

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 01/03/2025.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

Rodrigo Santos Lima

Avaliação de biomarcadores circulantes para monitoramento da esteato-hepatite e fibrose na doença gordurosa hepática não alcoólica

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção de título de Doutor em Ciências – Área Patologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rejane M. Tommasini Grotto

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Márjorie de Assis Golim

**Botucatu
2023**

Rodrigo Santos Lima

Avaliação de biomarcadores circulantes para monitoramento da esteato-hepatite e fibrose na doença gordurosa hepática não alcoólica

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Ciências – Área Patologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rejane M. Tommasini Grotto

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Márjorie de Assis Golim

Botucatu
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Lima, Rodrigo Santos.

Avaliação de biomarcadores circulantes para monitoramento da esteato-hepatite e fibrose na doença gordurosa hepática não alcoólica / Rodrigo Santos Lima. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Rejane Maria Tommasini Grotto

Coorientador: Márjorie de Assis Golim

Capes: 40105008

1. Cirrose hepática. 2. Hepatopatia gordurosa não alcoólica. 3. Biomarcadores. 4. Esteatose hepática.

Palavras-chave: Biomarcadores; Fibrose hepática; NAFL; NAFLD; NASH.

Dedicatória

Aos meus pais, **Vladimir Teixeira Lima** e **Sandra Cristina Ferreira Santos**, e minha irmã, **Gabriela Santos Lima**, por sempre me apoiarem durante toda esta minha trajetória profissional. Vocês sempre me inspiram a buscar o melhor para mim.

Agradecimientos

À Professora **Rejane M. Tommasini Grotto** por ter me dado a oportunidade de iniciar este estudo, tão importante para a minha formação profissional. Agradeço por toda a compreensão despendida durante esses anos, pois sempre apoiou minhas escolhas profissionais e me estimulou a aproveitar o máximo desta experiência para a minha formação. Gratidão imensurável a você.

À Professora **Márjorie de Assis Golim** por ter sido um ponto de apoio fundamental na elaboração deste projeto. Não mediu esforços para tornar viável a execução deste estudo, além de ter sido uma grande motivadora nos momentos de maior adversidade inerente a toda esta trajetória percorrida. Será sempre meu exemplo de profissional a ser seguida.

Ao Professor **Rafael Plana Simões**, profissional primordial na execução deste estudo. Meu muito obrigado por toda a capacitação técnica envolvida e por me fazer acreditar que eu seria capaz de chegar onde cheguei. Sua habilidade de trazer esperança para momentos difíceis, quando tudo aparenta falhar, jamais será esquecida.

Às colegas de profissão e de laboratório **Aline Marcia Marques Braz** e **Francielle Ramalho Rocha** por todo apoio com a coleta, discussão, organização e apoio com os experimentos de laboratório referentes aos dados deste estudo. Sem vocês, este projeto não teria sido possível. Minha eterna gratidão.

Ao Professor **Giovanni Faria Silva** por ter aceitado participar neste projeto, fornecer os dados essenciais que foram discutidos, além de contribuir com orientações imprescindíveis para o avanço do estudo.

Ao Professor **Guilherme Targino Valente** pelas valiosas considerações em relação às análises do estudo e por ter se prontificado a auxiliar sempre que necessário. Meu muito obrigado.

*Agradecimentos ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, processo nº 141116/2019-6, e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, processo nº 2017/07711-0, pelo apoio financeiro neste estudo.*

Epígrafe

“**O** Conhecimento se adquire e
a virtude se exercita.”

