

a cura di Lorella Marselli

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Pisa

Biomarcatori clinici e molecolari per la diagnosi e la stadiazione della NAFLD

Alessandra Scamporrino, Stefania Di Mauro, Agnese Filippello, Francesco Purrello, Salvatore Piro

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Catania

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2102f>

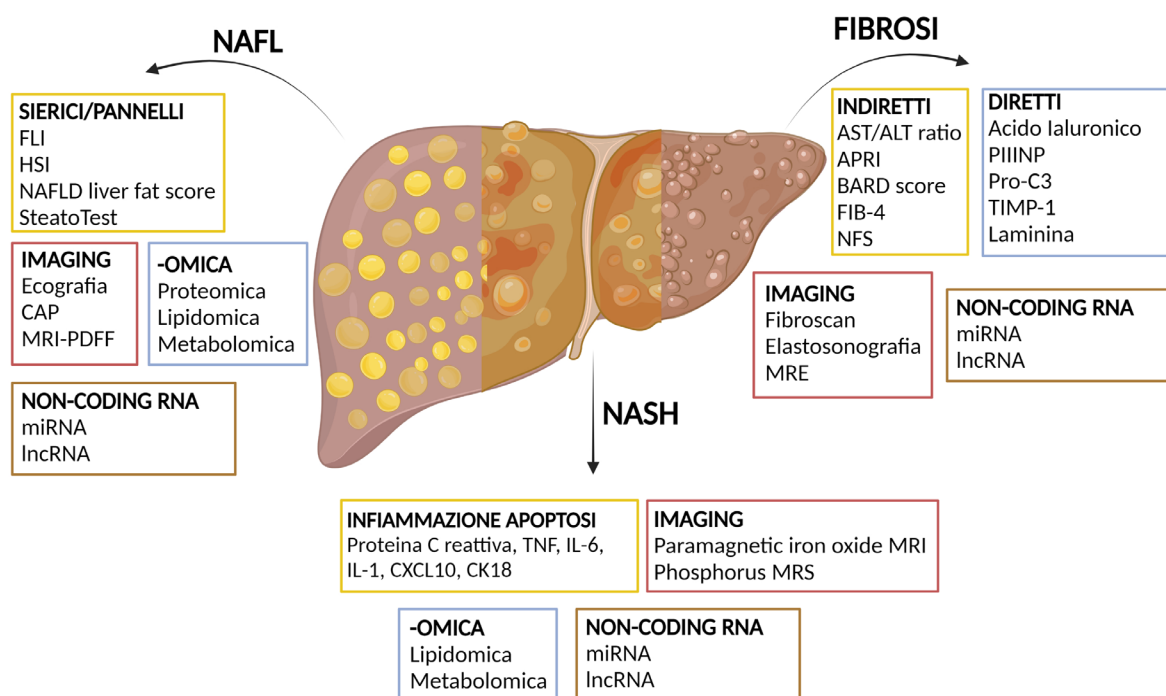
INTRODUZIONE

La steatosi epatica non alcolica (NAFLD, *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*) è l'epatopatia cronica più comune dei paesi industrializzati ed è associata ad un incremento della morbilità e mortalità (1). Si stima che la NAFLD colpisca circa il 25% della popolazione generale (2) anche se la reale prevalenza non è del tutto nota a causa della mancanza di test diagnostici specifici e sensibili. La NAFLD comprende un ampio spettro di condizioni patologiche che vanno dalla semplice steatosi alla steatoepatite non alcolica (NASH, *Non-Alcoholic SteatoHepatitis*) con necro-infiammazione epatica e rapida progressione verso la fibrosi, la cirrosi e, infine, il carcinoma epatocellulare (HCC, *HepatoCellular Carcinoma*) (2-3). La diagnosi di NAFLD è una diagnosi di esclusione e la biopsia epatica è ancora oggi il *gold standard* per differenziare la steatosi semplice dalla NASH e per stadiale il grado di fibrosi. Data l'elevata prevalenza nella popolazione generale, la possibilità di progressione verso condizioni patologiche più gravi e l'impossibilità di applicare la biopsia epatica su larga scala a causa dei rischi connessi all'invasività della metodica, negli ultimi anni uno degli obiettivi principali della ricerca in campo epatologico, è stato quello di identificare nuovi biomarcatori non invasivi per differenziare la steatosi semplice dalla NASH e per stadiale la fibrosi.

In questo articolo ci proponiamo di analizzare sia i biomarcatori di *routine* impiegati nella pratica clinica che i nuovi potenziali biomarcatori per le diverse condizioni patologiche associate alla NAFLD, ovvero, la steatosi semplice (NAFL, *Non-Alcoholic Fatty Liver*), la NASH e la fibrosi focalizzando l'attenzione sui biomarcatori clinici o combinazioni di questi, biomarcatori di *imaging* fino ai biomarcatori ottenuti mediante metodiche -omiche (Fig. 1).

BIOMARCATORI DI NAFL

La diagnosi di NAFL si basa sulla valutazione della presenza di steatosi epatica (steatosi $\geq 5\%$ degli epatociti tramite analisi istologica o accumulo di trigliceridi intraepatico $\geq 5\%$ tramite risonanza magnetica) e sull'esclusione della presenza di altre malattie epatiche (4). La diagnosi di NAFL è importante per iniziare una serie di valutazioni che determinino il grado della malattia. Per questo motivo nella pratica clinica sono stati sviluppati numerosi metodi non invasivi che tentano di sostituire la biopsia epatica per la diagnosi di NAFL (5-6). Questi si basano principalmente sullo sviluppo di biomarcatori e sulle metodiche di *imaging*.

Figura 1 ♦ Rappresentazione schematica dei principali biomarcatori circolanti nella NAFLD

Biomarcatori specifici per la NAFL (Non-Alcoholic Fatty Liver), per la NASH (Non-Alcoholic SteatoHepatitis) e per la fibrosi epatica. FLI (Fatty Liver Index); HSI (Hepatic Steatosis Index); CAP (Controlled Attenuation Parameter); MRI-PDFF (Magnetic Resonance Imaging Proton Density Fat Fraction); TNF (Tumor Necrosis Factor); IL-6 (Interleukin 6); IL-10 (Interleukin 10); CXCL10 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 10); CK18 (Cytokeratin 18); APRI (AST To Platelet Ratio Index); FIB-4 (Fibrosis 4); NFS (NAFLD Fibrosis Score); PIIINP (N-terminal type III collagen propeptide); Pro-C3 (C-terminal cleavage site of N-terminal type II collagen propeptide); TIMP1 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1); MRE (Magnetic Resonance Elastography)

Biomarcatori sierici e pannelli

In questi anni sono stati sviluppati numerosi indici e *score* per diagnosticare la steatosi epatica (7-8). FLI (Fatty Liver Index) comprende BMI, circonferenza vita, livelli sierici di trigliceridi e GGT (*Gamma-Glutamil Transferasi*). FLI ha un'accuratezza diagnostica moderata (AUC=0.84) nel diagnosticare la presenza di grasso nel fegato come determinato dall'analisi strumentale ecografica (9), tuttavia risulta essere poco accurato nel distinguere i differenti gradi di steatosi epatica (10). HSI (Hepatic Steatosis Index) è un pannello di biomarcatori che include ALT/AST, BMI, sesso e presenza di diabete di tipo 2, anch'esso presenta un'accuratezza diagnostica moderata (AUC=0.81) nel diagnosticare la presenza di steatosi epatica (11), questa accuratezza decrementa notevolmente nei bambini obesi (AUC=0.67) (12). Inoltre come FLI è poco accurato nel distinguere i differenti gradi di steatosi epatica (10). Un metodo più accurato e sensibile che usa la spettroscopia con tecnica di risonanza magnetica (MRS) per determinare il contenuto di grasso nel fegato è il NAFLD Liver Fat Score, un algoritmo che considera diversi parametri: presenza di sindrome metabolica e diabete di tipo 2, insulinemia, AST, ALT/AST. Questo *score* ha una buona accuratezza per la diagnosi di steatosi, definita come presenza di grasso nel fegato $\geq 5.6\%$ con un AUC di 0.87 (13), ma l'inclusione dell'insulinemia (che non è un test di *routine*) nella formula potrebbe limitare il suo utilizzo nell'ambito clinico. *SteatoTest* è un pannello che include parametri più specifici per diagnosticare la steatosi. Questo pannello è stato costruito usando la combinazione di sei componenti del *Fibrotest* ($\alpha 2$ -macroglobulina, aptoglobina, apolipoproteina A1, GGT, bilirubina totale ed ALT) in aggiunta a BMI, colesterolo, trigliceridi, glicemia e viene aggiustato per età e sesso. *SteatoTest* mostra una moderata accuratezza nel predire la steatosi ottenuta da biopsia epatica (AUC=0.80) (14). Questo test essendo molto costoso viene difficilmente utilizzato e come gli altri indici non riesce a distinguere i diversi gradi di steatosi.

Biomarcatori di *imaging*

I metodi di *imaging* sono frequentemente utilizzati nella pratica clinica, in questi anni sono stati applicati anche alla NAFL. L'ecografia è il test comunemente utilizzato nei soggetti con sospetta NAFL per la sua facile reperibilità e per il basso costo. In una metanalisi è stato dimostrato che l'ecografia ha un'elevata accuratezza nel distinguere la steatosi moderata da severa ($AUC=0.93$) (15); tuttavia questa metodica presenta dei limiti: non è in grado di rilevare una steatosi inferiore al 20%, viene influenzata dalla presenza di fibrosi ed è osservatore-dipendente (5). CAP (*Controlled Attenuation Parameter*) determina il grado di steatosi misurando il livello di attenuazione degli ultrasuoni determinato dalla presenza di grasso epatico. È stato riportato che CAP ha un AUC di 0.82 nella diagnosi di qualsiasi grado steatosi vs no steatosi (16). CAP presenta dei limiti, una bassa sensibilità nella diagnosi di steatosi lieve ed è osservatore-dipendente. La risonanza magnetica (MRI) basata sulla densità protonica della frazione grassa (MRI-PDFF) è una metodica non invasiva di *imaging* che consente di mappare il grasso presente in tutto il fegato. MRI-PDFF è più precisa di CAP nel rilevare i diversi gradi di steatosi nei pazienti con NAFLD ($AUC=0.99$) (17), tuttavia è una metodica lunga, molto costosa e che richiede personale specializzato.

