante, los mecanismos subyacentes que vinculan la fibrosis y la regeneración son escasos. Desde una perspectiva práctica, documentar la regresión de la fibrosis, definida como una reducción en el contenido de ECM, es más crítico en pacientes con cirrosis, con la expectativa de que los resultados clínicos puedan mejorar. En un análisis combinado de pacientes con cirrosis por NASH en dos ensayos clínicos negativos, aquellos cuya cirrosis retrocedió tuvieron significativamente menos eventos clínicos. Para los pacientes sin cirrosis, un criterio de valoración primario razonable, es simplemente la atenuación de una mayor progresión, de modo que la cirrosis nunca se desarrolle. De hecho, las agencias reguladoras consideran que la prevención de la progresión a cirrosis es un criterio de valoración clínico “duro” porque el diagnóstico de cirrosis confiere un riesgo creciente de complicaciones.

La regresión de la fibrosis en pacientes con enfermedad hepática crónica se ha reconocido durante décadas, en pacientes en los que la enfermedad subyacente está atenuada,

por ejemplo, en aquellos curados de VHC, después de la supresión antiviral del VHB o después de la descompresión biliar quirúrgica en la fibrosis secundaria de vías biliares, entre otros [revisado en Friedman y Bansal y en Rockey y Friedman]. Con base en estas observaciones clínicas, combinadas con los avances en las décadas de 1980 y 1990, con el aislamiento y caracterización de tipos de células individuales en el hígado, hubo una serie de estudios en ese momento, que buscaban mecanismos potenciales para explicar estas observaciones clínicas notables. De hecho, se describió una lista creciente de proteasas candidatas que degradan los constituyentes de las cicatrices y sus fuentes celulares, lo que condujo a modelos de degradación de la matriz en el hígado, en los cuales, ambos, las HSC como los macrófagos hepáticos, estaban implicados como fuentes de metaloproteinasas de la matriz (MMP). La actividad de estas enzimas está regulada, además, por concentraciones relativas de moléculas inhibidoras conocidas como Inhibidores Tisulares de Metalo Proteinasas (TIMP). En la lesión hepática, la producción elevada de TIMPs por parte de las células estelares, se ha implicado como un importante reóstato funcional que restringe la actividad de estas MMPs. Un estudio clave reciente, estableció que, los macrófagos son una fuente de proteasas de la matriz, al demostrar que su agotamiento en modelos de ratón afectó el nivel de regresión de la fibrosis. El trabajo adicional definió aún más, los subconjuntos específicos de macrófagos críticos para la degradación de la matriz en modelos de ratón, especialmente los macrófagos Ly6C y otros [revisados en Roderfeldy Geervliet y Bansal]. En conjunto, existe evidencia de la producción de proteasa por múltiples tipos de células en el hígado, incluidos macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, endotelio sinusoidal, epitelio biliar y células progenitoras. La evidencia en los primeros modelos de ratón, ha reforzado la promesa terapéutica de comprender la regulación de las proteasas en el hígado con base en la evidencia de que el aumento o la atenuación de la actividad de las proteasas de la matriz, podrían influir aún más en la acumulación neta de fibrosis.

A pesar de esta promesa, sigue siendo difícil lograr una comprensión coherente de qué proteasas, células e inhibidores, regulan la regresión de la fibrosis en el hígado humano y en los modelos experimentales se mantiene impreciso; y el campo se ha movido en gran medida a otros desafíos en la comprensión de la biología del hígado. Este cambio radical puede haber reflejado la creciente disponibilidad de modelos de ratones “knockout” para estudiar otras vías más manejables, combinado con fallas en los ensayos clínicos que utilizaron inhibidores de MMPs para atenuar otras enfermedades como la artritis, lo que sugirió que la biología de la degradación de la matriz era más compleja de lo que se pensaba originalmente. De hecho, los estudios clínicos iniciales de los inhibidores o activadores de las proteasas en otros tejidos, ninguno de los cuales tuvo éxito, probablemente fueron bastante ingenuos al suponer que había suficiente conocimiento sobre las actividades pleiotrópicas de las MMPs y sus inhibidores y los sustratos nativos de estas enzimas “in vivo”.

El rápido avance en el 2021, permitió el conocimiento

a profundidad sobre la biología de la degradación de la matriz, que se ha expandido enormemente, lo que exige un nuevo compromiso de los investigadores del hígado. Ahora sabemos que las MMPs son parte de una gran superfamilia de metzincina que se compone de cuatro subfamilias: matrixinas, astracinas, serralisininas bacterianas y adamalisinas [ver Geervliet y Bansal y Chuang et al. para excelentes revisiones]. Entre las MMPs humanas, hay seis grupos distintos que incluyen colagenasas, estromelisininas, gelatinasas, matrilisininas, metaloproteinasas unidas a la membrana y otras.

Además, las funciones de estas enzimas se han ampliado mucho más allá de la degradación de la matriz, para incluir la escisión de las moléculas de la superficie celular, la activación de factores de crecimiento latentes y la regulación de la señalización celular, además de servir como marcadores de la actividad y el pronóstico de la enfermedad. Entre muchos ejemplos, MMP-7 se descubrió en una pantalla proteómica imparcial, como un marcador de pronóstico de atresia biliar, insinuando la biología de esta molécula cuya elucidación adicional podría proporcionar una visión mecánica de la enfermedad.

También hay una biología emergente de Mediadores de Prorresolución Especializados (SPMs, por sus siglas en inglés), que están implicados en la resolución de la inflamación, lesión y fibrosis hepáticas, especialmente en NASH. Estas son una familia de moléculas lipídicas derivadas de omega-3. ácidos poliinsaturados con receptores bien caracterizados, que pueden afectar significativamente la infiltración de células inflamatorias y la progresión de la enfermedad hepática.

Así como hay “especies lipotóxicas” cuya evanescencia las hace difíciles de detectar en NASH, también hay especies de lípidos saludables cuya caracterización adicional es un área fértil para explorar terapias potenciales. Por ejemplo, un estudio reciente identificó un SPM, mare-sin-1, como preventivo de inflamación y progresión de NASH a través de su agonismo del receptor nuclear de tirosina kinasa, como receptor huérfano alfa en un modelo murino. No está claro si las SPMs contribuyen igualmente a antagonizar la enfermedad hepática por otras causas además de NASH o si impactan directamente en las células estelares/miofibroblastos activados para reducir la fibrogénesis o inactivar estas células; por lo tanto, estas son preguntas emocionantes para buscar respuestas.

En paralelo a estos avances, el desarrollo y la aplicación de tecnologías analíticas unicelulares para el hígado, se han disparado en los últimos 2 años. Una cantidad rápidamente creciente de conjuntos de datos que revelan los transcriptomas y proteomas específicos de células completas de la enfermedad hepática humana y los modelos de roedores han creado nuevas oportunidades para caracterizar las interacciones ligando-receptor y definir objetivos terapéuticos, entre otras aplicaciones, que se combinan con técnicas que incluyen la transcriptómica espacial y la proteómica espacial, estas tecnologías, prometen revolucionar nuestra comprensión de los mecanismos de las enfermedades y el desarrollo de fármacos.

## Necesidades no satisfechas

Estos emocionantes avances biológicos y técnicos conjuntamente, nos obligan a revisar los mecanismos de degradación de la matriz en la regresión de la fibrosis hepática. Ahora existe el conocimiento y la experiencia para abordar varias cuestiones clave:

- A. ¿Cuáles son los sitios celulares de expresión de todos los RNAm y proteínas de proteasas de mamíferos conocidos en el hígado normal y lesionado? Seguro que surgen sorpresas. Por ejemplo, el interrogatorio de un conjunto de datos transcriptómicos de una sola célula de cirrosis humana, revela múltiples fuentes celulares de TIMP-1 (datos no mostrados), a pesar de que las HSC se habían definido como la única fuente reconocida en estudios anteriores.
- B. ¿La expresión de RNA se correlaciona con la expresión de proteínas para proteasas y sus inhibidores?
- C. ¿Cuáles son las funciones o vías adicionales que regulan la expresión de inhibidores y proteasas de matriz, y qué dianas terapéuticas descubrirán?
- D. ¿Las vías que regulan la degradación de la matriz se conservan en los tejidos o son exclusivas del hígado? ¿Estas vías son las mismas en todas las enfermedades hepáticas y estadios de fibrosis?
- E. ¿Cuáles son los sustratos endógenos y los resultados biológicos de las acciones de las proteasas en el hígado normal y lesionado y durante la progresión o regresión de la fibrosis?
- F. ¿Dónde están activas las proteasas dentro del hígado normal y lesionado, y cuáles son las células y los sustratos con mayor probabilidad de ser regulados por ellas?
- G. ¿Las proteasas son la base del vínculo entre la regresión de la fibrosis y la regeneración? El hígado es notable porque la regeneración saludable no induce fibrosis, mientras que la fibrosis avanzada impide la regeneración. Por lo tanto, ¿cuáles son los elementos de la regresión de la fibrosis asociados con la curación de la enfermedad hepática subyacente que también conducen a una función hepática mejorada, por ejemplo, en pacientes tratados de forma efectiva por hepatitis B o C?

Estas preguntas resaltan la enorme necesidad y la oportunidad de avanzar en nuestra comprensión de la degradación de la matriz y su vínculo con la regeneración del hígado en la enfermedad hepática humana. Es seguro que los continuos avances tecnológicos facilitarán aún más el estudio de estas cuestiones importantes y poco exploradas.