Aristóteles

Listas

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO DA NAFLD⁹..... 23

FIGURE 2: ROC CURVES FROM THE ATTRIBUTES WITH AUROC ≥ 0.65 51

FIGURE 3: GENDER DISTRIBUTION ACCORDING TO LIVER FIBROSIS CLASSIFICATION. 52

FIGURE 4: FREQUENCY DISTRIBUTION OF BALLOONING, INFLAMMATION, STEATOSIS AND NAS ACCORDING TO THE HEPATIC FIBROSIS CLASSIFICATION..... 53

FIGURE 5: MEDIAN AND SEMI-INTERQUARTILE RANGE OF AGE (IN YEARS) OF GROUPS. MEDIANS - CONTROL: 48; STEATOSIS: 39.5; NASH GROUPS: F0 = 50; F1 = 53.5; F2 = 50; F3 = 57.5; F4 = 57.5. 54

FIGURE 6: FIB-4 AND NFS SCORES IN PREDICTING STEATOSIS AND FIBROSIS GRADES. A) FIB-4 IN THE DIFFERENT GROUPS. B) NFS SCORE IN THE DIFFERENT GROUPS (MEDIAN AND SEMI-INTERQUARTILE RANGE)..... 55

FIGURE 7: APRI SCORES IN PREDICTING STEATOSIS AND FIBROSIS GRADES. 55

FIGURE 8: CHEMOKINES DISTRIBUTION IN THE STUDY GROUPS (CONTROL, STEATOSIS AND FIBROSIS GRADES). 58

FIGURE 9: DISTRIBUTION VALUE OF TIMPS IN IN THE STUDY GROUPS (CONTROL, STEATOSIS AND FIBROSIS GRADES). .. 59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1– DESCRIÇÃO E PERFORMANCE DE ESCORES PARA A DETECÇÃO DE FIBROSE AVANÇADA NA NAFLD.²²	28
TABLE 2: CHARACTERIZATION OF THE STUDY GROUPS ACCORDING TO NASH AND NON-NASH.	50
TABLE 3: DISTRIBUTION OF CATEGORICAL VARIABLES IN NAFLD PATIENTS.....	52
TABLE 4: STATISTICAL ANALYSIS OF CONSOLIDATED ATTRIBUTES FOR NAFLD IN NORMALITY TEST.	56
TABLE 5: STATISTICAL ANALYSIS OF CHEMOKINES ACCORDING TO KRUSKAL-WALLIS/POST HOC DUNN FOR THE GROUPS AND MANN WHITNEY TEST FOR P=VALUE IN NORMALITY TEST.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- α -SMA – α -Actina do músculo liso – do inglês *α -Smooth Muscle Actin*
- α 2M – Alfa 2 - macroglobulina
- AH – Ácido Hialurônico
- ALT – Alanina Aminotransferase
- Apo-A1 – Apolipoproteína A-1
- APRI – Índice APRI – do inglês *AST to Platelet Ratio Index*
- AST – Aspartato Aminotransferase
- AUROC – do inglês *Area Under de ROC Curve*
- CCL – do inglês *Chemokine (C-C motif) Ligand*
- CCR – do inglês *C-C Motif Chemokine Receptor*
- CHC – Carcinoma Hepatocelular
- DC – Células Dendríticas – do inglês *Dendritic Cells*
- EASD – Associação para o Estudo do Diabetes – do inglês *European Association for the Study of Diabetes*
- EASL – Associação Europeia para o Estudo do Fígado – do inglês *European Association for the Study of the Liver*
- EASO – Associação Europeia para o Estudo da Obesidade – do inglês *European Association for the Study Obesity*
- ELF – Teste Aprimorado de Fibrose Hepática – do inglês *Enhanced Liver Fibrosis*
- F0 – Ausência de fibrose
- F1 – Fibrose perisinusoidal ou periportal
- F2 – Fibrose perisinusoidal e portal/periportal
- F3 – Fibrose em ponte
- F4 – Presença de cirrose
- FIB-4 – Calculador de Fibrose-4
- FLI – Índice de Gordura Hepática – do inglês *Fatty Liver Index*
- GGT – Gama Glutamil Transferase
- HOMA-IR – do inglês *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*
- HSCs – Células Estreladas Hepáticas – do inglês *Hepatic Stellate Cells*
- IFN – Interferon
- IL – Interleucina – do inglês *Interleukin*