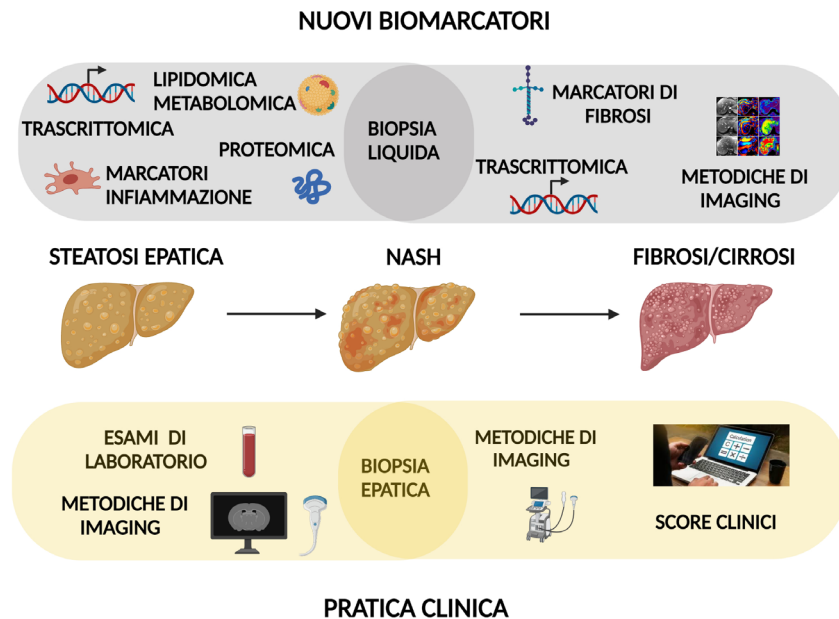
Biomarcatori-omici

Lo sviluppo di nuove tecnologie basate sulle analisi massive ha permesso di identificare nuovi biomarcatori, che potrebbero essere utilizzati nella diagnosi di NAFL, attraverso la misurazione contemporanea di migliaia di molecole. La proteomica permette di analizzare più proteine simultaneamente utilizzando piccole quantità di fluidi biologici. Uno studio effettuato su 70 pazienti (35 controlli e 35 NAFL) ha identificato 20 picchi proteici differenzialmente espressi nei NAFL rispetto ai controlli (sensibilità 89% e specificità 83%), inoltre con questo approccio è stato evidenziato che i pazienti con NAFL avevano livelli di emoglobina basale più alti (18). In un altro studio usando una metodica di proteomica ancora più sensibile (LFQP) sono state identificate 605 proteine differenzialmente espresse nei pazienti NAFL, tuttavia questa tecnica falliva nel distinguere i pazienti con steatosi semplice dai NASH (19). La metabolomica è stata utilizzata per identificare dei sottotipi metabolici specifici della NAFL come gli acidi biliari ed il glutatione dove i loro livelli sierici si modificano in corso di NAFLD (20). Studi basati sulle tecniche di lipidomica hanno permesso di identificare variazioni nei livelli di alcuni lipidi come gli acidi grassi a catena corta e gli eicosanoidi (7); uno studio effettuato su 679 pazienti ha evidenziato un profilo lipidico specifico rappresentato da tre lipidi ("lipid triplet") in grado di diagnosticare la NAFL, tuttavia la *performance* diagnostica di questi biomarcatori era modesta ($AUC=0.71-0.74$) (21). I biomarcatori -omici potrebbero essere usati anche per monitorare la progressione della malattia e valutarne la severità, in una coorte di studio di 467 pazienti NAFLD sono stati identificati due pannelli di trigliceridi che erano in grado di discriminare sia tra soggetti NAFL e controlli ($AUC=0.88$) sia tra NAFL e NASH ($AUC=0.79$) (22). Queste metodiche presentano però dei limiti: questi studi mancano frequentemente di una validazione esterna, il numero di pazienti in cui vengono trovati i biomarcatori è limitato ed infine spesso falliscono nel discriminare i diversi gradi di steatosi e la sua progressione (Fig. 2).

BIOMARCATORI DI NASH

I pazienti con la NASH presentano una maggiore probabilità di sviluppare cirrosi e di morire per cause cardiovascolari o per cause fegato-correlate (23), di conseguenza l'identificazione precoce dei pazienti con NASH e fibrosi all'interno dei pazienti NAFLD quando la patologia è ancora reversibile è di estrema importanza per poter ridurre la mortalità dei pazienti. Questa sfida clinica ha pertanto stimolato l'interesse allo sviluppo di test non-invasivi di diagnosi differenziale tra NAFL e NASH mediante l'identificazione di nuovi marcatori biochimici coinvolti in specifiche *pathway* di progressione da NAFL a NASH quali l'apoptosi, lo stress ossidativo, l'infiammazione e la deregolazione del *signalling* delle adipochine.

Figura 2 ♦ Confronto tra le metodiche attualmente utilizzate nella pratica clinica ed i differenti campi della ricerca volti ad identificare nuovi biomarcatori non invasivi in grado di diagnosticare la steatosi semplice, la NASH e di studiare la fibrosi



Biomarcatori proteici sierici o plasmatici associati all'apoptosi ed all'infiammazione

L'apoptosi gioca un ruolo fondamentale nel danno epatico che si osserva nella NASH, e la citocheratina 18 (CK-18), rappresenta un biomarcatore di tale processo. La CK-18 è infatti la principale proteina che costituisce dei filamenti intermedi degli epatociti, e nelle cellule che vanno incontro ad apoptosi viene clivata ad opera della caspasi 3, i frammenti di CK-18 vengono quindi rilasciati a livello extracellulare (24). I livelli sierici dei frammenti di CK-18 sono facilmente misurabili mediante saggio ELISA. Una metanalisi relativa a 11 studi ha evidenziato che la CK-18 presenta una sensibilità complessiva del 66% ed una specificità complessiva dell'82%; per cui la limitata accuratezza di questo biomarcatore ne impedisce l'applicazione clinica ai fini dello *screening* e della definizione di NASH (25). La CK-18 è stata combinata con altri indicatori per costituire dei pannelli di biomarcatori nel tentativo di incrementare l'efficienza diagnostica per la discriminazione dei pazienti NASH. I livelli sierici dei frammenti M30 della CK-18 sono stati combinati con i livelli sierici dell'antigene di superficie che media l'apoptosi sFAS, coinvolto nell'attivazione della via estrinseca dell'apoptosi negli epatociti. La combinazione di questi due *marker* ha determinato un incremento considerevole dell'accuratezza diagnostica raggiungendo un AUC di 0.79-0.93. Tuttavia lo studio è stato condotto su una numerosità campionaria ristretta, questo risultato necessita pertanto di ulteriori validazioni sperimentali (26). Younossi et al. hanno associato i livelli della CK-18 e dei suoi frammenti, al rilevamento dell'adiponectina e della resistina in una coorte di 101 pazienti ottenendo in questo modo valori di AUC tra 0.73 e 0.91; questo studio è stato condotto su un numero limitato di pazienti obesi per cui necessita di ulteriori validazioni (27). Un ulteriore studio ha dimostrato che la combinazione del *Fibroblast Growth Factor 12* (FGF12) e CK-18 determina il raggiungimento di valori di sensibilità e specificità superiori al 90% (28). La steatoepatite è associata ad uno stato di infiammazione cronica, diversi studi hanno proposto il dosaggio di indicatori di infiammazione quali la proteina C reattiva (PCR), TNF, IL-6, IL-1, IL-1RA (*receptor antagonist protein*), CXCL10 (CSC-chemokine 10). Tuttavia tali studi hanno portato a risultati discordanti ed inconsistenti ed a mancanza di specificità per la condizione di NASH (29). Ajmera et al. in una coorte di 648 pazienti con NAFLD accertata mediante biopsia hanno testato l'efficienza diagnostica di 32 *biomarker* plasmatici, tra cui diversi associati ad infiammazione. Tra i biomarcatori analizzati, a seguito di correzione per fattori clinici e metabolici solamente l'*Activated Plasminogen Activator Inhibitor* (APAI-1) manteneva il suo valore predittivo per la condizione di NASH (30).

Biomarcatori-omici

Lo stress ossidativo è uno dei meccanismi chiave del danno epatico e porta alla formazione di prodotti di ossidazione dei lipidi che possono essere rilevabili nei campioni di siero.

Studi di lipidomica effettuati mediante l'impiego della spettrometria di massa hanno portato all'identificazione di specifici prodotti derivanti dall'ossidazione di acidi grassi associati alla NASH. In particolare sono stati identificati i prodotti dell'ossidazione dell'acido arachidonico, *11-hydroxyeicosatetraenoic acid* (11-HETE) ed i prodotti dell'ossidazione dell'acido linoleico *13 hydroxyoctadecadienoic acid* (HODE) e *9 and 13 oxo-octadecadienoic acids* (oxo-ODE) come indicatori di NASH. Il rapporto tra acido linoleico e 13-HODE è stato inoltre incorporato insieme ad altri parametri clinici (età, BMI e AST) per costituire un pannello denominato oxNASH. Questo pannello raggiunge una sensibilità dell'81% ed una specificità del 97% nella discriminazione dei pazienti NASH rispetto ai *not*-NASH (31).

In un altro studio basato sull'approccio della metabolomica è stato riscontrato un incremento della taurina, di coniugati della glicina e degli acidi biliari primari e secondari nei pazienti NASH in fase post-prandiale (32).