## EVALUACIÓN DE LA FIBROSIS HEPÁTICA

La histopatología ha sido una herramienta fundamental en el diagnóstico y tratamiento de los trastornos hepáticos. No obstante, la evaluación de la fibrosis hepática en la enfermedad hepática crónica, era meramente descriptiva hasta principios de la década de 1990, cuando el descubrimiento del VHC y el lanzamiento de ensayos terapéuticos para la hepatitis viral llevó al desarrollo de sistemas de puntuación semicuantitativos, los cuales permitieron definir diferentes etapas de enfermedad

progresiva. Estos esfuerzos concluyeron que el estadio de fibrosis es el predictor individual más importante y significativo de morbilidad y mortalidad. Sin embargo, en la práctica clínica, la cuantificación de la fibrosis sigue siendo semicuantitativa y subjetiva. La introducción de la morfometría asistida por computadora, que permite la evaluación cuantitativa y objetiva de la fibrosis hepática, es un intento de ir más allá de los sistemas semicuantitativos. Como se destacó anteriormente, el Área Proporcional de Colágeno (CPA) puede subclasificar con precisión la cirrosis y es el único predictor validado de descompensación clínica en comparación con todos los demás sistemas de subclasificación histológica descritos hasta la fecha. A pesar de ello, los sistemas semicuantitativos siguen siendo ampliamente utilizados en la práctica clínica y en los ensayos clínicos, aunque son menos apropiados que el CPA. El advenimiento de la patología digital, que ahora puede basarse en técnicas de escaneo para imágenes de portaobjetos completos, aumentará exponencialmente la velocidad y la flexibilidad en la evaluación de imágenes histopatológicas digitales y finalmente facilitará la aplicación de inteligencia artificial (IA), con la creación de máquinas con algoritmos de diagnóstico de aprendizaje (ML). Recientemente, se demostró que un modelo de ML basado en portaobjetos de biopsia de hígado teñidos con tricrómicos predice, por ejemplo, hipertensión portal clínicamente significativa en pacientes con NASH y cirrosis.

Actualmente, la elastografía, la ecografía, la TC y la RM son las principales modalidades de diagnóstico por imágenes utilizadas en hepatología. En particular, la utilidad de los biomarcadores basados en RM para la detección de características de NAFLD y su uso potencial en la clínica o en la investigación clínica en NAFLD, está avanzando rápidamente. En este contexto, las imágenes hepáticas funcionales también pueden acelerar el desarrollo de nuevos tratamientos para NASH; especialmente cuando el modo de acción de estos fármacos puede reflejarse mejor en los cambios de la función hepática.

Una de estas modalidades, la resonancia magnética realizada con ácido etoxibencil dietilentriamina pentaacético de gadolinio (Gd-EOB-DTPA), se basa en el uso de un agente de contraste de resonancia magnética, específico para el hígado, gadoxetato disódico que, cuando se inyecta por vía intravenosa, se absorbe en los hepatocitos, a través del transportador del polipéptido 1 transportador de aniones orgánicos y se excreta en la bilis a través del transportador de la proteína 2 asociada a la resistencia a múltiples fármacos. En particular, la RM realizada con Gd-EOB-DTPA tiene una excelente correlación con la evaluación histopatológica de la fibrosis hepática y su estadificación.

## Necesidades no satisfechas

- A. La validación de la IA (Inteligencia Artificial) en el análisis de datos de imágenes digitales y la patología, junto con los registros médicos electrónicos, abrirá una nueva era de la medicina de precisión en la Hepatología lo que transformará progresivamente la práctica clínica. Los esfuerzos en curso deben superar la inercia para resistir

- el cambio y, en su lugar, promover la validación y adopción de estas tecnologías emergentes.
- B. Las funciones del hepatólogo, el patólogo y el radiólogo deben evolucionar a medida que la medicina de precisión basada en IA se integra en la atención clínica. Cuánto deben confiar estos especialistas en estos métodos y cómo pueden aprovecharse de manera efectiva para mejorar los resultados, estos serán desafíos continuos.
- C. La estratificación de la cirrosis, que actualmente se basa en gran medida en indirectos, debe basarse en cambio en biomarcadores precisos que cuantifiquen con mayor precisión los cambios sutiles en la función hepática, la hemodinámica, la inmunidad y la inflamación, y la regeneración. Tal clasificación multidimensional puede incorporar características moleculares y celulares, tanto en el hígado como en la sangre, junto con las lecturas funcionales y de imágenes.

## EVALUACIÓN NO INVASIVA DE LA FIBROSIS HEPÁTICA

Hay una gran necesidad de metodologías para evaluar en forma no invasiva la estructura y función hepática con precisión y reproducibilidad. Actualmente, las agencias reguladoras requieren biopsias de hígado para mostrar evidencia de beneficio en estudios de fase 2B o fase 3, antes de la posible aprobación de terapias antifibróticas. Sin embargo, es axiomático que la biopsia hepática deba ser reemplazada como método para evaluar la fibrosis, debido a su invasividad, la variabilidad del muestreo y la naturaleza estática de la información que proporciona. Además, un número cada vez menor de gastroenterólogos y hepatólogos realizan biopsias y, por lo tanto, la experiencia entre ellos está disminuyendo, mientras que las biopsias son realizadas por radiólogos, al menos en los Estados Unidos.

Los ensayos clínicos en enfermedades fibróticas de otros órganos, por ejemplo, los pulmones, no se basan en el análisis de tejidos, sino en lecturas clínicas, de imágenes y pruebas funcionales; y, sin embargo, ningún órgano tiene un repertorio funcional más rico que el hígado, lo cual no está suficientemente aprovechado por las tecnologías más utilizadas. Además, incluso la aprobación de medicamentos antifibróticos basados en la mejora de la biopsia, será condicional y requerirá evidencia a largo plazo de mejores resultados clínicos para su aprobación completa porque la biopsia se considera un "sustituto" de los criterios de valoración "duros" de mejorar, la forma en que el paciente se siente, funciona o sobrevive (es decir, mejoría clínica). Independientemente, mientras se requieran biopsias, los esfuerzos para validar métodos digitales altamente cuantitativos para evaluar todos los elementos de la biopsia, combinados con enfoques de ML, deben explorarse lo más rápido posible, como se destaca en la sección anterior.

Los diagnósticos no invasivos para fibrosis están evolucionando rápidamente. Las amplias clases de herramientas de evaluación no invasivas incluyen (1) análisis de suero, utilizando pruebas de laboratorio estándar (p. ej., Fibrosis-4), análisis patentados para componentes de

la matriz (p. ej., fibrosis hepática mejorada, propéptido de colágeno tipo III N-terminal [ProC3]/ProC5), proteómica, lipidómica, microRNA, y componentes del microbioma; (2) pruebas de diagnóstico por la imagen (TC, IRM o tomografía por emisión de positrones) que pueden cuantificar la grasa, la inflamación y la fibrosis del hígado, así como la rigidez del hígado como sustituto del contenido de la matriz (revisado en Besutti et al. y Ajmena y Loomba), también se están desarrollando técnicas para obtener imágenes del contenido de colágeno usando directamente sondas específicas de colágeno, (3) evaluación del microbioma, porque el patrón y la diversidad del microbioma para bacterias, hongos y virus que evolucionan con la progresión de la enfermedad; y (4) pruebas funcionales, que miden la derivación intrahepática, la actividad microsomal, o la actividad proteolítica en el hígado o en la circulación.

A pesar del progreso sustancial y la inversión significativa en el desarrollo de marcadores no invasivos de fibrosis hepática, ninguno ha sido capaz de suplantar a la biopsia. Hay una tendencia creciente a combinar las pruebas existentes o las que están en desarrollo, pero es demasiado pronto para determinar si tales esfuerzos alcanzarán los altos estándares de precisión y valor predictivo requeridos por las agencias reguladoras antes de que la biopsia pueda abandonarse como medida del contenido de fibrosis y la respuesta a la terapia. Además, los esfuerzos como estos se ven obstaculizados por el requisito de correlacionar los resultados con la biopsia y, por lo tanto, es más probable que su éxito se deba a la evidencia de que estas pruebas no invasivas predicen eventos clínicos, lo que requerirá estudios a largo plazo o validación en pacientes que tienen un riesgo más inminente de complicaciones (es decir, con fibrosis más avanzada).

## Necesidades no satisfechas

Además de la clara necesidad no satisfecha de reemplazar la biopsia, existen preguntas críticas que deben abordarse a medida que se desarrollan más las pruebas no invasivas:

- A. ¿Qué actividades biológicas debemos medir?
- ¿*Fibrogénesis versus contenido de fibrosis*? Debido a que existe un retraso de duración desconocida entre los cambios en la actividad fibrogénica de los miofibroblastos y su impacto en el contenido de fibrosis en el hígado, se debe invertir un mayor esfuerzo en caracterizar la actividad fibrogénica, con la esperanza de proporcionar una lectura más sensible y receptiva de la actividad del fármaco antifibrótico. Esfuerzos de este tipo podrían incluir medidas de actividad de unión por receptores celulares expresados en células fibrogénicas (p. ej., receptores para factor de crecimiento derivado de plaquetas beta [ $\beta$ -PDGF] o colágeno tipo VI, entre otros). Si bien varios de los paneles de marcadores séricos ampliamente utilizados incluyen ensayos de moléculas de matriz o sus fragmentos, los mecanismos subyacentes a su liberación en la sangre y los niveles circulantes no están bien caracterizados y, por lo tanto, su plausibilidad biológica no está completamente establecida. Por otro

lado, las imágenes específicas del colágeno hepático u otros componentes de la ECM pueden permitir una evaluación más directa de su contenido en hígado.