IMC – Índice de Massa Corporal

IP-10 – do inglês *interferon gamma-induced protein 10*

MAFLD – Disfunção Metabólica Associada à Doença Gordurosa do inglês *Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease*

MAIT – Células T Invariáveis Associadas à Mucosa – do inglês *Mucosal Associated Invariant T Cells*

MCP-1 – do inglês *monocyte chemoattractant protein 1*

MIG – do inglês *monokine induced by gamma interferon*

MMPs – Metaloproteinases – inglês *Matrix Metalloproteinases*

MRE – Ressonância magnética – do inglês *Magnetic Resonance Elastography*

NAFL – Doença Gordurosa Não Alcoólica – do inglês *Nonalcoholic Fat Liver*

NAFLD – Doença Gordurosa Hepática Não Alcoólica – do inglês *Nonalcoholic Fat Liver Disease*

NAS – do inglês *NAFLD Activity Score*

NASH – Esteato-hepatite Não Alcoólica – do inglês *Nonalcoholic Steatohepatitis*

NFS – Escore de Fibrose NAFLD – do inglês *NAFLD Fibrosis Score*

PDFF – do inglês *Proton Density Fat Fraction*

PDFF – Ressonância magnética por meio da mensuração da fração de gordura em densidade protônica – do inglês *Magnetic Resonance Imaging-Proton Density*

RANTES – do inglês *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*

ROC – Espécies Reativas de Oxigênio – do inglês *Reactive Oxygen Species*

SAF – Escore denominado do inglês (*Steatosis, Activity, Fibrosis*)

SWE – Elastografia de quantificação de ponto (SWE) – do inglês *Shear Wave Elastography*

TGF – Fator de Crescimento Transformador – do inglês *Transforming Growth Factor*

TIMP – Inibidor de Metalopeptidase – do inglês *Metalloproteinase Inhibitor*

TNF – Fator de Necrose Tumoral – do inglês *Tumor Necrosis Factor*

Tregs – Células T reguladoras – do inglês *Regulatory T Cells*

US – Ultrassonografia

VCTE – Elastografia transitória controlada por vibração – do inglês *Vibration-controlled transient elastography*

Sumário

SUMÁRIO

Sumário

Resumo.....	19
Abstract	20
Capítulo I.....	21
Revisão de Literatura.....	21
1. Introdução	19
2. Fisiopatologia	21
3. Epidemiologia	23
4. Biópsia Hepática no Estadiamento de Fibrose Hepática, Esteatose e NASH.....	25
5. Método Não Invasivos para o Estadiamento de Fibrose Hepática	26
6. Citocinas, Quimiocinas e TIMPs	29
7. Células do Sistema Imune no Contexto da NAFLD	33
8. Conclusão	36
9. Referências	38
Capítulo II Artigo.....	42
Abstract.....	45
1. Introduction	46
2. Methods	47
3. Results	49
4. Discussion.....	59
5. Conclusion	63
6. References.....	64
7. ANEXOS	66
A) Parecer Consubstanciado do CEP	66
B) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	71

Resumo

Neste trabalho foi descrito um panorama acerca da Doença Gordurosa Hepática (NAFLD). O conteúdo deste estudo foi subdividido em Capítulos I e II. O Capítulo I versa sobre uma revisão da literatura no que diz respeito à temas como apresentação da doença, fisiopatologia, epidemiologia atual, a relevância da biópsia hepática para o estadiamento de lesões inerentes à progressão da doença, a utilização de métodos não invasivos para avaliação de fibrose hepática e a participação de citocinas, quimiocinas, TIMPs e células do sistema imune no contexto inflamatório que deflagra as lesões progressivas da doença. No Capítulo II foi apresentado o estudo decorrente das pesquisas realizadas para esta tese, o qual avaliou o potencial de biomarcadores circulantes para o monitoramento de esteato-hepatite e fibrose hepática na NAFLD. Nestas análises foi possível observar a relevância de moléculas como TIMP-1, IL-8, MIG, IP-10, MCP-1 e RANTES para o acompanhamento de pacientes diagnosticados com a NAFLD, resultados estes que poderiam propiciar o desenvolvimento de novos algoritmos para o acompanhamento clínico de pacientes com NAFLD.