Biomarcatori di imaging

Le metodiche di *imaging* di routine quali l'ultrasonografia addominale, CT o MRI non sono in grado di distinguere la NAFL dalla NASH. Diverse tecniche basate sull'MRI sono state sperimentate negli animali ed in studi pilota effettuati nell'uomo per la diagnosi di pazienti NASH. La *super paramagnetic iron oxide MRI* è in grado di rilevare la funzione di *uptake* delle cellule di Kupffer, che è alterata in modelli *in vivo* e nell'uomo in presenza di NASH, ma il protocollo attuale richiede *scanning* ripetuti nel corso di 72 ore per cui questa metodica presenta limiti logistici (33). Il *turnover* della membrana degli epatociti e l'ATP intracellulare sono alterati nella NASH e possono essere misurati tramite *phosphorus MRS*. In particolare, il rapporto tra *alpha-nucleotide triphosphate/total phosphate* presenta un AUC di 0.71 per la discriminazione dei pazienti NASH (34). Infine la *performance* diagnostica della *stiffness* epatica, misurata mediante risonanza magnetica elastografica, necessita di essere valutata in coorti più ampie a seguito di correzione per gli stadi di fibrosi (35) (Fig. 2).

BIOMARCATORI DI FIBROSI

La fibrosi associata alla NASH ha diversi stadi che vanno dall'assenza di fibrosi (Fo) alla cirrosi (F4); dal punto di vista clinico viene distinta la fibrosi clinicamente significativa (F2-F4) dalla fibrosi avanzata o severa (F3-F4). Tale distinzione è stata utilizzata per interpretare gli studi che hanno utilizzato test non invasivi per la diagnosi di fibrosi epatica. È noto che esistono differenti fattori di rischio in grado di predire lo sviluppo della fibrosi, quali l'età avanzata, l'obesità grave, il diabete di tipo 2, l'elevato rapporto AST-ALT, l'ipertensione, la dislipidemia e la presenza della sindrome metabolica (36-38).

Secondo uno studio pubblicato su *Hepatology*, lo stadio della fibrosi epatica potrebbe essere il fattore più importante nel determinare la prognosi della NAFLD e nel prevedere il rischio di progressione verso la cirrosi e le complicanze ad essa associate (39).

Pertanto l'individuazione di nuovi biomarcatori è tra le strategie non invasive ad oggi più ricercare per comprendere come stadiare la fibrosi epatica in questa popolazione di pazienti.

Tra i biomarcatori utilizzati per stadiare la fibrosi possiamo distinguere: a) i biomarcatori indiretti per la fibrosi epatica; b) i biomarcatori specifici per la fibrogenesi o la fibrinolisi; c) biomarcatori di *imaging* per la fibrosi.

Biomarcatori indiretti per la fibrosi epatica

I biomarcatori indiretti non misurano direttamente la fibrogenesi o la fibrinolisi ma sono spesso associati a fattori di rischio per la fibrosi; inoltre a causa della loro ridotta accuratezza vengono spesso utilizzati come pannelli cioè una combinazione di 2 o più marcatori di rischio per la fibrosi epatica.

AAR (AST: ALT Ratio) e APRI (AST: *platelet ratio index*) sono tra i pannelli più semplici da calcolare ma presentano una bassa accuratezza nel diagnosticare la fibrosi avanzata di stadio 3 (AUC AST: ALT ratio: tra 0.66-0.74; AUC APRI: 0.74)

(40-41). Il *BARD score* deriva dalla somma di 3 variabili (BMI, AST-ALT Ratio, presenza di diabete) e mostra una moderata accuratezza nell'individuare i soggetti con fibrosi F3 (AUC compreso tra 0.69 e 0.81) (42-43). *FIB-4 index* (*Fibrosis Index Based on four factors*) prevede un calcolo più complesso e spesso vengono utilizzati dei calcolatori *on-line*, comprende l'età, AST, ALT e la conta piastrinica, ha una buona *performance* diagnostica (AUC di 0.80 nell'individuare i soggetti con fibrosi F3) (44). Il *NAFLD fibrosis score* (NFS) (45) si ottiene dalla combinazione di età, presenza di diabete, indice di massa corporea, piastrine, albumina e AAR. Questo *score* è stato validato in più studi con un AUC stimato tra 0.75 e 0.83 nel prevedere la fibrosi F3 (46).

Nonostante questi *score* siano meno accurati rispetto a specifici *marker* di fibrosi sono tra gli strumenti di screening più utilizzati grazie alla loro elevata applicabilità.

Biomarcatori specifici per la fibrosi

I biomarcatori specifici per la fibrosi prendono in considerazione molecole direttamente coinvolte nella fibrogenesi e/o nella fibrinolisi. La fibrosi epatica si sviluppa attraverso la deposizione epatica della matrice extracellulare di cui l'acido ialuronico (HA) è un componente principale (47). Se usato da solo, i livelli sierici di HA mostrano un AUC di 0.87 per la fibrosi F2 e di 0.92 per la cirrosi (48). Altri componenti principali della matrice extracellulare includono il collagene, i proteoglicani, l'elastina, la fibronectina e la laminina. Il peptide ammino-terminale procollagene III (PIIINP) del siero deriva dalla sintesi di nuovo collagene di tipo III o dalla degradazione di fibrille di collagene di tipo III esistenti; i livelli di PIIINP da soli non sono un buon marker diagnostico per la fibrosi epatica nella NAFLD (49) ma è stato osservato che Pro-C3 (il neo-epitopo di PIIINP) riflette la vera formazione del collagene di tipo III (50) ed è stato dimostrato che l'aumento dei livelli sierici di Pro-C3 è correlato ai componenti chiave della NASH e della fibrosi (51). I livelli circolanti dell'inibitore tissutale delle metalloproteinasi 1 (TIMP1) sono responsabili della composizione della matrice extracellulare, della guarigione della ferita e riflettono le alterazioni nel rimodellamento della matrice tissutale durante la fibrogenesi epatica e la fibrinolisi (52). TIMP1 ha un'eccellente accuratezza diagnostica (AUC: 0.97) nel differenziare i pazienti obesi e affetti da fibrosi NASH-correlata da soggetti di controllo sani di pari età (53). La laminina è la glicoproteina più abbondante nelle membrane basali ed il livello di laminina sierica è in grado di diagnosticare la fibrosi in pazienti con NAFLD con un'ottima *performance* diagnostica (AUC: 0.87) (54). Sebbene i biomarcatori specifici per la fibrosi siano più promettenti, il loro costo e la loro disponibilità hanno limitato il loro utilizzo nella pratica di *routine*. Tra i pannelli di biomarcatori specifici della fibrosi troviamo l'*Enhanced Liver Fibrosis test* (ELF) che è stato sviluppato in base al concetto secondo cui la fibrosi epatica è un processo dinamico che determina un aumento dei livelli sierici dei *marker* del *turnover* della matrice extracellulare. L'ELF comprende tre biomarcatori della fibrosi (HA, TIMP1 e PIIINP) e presenta un'eccellente *performance* diagnostica nel predire la fibrosi avanzata in pazienti adulti e pediatrici con NAFLD (rispettivamente AUC 0.93 e 0.99) (55-56). Un altro strumento, ottenuto dalla combinazione di cinque biomarcatori (aptoglobina, α 2-macroglobulina, apolipoproteina A1, bilirubina totale e GGT), utilizzato per predire la presenza di fibrosi è il *FibroTest*. Il valore diagnostico del *FibroTest* è stato valutato in un'ampia coorte di pazienti NAFLD con un AUC di 0.88 (56).

Il *NAFLD FibroMeter* è un indice composto da peso corporeo, indice di protrombina e livelli sierici di ALT, AST, ferritina e glucosio a digiuno. In due studi condotti in Europa e in Asia, il *NAFLD FibroMeter* ha superato altri test sierici per la diagnosi di fibrosi con un AUC di 0.76 nel discriminare la fibrosi F2 e 0.77 nel discriminare la fibrosi F3 (57-58). Infine, l'*Hepascore*, composto da età, sesso e livelli sierici di bilirubina, GGT, HA e α 2-macroglobulina, ha una buona *performance* diagnostica (AUC: 0.82) per diagnosticare la fibrosi avanzata (stadio F3-F4) in pazienti con NAFLD (59).

Nonostante presentino una *performance* diagnostica superiore a quella dei biomarcatori indiretti di fibrosi il loro utilizzo su larga scala è limitato dalla scarsa disponibilità di marcatori specifici di fibrosi, dal loro costo e dall'utilizzo di formule brevettate.

Biomarcatori di *imaging* per la fibrosi

Negli ultimi dieci anni, i progressi negli studi di *imaging* hanno rivoluzionato la gestione delle malattie del fegato migliorando la capacità di quantificare in modo non invasivo la fibrosi epatica.

Il Fibroscan o VTCE (Vibration Controlled Transient Elastography) prevede l'utilizzo di una sonda ecografica che trasmette un'onda di vibrazione che si propaga attraverso il fegato consentendo di valutarne l'elasticità; la velocità di propagazione è direttamente proporzionale alla rigidità del tessuto. I risultati sono espressi in kilopascal (kPa), solitamente il valore medio di 10 misurazioni in individui sani è compreso tra 1.5 e 7.5 kPa mentre valori >10.5 kPa sono indice di presenza di fibrosi e cirrosi avanzata (60). Sfortunatamente, la sonda VTCE o sonda M sono meno affidabili nei pazienti gravemente obesi con NAFLD, perché il tessuto adiposo attenua sia l'onda elastica sia gli ultrasuoni (61). Pertanto, per superare questo problema in pazienti con BMI >30 kg/m² è stata sviluppata una nuova sonda chiamata sonda XL. La *performance* diagnostica delle sonde FibroScan M e XL per la diagnosi di fibrosi avanzata sono rispettivamente 0.88 e 0.85 (62).