(ii). *¿Reserva funcional y regeneración?* Como se ha señalado, el hígado es un órgano funcionalmente rico que regula innumerables funciones metabólicas y homeostáticas, con un secretoma inigualable y, por lo tanto, los esfuerzos continuos para capturar lecturas funcionales de la salud y la enfermedad del hígado exigen una mayor inversión. En la cirrosis, medidas como el modelo para la puntuación de la enfermedad hepática en etapa terminal, que reflejan claramente la función, predicen contundentemente los resultados; sin embargo, no está claro si las características sutiles y pasadas por alto de la función hepática podrían detectarse en etapas más tempranas; datos iniciales usando la prueba HepQuant, insinúa que esto puede ser posible. Los esfuerzos para catalogar el proteoma y el lipidoma en la enfermedad hepática, son prometedores, pero los componentes analíticos candidatos, generalmente carecen de plausibilidad biológica (es decir, cómo contribuyen a la enfermedad hepática y por qué cambian), lo que socava el interés en su desarrollo. Por otro lado, la regresión de la fibrosis en pacientes curados del VHC o tratados por el VHB conduce a una función hepática mejorada asociada con la regeneración, sin embargo, casi no se ha hecho ningún esfuerzo por capturar las señales regenerativas, ya sea mediante la evaluación de las moléculas secretadas. o por imagen.

(iii). *¿Angiogénesis?* La angiogénesis es una parte vital de la reparación del hígado, pero también un requisito para la tumorogénesis y las distinciones mecánicas entre estos dos contextos no están aclarados. Aún así, se ha pasado por alto la evaluación cuantitativa de la actividad angiogénica como una lectura de la curación hepática o de respuesta a la terapia.

B. ¿Se requerirán diferentes marcadores no invasivos para las diferentes etapas de la enfermedad hepática o en diferentes enfermedades subyacentes? Es bastante probable que las diferentes etapas de la enfermedad tengan distintos impulsores patogénicos, especialmente en NASH donde el contenido de grasa disminuye con la progresión hacia la cirrosis. De manera similar, algunas características de la patogenia de la fibrosis son distintas en diferentes enfermedades y, por lo tanto, es probable que existan marcadores específicos de la enfermedad. Un ejemplo reciente y sorprendente es el microambiente inmunitario, que es distinto en NASH en comparación con otras etiologías de enfermedad hepática, de modo que los pacientes con NASH y HCC tienen menos probabilidades de responder a los inhibidores “checkpoint”. Del mismo modo, las diferencias sutiles, no detectables por la histopatología convencional o los marcadores de la enfermedad, bien pueden ser la base de las diferencias en la progresión o regresión de la fibrosis. De hecho, la evidencia preliminar indica que, entre los pacientes con

cirrosis, la regresión de la fibrosis en NASH puede ser menos probable que en otras enfermedades hepáticas, al menos después de la cirugía bariátrica.

C. ¿Se deben usar los marcadores solos o en combinación? El enfoque para combinar diferentes modalidades diagnósticas ha sido completamente empírico, buscando diferentes combinaciones de pruebas de sangre, de imagen y funcionales para definir el estadio de la enfermedad hepática y predecir los resultados clínicos. Sin embargo, los enfoques de macrodatos que usan ML y la IA brindan oportunidades incomparables para seleccionar de forma más racional los objetivos terapéuticos, definir el estadio de la enfermedad y predecir la respuesta a las terapias. Por supuesto, los nuevos algoritmos que usan estos enfoques son tan buenos como la calidad de los datos ingresados, especialmente características histológicas. Por lo tanto, la validación de algoritmos no invasivos, debe basarse en especímenes de biopsia de hígado altamente cuantificados, utilizando las estrategias de patología digital descritas anteriormente.

## DESCUBRIMIENTO Y VALIDACIÓN DE OBJETIVOS

El descubrimiento de objetivos antifibróticos es un campo muy dinámico, ya que aumenta la evidencia de la regresión de la fibrosis y la progresión atenuada en respuesta a terapias específicas de la enfermedad hepática humana (p.ej., antivirales). El enfoque convencional y más ampliamente utilizado requiere la identificación de moléculas cuyo antagonismo o agonismo podría influir en la fibrogénesis o en el recambio de la matriz en función de sus funciones biológicas conocidas. Luego, se pueden desarrollar propuestas terapéuticas específicas, que primero se prueban en cultivos celulares, luego en animales y finalmente en humanos, si el fármaco sigue siendo prometedor a través de estas etapas de desarrollo. Para identificar objetivos potenciales, existe una variedad rica y en expansión de datos disponibles que caracterizan la expresión de genes y proteínas tanto del dominio público y en los conjuntos de datos patentados derivados de tejidos de roedores, de humanos y en células aisladas. En particular, el análisis de células individuales ha permitido la construcción de mapas completos y detallados de la heterogeneidad de células fibrogénicas no solo en el hígado sino también en otros tejidos. Estas notables herramientas, no solo iluminan los subtipos de miofibroblastos en diferentes enfermedades hepáticas, sino que también nos permiten determinar si las terapias candidatas dirigidas a las células en el hígado, también podrían afectar otros tejidos, reduciendo así la posibilidad de efectos inesperados fuera del objetivo para terapias dirigidas al hígado. Estos conjuntos de datos masivos y complejos también requieren la asimilación de nuevas habilidades informáticas para extraer información relevante, pero pueden definir rápidamente objetivos potenciales en función de su(s) sitio(s) celular(es) y tisular(es) preferido(s) de expresión, localización (superficie celular, intracelular o circulación) y asociación con procesos biológicos específicos (p. ej., secreción, respuestas al estrés, apoptosis, proliferación y otros).

Además de estos enfoques “impulsados por hipótesis” para identificar objetivos basados en las funciones conocidas de las moléculas en la fibrosis, existen enfoques computacionales y de detección emergentes que son imparciales y no hacen suposiciones sobre lo que las moléculas podrían hacer en las enfermedades fibróticas. Los enfoques integrales de este tipo pueden aplicar perturbaciones específicas, como pequeños RNA de interferencia o pantallas CRISPR para definir vías críticas o mediadores cuya inhibición reduce la actividad fibrogénica en los miofibroblastos. Si bien se usa ampliamente para descubrir objetivos de cáncer, este enfoque también se puede aplicar para objetivos relacionados con la fibrosis tanto en células aisladas como “in vivo”. Los enfoques ortogonales que integran la expresión génica espacial, los datos proteómicos y los ensayos que identifican los objetivos genéticos que tienen cromatina abierta, utilizando el ensayo para la cromatina accesible a la transposasa con secuenciación de alto rendimiento, pueden aprovechar aún más estos enfoques imparciales para el descubrimiento de objetivos. Estas tecnologías pueden fortalecerse aún más mediante enfoques de ML, para refinar la identificación y validación de objetivos y mejorar la probabilidad de éxito clínico.

Otro enfoque imparcial, la reutilización de fármacos basada en computación, se ha validado en una serie de enfermedades, en las que se examina un gran número de fármacos existentes para determinar su capacidad de revertir la firma de un gen de la enfermedad en células cultivadas, identificando así candidatos con actividad potencial, cuya actividad inicial, no estaba relacionada con la fibrosis. Uno de nosotros [Scott. L. Friedman] ha utilizado este enfoque para identificar dos fármacos antifibróticos candidatos a pesar de no tener un vínculo previo con la biología de las células estelares o de la fibrosis hepática.

Complementando estos enfoques, los objetivos potenciales pueden surgir de estudios imparciales de asociación de todo el genoma que vincula variantes genéticas específicas con los resultados de la enfermedad. Por ejemplo, un polimorfismo en el gen “patatin like phospholipase domain containing 3” (PNPLA3 por sus siglas en inglés), está asociado con el riesgo de NASH, no solo a través de su efecto sobre el metabolismo de las grasas en los hepatocitos, sino también a través de una acción directa, efecto que mejora la actividad fibrogénica de las HSC debido a que las variantes genómicas a menudo se descubren dentro de genes previamente desconocidos, estos enfoques pueden revelar vías biológicas, como fue el caso con el descubrimiento de PNPLA3. Las terapias pueden evolucionar directamente a partir de información genómica de este tipo, replicando el efecto de variantes protectoras o antagonizando variantes causantes de enfermedades. Un ejemplo convincente ha sido la identificación de una variante en el gen de la Proproteína Convertasa Subtilisina/Kexina tipo 9 (PCSK9), que fue protectora contra la enfermedad de las arterias coronarias, lo que inmediatamente condujo a esfuerzos exitosos para antagonizar terapéuticamente a PCSK9. De manera similar, ahora hay esfuerzos en curso para alterar la función de PNPLA3 como una estrategia terapéutica

en NASH basada en la biología de la variante asociada a la enfermedad.

Si bien no existe un perfil ideal único de un objetivo antifibrótico expresado por células estelares/miofibroblastos activados, algunas características importantes deben incluir lo siguiente: (1) El objetivo es fácilmente accesible. Los receptores de la superficie celular son más sencillos de activar, pero los métodos están evolucionando para entregar cargas útiles intracelulares a la célula estelar, por ejemplo, usando un sistema de entrega liposomal que contiene vitamina A que entrega un RNA de horquilla corta dentro de la célula. (2) La inhibición o alteración del objetivo no interfiere con la función normal de las células estelares y del hígado. Una estrategia atractiva es apuntar a moléculas que solo son expresadas por células estelares/miofibroblastos activados, minimizando así cualquier impacto en las funciones homeostáticas de las células estelares, incluido el metabolismo de la vitamina A y el apoyo a la regeneración hepática. Un ejemplo temprano es el receptor PDGF-β, que se induce marcadamente durante la lesión, pero hay muchos otros. (3) El objetivo se expresa de forma más intensa o selectiva en el hígado lesionado. Si bien no existe una sola molécula que sea absolutamente específica de células estelares, los efectos fuera del objetivo en otros órganos pueden minimizarse interrogando conjuntos de datos de expresión génica para determinar los niveles de expresión de un objetivo candidato, tanto en el hígado normal como en otros tejidos. Además, los métodos de administración de fármacos podrían contribuir a la identificación de biomarcadores para emplear un enfoque de direccionamiento dual que requiere la participación de dos moléculas, que juntas pueden tener una especificidad mucho mayor. Por ejemplo, las células estelares expresan un heterodímero compuesto por el receptor tipo 1 de angiotensina II, combinado con el receptor cannabinoide tipo 1, cuya expresión puede estar más restringida al hígado.