Abstract

In this work it was described an overview regarding Fatty Liver Disease (NAFLD). The content of this study was subdivided into Chapters I and II. Chapter I presents a literature review related to topics such as disease presentation, pathophysiology, current epidemiology, the relevance of liver biopsy for staging lesions inherent to disease progression, the use of non-invasive methods for assessing hepatic fibrosis and the participation of cytokines, chemokines, TIMPs and cells of the immune system in the inflammatory context that triggers the progressive lesions of the disease. In Chapter II, it was presented the study resulting from this research, which evaluated the potential of circulating biomarkers for monitoring steatohepatitis and liver fibrosis in NAFLD. In these analyses, it was possible to observe the relevance of molecules such as TIMP-1, IL-8, MIG, IP-10, MCP-1 and RANTES for the follow-up of patients diagnosed with NAFLD, results that could provide the development of new algorithms for the clinical follow-up of patients with NAFLD.

Capítulo I

Revisão de Literatura

Doença Hepática Gordurosa Não

Alcoólica (NAFLD)

1. Introdução

A doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) é caracterizada pelo acúmulo de gordura em hepatócitos, sendo sua etiologia independente de fatores tais como etilismo e causas secundárias de esteatose hepática como infecção pelo vírus causador da hepatite C, utilização de drogas e toxinas, hipotireoidismo, doenças associadas à gestação e doenças intestinais^{1,2}. Esta enfermidade encontra-se em elevada prevalência principalmente em indivíduos acometidos pela obesidade e síndrome metabólica. A NAFLD abrange duas variações dentro de seu espectro: incluindo a doença hepática gordurosa (NAFL) e a esteato-hepatite não alcoólica (NASH)¹. Salienta-se sobre a proposta de mudança de nomenclatura de NAFLD para disfunção metabólica associada à doença gordurosa (MAFLD), a qual foi recomendada por especialistas. Além disso, destaca-se que a nova nomenclatura também contempla novos critérios de definição da doença, uma vez que a MAFLD tem é proposta como uma nova definição para a doença hepática gordurosa³. Contudo, salienta-se que esta terminologia ainda carece de um consenso para sua utilização segundo especialistas⁴ e também requer um maior esclarecimento a respeito das bases moleculares desta nova definição⁵.

Destaca-se que, enquanto a NAFL é definida pela presença de esteatose hepática não-inflamatória, a NASH difere-se por incluir tanto a esteatose como a presença de inflamação, sendo esta última indistinguível histologicamente da esteato-hepatite alcoólica¹.

Comparando-se os conceitos definidores da NAFLD e MAFLD, observa-se que a NAFLD se baseia em critérios de exclusão tais como: consumo de álcool ≥ 30 gramas/dia para homens e 20 gramas/dia para mulheres, diagnóstico de infecção por hepatites virais e outras causas relacionadas com doenças hepáticas crônicas. Por outro lado, a MAFLD foi proposta através de critérios de inclusão como: presença de sobrepeso/obesidade, diabetes mellitus do tipo 2 e disfunção metabólica. Adicionalmente, enfatiza-se que o diagnóstico de NASH requer a realização de biópsia hepática, enquanto que o diagnóstico da MAFLD independe do consumo de álcool e não requer a execução de biópsia hepática³. Dado ao foco deste estudo ter sido direcionado para a NAFLD e suas variações, as considerações a seguir serão destinadas para esta definição.

Ressalta-se que até o presente momento a NAFLD é considerada a primeira

causa de doença crônica hepática no mundo⁶. A NAFLD é caracterizada pelo acúmulo de gordura hepática, independentemente da presença ou não de inflamação. Por outro lado, a NAFL apresenta potencial de evoluir para NASH, sendo esta última associada com a presença de lesão hepatocitária, denominada “balonização” dos hepatócitos, além de apresentar inflamação e nível variado de fibrose hepática, cuja lesão eleva significativamente a probabilidade de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (CHC)⁶. Adicionalmente, denota-se que, no contexto da NAFLD, o risco de desenvolvimento de CHC independe da presença de cirrose estabelecida, fato este que difere de outras causas conhecidas de CHC, como hepatites virais, as quais apresentam risco elevado de desenvolvimento de CHC após o desenvolvimento da fibrose hepática avançada⁷.