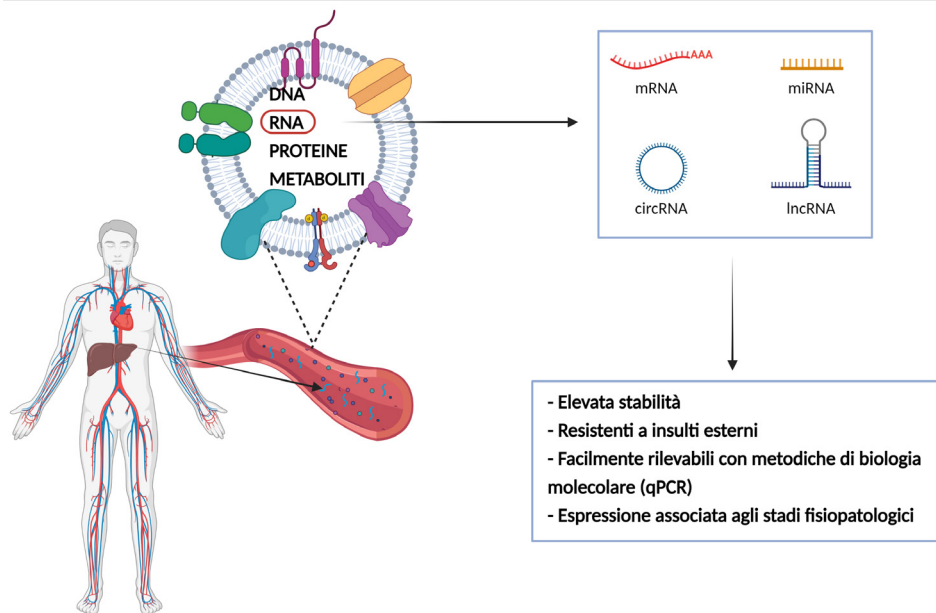
L'elastografia con tecnica ARFI (Acoustic Radiation Force Impulse) è una metodica alternativa per stimare la rigidità del tessuto epatico che può essere integrata ad una sonda ad ultrasuoni convenzionale, fornendo così la *stiffness* durante l'ecografia di *routine*. Durante l'esecuzione dell'*imaging*, una regione di interesse del fegato viene eccitata meccanicamente usando impulsi acustici. La rigidità epatica è espressa in m/s, questa metodica presenta un *range* ristretto (0,5-4,4 m/s) e ciò ne limita la definizione dei valori di *cut-off* per discriminare alcuni stadi di fibrosi; è stato infatti osservato che l'accuratezza diagnostica dell'elastografia con tecnica ARFI è superiore nel discriminare la fibrosi e la cirrosi grave (AUC: 0.74-0.97 per F3; AUC: 0.78-0.89 per F4) rispetto a quelle meno gravi (AUC: 0.70-0.83 per F2) (63).

L'elastografia a risonanza magnetica (MRE) è un'altra tecnica non invasiva per diagnosticare la fibrosi nei pazienti con NAFLD. Funziona combinando la risonanza magnetica con onde sonore per creare una mappa visiva (elastogramma), che mostra la rigidità del tessuto epatico. In differenti studi è stato osservato che i valori di *stiffness* del tessuto epatico, ottenuti mediante MRE, sono abbastanza riproducibili (64-65). In particolare, una metanalisi di nove studi comprendenti 232 pazienti con NAFLD ha evidenziato che la MRE è in grado di rilevare la fibrosi con un alto livello di accuratezza, indipendente dall'infiammazione epatica e dal BMI (a differenza del FibroScan), con valori AUC di 0.86-0.91 per tutti gli stadi della fibrosi (66). Questa tecnica è più accurata del FibroScan nel rilevare la fibrosi F2 (AUC: 0.86-0.89 contro AUC: 0.84) e la fibrosi F4 (AUC: 0.88-0.97 contro AUC: 0.95) (67). Tuttavia, la sua applicazione su larga scala è limitata dal costo e dalla mancata disponibilità rendendo improbabile che MRE possa essere applicata come test di screening (Fig. 2).

BIOMARCATORI AD RNA

Nei fluidi biologici sono presenti molecole di RNA appartenenti a differenti classi tra cui RNA messaggeri, long non-coding RNA (lncRNA), circular RNA (circRNA), microRNA (miRNA). La presenza di molecole di *cell-free* RNA (*cf*-RNA) nei fluidi corporei ha stimolato l'interesse allo studio di queste molecole come nuovi biomarcatori non invasivi diagnostici, prognostici e di monitoraggio di risposte terapeutica in diversi tipi di patologie (68-69).

Una caratteristica fondamentale che rende le molecole di *cf*-RNA degli ottimi biomarcatori è data dalla loro elevata stabilità, queste molecole infatti sono protette dall'attività delle RNasi endogene presenti nei fluidi corporei e sono resistenti a diversi insulti esterni, quali cicli multipli di congelamento-scongelo, bollitura, condizioni di pH estreme, conservazione prolungata, trattamento con RNasi esogene (70-71). L'estrema stabilità degli RNA circolanti è determinata dal fatto che essi non si trovano liberi nei fluidi corporei ma inglobati all'interno di vescicole membranose (i.e. microvescicole, esosomi, corpi apoptotici), complessati ad *RNA binding protein* (i.e. NPM1, ArgonAUTA 2) o associati a lipoproteine, tutti questi meccanismi hanno un ruolo protettivo nei confronti della degradazione (72). Un'altra caratteristica che rende le molecole di RNA degli ottimi biomarcatori è data dal fatto che le tecniche utilizzate per la loro rivelazione sono estremamente sensibili. A differenza delle proteine, infatti, gli acidi nucleici vengono rilevati e quantificati mediante metodiche basate sulla PCR, che determina un'amplificazione esponenziale del *template* originale. Di conseguenza, le tecniche di rilevazione delle proteine sono molto meno sensibili rispetto a quelle sviluppate

Figura 3 ♦ **Rappresentazione schematica dei biomarcatori circolanti nella NAFLD**

Gli RNA circolanti (i.e. mRNA, miRNA, lncRNA e circRNA) possono essere inglobati all'interno di vescicole membranose o liberi ed associati a RNA binding protein. Le vescicole membranose, oltre l'RNA, racchiudono molecole di diversa natura tra cui DNA, proteine e metaboliti

per gli acidi nucleici. Teoricamente infatti persino una singola molecola di RNA potrebbe essere rilevata mediante PCR quantitativa (73). Infine è importante sottolineare che diversi studi hanno riportato che differenti profili di espressione di molecole di RNA circolanti sono associati a differenti stati fisiologici o patologici (74), questi studi avvalorano quindi l'utilizzo di queste molecole come biomarcatori non invasivi; l'intero profilo di espressione delle molecole di RNA inoltre nei fluidi biologici può essere valutato mediante metodiche *high-throughput*, tra cui la *Next Generation Sequencing* (NGS) ed i *microarray*, per cui l'analisi di queste molecole ha un ruolo fondamentale nella *biomarker discovery* (73) (Fig. 3).

RNA circolanti per la diagnosi di NAFLD nella popolazione generale

La maggior parte dei dati riguardanti il dosaggio degli RNA circolanti come biomarcatori di NAFL è relativa ai miRNA. Akuta et al. hanno analizzato i livelli di espressione sierici del miR-122 in pazienti NAFL che sono andati incontro a due prelievi biotipici seriali. In questo modo hanno riscontrato che i pazienti che andavano incontro ad un miglioramento degli *score* istopatologici presentavano un decremento dei livelli di espressione del miR-122 alla seconda biopsia rispetto alla prima biopsia. Inoltre vi era un'associazione significativa tra il rapporto dei livelli di espressione del miR-122 (alla seconda biopsia rispetto alla prima) ed i cambiamenti degli *score* istopatologici. Gli autori hanno infine riscontrato un'associazione anche tra il rapporto dei livelli di espressione del miR-122 ed i parametri clinici di *routine* quali i livelli di AST ed ALT (75). In uno studio è stato riportato che anche i livelli del miR-21 erano più bassi nei NAFL rispetto ai soggetti sani (76). Yamada et al. hanno studiato la presenza di steatosi epatica ed i livelli sierici di cinque miRNA (miR-21, -34a, -122, -145, -451) associati all'omeostasi lipidica in 403 soggetti. I livelli sierici di quattro su cinque miRNA analizzati (miR-21, -34a, -122, -451) erano significativamente più alti nei soggetti NAFL (92/403) rispetto ai sani, inoltre i livelli di espressione del miR-122 erano correlati anche al grado di steatosi (77).

In un altro studio tecnicamente più avanzato è stata valutata, tramite *deep sequencing*, l'espressione dei miRNA circolanti su 20 pazienti NAFL e 20 controlli. Successivamente i miRNA differenzialmente espressi sono stati analizzati in una coorte più ampia di pazienti (90 controlli vs 152 NAFL) ed i risultati sono stati validati in una coorte esterna (80 controlli