En la farmacología de las potenciales terapias influirá su atractivo como tratamiento para la fibrosis hepática. Estas características incluyen la vía de administración, la frecuencia, la tolerabilidad, las interacciones farmacológicas y la seguridad. Si bien las moléculas pequeñas son más atractivas porque se pueden administrar por vía oral, algunos agentes biológicos más grandes, incluidos los anticuerpos y las formulaciones de ácido nucleico, se pueden administrar con poca frecuencia, a veces mensualmente o incluso con menos frecuencia, lo que reduce la ventaja de las terapias con moléculas pequeñas.

Las pruebas de candidatos a terapias antifibróticas pueden progresar de sistemas simples a sistemas más complejos y de animales pequeños a primates no humanos, antes de las pruebas clínicas en humanos. Cuanto más representativa sea una plataforma de prueba de su comportamiento “in vivo” en la enfermedad hepática humana, mayor será el nivel de confianza en su eficacia potencial como fármaco. Para las moléculas de acción directa destinadas a atenuar la fibrogénesis de células estelares, las células estelares tanto primarias como inmortalizadas de ratón y humanas son una sólida herramienta de validación inicial, siempre que

expresen las moléculas diana relevantes de manera similar a su expresión “in vivo”. Más recientemente, la generación de HSC a partir de células madre pluripotentes inducidas, han ofrecido la perspectiva de replicar antecedentes genéticos específicos dentro de las células que pueden contribuir al riesgo de enfermedad, la patogénesis y/o la actividad fibrogénica.

Los modelos de cultivo para probar agentes antifibróticos son cada vez más sofisticados en un esfuerzo por imitar mejor las propiedades físicas, químicas e intercelulares del hígado fibrótico humano. Estos enfoques incluyen organoides unicelulares o multicelulares, rebanadas de hígado cortadas con precisión de hígado humano o de roedores normales o enfermos, y el uso de sustratos de rigidez variable. Además, los dispositivos de hígado artificial (“Liver on a Chip”) buscan replicar sistemáticamente todos los elementos celulares, mecánicos y solubles del hígado humano utilizando componentes definidos en plataformas altamente reproducibles; estas tecnologías se optimizan aún más mediante el uso de la impresión 3D. Una tecnología relacionada, como se señaló anteriormente, es el uso de andamios 3D de ECM para evaluar con mayor precisión el impacto de los materiales derivados directamente del hígado humano como respuestas a los medicamentos.

Una discusión detallada de modelos animales para probar fármacos antifibróticos está más allá del alcance de este artículo y ha sido objeto de revisiones recientes, enfocadas especialmente en NASH. No obstante, los elementos clave de cualquier modelo que pruebe fármacos antifibróticos deben incluir lo siguiente: (1) La patogénesis de la enfermedad y el comportamiento de las células fibrogénicas deben imitar la enfermedad humana; (2) las dianas terapéuticas candidatas específicas deben ser expresadas por las mismas células y en niveles comparables a la enfermedad humana; (3) la eficacia debe validarse en más de un modelo, y los modelos deben ser mecánicamente distintos; (4) los medicamentos deben ser eficaces cuando se administran después de que la enfermedad ya está establecida, similar al entorno clínico, en lugar de únicamente preventivos; (5) la farmacología del fármaco debe ser similar entre roedores y humanos; (6) debe haber evidencia de compromiso con el objetivo, es decir, que el efecto de un fármaco debe atribuirse directamente a la interacción con su objetivo previsto y no a través de una actividad fuera del objetivo.

Si bien los modelos de fibrosis hepática en roedores han sido pilar de las pruebas de fármacos durante décadas, existe una creciente frustración con su relevancia y su traducción a la eficacia de los fármacos en humanos, especialmente porque ningún fármaco ha sido probado. Y aún no ha sido aprobado para la fibrosis hepática, a pesar de muchas perspectivas prometedoras basadas en estudios con animales. Este problema se ha abordado en revisiones recientes, y aquí destacamos tres puntos clave. (1) La contribución potencial del microbioma. Estudios Elegantes recientes demuestran que la composición del microbioma puede influir en la eficacia de los fármacos en modelos animales, de modo que el uso de animales con un microbioma de ratón salvaje más complejo

predice más fielmente los resultados posteriores en ensayos con humanos, aunque este hallazgo aún no se ha extendido a estudios que prueban fármacos antifibróticos. (2) Corta duración de la enfermedad en los animales. La enfermedad hepática humana evolucionó durante décadas, lo que permitió la reticulación progresiva del colágeno que lo hace más insoluble y la distorsión de la arquitectura hepática. Es posible que estas características críticas no se reproduzcan por completo en el intervalo relativamente corto que se utiliza para los modelos de roedores que prueban los fármacos antifibróticos. (3) Debido a que múltiples vías impulsan las terapias para la NASH, es posible que no sea suficientemente activo dirigirse a una sola vía o molécula. Un estudio reciente ha definido redes de expresión génica que juntas estimulan la fibrosis en NASH, lo que implica que puede ser necesaria la interrupción de múltiples vías para lograr un beneficio terapéutico. (4) El NASH puede estar compuesta por diferentes subtipos que tienen diferentes impulsores de la enfermedad y, por lo tanto, diferentes objetivos terapéuticos. Se han descrito subtipos de enfermedades, también llamados endofenotipos, tanto en la diabetes como en el NASH, pero aún no se han explotado para enriquecer los ensayos clínicos con subgrupos específicos de pacientes.

## Necesidades no satisfechas

- A. Aprovechar nuevas y poderosas líneas tecnológicas para identificar y optimizar objetivos terapéuticos e identificar biomarcadores. Ha llegado el momento de aprovechar las tecnologías unicelulares y los algoritmos de reutilización de fármacos, impulsados por IA, para refinar los candidatos como objetivos terapéuticos. Estos esfuerzos deben complementarse con un análisis más profundo de muestras de hígado humano de pacientes en ensayos clínicos, tanto de los que responden como de los que no responden, para identificar qué marcadores se corresponden con un beneficio terapéutico. Dichos esfuerzos pueden no solo descubrir impulsores moleculares inesperados de eficacia, sino también identificar candidatos para biomarcadores de contenido o actividad fibrótica, que podrían producir diagnósticos no invasivos.
- B. Optimizar y validar líneas sólidas para pruebas preclínicas de fármacos. Los enfoques actuales consumen mucho tiempo y son demasiado optimistas para predecir la eficacia de los medicamentos utilizando modelos de enfermedades en roedores. Los refinamientos en estos modelos animales, posiblemente mediante la manipulación del microbioma, pueden complementarse con organoides más sofisticados y otros modelos “ex vivo” complejos, traduciéndose en predictores de eficacia derivados de tejidos humanos en estos procesos de mayor rendimiento.
- C. Para los estudios que dependen de la biopsia, validar los métodos de patología digital. El rico conjunto de datos generado por estos métodos establece una sólida justificación para evaluar su utilidad en la cuantificación de la respuesta a las terapias y la predicción de eventos

- clínicos. Estos esfuerzos requerirán acceso a un gran número de biopsias de hígado de cohortes longitudinales.
- D. Desarrollar fundamentos basados en datos para terapias combinadas. Los ensayos clínicos realizados hasta la fecha con fármacos únicos en fibrosis por NASH, han mostrado una eficacia decepcionante, lo que ha provocado esfuerzos para probar terapias combinadas que atacan diferentes dianas subyacentes de la patogenia de la enfermedad. Sin embargo, la elección de las combinaciones ha sido totalmente empírica y, a menudo, determinada por los fármacos disponibles para un patrocinador comercial. Se deben acelerar los esfuerzos para aprovechar los sistemas preclínicos o de alto rendimiento (p. ej., organoides) para evaluar las respuestas transcriptómicas o proteómicas globales a un gran número de combinaciones. Aquellas combinaciones que son sinérgicas pueden evaluarse adicionalmente utilizando modelos de enfermedad “in vivo”.
- E. Buscar la caracterización de los subtipos de enfermedad que pueden responder mejor a los antifibróticos. Actualmente, solo se usa la etapa de fibrosis para seleccionar subgrupos de pacientes para ensayos de tratamiento, aunque puede haber objetivos específicos que definen subgrupos en función de los datos genéticos y de expresión génica. La identificación precisa de tales pacientes podría enriquecer enormemente los ensayos clínicos y mejorar las respuestas al tratamiento.

## ENSAYOS CLÍNICOS DE ANTIFIBRÓTICOS

Casi todos los ensayos clínicos actuales y planificados dirigidos a la fibrosis se centran en el NASH, que ha sido objeto de varias revisiones. Entre los objetivos antifibróticos en el NASH, varios se dirigen específicamente a la activación de las células estelares o la fibrogénesis, sin embargo, ninguno ha sido aprobado todavía y, por lo tanto, no se revisan en detalle aquí. Los enfoques generales de las terapias antifibróticas se pueden subdividir en los siguientes: (1) agentes que se dirigen directamente a las HSC o sus componentes, incluidas las moléculas fibrogénicas, proliferativas, apoptóticas y/o contráctiles, así como estrategias basadas en células para eliminar las células senescentes. - células tardías -; (2) fármacos que modifican la inflamación o lesión para reducir las señales fibrogénicas que activan las células estelares; (3) moléculas que se dirigen a la estructura de ECM y la reticulación para reducir su estabilidad y acumulación; (4) agentes que provocan la degradación de la matriz, al amplificar las células que conducen la proteólisis y/o al desenmascarar la actividad proteolítica, por ejemplo, al inhibir los TIMPs. Entre estos, los esfuerzos más avanzados han sido las terapias directas con células estelares, los modificadores de la inflamación y las lesiones, y los inhibidores del entrecruzamiento del colágeno; pero ninguno ha demostrado eficacia en ensayos con humanos. Los enfoques descritos en la sección anterior continuarán perfeccionando estos objetivos y buscarán su eficacia en modelos preclínicos y ensayos clínicos iniciales.