A NAFLD apresenta como principais fatores de risco reversíveis a predisposição genética, os hábitos alimentares não saudáveis e a baixa frequência de atividades físicas. Neste contexto e considerando à ausência de tratamentos farmacológicos específicos para NAFLD, organizações como a Associação Europeia para o Estudo do Fígado (EASL), a Associação para o Estudo do Diabetes (EASD) e a Associação Europeia para o Estudo da Obesidade (EASO), recomendam que alterações de hábitos de vida sejam adotadas no sentido de promover a prevenção e a regressão da NAFLD. Segundo estas entidades, a promoção de um déficit calórico de 500-1000 kcal estaria relacionado com a perda de peso de 7-10% quando associado com dietas de baixo índice de gorduras, dietas cetogênicas e dietas com elevado percentual de proteínas associadas a exercícios aeróbicos, juntamente com exercícios físicos de resistência⁸.

8. Conclusão

A NAFLD e suas variações, como NAFL e NASH, têm sido objetivo-alvo de pesquisa no campo da hepatologia. Apesar do novo conceito da doença estar sendo transferido para MAFLD, esta definição ainda exigirá mais dados de pesquisa para que seja amplamente difundida nos meios científicos. Por outro lado, os dados referentes à NAFLD têm se mostrado alarmantes, uma vez que o cenário epidemiológico de prevalência do agravo já corresponde a 25% da população, aproximadamente. Para fins de reversão deste cenário, as medidas não farmacológicas como a promoção de hábitos alimentares saudáveis, bem como a prática de exercícios físicos têm se colocado como estratégias mais efetivas até o presente momento, pois ainda não foram aprovados medicamentos específicos para NAFLD, apesar do avanço das pesquisas científicas.

O exame de biópsia hepática continua sendo considerado a avaliação padrão-ouro na investigação de NASH, porém seu elevado custo e as desvantagens aqui citadas implicam na necessidade de desenvolvimento de novas ferramentas de avaliação das lesões hepáticas inerentes do avanço da NAFLD e que possam, desde que validadas, reduzir a necessidade de realização deste exame invasivo e ampliar as opções não invasivas aplicáveis ao monitoramento da doença. Dentre as alternativas citadas destacam-se as metodologias não invasivas baseadas em diagnóstico por imagem e em biomarcadores séricos, bem como em atributos tais como idade e sexo, por exemplo. Grandes avanços foram conquistados com o desenvolvimento de novos algoritmos e fórmulas que possam prever lesões associadas à NAFLD. Contudo, a utilização destes na prática clínica continua sendo

um desafio, visto as dificuldades destas técnicas em ter o mesmo poder discriminatório das lesões hepáticas que já se tem com a realização da biópsia hepática.

Diante disto, cada vez mais estudos têm avaliado variáveis associadas à fisiopatologia da NAFLD no sentido de caracterizar novos marcadores que possam auxiliar na classificação das lesões hepáticas. Dentre estas variáveis em constante estudo, destacam-se pelo papel biológico exercido por citocinas, quimiocinas e diferentes células do sistema imune. De forma suplementar, abordagens inovadoras utilizando técnicas de *machine learning* têm sido empregadas com o intuito de alavancar a performance destas metodologias não invasivas, aumentando o poder preditivo.

Assim sendo, conclui-se que o avanço no desenvolvimento de novas ferramentas não invasivas para avaliação de lesões hepáticas decorrentes da NAFLD se faz essencial para que pacientes possam ser avaliados de maneira cada vez mais otimizada, de forma a reduzir a necessidade de execução do exame de avaliação invasivo, porém sem reduzir a eficácia desta avaliação tão importante para o diagnóstico preciso e para a decisão terapêutica personalizada direcionada aos indivíduos acometidos por este agravo.