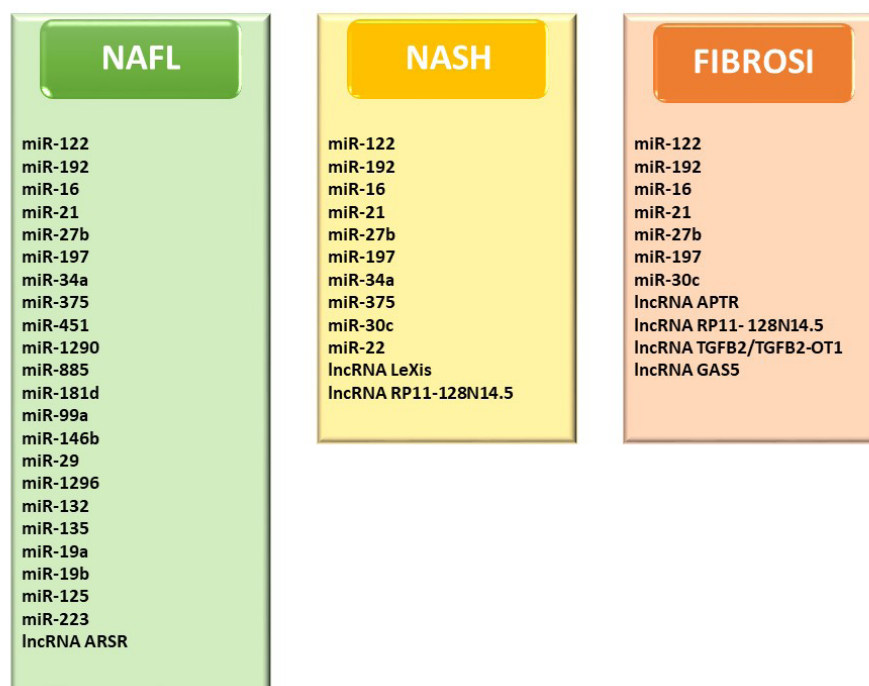
vs103 NAFL). Il pannello di miRNA trovato (miR-122, -1290, -27b, -192) mostrava un'elevata accuratezza diagnostica per NAFL (AUC: 0.86; sensibilità=85.6%, specificità=73.3%), inoltre questi miRNA avevano una sensibilità e specificità superiore rispetto ad ALT e FIB-4 (78). Raitoharju et al. hanno riportato l'associazione dei livelli nel sangue dei miR-122 e -885 con la steatosi epatica rilevata attraverso ecografia in un'ampia coorte di pazienti (n=871) di età compresa tra i 34 ed i 49 anni. I livelli di espressione dei miR-122 e -885 erano up-regolati nei soggetti con steatosi epatica con una *performance* diagnostica paragonabile, per il miR-122, ai livelli di transaminasi nel sangue. Inoltre tramite approccio di metabolomica veniva mostrata una correlazione positiva tra i livelli del miR-122 e di alcune classi di lipoproteine (VLDL, IDL, LDL) ed una correlazione negativa tra miR-885 ed i livelli di colesterolo HDL (79). In un altro studio sono stati saggiati altri miRNA: i livelli di espressione dei miR-181d, -99a, -197 e -146b erano più bassi nei NAFL rispetto ai controlli, inoltre i livelli dei miR-197 e -146b erano inversamente correlati con il grado di infiammazione del fegato ed i miR-181d e -99a erano inversamente correlati con i livelli di GGT nei pazienti NASH (80). Infine studi recenti hanno mostrato che i livelli di espressione di altri miRNA (miR-29, -1296, -132, -135) erano alterati nei soggetti con NAFL ed erano associati al rischio di insorgenza della malattia (81-85). Ad oggi, invece, solo un lncRNA è stato riconosciuto come potenziale biomcatore della NAFL: i livelli d'espressione del lncRNA ARSR sono elevati nel siero dei pazienti NAFL rispetto ai controlli, inoltre in modelli murini di NASH è stato riportato che questo lncRNA promuove la lipogenesi regolando la steatosi a livello epatico (86).

Le vescicole extracellulari circolanti (esosomi ed ectosomi) contengono differenti molecole (miRNA, mRNA, proteine, DNA) e possono essere utilizzati come biomarcatori di NAFLD (6). Gli ectosomi sono vescicole che derivano da frammenti della membrana plasmatica e che vengono rilasciati nello spazio extracellulare dove si legano a cellule riceventi rilasciando le loro informazioni molecolari. Nei pazienti NAFL è stato osservato un incremento del numero di ectosomi nei monociti e nelle cellule *natural-killer* ed un decremento nei neutrofili e nelle cellule endoteliali, i livelli degli ectosomi sono stati associati, quindi, alla diagnosi di NAFL; inoltre questi livelli sono differenti nei pazienti NAFL rispetto ai NASH (87) (Fig. 4).

RNA circolanti per la diagnosi differenziale di NAFL e NASH

Così come evidenziato per la NAFL, la maggior parte dei dati riguardanti il dosaggio degli RNA circolanti come biomarcatori di NASH è relativa ai miRNA. Il primo tentativo dell'utilizzo dei miRNA circolanti come biomarcatori di diagnosi differenziale e di progressione da NAFL a NASH è rappresentato dallo studio pionieristico svolto da Cermelli et al. del 2011. In particolare, essi hanno riscontrato un incremento dei livelli di espressione sierici dei miRNA-122, -16, -34a in 34 pazienti affetti da NAFLD rispetto a 19 controlli. In media il miRNA-122 presentava un incremento dei livelli di espressione di circa 7.2 volte, il miRNA-34a di circa 5.3 volte ed infine il miRNA-16 passava da livelli di espressione irrilevabili nei controlli a circa 1000 copie per mL di siero (88). Ancora più interessante è il risultato che i ricercatori hanno ottenuto sottostratificando la popolazione NAFLD, tramite questa analisi infatti hanno osservato che i miRNA-122 e -34a presentavano un ulteriore incremento dei livelli di espressione rispettivamente di circa 2 e 3 volte nei pazienti NASH rispetto ai pazienti con steatosi semplice. Inoltre, mediante analisi delle curve ROC è stato riportato che i miRNA-122 e -34a presentavano un'elevata efficienza diagnostica (miRNA-122 AUC: 0.93; miRNA-34a AUC: 0.96) nella distinzione dei pazienti NAFLD rispetto ai controlli sani, che tuttavia si abbassava a 0.70 e 0.76 nella distinzione NASH *versus* NAFL (88).

Un altro importante studio volto all'identificazione di miRNA come biomarcatori di diagnosi differenziale di NAFL o NASH è stato condotto da Pirola et al. nel 2015. Essi hanno effettuato il *profiling* di un set di 84 miRNA in pazienti affetti da NAFL e da NASH rispetto ai controlli sani (n=48), successivamente hanno confermato la sovraespressione (superiore a 2 volte) di 6 miRNA su una coorte di pazienti indipendente (n=96): miR-122, -192, -19a, -19b, -125 e -375. Tra questi miRNA solamente tre, ovvero il miR-122, -192 e -375 erano associati in maniera statisticamente significativa alla severità istologica della patologia e significativamente sovraespressi nei pazienti affetti da NASH rispetto ai pazienti con NAFL, con un'efficienza diagnostica rispettivamente di AUC: 0.69, 0.68, 0.72 nella distinzione dei pazienti NAS>5 rispetto a NAS<5 (89).

Figura 4 ♦ Rappresentazione schematica del pattern degli RNA non codificanti nella NAFLD

L'illustrazione descrive tre gruppi di miRNA e lncRNA correlati alla diagnosi di NAFL (*Non-Alcoholic Fatty Liver*), NASH (*Non-Alcoholic SteatoHepatitis*) e fibrosi epatica

Successivamente Becker et al. hanno fornito un'ulteriore validazione dei miRNA miR-122 e -192 come indicatori della severità istologica della patologia (90).

In particolare essi hanno analizzato l'alterazione dell'espressione genica di 4 microRNA: miR-122, -192, -21, -223 in 137 pazienti NAFLD con obesità moderata o con obesità severa (di cui 87 NASH e 50 *Simple Steatosis* SS) rispetto a 61 controlli, ed hanno analizzato la correlazione tra i loro livelli di espressione ed i livelli di biomarcatori di routine quali AST, ALT ed i frammenti CK18-Asp396, rilasciati dagli epatociti durante l'apoptosi. Tra i miRNA analizzati, i miR-122 e -192 erano sovraespressi nei pazienti NASH con obesità severa rispetto ai pazienti SS con obesità severa. Questa deregolazione invece non veniva confermata nel confronto NASH/SS nei pazienti con obesità moderata. Il miR-21 era sovraespresso nei pazienti NASH rispetto ai pazienti SS con obesità sia moderata che severa. Il miR-223 era sovraespresso nei pazienti NASH rispetto ai controlli, ma non era in grado di discriminare tra i due fenotipi patologici (90).

Inoltre i livelli di espressione dei miR-122 e -192 presentavano una correlazione positiva con i livelli di ALT, CK18-Asp396 e con il NAS score ed i livelli del miR-21 presentavano una correlazione positiva con ALT ed il NAS score. Successivamente, le concentrazioni sieriche di questi tre microRNA sono state utilizzate per determinare uno *scoring system* con un range da 0 a 3 sulla base del quale è stata valutata l'efficienza diagnostica per la distinzione dei pazienti NASH rispetto a NAFL. Tramite queste analisi Becker et al. sono arrivati alla conclusione che la combinazione dello *scoring system* basato sui miRNA ed il biomarcatore CK18-Asp396 portava ad un AUC di 0.83 con una sensibilità del 93% ed una specificità dell'83% (90).

In uno studio successivo del 2016 (91), Liu et al. hanno riscontrato un incremento di espressione dei miRNA miR-122, -192, -34a e -16 in pazienti affetti da NAFLD (con diagnosi accertata mediante biopsia epatica n=48) rispetto ai soggetti di controllo sani (n=37); tra questi miRNA inoltre i miR-122, -16 e -34a erano in grado di discriminare tra i pazienti affetti da NAFL (n=17) ed i pazienti affetti da NASH (n=31). Gli autori hanno inoltre riscontrato che il miR-34a presentava un'efficienza diagnostica ed una sensibilità (AUC: 0.81, sensibilità: 0.70, specificità: 0.86) per la condizione di NASH superiori rispetto a quella di altri biomarcatori clinici già noti, in particolare l'ALT (AUC: 0.68, sensibilità: 0.84, spe-

cificità: 0.94) e la CK-18 M30 e M60 (M30 AUC: 0.70 sensibilità: 0.41, specificità: 0.94; M60 AUC: 0.72 sensibilità: 0.52, specificità: 0.94).

Infine lo studio più recente relativo ai miRNA come biomarcatori di progressione della steatosi epatica è stato condotto nel 2018 da Mireia Lopez-Riera et al. che riesaminando sperimentalmente miRNA precedentemente riportati in letteratura, hanno dimostrato che i miRNA -27b, -34a, -22, -122, -192 e -21 sono indotti ed i miRNA -30c, -16 e 197 sono repressi nel siero di pazienti con patologia severa rispetto ai pazienti con steatosi semplice. Inoltre i rapporti miR-34a/miR-197 e miR-27b/miR-30c rappresentavano i biomarcatori con efficienza diagnostica migliore per l'identificazione rispettivamente dei pazienti con NASH definita mediante SAF ≥ 2 AUC: 0.81 e dei pazienti con NASH definita tramite NAS score ≥ 5 AUC: 0.79 (92). Ad oggi quindi, sulla base dei dati finora riportati emerge che l'up-regolazione dei miRNA-122, -192, -34a è concordante in diversi studi, per cui la validazione in coorti più ampie di pazienti e successivamente in trial clinici potrebbe portare all'introduzione di questi *biomarker* a RNA nella pratica clinica utili per l'identificazione di pazienti a rischio di progressione dalla steatosi semplice alla steatoepatite non alcolica.