Desde la perspectiva de un ensayo clínico, hay tres

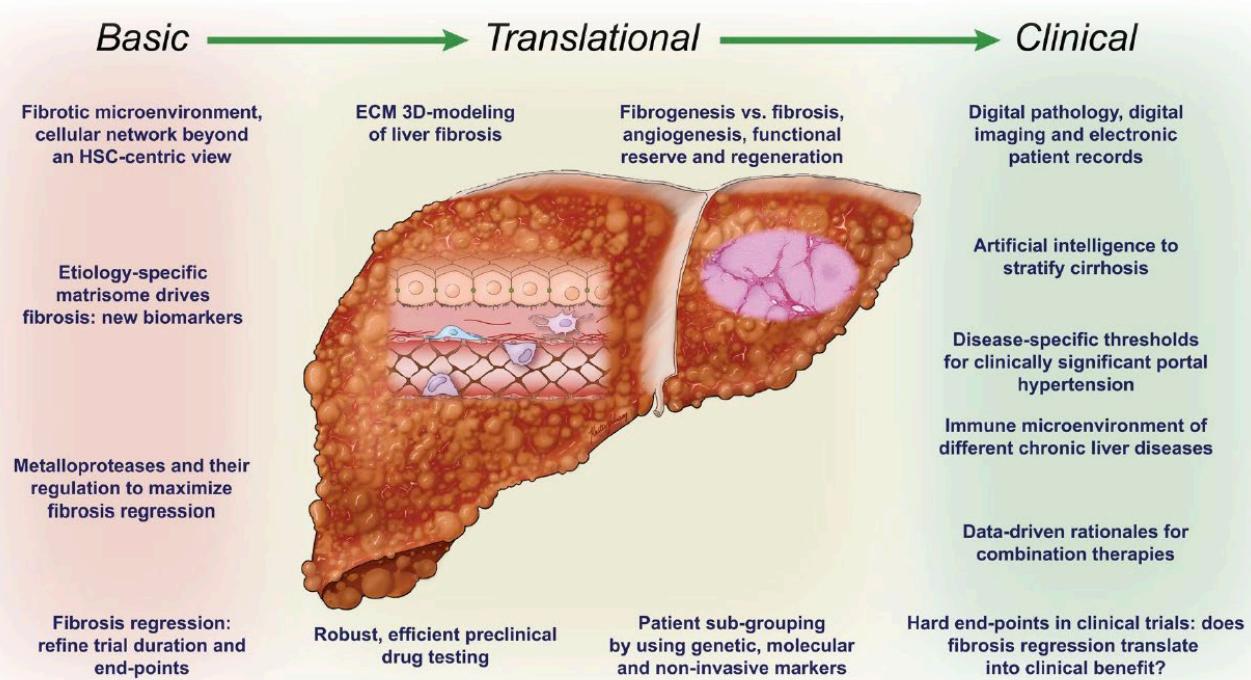
cuestionamientos clave en la evaluación de las terapias antifibróticas y son: qué medir, cómo medirlo y cuánto tiempo deben de llevarse a cabo los ensayos. Como se detalló anteriormente, el campo se ve frenado por la falta de marcadores robustos no invasivos de fibrosis y fibrogénesis, que puedan evaluar la eficacia a intervalos progresivos sin biopsia. Para NASH, la mayoría de los ensayos son de 6 a 18 meses, pero este intervalo es en gran medida empírico. Los estudios de historia natural de la hepatitis B y C, así como del NASH, sugieren que es posible cierta reducción de la fibrosis en un año o menos, pero es mayor a los 5 años. Además, mientras que se ha documentado la reversión de la cirrosis en el VHB y el VHC, esto no se ha observado de forma consistente en la cirrosis por NASH. Desafortunadamente, los modelos animales no son muy informativos a este respecto, ya que todo el proceso de la enfermedad que lleva décadas en los humanos se reduce a semanas o meses en los roedores.

Las metas y objetivos de la terapia antifibrótica en el hígado también deberán tener en cuenta el estadio de la enfermedad. Los pacientes con estadios intermedios de fibrosis pueden beneficiarse clínicamente simplemente atenuando la progresión, mientras que aquellos con cirrosis probablemente se beneficiarán si una terapia induce la degradación de la matriz y provoca la regeneración hepática con una función sintética mejorada. Actualmente, los ensayos dividen a los pacientes entre cirróticos y no cirróticos, ésta es una distinción contundente y se beneficiará de una mayor claridad sobre el punto en el que la fibrosis o la cirrosis ya no son reversibles (es decir, “el punto de no retorno”).

El progreso más amplio en el campo de las terapias antifibróticas, también ha sido decepcionantemente lento. Dada la capacidad regenerativa única del hígado, la mayoría de las enfermedades crónicas, incluida el NASH, requieren décadas para acumular suficiente cicatriz para comprometer la función del órgano, mientras que, en el pulmón, por ejemplo, la enfermedad lleva una mortalidad significativa dentro de los 3 a 5 años. Por lo tanto, puede haber mayores perspectivas de éxito con los antifibróticos en el hígado que en otros tejidos. Sin embargo, solo la fibrosis pulmonar tiene dos medicamentos aprobados, pirfenidona y nintedanib; pero estos solo retrasan la tasa de deterioro y son difíciles de tolerar debido a los efectos adversos y no existen terapias antifibróticas aprobadas para ningún otro órgano o afección. No obstante, el ritmo del progreso en la comprensión de la patogénesis de la enfermedad y la regulación de la fibrosis se ha acelerado, y no hay duda de que los próximos años traducirán estos avances en terapias efectivas.

## Necesidades no satisfechas

- Aclarar las tasas de regresión de la fibrosis en diferentes enfermedades hepáticas en diferentes etapas para refinar la duración de los ensayos y los criterios de valoración. Los ensayos en pacientes con fibrosis o cirrosis más avanzada pueden ser menos “regresivos” y requieren más tiempo para lograr un beneficio clínicamente significativo
- Explorar las perspectivas para el enriquecimiento de ensayos antifibróticos al definir mejor los subgrupos de



**FIGURA 2.** Necesidades insatisfechas actuales en fibrosis hepática desde la perspectiva básica hasta la translacional y la clínica. Se muestran las necesidades insatisfechas y las brechas actuales en la fibrosis hepática descritas en esta revisión, en torno a una imagen de un hígado cirrótico dentro de la cual se encuentran los cambios celulares a la izquierda y la aparición de fibrosis a la derecha. Estas necesidades insatisfechas se muestran a lo largo del continuo desde la investigación básica hasta la translacional y la clínica.

pacientes utilizando marcadores genéticos, moleculares y no invasivos. Si bien alcanzar este objetivo no es inminente, la aclaración de los factores y objetivos de la enfermedad en diferentes grupos de pacientes mejorará las perspectivas de ensayos clínicos más concluyentes, incluso si esto significa que los medicamentos pueden aprobarse para cohortes de pacientes más pequeñas y mejor definidas.

C. Diseñar ensayos clínicos que incluyan criterios de valoración estrictos, cuando sea posible. Debido a que una mejoría en la fibrosis es un criterio de valoración alternativo que puede no traducirse en un beneficio clínico, los ensayos más largos y/o aquellos que usan marcadores que predicen directamente los resultados clínicos tendrán un mayor atractivo para las agencias reguladoras, los proveedores y los pacientes.

La exploración en curso de la fibrosis hepática ha dado enormes frutos en la definición de determinantes celulares y moleculares clave de la enfermedad hepática crónica. Estos avances han llevado a un optimismo sostenido de que la fibrosis dará lugar a terapias antifibróticas eficaces que mejoren la vida de los pacientes con enfermedad hepática crónica. Seguramente llegará el éxito, pero hay más trabajo por hacer para abordar las necesidades insatisfechas (Figura 2). Esperamos que este artículo ayude a agilizar el progreso y fertilizar el campo en los próximos años.

## REFERENCIAS

1. Pinzani M, Macias-Barragan J. Update on the pathophysiology of liver fibrosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010;4:459–72.
2. Popper H, Uenfriend S. Hepatic fibrosis. Correlation of biochemical and morphologic investigations. *Am J Med.* 1970;49:707–21.
3. Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Bissell DM. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82:8681–5.
4. Pinzani M, Rombouts K. Liver fibrosis: from the bench to clinical targets. *Dig Liver Dis.* 2004;36:231–42.
5. Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol.* 2014;14:181–94.
6. Seki E, Schwabe RF. Hepatic inflammation and fibrosis: functional links and key pathways. *Hepatology.* 2015;61:1066–79.
7. Krenkel O, Tacke F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol.* 2017;17:306–21.
8. Higashi T, Friedman SL, Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017;121:27–42.
9. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14:397–411.
10. Lemoinne S, Thabut D, Housset C. Portal myofibroblasts connect angiogenesis and fibrosis in liver. *Cell Tissue Res.* 2016;365:583–9.
11. Xu J, Kisseleva T. Bone marrow-derived fibrocytes contribute to liver fibrosis. *Exp Biol Med (Maywood).* 2015;240:691–700.

12. Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology*. 2004;39:273–8.
13. Canbay A, Taimr P, Torok N, Higuchi H, Friedman S, Gores GJ. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Lab Invest*. 2003;83:655–63.
14. Casini A, Ceni E, Salzano R, Biondi P, Parola M, Galli A, et al. Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology*. 1997;25:361–7.
15. Novo E, Povero D, Busletta C, Paternostro C, di Bonzo LV, Cannito S, et al. The biphasic nature of hypoxia-induced directional migration of activated human hepatic stellate cells. *J Pathol*. 2012;226:588–97.
16. Maher JJ. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. *Semin Liver Dis*. 2001;21:417–26.
17. Ju C, Tacke F. Hepatic macrophages in homeostasis and liver diseases: from pathogenesis to novel therapeutic strategies. *Cell Mol Immunol*. 2016;13:316–27.
18. Marra F, Svegliati-Baroni G. Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis. *J Hepatol*. 2018;68:280–95.
19. Pinzani M. Pathophysiology of liver fibrosis. *Dig Dis*. 2015;33:492–7.
20. Moran-Salvador E, Mann J. Epigenetics and liver fibrosis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2017;4:125–34.
21. Mazza G, Al-Akkad W, Telesse A, Longato L, Urbani L, Robinson B, et al. Rapid production of human liver scaffolds for functional tissue engineering by high shear stress oscillation-decellularization. *Sci Rep*. 2017;7:5534.
22. Mazza G, Telesse A, Al-Akkad W, Frenguelli L, Levi A, Marral M, et al. Cirrhotic human liver extracellular matrix 3D scaffolds promote Smad-dependent TGF- $\beta$ 1 epithelial mesenchymal transition. *Cells*. 2019;9:83.
23. DeLeve LD. Liver sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis. *Hepatology*. 2015;61:1740–6.
24. Xie G, Wang X, Wang L, Wang L, Atkinson RD, Kanel GC, et al. Role of differentiation of liver sinusoidal endothelial cells in progression and regression of hepatic fibrosis in rats. *Gastroenterology*. 2012;142:918–27. e6.
25. Deleve LD, Wang X, Guo Y. Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cell activation and promote reversion to quiescence. *Hepatology*. 2008;48:920–30.
26. MacParland SA, Liu JC, Ma X-Z, Innes BT, Bartczak AM, Gage BK, et al. Single cell RNA sequencing of human liver reveals distinct intrahepatic macrophage populations. *Nat Commun*. 2018;9:4383.
27. Xiong X, Kuang H, Ansari S, Liu T, Gong J, Wang S, et al. Landscape of intercellular crosstalk in healthy and NASH liver revealed by single-cell secretome gene analysis. *Mol Cell*. 2019;75:644–60. e5.
28. Ramachandran P, Matchett KP, Dobie R, Wilson-Kanamori JR, Henderson NC. Single-cell technologies in hepatology: new insights into liver biology and disease pathogenesis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020;17:457–72.
29. Saviano A, Henderson NC, Baumert TF. Single-cell genomics and spatial transcriptomics: discovery of novel cell states and cellular interactions in liver physiology and disease biology. *J Hepatol*. 2020;73:1219–30.
30. Mehal WZ, Iredale J, Friedman SL. Scraping fibrosis: expressway to the core of fibrosis. *Nat Med*. 2011;17:552–3.
31. Dobie R, Wilson-Kanamori JR, Henderson BEP, Smith JR, Matchett KP, Portman JR, et al. Single-cell transcriptomics uncovers zonation of function in the mesenchyme during liver fibrosis. *Cell Rep*. 2019;29:1832–47. e8.
32. Rosenthal SB, Liu X, Ganguly S, Dhar D, Pasillas MP, Ricciardelli E, et al. Heterogeneity of HSCs in a mouse model of NASH. *Hepatology*. 2021;74:667–85.
33. Carter J, Wang S, Friedman SL. Ten thousand points of light: heterogeneity among the stars of NASH fibrosis. *Hepatology*. 2021;74:543–6.
34. Garcia-Tsao G, Friedman S, Iredale J, Pinzani M. Now there are many [stages] where before there was one: in search of a pathophysiological classification of cirrhosis. *Hepatology*. 2010;51:1445–9.
35. Tsochatzis E, Bruno S, Isgrò G, Hall A, Theocharidou E, Manousou P, et al. Collagen proportionate area is superior to other histological methods for sub-classifying cirrhosis and determining prognosis. *J Hepatol*. 2014;60:948–54.
36. Ferrusquía-Acosta J, Bassegoda O, Turco L, Reverter E, Pellone M, Bianchini M, et al. Agreement between wedged hepatic venous pressure and portal pressure in non-alcoholic steatohepatitis-related cirrhosis. *J Hepatol*. 2021;74:811–8.
37. Younossi ZM, Stepanova M, Rafiq N, Makhlouf H, Younoszai Z, Agrawal R, et al. Pathologic criteria for nonalcoholic steatohepatitis: interprotocol agreement and ability to predict liver-related mortality. *Hepatology*. 2011;53:1874–82.
38. Sanyal AJ, Anstee QM, Trauner M, Lawitz EJ, Abdelmalek MF, Ding D, et al. Cirrhosis regression is associated with improved clinical outcomes in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2021. <https://doi.org/10.1002/hep.32204>
39. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med*. 2018;24:908–22.
40. Friedman SL, Bansal MB. Reversal of hepatic fibrosis—fact or fantasy? *Hepatology*. 2006;43(Suppl 1):S82–8.
41. Rockey DC, Friedman SL. Fibrosis regression after eradication of hepatitis C virus: from bench to bedside. *Gastroenterology*. 2021;160(5):1502–20. e1.
42. Iredale JP, Murphy G, Hembry RM, Friedman SL, Arthur MJ. Human hepatic lipocytes synthesize tissue inhibitor of metalloproteinases- 1. Implications for regulation of matrix degradation in liver. *J Clin Invest*. 1992;90:282–7.
43. Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest*. 1998;102:538–49.
44. Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest*. 2005;115:56–65.
45. Ramachandran P, Pellicoro A, Vernon MA, Boulter L, Aucott RL, Ali A, et al. Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:E3186–95.
46. Roderfeld M. Matrix metalloproteinase functions in hepatic injury and fibrosis. *Matrix Biol*. 2018;68–69: 452–62.
47. Geervliet E, Bansal R. Matrix metalloproteinases as potential biomarkers and therapeutic targets in liver diseases. *Cells*. 2020;9:1212.
48. Jiao J, Sastre D, Fiel MI, Lee UE, Ghiassi-Nejad Z, Ginhoux F, et al. Dendritic cell regulation of carbon tetrachloride-induced murine liver fibrosis regression. *Hepatology*. 2012;55:244–55.