Neste sentido, o Capítulo II deste trabalho que será apresentado a seguir apresenta como proposta a publicação de um artigo científico, cujos dados refletem em novas perspectivas no que tange à avaliação de biomarcadores circulantes para o monitoramento da esteato-hepatite e fibrose hepática na NAFLD. Os achados do referido trabalho utilizam como referência o estado da arte mencionado nesta revisão literária no que tange ao atual contexto em que a NAFLD se encontra. Através de análises de biomarcadores circulantes aqui citados, como células do sistema imune, enzimas hepáticas, quimiocinas, TIMPs e avaliação de algoritmos preditores de lesão hepática, buscou-se fornecer novos conhecimentos sobre estas variáveis, de modo a ampliar o conhecimento já adquirido para doença, como também corroborar com o desenvolvimento de novas metodologias diagnósticas para as lesões hepáticas inerentes da NAFLD.

9. Referências

1. Hadinia A, Doustimotlagh AH, Goodarzi HR, et al. Circulating levels of pro-inflammatory cytokines in patients with nonalcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Iran J Immunol* 2019; 16: 327–333.
2. Liebe R, Esposito I, Bock HH, et al. Diagnosis and management of secondary causes of steatohepatitis. *J Hepatol* 2021; 74: 1455–1471.
3. Kawaguchi T, Tsutsumi T, Nakano D, et al. MAFLD: Renovation of clinical practice and disease awareness of fatty liver. *Hepatol Res* 2022; 52: 422–432.
4. Arab JP, Díaz LA, Dirchwolf M, et al. NAFLD: Challenges and opportunities to address the public health problem in Latin America. *Ann Hepatol* 2021; 24: 100359.
5. Huang DQ, El-Serag HB, Loomba R. Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2021; 18: 223–238.
6. Lambrecht J, Tacke F. Controversies and Opportunities in the Use of Inflammatory Markers for Diagnosis or Risk Prediction in Fatty Liver Disease. *Front Immunol* 2021; 11: 1–10.
7. Bengtsson B, Stål P, Wahlin S, et al. Characteristics and outcome of hepatocellular carcinoma in patients with NAFLD without cirrhosis. *Liver Int* 2019; 39: 1098–1108.
8. El-Agroudy NN, Kurzbach A, Rodionov RN, et al. Are Lifestyle Therapies Effective for NAFLD Treatment? *Trends Endocrinol Metab* 2019; 30: 701–709.
9. Thibaut R, Gage MC, Pineda-Torra I, et al. Liver macrophages and inflammation in physiology and physiopathology of non-alcoholic fatty liver disease. *FEBS J* 2022; 289: 3024–3057.
10. Okazaki I, Noro T, Tsutsui N, et al. Fibrogenesis and Carcinogenesis in Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH): Involvement of Matrix Metalloproteinases (MMPs) and

- Tissue Inhibitors of Metalloproteinase (TIMPs). *Cancers (Basel)* 2014; 6: 1220–1255.
11. Barros BSV, Monteiro FC, Terra C, et al. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its associated factors in individuals with type 1 diabetes: a cross-sectional study in a tertiary care center in Brazil. *Diabetol Metab Syndr* 2021; 13: 33.
 12. Povsic M, Wong OY, Perry R, et al. A Structured Literature Review of the Epidemiology and Disease Burden of Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH). *Adv Ther* 2019; 36: 1574–1594.
 13. Akyol T, Tanoglu A, Yazgan Y, et al. Serum Matrix Metalloproteinase-9 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Expression in Patients with Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Dis Mol Med* 2015; 3: 11.
 14. Araújo AR, Rosso N, Bedogni G, et al. Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future. *Liver Int* 2018; 38: 47–51.
 15. Yip TC, Vilar-Gomez E, Petta S, et al. Geographical similarity and differences in the burden and genetic predisposition of <scp>NAFLD</scp>. *Hepatology* 2022; 1–15.
 16. Marchesini G, Day CP, Dufour JF, et al. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2016; 64: 1388–1402.
 17. Berger D, Desai V, Janardhan S. Con: Liver Biopsy Remains the Gold Standard to Evaluate Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Liver Dis* 2019; 13: 114–116.
 18. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41: 1313–1321.
 19. Bedossa P, Burt AA, Gouw AHA, et al. Utility and appropriateness of the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm and steatosis, activity, and fibrosis (SAF)