Pochi studi, invece, hanno valutato il dosaggio di lncRNA come biomarcatori di NASH. Jung Gil Park et al. hanno analizzato i livelli di espressione mediante PCR quantitativa del lncRNA LeXis nel plasma di 35 pazienti NASH rispetto a 9 pazienti NAFL con diagnosi accertata mediante biopsia. In questo modo, hanno osservato che il lncRNA LeXis era sovraespresso nei pazienti NASH rispetto ai pazienti NAFL con una performance diagnostica di AUC: 0.74, sensibilità del 54.3% e specificità del 100% (93).

In uno studio pubblicato nel 2019 dal nostro gruppo (94), a seguito dell'analisi *microarray* è stata validata la sovraespressione a livello sierico del lncRNA RP11-128N14.5 in pazienti con patologia severa (NAS score ≥ 5 versus NAS score ≤ 4) con un'efficienza diagnostica di 0.71 (sensibilità=73.7%, specificità=70.4%) superiore all'efficienza diagnostica di AST (AUC=0.66) ed ALT (AUC=0.37) (Fig. 4).

RNA circolanti per la stadiazione di fibrosi

È ormai noto il coinvolgimento dei miRNA nella patogenesi della NAFLD e la loro deregolazione nel fegato di pazienti con fibrosi NASH-correlata (95). Purtroppo nonostante siano differenti i lavori che hanno valutato il ruolo dei miRNA come biomarcatori sierici sia nella NAFL che nella NASH ad oggi solo pochi studi hanno analizzato i miRNA come biomarcatore di fibrosi nella popolazione NAFLD.

Nello studio condotto da Miyaak et al. è stata analizzata l'espressione del miR-122 su 67 pazienti NAFLD stadiati per fibrosi. È stato osservato che i livelli sierici del miR-122 erano significativamente down-regolati nei pazienti con fibrosi severa rispetto ai pazienti con fibrosi lieve. Inoltre è stato valutato il valore diagnostico di questo biomarcatore non invasivo ed è stato confrontato con altri biomarcatori di fibrosi come l'acido ialuronico e il collagene di tipo IV. La curva ROC del miR-122 mostrava una *performance* diagnostica migliore (0.82) rispetto a quella dell'acido ialuronico e collagene di tipo IV rispettivamente di 0.74 e 0.72 (96).

Nello studio condotto da Pirola et al., precedentemente menzionato, invece, il miR-122 era up-regolato nei pazienti con fibrosi avanzata (F 2-3) rispetto ai pazienti con fibrosi 0-1 con un AUC pari a 0.61. Sebbene questo valore predittivo non sia ideale per un buon biomarcatore, la *performance* diagnostica del miR-122 era nettamente superiore a quella della CK-18 (AUC: 0.49) e leggermente più di ALT (AUC: 0.59) e AST (AUC: 0.64) nel predire la fibrosi (89).

Nel 2018, López-Riera ed il suo gruppo hanno effettuato una validazione in una coorte indipendente di pazienti NAFLD (stadiati anche per fibrosi) dei miRNA sierici precedentemente identificati. In particolare, è stata analizzata la deregolazione di questi miRNA dividendo la coorte anche in base al grado di fibrosi in 2 gruppi (F ≤ 2 o F >2) o in 5 gruppi (F0, F1, F2, F3, F4, F5). Dividendo la coorte da F0 a F5 è stato osservato che i livelli d'espressione del miR-122 e del miR-192 tendono ad aumentare negli stadi di fibrosi lieve (F1 e F2) e a diminuire nella fibrosi severa (F3 e F4). Il miR-122 in questo studio, presentava un trend d'espressione opposto rispetto a quello riportato da Miyaak; questo purtroppo ne limita l'utilizzo nel prevedere la fibrosi severa nei pazienti NAFLD (92).

Un altro microRNA che presentava un andamento opposto rispetto ai dati presenti in letteratura è il miR-16; infatti nello studio condotto da López-Riera miR-16 era down-regolato nei soggetti con fibrosi F3-4 a differenza dello studio

condotto da Liu et al. dove il miR-16 era up-regolato e presentava una buona *performance* diagnostica nel predire la fibrosi (AUC: 0.71) (91).

Invece sempre il gruppo di López-Riera ha dimostrato per la prima volta l'associazione dei miRNA-21, -27b e -30c con la fibrosi F3-4 in particolare miR-27b e miR-21 erano up-regolati nel confronto F≤2 vs F>2 mentre miR-30c era down-regolato nello stesso confronto. Nello stesso studio è stata valutata anche la *performance* diagnostica di questi miRNA nel discriminare i soggetti con fibrosi severa. Dai risultati è emerso che i miRNA non mostrano una *performance* diagnostica migliore rispetto agli algoritmi di fibrosi convenzionali. Tra i miRNA analizzati quello con un AUC (0.72) più elevato era il miR-30c (down-regolato in F>2). È stato inoltre osservato che la combinazione dei miRNA miR-27b con -30c e miR-27b con -197 presentava una *performance* diagnostica leggermente superiore con AUC rispettivamente di 0.77 e 0.75 (92).

Ad oggi, sono ancora pochi gli studi che prendono in esame i lncRNA come biomarcatori di fibrosi NASH-correlata. Un potenziale biomarcatore di cirrosi epatica NASH correlata è rappresentato dal lncRNA APTR (*Alu-mediated p21 transcriptional regulator*). In uno studio condotto da Yu et al. nel siero di 34 pazienti con cirrosi epatica (accertata mediante biopsia) e 24 soggetti sani è stata osservata un up-regolazione dei livelli sierici di APTR rispetto ai soggetti di controllo. Inoltre il lncRNA APTR era up-regolato anche nel siero di pazienti con cirrosi epatica scompensata rispetto a quelli con cirrosi compensata (97).

Nel nostro studio del 2019 precedentemente citato (94), abbiamo validato, dopo l'analisi dei *microarray*, l'up-regolazione a livello sierico del lncRNA TGFB2/TGFB2-OT1 nei pazienti con fibrosi 3-4 rispetto a fibrosi 0-2. Dall'analisi delle curve ROC è emerso che il lncRNA TGFB2/TGFB2-OT1 presentava un AUC di 0.80 nel confronto F=3-4 rispetto a F=0-2 (sensibilità=65%, specificità=81.3%). Inoltre, le combinazioni di TGFB2-OT1 con FIB-4 o il Fibroscan miglioravano l'accuratezza diagnostica nel rilevare i pazienti con fibrosi F 3-4 rispetto alla fibrosi F 0-2. Il nostro studio fornisce nuovi dati *high-throughput* sull'espressione dei non-coding RNA nel siero di pazienti con NAFLD e pone le basi per l'identificazione di nuovi biomarcatori come alternative future alla biopsia epatica.

Infine, in uno studio più recente, condotto da Han et al. (98), è stata analizzata l'espressione del lncRNA GAS5 a livello plasmatico in pazienti NAFLD stadiati per il grado di fibrosi. È stato osservato che i livelli plasmatici di GAS5 erano significativamente più elevati nei pazienti con fibrosi avanzata (F3) rispetto ai soggetti con fibrosi assente o moderata (F<2) e l'espressione di GAS5 correlava positivamente con i vari stadi della fibrosi (da F0 a F3). Sebbene l'espressione di GAS5 risultava essere up-regolata nel confronto F3 vs F<2, la sua espressione era down-regolata nel confronto tra i pazienti NAFLD con cirrosi (F4) rispetto ai pazienti con fibrosi avanzata (F3). Questo è stato il primo studio a rivelare che i livelli di GAS5 differiscono durante la progressione della fibrosi e lo sviluppo della cirrosi (Fig. 4).

CONCLUSIONI

Attualmente la NAFLD rappresenta una preoccupazione per la salute globale a causa dell'elevata prevalenza nella popolazione generale e alla morbilità e mortalità ad essa associata (99).

Una delle principali sfide per la gestione di questa patologia sta nel differenziare correttamente gli individui con NASH dalla più ampia popolazione di pazienti con NAFL e nello stadare il grado di fibrosi. Al momento, la biopsia epatica rimane il *gold standard* per la diagnosi di NASH e la stadiazione della fibrosi. Purtroppo a causa dei rischi connessi a questa metodica, i clinici si affidano spesso ad una combinazione di test biochimici e di *imaging*, se pur con efficienze diagnostiche limitate, per la diagnosi e la stadiazione della patologia (7, 8, 15). L'identificazione di metodi non invasivi e l'integrazione sempre più estesa dei vari trattamenti rende necessario studiare e caratterizzare tale patologia in modo da poter monitorare la risposta al trattamento e la progressione della patologia.

Negli ultimi anni numerosi biomarcatori sono stati studiati al fine di poter diagnosticare la NAFL, la NASH e stadare la fibrosi. Per quanto riguarda i biomarcatori sierici non possono ancora essere utilizzati per lo *screening* e la stadiazione della NAFLD a causa della loro limitata accuratezza; nel corso di questi anni è stato dimostrato che i pannelli di biomarcatori sierici avendo una promettente *performance* diagnostica potranno essere utilizzati in futuro nella diagnosi della steatosi.

L'introduzione di nuovi approcci "omici" nella ricerca dei biomarcatori non invasivi potrebbe portare all'identificazione di molecole in grado di individuare i pazienti NAFL, differenziare i soggetti NASH e stadiare il grado di fibrosi. Questi studi "omici" necessitano tuttavia di essere validati su coorti più ampie ed eterogenee prima di essere utilizzati nella pratica clinica.