49. Siller-Lopez F, Sandoval A, Salgado S, Salazar A, Bueno M, Garcia J, et al. Treatment with human metalloproteinase-8 gene delivery ameliorates experimental rat liver cirrhosis. *Gastroenterology*. 2004;126:1122–33; discussion 1949.
50. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse. *Hepatology*. 2002;36:850–60.
51. Cathcart JM, Cao J. MMP inhibitors: past, present and future. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2015;20:1164–78.
52. Klein T, Eckhard U, Dufour A, Solis N, Overall CM. Proteolytic cleavage—mechanisms, function, and “omic” approaches for a near-ubiquitous posttranslational modification. *Chem Rev*. 2018;118:1137–68.
53. Chuang HM, Chen YS, Harn HJ. The versatile role of matrix metalloproteinase for the diverse results of fibrosis treatment. *Molecules*. 2019;24:4188.
54. Villesen IF, Daniels SJ, Leeming DJ, Karsdal MA, Nielsen MJ. Review article: the signalling and functional role of the extracellular matrix in the development of liver fibrosis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2020;52:85–97.
55. Chen IM, Willumsen N, Dehlendorff C, Johansen AZ, Jensen BV, Hansen CP, et al. Clinical value of serum hyaluronan and propeptide of type III collagen in patients with pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 2020;146:2913–22.
56. Lertudomphonwanit C, Mourya R, Fei L, Zhang Y, Gutta S, Yang LI, et al. Large-scale proteomics identifies MMP-7 as a sentinel of epithelial injury and of biliary atresia. *Sci Transl Med*. 2017;9:eaan8462.
57. Musso G, Gambino R, Cassader M, Paschetta E, Sircana A. Specialized proresolving mediators: enhancing nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis resolution. *Trends Pharmacol Sci*. 2018;39:387–401.
58. Musso G, Cassader M, Paschetta E, Gambino R. Bioactive lipid species and metabolic pathways in progression and resolution of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2018;155:282–302. e8.
59. Han YH, Shin KO, Kim JY, Khadka DB, Kim HJ, Lee YM, et al. A maresin 1/RORalpha12-lipoxygenase autoregulatory circuit prevents inflammation and progression of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest*. 2019;130:1684–98.
60. Ramachandran P, Dobie R, Wilson-Kanamori JR, Dora EF, Henderson BEP, Luu NT, et al. Resolving the fibrotic niche of human liver cirrhosis at single-cell level. *Nature*. 2019;575:512–8.
61. Aizarani N, Saviano A, Sagar, Mailly L, Durand S, Herman JS, et al. A human liver cell atlas reveals heterogeneity and epithelial progenitors. *Nature*. 2019;572:199–204.
62. Olander M, Wisniewski JR, Artursson P. Cell-type- resolved proteomic analysis of the human liver. *Liver Int*. 2020;40:1770–80.
63. Tabula Sapiens Consortium; Quake SR. The Tabula Sapiens: a single cell transcriptomic atlas of multiple organs from individual human donors. *bioRxiv*. 2021. <https://www.biorxiv.org/content/https://doi.org/10.1101/2021.07.19.452956v1>
64. Cho C-S, Xi J, Si Y, Park S-R, Hsu J-E, Kim M, et al. Microscopic examination of spatial transcriptome using Seq-Scope. *Cell*. 2021;184:3559–72. e22.
65. Hou X, Yang Y, Li P, Zeng Z, Hu W, Zhe R, et al. Integrating spatial transcriptomics and single-cell RNA-seq reveals the gene expression profiling of the human embryonic liver. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:652408.
66. Inverso D, Shi J, Lee KH, Jakab M, Ben-Moshe S, Kulkarni SR, et al. A spatial vascular transcriptomic, proteomic, and phosphoproteomic atlas unveils an angiocrine ie-Wnt signaling axis in the liver. *Dev Cell*. 2021;56:1677–93. e10.
67. Su T, Yang Y, Lai S, Jeong J, Jung Y, McConnell M, et al. Single-cell transcriptomics reveals zone-specific alterations of liver sinusoidal endothelial cells in cirrhosis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2021;11:1139–61.
68. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*. 1996;24:289–93.
69. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol*. 1995;22:696–9.
70. Hall A, Germani G, Isgro G, Burroughs AK, Dhillon AP. Fibrosis distribution in explanted cirrhotic livers. *Histopathology*. 2012;60:270–7.
71. Calderaro J, Kather JN. Artificial intelligence-based pathology for gastrointestinal and hepatobiliary cancers. *Gut*. 2021;70:1183–93.
72. Bosch J, Chung C, Carrasco-Zevallos OM, Harrison SA, Abdelmalek MF, Schiffman ML, et al. A machine learning approach to liver histological evaluation predicts clinically significant portal hypertension in NASH cirrhosis. *Hepatology*. 2021;74:3146–60.
73. Verloh N, Utpatel K, Haimerl M, Zeman F, Fellner C, Fichtner-Feigl S, et al. Liver fibrosis and Gd-EOB-DTPA- enhanced MRI: a histopathologic correlation. *Sci Rep*. 2015;5:15408.
74. Li X, Liu H, Wang R, Yang J, Zhang Y, Li C. Gadoxetate-disodium-enhanced magnetic resonance imaging for liver fibrosis staging: a systematic review and meta-analysis. *Clin Radiol*. 2020;75(319):e311–319. e9.
75. Cheung A, Neuschwander-Tetri BA, Kleiner DE, Schabel E, Rinella M, Harrison S, et al. Defining improvement in nonalcoholic steatohepatitis for treatment trial endpoints: recommendations from the liver forum. *Hepatology*. 2019;70:1841–55.
76. Decharatanachart P, Chaiteerakij R, Tiyarattanachai T, Treeprasertsuk S. Application of artificial intelligence in chronic liver diseases: a systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterol*. 2021;21:10.77. Martí-Aguado D, Rodríguez-Ortega A, Mestre-Alagarda C, Bauzá M, Valero-Pérez E, Alfaro-Cervello C, et al. Digital pathology: accurate technique for quantitative assessment of histological features in metabolic-associated fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2021;53:160–71.
77. Taylor-Weiner A, Pokkalla H, Han L, Jia C, Huss R, Chung C, et al. A machine learning approach enables quantitative measurement of liver histology and disease monitoring in NASH. *Hepatology*. 2021;74:133–47.
78. Mózes FE, Lee JA, Selvaraj EA, Jayaswal ANA, Trauner M, Boursier J, et al. Diagnostic accuracy of non-invasive tests for advanced fibrosis in patients with NAFLD: an individual patient data meta-analysis. *Gut*. 2021. <https://doi.org/10.1136/gutjnls-2021-324243>
79. Loomba R, Adams LA. Advances in non-invasive assessment of hepatic fibrosis. *Gut*. 2020;69:1343–52. 81. Albhaisi S, Sanyal AJ. Applying non-invasive fibrosis measurements in NAFLD/NASH: progress to date. *Pharmaceut Med*. 2019;33:451–63.
80. Anstee QM, Lawitz EJ, Alkhouri N, Wong V-S, Romero-Gomez M, Okanoue T, et al. Noninvasive tests accurately identify advanced fibrosis due to NASH: baseline data from the STELLAR trials. *Hepatology*. 2019;70:1521–30.

83. Vali Y, Lee J, Boursier J, Spijker R, Löffler J, Verheij J, et al. Enhanced liver fibrosis test for the non-invasive diagnosis of fibrosis in patients with NAFLD: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol.* 2020;73:252–62.
84. Govaere O, Cockell S, Tiniakos D, Queen R, Younes R, Vacca M, et al. Transcriptomic profiling across the nonalcoholic fatty liver disease spectrum reveals gene signatures for steatohepatitis and fibrosis. *Sci Transl Med.* 2020;12:eaba4448.
85. Mayo R, Crespo J, Martínez-Arranz I, Banales JM, Arias M, Mincholé I, et al. Metabolomic-based noninvasive serum test to diagnose nonalcoholic steatohepatitis: results from discovery and validation cohorts. *Hepatol Commun.* 2018;2:807–20.
86. Harrison SA, Ratziu V, Boursier J, Francque S, Bedossa P, Majd Z, et al. A blood-based biomarker panel (NIS4) for non-invasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis: a prospective derivation and global validation study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020;5(11):970–85.
87. Pirola CJ, Fernández Gianotti T, Castaño GO, Mallardi P, San Martino J, Mora Gonzalez Lopez Ledesma M, et al. Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut.* 2015;64:800–12.
88. Kolodziejczyk AA, Zheng D, Shibolet O, Elinav E. The role of the microbiome in NAFLD and NASH. *EMBO Mol Med.* 2019;11:e9302.
89. Besutti G, Valenti L, Ligabue G, Bassi MC, Pattacini P, Guaraldi G, et al. Accuracy of imaging methods for steatohepatitis diagnosis in non-alcoholic fatty liver disease patients: a systematic review. *Liver Int.* 2019;39(8):1521–34.
90. Ajmera V, Loomba R. Imaging biomarkers of NAFLD, NASH, and fibrosis. *Mol Metab.* 2021;50:101167. 91. Zhou LY, Tanabe KK, Fuchs BC, Caravan P. Collagen-targeted molecular imaging in diffuse liver diseases. *Abdom Radiol (NY).* 2020;45:3545–56.
92. Lang S, Demir M, Martin A, Jiang LU, Zhang X, Duan YI, et al. Intestinal virome signature associated with severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2020;159:1839–52.
93. Oh TG, Kim SM, Caussy C, Fu T, Guo J, Bassirian S, et al. A universal gut-microbiome-derived signature predicts cirrhosis. *Cell Metab.* 2020;32:878–88.e6.
94. Caussy C, Tripathi A, Humphrey G, Bassirian S, Singh S, Faulkner C, et al. A gut microbiome signature for cirrhosis due to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Commun.* 2019;10:1406.
95. Jiang L, Starkel P, Fan JG, Fouts DE, Bacher P, Schnabl B. The gut mycobiome: a novel player in chronic liver diseases. *J Gastroenterol.* 2021;56:1–11.
96. Wieland A, Etzion O, Ali RO, Levy E, Kleiner DE, Helmke SM, et al. HepQuant SHUNT detects portal hypertension in early stages of clinically compensated chronic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2021.04.030>
97. Stravitz RT, Ilan Y. Potential use of metabolic breath tests to assess liver disease and prognosis: has the time arrived for routine use in the clinic? *Liver Int.* 2017;37:328–36.
98. Ferrandino G, Orf I, Smith R, Calcagno M, Thind AK, Debiram-Beecham I, et al. Breath biopsy assessment of liver disease using an exogenous volatile organic compound—toward improved detection of liver impairment. *Clin Transl Gastroenterol.* 2020;11:e00239.
99. Cazanave SC, Warren AD, Pacula M, Touti F, Zagorska A, Gural N, et al. Peptide-based urinary monitoring of fibrotic nonalcoholic steatohepatitis by mass-barcoded activity-based sensors. *Sci Transl Med.* 2021;13:eabe8939.
100. Li D, He L, Guo H, Chen H, Shan H. Targeting activated hepatic stellate cells (aHSCs) for liver fibrosis imaging. *EJNMMI Res.* 2015;5:71.
101. Beljaars L, Molema G, Schuppan D, Geerts A, De Blieser PJ, Weert B, et al. Successful targeting to rat hepatic stellate cells using albumin modified with cyclic peptides that recognize the collagen type VI receptor. *J Biol Chem.* 2000;275:12743–51.
102. Shao T, Josephson L, Liang SH. PET/SPECT molecular probes for the diagnosis and staging of nonalcoholic fatty liver disease. *Mol Imaging.* 2019;18:1536012119871455.
103. Fallahzadeh MA, Hansen DJ, Trotter JF, Everson GT, Saracino G, Rahimi RS, et al. Predicting clinical decompensation in patients with cirrhosis using the Hepquant-SHUNT test. *Aliment Pharmacol Ther.* 2021;53:928–38.
104. Yang L, Kwon J, Popov Y, Gajdos GB, Ordog T, Brekke RA, et al. Vascular endothelial growth factor promotes fibrosis resolution and repair in mice. *Gastroenterology.* 2014;146:1339–50.e1.
105. Lei L, El Mourabit H, Housset C, Cadoret A, Lemoinne S. Role of angiogenesis in the pathogenesis of NAFLD. *J Clin Med.* 2021;10:1338.
106. Lindenmeyer CC, McCullough AJ. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease—an evolving view. *Clin Liver Dis.* 2018;22:11–21.
107. Pfister D, Núñez NG, Pinyol R, Govaere O, Pinter M, Szydlowska M, et al. NASH limits anti-tumour surveillance in immunotherapy-treated HCC. *Nature.* 2021;592:450–6.
108. Lassailly G, Caiazzo R, Ntandja-Wandji L-C, Gnemmi V, Baud G, Verkindt H, et al. Bariatric surgery provides long-term resolution of nonalcoholic steatohepatitis and regression of fibrosis. *Gastroenterology.* 2020;159:1290–301.e5.
109. Wooden B, Goossens N, Hoshida Y, Friedman SL. Using big data to discover diagnostics and therapeutics for gastrointestinal and liver diseases. *Gastroenterology.* 2017;152:53–67.e3.
110. Ahn JC, Connell A, Simonetto DA, Hughes C, Shah VH. Application of artificial intelligence for the diagnosis and treatment of liver diseases. *Hepatology.* 2021;73:2546–63.
111. Buechler MB, Pradhan RN, Krishnamurty AT, Cox C, Calviello AK, Wang AW, et al. Cross-tissue organization of the fibroblast lineage. *Nature.* 2021;593:575–9.
112. Tsukui T, Sun K-H, Wetter JB, Wilson-Kanamori JR, Hazelwood LA, Henderson NC, et al. Collagen-producing lung cell atlas identifies multiple subsets with distinct localization and relevance to fibrosis. *Nat Commun.* 2020;11:1920.
113. Kuppe C, Ibrahim MM, Kranz J, Zhang X, Ziegler S, Perales-Patón J, et al. Decoding myofibroblast origins in human kidney fibrosis. *Nature.* 2021;589:281–6.
114. Rudalska R, Dauch D, Longerich T, McJunkin K, Wuestefeld T, Kang T-W, et al. In vivo RNAi screening identifies a mechanism of sorafenib resistance in liver cancer. *Nat Med.* 2014;20:1138–46.
115. Michels BE, Mosa MH, Streibl BI, Zhan T, Menche C, Abou-El-Ardat K, et al. Pooled in vitro and in vivo CRISPR-Cas9 screening identifies tumor suppressors in human colon organoids. *Cell Stem Cell.* 2020;26:782–92.e7.
116. Turner RJ, Golz S, Wollnik C, Burkhardt N, Sternberger I, Andag U, et al. A whole genome-wide arrayed CRISPR screen in primary organ fibroblasts to identify regulators of kidney fibrosis. *SLAS Discov.* 2020;25:591–604.
117. Dow LE. Modeling disease in vivo with CRISPR/Cas9. *Trends Mol Med.* 2015;21:609–21.