- score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2014; 60: 565–575.
20. Tamaki N, Ajmera V, Loomba R. Non-invasive methods for imaging hepatic steatosis and their clinical importance in NAFLD. *Nat Rev Endocrinol* 2022; 18: 55–66.
 21. Selvaraj EA, Mózes FE, Jayaswal ANA, et al. Diagnostic accuracy of elastography and magnetic resonance imaging in patients with NAFLD: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 2021; 75: 770–785.
 22. Lonardo A, Arab JP, Arrese M. Perspectives on Precision Medicine Approaches to NAFLD Diagnosis and Management. *Adv Ther* 2021; 38: 2130–2158.
 23. Feng G, Zheng KI, Li YY, et al. Machine learning algorithm outperforms fibrosis markers in predicting significant fibrosis in biopsy-confirmed NAFLD. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2021; 28: 593–603.
 24. Yip TCF, Ma AJ, Wong VW-S, et al. Laboratory parameter-based machine learning model for excluding non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in the general population. *Aliment Pharmacol Ther* 2017; 46: 447–456.
 25. Chang D, Truong E, Mena EA, et al. Machine learning models are superior to noninvasive tests in identifying clinically significant stages of <scp>NAFLD</scp> and <scp>NAFLD</scp>-related cirrhosis. *Hepatology* 2022; 1–12.
 26. Braunersreuther V, Viviani GL, Mach F, et al. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 727–735.
 27. Nagata N, Chen G, Xu L, et al. An Update on the Chemokine System in the Development of NAFLD. *Med* 2022; 58: 1–10.
 28. Pan X, Chiwanda Kaminga A, Liu A, et al. Chemokines in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Front Immunol* 2020; 11: 1–11.

29. Desai MS, Mariscalco MM, Tawil A, et al. Atherogenic diet-induced hepatitis is partially dependent on murine TLR4. *J Leukoc Biol* 2008; 83: 1336–1344.
30. Wu H, Ghosh S, Perrard XD, et al. T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation* 2007; 115: 1029–1038.
31. Chen W, Zhang J, Fan H-N, et al. Function and therapeutic advances of chemokine and its receptor in nonalcoholic fatty liver disease. *Therap Adv Gastroenterol* 2018; 11: 175628481881518.
32. Trojanek JB, Michałkiewicz J, Grzywa-Czuba R, et al. Expression of Matrix Metalloproteinases and Their Tissue Inhibitors in Peripheral Blood Leukocytes and Plasma of Children with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Mediators Inflamm* 2020; 2020: 1–14.
33. Yilmaz Y, Eren F. Serum biomarkers of fibrosis and extracellular matrix remodeling in patients with nonalcoholic fatty liver disease: association with liver histology. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2019; 31: 43–46.
34. Almeda-Valdes P, Aguilar Olivos NE, Barranco-Fragoso B, et al. The role of dendritic cells in fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Biomed Res Int*; 2015. Epub ahead of print 2015. DOI: 10.1155/2015/768071.
35. Zhang C, Yang M. Targeting T Cell Subtypes for NAFLD and NAFLD-Related HCC Treatment: An Opinion. *Front Med* 2021; 8: 1–7.
36. Diedrich T, Kummer S, Galante A, et al. Characterization of the immune cell landscape of patients with NAFLD. *PLoS One* 2020; 15: e0230307.
37. Lin S-Z, Fan J-G. Peripheral immune cells in NAFLD patients: A spyhole to disease progression. *eBioMedicine* 2022; 75: 103768.