BIBLIOGRAFIA

1. Younossi ZM, Stepanova M, Afendy M, Fang Y, Younossi Y, Mir H, et al. Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clin Gastroenterol Hepatol* 9: 524-530 e1; quiz e60, 2011.
2. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 64: 73-84, 2016.
3. Di Mauro S, Ragusa M, Urbano F, Filippello A, Di Pino A, Scamporrino A, et al. Intracellular and extracellular miRNome deregulation in cellular models of NAFLD or NASH: Clinical implications. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 26: 1129-1139, 2016.
4. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 67: 328-357, 2018.
5. Zhou JH, Cai JJ, She ZG, Li HL. Noninvasive evaluation of nonalcoholic fatty liver disease: Current evidence and practice. *World J Gastroenterol* 25: 1307-1326, 2019.
6. Piazzolla VA, Mangia A. Noninvasive Diagnosis of NAFLD and NASH. *Cells* 9, 2020.
7. Wong VW, Adams LA, de Ledington V, Wong GL, Sookoian S. Noninvasive biomarkers in NAFLD and NASH - current progress and future promise. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15: 461-478, 2018.
8. Kogachi S, Nouredin M. Noninvasive Evaluation for Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin Ther* 43: 455-472, 2021.
9. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol* 6: 33, 2006.
10. Fedchuk L, Nascimbeni F, Pais R, Charlotte F, Housset C, Ratzu V, et al. Performance and limitations of steatosis biomarkers in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 40: 1209-1222, 2014.
11. Lee JH, Kim D, Kim HJ, Lee CH, Yang JI, Kim W, et al. Hepatic steatosis index: a simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis* 42: 503-508, 2010.
12. Koot BG, van der Baan-Slootweg OH, Bohte AE, Nederveen AJ, van Werven JR, Tamminga-Smeulders CL, et al. Accuracy of prediction scores and novel biomarkers for predicting nonalcoholic fatty liver disease in obese children. *Obesity (Silver Spring)* 21: 583-590, 2013.
13. Kotronen A, Peltonen M, Hakkarainen A, Sevestianova K, Bergholm R, Johansson LM, et al. Prediction of non-alcoholic fatty liver disease and liver fat using metabolic and genetic factors. *Gastroenterology* 137: 865-872, 2009.
14. Poynard T, Ratzu V, Naveau S, Thabut D, Charlotte F, Messous D, et al. The diagnostic value of biomarkers (SteatoTest) for the prediction of liver steatosis. *Comp Hepatol* 4: 10, 2005.
15. Hernaez R, Lazo M, Bonekamp S, Kamel I, Brancati FL, Guallar E, et al. Diagnostic accuracy and reliability of ultrasonography for the detection of fatty liver: a meta-analysis. *Hepatology* 54: 1082-1090, 2011.
16. Karlas T, Petroff D, Sasso M, Fan JG, Mi YQ, de Ledington V, et al. Individual patient data meta-analysis of controlled attenuation parameter (CAP) technology for assessing steatosis. *J Hepatol* 66: 1022-1030, 2017.
17. Park CC, Nguyen P, Hernandez C, Bettencourt R, Ramirez K, Fortney L, et al. Magnetic Resonance Elastography vs Transient Elastography in Detection of Fibrosis and Noninvasive Measurement of Steatosis in Patients With Biopsy-Proven Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 152: 598-607 e2, 2017.
18. Yu C, Xu C, Xu L, Yu J, Miao M, Li Y. Serum proteomic analysis revealed diagnostic value of hemoglobin for nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 56: 241-247, 2012.

19. Bell LN, Theodorakis JL, Vuppalanchi R, Saxena R, Bemis KC, Wang M, et al. Serum proteomics and biomarker discovery across the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 51: 111-120, 2010.
20. Kalhan SC, Guo L, Edmison J, Dasarathy S, McCullough AJ, Hanson RW, et al. Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 60: 404-413, 2011.
21. Oresic M, Hyotylainen T, Kotronen A, Gopalacharyulu P, Nygren H, Arola J, et al. Prediction of non-alcoholic fatty-liver disease and liver fat content by serum molecular lipids. *Diabetologia* 56: 2266-2274, 2013.
22. Mayo R, Crespo J, Martinez-Arranz I, Banales JM, Arias M, Minchole I, et al. Metabolomic-based noninvasive serum test to diagnose nonalcoholic steatohepatitis: Results from discovery and validation cohorts. *Hepatol Commun* 2: 807-820, 2018.
23. Ekstedt M, Hagstrom H, Nasr P, Fredrikson M, Stal P, Kechagias S, et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology* 61: 1547-1554, 2015.
24. Eguchi A, Wree A, Feldstein AE. Biomarkers of liver cell death. *J Hepatol* 60: 1063-74, 2014.
25. Kwok R, Tse YK, Wong GL, Ha Y, Lee AU, Ngu MC, et al. Systematic review with meta-analysis: non-invasive assessment of non-alcoholic fatty liver disease--the role of transient elastography and plasma cytokeratin-18 fragments. *Aliment Pharmacol Ther* 39: 254-269, 2014.
26. Tamimi TI, Elgouhari HM, Alkhouri N, Yerian LM, Berk MP, Lopez R, et al. An apoptosis panel for nonalcoholic steatohepatitis diagnosis. *J Hepatol* 54: 1224-129, 2011.
27. Younossi ZM, Jarrar M, Nugent C, Randhawa M, Afendy M, Stepanova M, et al. A novel diagnostic biomarker panel for obesity-related nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Obes Surg* 18: 1430-1437, 2008.
28. Shen J, Chan HL, Wong GL, Choi PC, Chan AW, Chan HY, et al. Non-invasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis by combined serum biomarkers. *J Hepatol* 56: 1363-1370, 2012.
29. Fitzpatrick E, Dhawan A. Noninvasive biomarkers in non-alcoholic fatty liver disease: current status and a glimpse of the future. *World J Gastroenterol* 20: 10851-10863, 2014.
30. Ajmera V, Perito ER, Bass NM, Terrault NA, Yates KP, Gill R, et al. Novel plasma biomarkers associated with liver disease severity in adults with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 65: 65-77, 2017.
31. Feldstein AE, Lopez R, Tamimi TA, Yerian L, Chung YM, Berk M, et al. Mass spectrometric profiling of oxidized lipid products in human nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *J Lipid Res* 51: 3046-3054, 2010.
32. Ferslew BC, Xie G, Johnston CK, Su M, Stewart PW, Jia W, et al. Altered Bile Acid Metabolome in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Dig Dis Sci* 60: 3318-3328, 2015.
33. Smits LP, Coolen BF, Panno MD, Runge JH, Nijhof WH, Verheij J, et al. Noninvasive Differentiation between Hepatic Steatosis and Steatohepatitis with MR Imaging Enhanced with USPIOs in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Proof-of-Concept Study. *Radiology* 278: 782-791, 2016.
34. Abrigo JM, Shen J, Wong VW, Yeung DK, Wong GL, Chim AM, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: spectral patterns observed from an in vivo phosphorus magnetic resonance spectroscopy study. *J Hepatol* 60: 809-815, 2014.
35. Chen J, Talwalkar JA, Yin M, Glaser KJ, Sanderson SO, Ehman RL. Early detection of nonalcoholic steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease by using MR elastography. *Radiology* 259:749-756, 2011.
36. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology* 121: 91-100, 2001.
37. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 30: 1356-1362, 1999.
38. Ratziu V, Giral P, Charlotte F, Bruckert E, Thibault V, Theodorou I, et al. Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology* 118: 1117-1123, 2000.
39. Angulo P. Long-term mortality in nonalcoholic fatty liver disease: is liver histology of any prognostic significance? *Hepatology* 51: 373-375, 2010.
40. Sheth SG, Flamm SL, Gordon FD, Chopra S. AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 93: 44-48, 1998.

41. Shaheen AA, Myers RP. Diagnostic accuracy of the aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index for the prediction of hepatitis C-related fibrosis: a systematic review. *Hepatology* 46: 912-921, 2007.
42. Shah AG, Lydecker A, Murray K, Tetri BN, Contos MJ, Sanyal AJ, et al. Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 7: 1104-1112, 2009.
43. McPherson S, Stewart SF, Henderson E, Burt AD, Day CP. Simple non-invasive fibrosis scoring systems can reliably exclude advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 59: 1265-1269, 2010.
44. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, Sola R, Correa MC, Montaner J, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology* 43: 1317-1325, 2006.
45. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology* 45: 846-854, 2007.
46. Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Ann Med* 43: 617-649, 2011.
47. Gudowska M, Gruszevska E, Panasiuk A, Cylwik B, Flisiak R, Swiderska M, et al. Hyaluronic acid concentration in liver diseases. *Clin Exp Med* 16: 523-528, 2016.
48. Suzuki A, Angulo P, Lym J, Li D, Satomura S, Lindor K. Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 25: 779-786, 2005.
49. Monarca A, Petrini C, Perolini S, Pozzi F, Adelasco L, Natangelo R, et al. Procollagen-type III peptide serum concentrations in alcoholic and non-alcoholic liver disease. *Ric Clin Lab* 15: 167-171, 1985.
50. Nielsen MJ, Nedergaard AF, Sun S, Veidal SS, Larsen L, Zheng Q, et al. The neo-epitope specific PRO-C3 ELISA measures true formation of type III collagen associated with liver and muscle parameters. *Am J Transl Res* 5: 303-315, 2013.
51. al. LDJe. Estimation of serum "true collagen type III formation" (Pro-C3) levels as a marker of non-alcoholic steatohepatitis in a prospective cohort. *Journal of Hepatology* 66 (Suppl. 1), S154, 2017.
52. Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb E. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol* 46: 955-975, 2007.
53. Abdelaziz R, Elbasel M, Esmat S, Essam K, Abdelaaty S. Tissue Inhibitors of Metalloproteinase-1 and 2 and Obesity Related Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Is There a Relationship. *Digestion* 92: 130-137, 2015.
54. Santos VN, Leite-Mor MM, Kondo M, Martins JR, Nader H, Lanzoni VP, et al. Serum laminin, type IV collagen and hyaluronan as fibrosis markers in non-alcoholic fatty liver disease. *Braz J Med Biol Res* 38: 747-453, 2005.
55. Guha IN, Parkes J, Roderick P, Chattopadhyay D, Cross R, Harris S, et al. Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Validating the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers. *Hepatology* 47: 455-460, 2008.
56. Nobili V, Parkes J, Bottazzo G, Marcellini M, Cross R, Newman D, et al. Performance of ELF serum markers in predicting fibrosis stage in pediatric non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 136: 160-167, 2009.
57. Boursier J, de Ledinghen V, Leroy V, Anty R, Francque S, Salmon D, et al. A stepwise algorithm using an at-a-glance first-line test for the non-invasive diagnosis of advanced liver fibrosis and cirrhosis. *J Hepatol* 66: 1158-1165, 2017.
58. Loong TC, Wei JL, Leung JC, Wong GL, Shu SS, Chim AM, et al. Application of the combined FibroMeter vibration-controlled transient elastography algorithm in Chinese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 32: 1363-1369, 2017.
59. Boursier J, Vergniol J, Guillet A, Hiriart JB, Lannes A, Le Bail B, et al. Diagnostic accuracy and prognostic significance of blood fibrosis tests and liver stiffness measurement by FibroScan in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 65: 570-578, 2016.
60. Wilder J, Patel K. The clinical utility of FibroScan((R)) as a noninvasive diagnostic test for liver disease. *Med Devices (Auckl)* 7: 107-114, 2014.
61. Bonder A, Tapper EB, Afdhal NH. Contemporary assessment of hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis* 19: 123-134, 2015.
62. Xiao G, Zhu S, Xiao X, Yan L, Yang J, Wu G. Comparison of laboratory tests, ultrasound, or magnetic resonance elastography to detect fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A meta-analysis. *Hepatology* 66: 1486-1501, 2017.