118. Chow RD, Guzman CD, Wang G, Schmidt F, Youngblood MW, Ye L, et al. AAV-mediated direct *in vivo* CRISPR screen identifies functional suppressors in glioblastoma. *Nat Neurosci.* 2017;20:1329–41.
119. Dara S, Dhamercherla S, Jadav SS, Babu CM, Ahsan MJ. Machine learning in drug discovery: a review. *Artif Intell Rev.* 2021;1:53.
120. Dudley JT, Sirota M, Shenoy M, Pai RK, Roedder S, Chiang AP, et al. Computational repositioning of the anticonvulsant topiramate for inflammatory bowel disease. *Sci Transl Med.* 2011;3:96ra76.
121. Shameer K, Readhead B, Dudley JT. Computational and experimental advances in drug repositioning for accelerated therapeutic stratification. *Curr Top Med Chem.* 2015;15:5–20.
122. Hicks DF, Goossens N, Blas-García A, Tsuchida T, Wooden B, Wallace MC, et al. Transcriptome-based repurposing of apigenin as a potential anti-fibrotic agent targeting hepatic stellate cells. *Sci Rep.* 2017;7:42563.
123. Bhattacharya B, Becker C, Readhead B, Goossens N, Novik J, Fiel MI, et al. Repositioning of a novel GABA-B receptor agonist, AZD3355 (Lesogaberan), for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *Sci Rep.* 2021;11:20827.
124. BasuRay S, Smagris E, Cohen JC, Hobbs HH. The PNPLA3 variant associated with fatty liver disease (I148M) accumulates on lipid droplets by evading ubiquitylation. *Hepatology.* 2017;66:1111–24.
125. Bruschi FV, Claudel T, Tardelli M, Caligiuri A, Stulnig TM, Marra F, et al. The PNPLA3 I148M variant modulates the fibrogenic phenotype of human hepatic stellate cells. *Hepatology.* 2017;65:1875–90. 126. He N-Y, Li Q, Wu C-Y, Ren Z, Gao YA, Pan L-H, et al. Lowering serum lipids via PCSK9-targeting drugs: current advances and future perspectives. *Acta Pharmacol Sin.* 2017;38:301–11.
127. Sato Y, Murase K, Kato J, Kobune M, Sato T, Kawano Y, et al. Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. *Nat Biotechnol.* 2008;26:431–42.
128. Wong L, Yamasaki G, Johnson RJ, Friedman SL. Induction of beta-platelet-derived growth factor receptor in rat hepatic lipocytes during cellular activation *in vivo* and in culture. *J Clin Invest.* 1994;94:1563–9.
129. Rozenfeld R, Gupta A, Gagnidze K, Lim MP, Gomes I, Lee-Ramos D, et al. AT1R-CB(1)R heteromerization reveals a new mechanism for the pathogenic properties of angiotensin II. *EMBO J.* 2011;30:2350–63.
130. Vallverdú J, Martínez García de la Torre RA, Mannaerts I, Verhulst S, Smout A, Coll M, et al. Directed differentiation of human induced pluripotent stem cells to hepatic stellate cells. *Nat Protoc.* 2021;16(5):2542–63.
131. Uchi R, Togo S, Kimura M, Shinozawa T, Koido M, Koike H, et al. Modeling steatohepatitis in humans with pluripotent stem cell-derived organoids. *Cell Metab.* 2019;30:374–84.e6.
132. van de Bovenkamp M, Groothuis GMM, Draaisma AL, Merema MT, Bezuijen JL, van Gils MJ, et al. Precision-cut liver slices as a new model to study toxicity-induced hepatic stellate cell activation in a physiologic milieu. *Toxicol Sci.* 2005;85:632–8.
133. Paish HL, Reed LH, Brown H, Bryan MC, Govaere O, Leslie J, et al. A bioreactor technology for modeling fibrosis in human and rodent precision-cut liver slices. *Hepatology.* 2019;70:1377–91.
134. Caliari SR, Perepelyuk M, Soulás EM, Lee GY, Wells RG, Burdick JA. Gradually softening hydrogels for modeling hepatic stellate cell behavior during fibrosis regression. *Integr Biol* [Camb]. 2016;8:720–8.
135. Bhatia SN, Underhill GH, Zaret KS, Fox IJ. Cell and tissue engineering for liver disease. *Sci Transl Med.* 2014;6:245sr242.
136. Vunjak-Novakovic G, Ronaldson-Bouchard K, Radisic M. Organs-on-a-chip models for biological research. *Cell.* 2021;184:4597–611.
137. Proctor WR, Foster AJ, Vogt J, Summers C, Middleton B, Pilling MA, et al. Utility of spherical human liver microtissues for prediction of clinical drug-induced liver injury. *Arch Toxicol.* 2017;91:2849–63.
138. Eng JM, Estall JL. Diet-induced models of non-alcoholic fatty liver disease: food for thought on sugar, fat, and cholesterol. *Cells.* 2021;10:1805.
139. Carreres L, Jilkova ZM, Vial G, Marche PN, Decaens T, Lerat H. Modeling diet-induced NAFLD and NASH in rats: a comprehensive review. *Biomedicines.* 2021;9:378.
140. Rinella ME, Noureddin M. STELLAR 3 and STELLAR 4: lessons from the fall of Icarus. *J Hepatol.* 2020;73:9–11.
141. Ratziu V, Friedman SL. Why do so many NASH trials fail? *Gastroenterology.* 2020. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.05.046>
142. Loft A, Alfaro AJ, Schmidt SF, Pedersen FB, Terkelsen MK, Puglia M, et al. Liver-fibrosis-activated transcriptional networks govern hepatocyte reprogramming and intra-hepatic communication. *Cell Metab.* 2021;33:1685–700.e9.
143. Ghiassian SD, Menche J, Chasman DI, Julianini F, Wang R, Ricchiuto P, et al. Endophenotype network models: common core of complex diseases. *Sci Rep.* 2016;6:27414. 144. Li L, Cheng WY, Glicksberg BS, Gottesman O, Tamler R, Chen R, et al. Identification of type 2 diabetes subgroups through topological analysis of patient similarity. *Sci Transl Med.* 2015;7:311ra174.
145. Alonso C, Fernández-Ramos D, Varela-Rey M, Martínez-Arranz I, Navasa N, Van Liempd SM, et al. Metabolomic identification of subtypes of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology.* 2017;152:1449–61.e7.
146. Sumida Y, Yoneda M, Ogawa Y, Yoneda M, Okanoue T, Nakajima A. Current and new pharmacotherapy options for non-alcoholic steatohepatitis. *Expert Opin Pharmacother.* 2020;21:953–67.
147. Konerman MA, Jones JC, Harrison SA. Pharmacotherapy for NASH: current and emerging. *J Hepatol.* 2018;68:362–75.
148. Younossi ZM, Loomba R, Rinella ME, Bugianesi E, Marchesini G, Neuschwander-Tetri BA, et al. Current and future therapeutic regimens for nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2018;68:361–71.
149. Marcellin P, Gane E, Buti M, Afdhal N, Sievert W, Jacobson IM, et al. Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study. *Lancet.* 2013;381:468–75.
150. Lee YA, Friedman SL. Reversal, maintenance or progression: what happens to the liver after a virologic cure of hepatitis C? *Antiviral Res.* 2014;107C:23–30.
151. Salisbury ML, Wijsenbeek MS. Management of idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin Chest Med.* 2021;42:275–85.