63. Cassinotto C, Boursier J, de Ledinghen V, Lebigot J, Lapuyade B, Cales P, et al. Liver stiffness in nonalcoholic fatty liver disease: A comparison of supersonic shear imaging, FibroScan, and ARFI with liver biopsy. *Hepatology* 63: 1817-1827, 2016.
64. Venkatesh SK, Wang G, Teo LL, Ang BW. Magnetic resonance elastography of liver in healthy Asians: normal liver stiffness quantification and reproducibility assessment. *J Magn Reson Imaging* 39: 1-8, 2014.
65. Lee Y, Lee JM, Lee JE, Lee KB, Lee ES, Yoon JH, et al. MR elastography for noninvasive assessment of hepatic fibrosis: reproducibility of the examination and reproducibility and repeatability of the liver stiffness value measurement. *J Magn Reson Imaging* 39: 326-331, 2014.
66. Singh S, Venkatesh SK, Wang Z, Miller FH, Motosugi U, Low RN, et al. Diagnostic performance of magnetic resonance elastography in staging liver fibrosis: a systematic review and meta-analysis of individual participant data. *Clin Gastroenterol Hepatol* 13: 440-451 e6, 2015.
67. Imajo K, Kessoku T, Honda Y, Tomeno W, Ogawa Y, Mawatari H, et al. Magnetic Resonance Imaging More Accurately Classifies Steatosis and Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease Than Transient Elastography. *Gastroenterology* 150: 626-637 e7, 2016.
68. Drag MH, Kilpelainen TO. Cell-free DNA and RNA-measurement and applications in clinical diagnostics with focus on metabolic disorders. *Physiol Genomics* 53: 33-46, 2021.
69. Di Mauro S, Scamporrino A, Fruciano M, Filippello A, Fagone E, Gili E, et al. Circulating Coding and Long Non-Coding RNAs as Potential Biomarkers of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Int J Mol Sci* 21, 2020.
70. Happel C, Ganguly A, Tagle DA. Extracellular RNAs as potential biomarkers for cancer. *J Cancer Metastasis Treat* 6, 2020.
71. Zhu H, Fan GC. Extracellular/circulating microRNAs and their potential role in cardiovascular disease. *Am J Cardiovasc Dis* 1: 138-149, 2011.
72. Pos O, Biro O, Szemes T, Nagy B. Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications. *Eur J Hum Genet* 26: 937-945, 2018.
73. Turchinovich A, Baranova A, Drapkina O, Tonevitsky A. Cell-Free Circulating Nucleic Acids as Early Biomarkers for NAFLD and NAFLD-Associated Disorders. *Front Physiol* 9: 1256, 2018.
74. Velu VK, Ramesh R, Srinivasan AR. Circulating MicroRNAs as Biomarkers in Health and Disease. *J Clin Diagn Res* 6: 1791-1795, 2012.
75. Akuta N, Kawamura Y, Suzuki F, Saitoh S, Arase Y, Fujiyama S, et al. Analysis of association between circulating miR-122 and histopathological features of nonalcoholic fatty liver disease in patients free of hepatocellular carcinoma. *BMC Gastroenterol* 16: 141, 2016.
76. Sun C, Huang F, Liu X, Xiao X, Yang M, Hu G, et al. miR-21 regulates triglyceride and cholesterol metabolism in non-alcoholic fatty liver disease by targeting HMGCR. *Int J Mol Med* 35: 847-853, 2015.
77. Yamada H, Suzuki K, Ichino N, Ando Y, Sawada A, Osakabe K, et al. Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver. *Clin Chim Acta* 424: 99-103, 2013.
78. Tan Y, Ge G, Pan T, Wen D, Gan J. A pilot study of serum microRNAs panel as potential biomarkers for diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One* 9:e105192, 2014.
79. Raitoharju E, Seppala I, Lyytikainen LP, Viikari J, Ala-Korpela M, Soininen P, et al. Blood hsa-miR-122-5p and hsa-miR-885-5p levels associate with fatty liver and related lipoprotein metabolism-The Young Finns Study. *Sci Rep* 6: 38262, 2016.
80. Celikbilek M, Baskol M, Taheri S, Deniz K, Dogan S, Zararsiz G, et al. Circulating microRNAs in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol* 6: 613-620, 2014.
81. Jampoka K, Muangpaisarn P, Khongnomnan K, Treeprasertsuk S, Tangkijvanich P, Payungporn S. Serum miR-29a and miR-122 as Potential Biomarkers for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Microna* 7: 215-222, 2018.
82. Yu F, Wang X, Zhao H, Hao Y, Wang W. Decreased Serum miR-1296 may Serve as an Early Biomarker for the Diagnosis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Lab*. 65, 2019.
83. He Z, Yang JJ, Zhang R, Li HT, Wu L, Jiang F, et al. Circulating miR-29b positively correlates with non-alcoholic fatty liver disease in a Chinese population. *J Dig Dis* 20: 189-195, 2019.

84. Zong Y, Yan J, Jin L, Xu B, He Z, Zhang R, et al. Relationship between circulating miR-132 and non-alcoholic fatty liver disease in a Chinese population. *Hereditas* 157: 22, 2020.
85. Jiang H, Qian Y, Shen Z, Liu Y, He Y, Gao R, et al. Circulating microRNA135a3p in serum extracellular vesicles as a potential biological marker of nonalcoholic fatty liver disease. *Mol Med Rep* 24, 2021.
86. Zhang M, Chi X, Qu N, Wang C. Long noncoding RNA lncARSR promotes hepatic lipogenesis via Akt/SREBP-1c pathway and contributes to the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 499: 66-70, 2018.
87. Kornek M, Lynch M, Mehta SH, Lai M, Exley M, Afdhal NH, et al. Circulating microparticles as disease-specific biomarkers of severity of inflammation in patients with hepatitis C or nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 143: 448-458, 2012.
88. Cermelli S, Ruggieri A, Marrero JA, Ioannou GN, Beretta L. Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One* 6:e23937, 2011.
89. Pirola CJ, Fernandez Gianotti T, Castano 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* 64: 800-812, 2015.
90. Becker PP, Rau M, Schmitt J, Malsch C, Hammer C, Bantel H, et al. Performance of Serum microRNAs -122, -192 and -21 as Biomarkers in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis. *PLoS One* 10:e0142661, 2015.
91. Liu XL, Pan Q, Zhang RN, Shen F, Yan SY, Sun C, et al. Disease-specific miR-34a as diagnostic marker of non-alcoholic steatohepatitis in a Chinese population. *World J Gastroenterol* 22: 9844-9852, 2016.
92. Lopez-Riera M, Conde I, Quintas G, Pedrola L, Zaragoza A, Perez-Rojas J, et al. Non-invasive prediction of NAFLD severity: a comprehensive, independent validation of previously postulated serum microRNA biomarkers. *Sci Rep* 8:10606, 2018.
93. Park JG, Kim G, Jang SY, Lee YR, Lee E, Lee HW, et al. Plasma Long Noncoding RNA LeXis is a Potential Diagnostic Marker for Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Life (Basel)* 10, 2020.
94. Di Mauro S, Scamporrino A, Petta S, Urbano F, Filippello A, Ragusa M, et al. Serum coding and non-coding RNAs as biomarkers of NAFLD and fibrosis severity. *Liver Int* 39: 1742-1754, 2019.
95. Sun C, Fan JG, Qiao L. Potential epigenetic mechanism in non-alcoholic Fatty liver disease. *Int J Mol Sci* 16: 5161-5179, 2015.
96. Miyaaki H, Ichikawa T, Kamo Y, Taura N, Honda T, Shibata H, et al. Significance of serum and hepatic microRNA-122 levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 34:e302-7, 2014.
97. Yu F, Zheng J, Mao Y, Dong P, Li G, Lu Z, et al. Long non-coding RNA APTR promotes the activation of hepatic stellate cells and the progression of liver fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 463: 679-685, 2015.
98. Han MH, Lee JH, Kim G, Lee E, Lee YR, Jang SY, et al. Expression of the Long Noncoding RNA GAS5 Correlates with Liver Fibrosis in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Genes (Basel)* 11, 2020.
99. Estes C, Razavi H, Loomba R, Younossi Z, Sanyal AJ. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology* 67: 123-133, 2018.