

Nuevas perspectivas terapéuticas de la fibrosis hepática

R. Moreno-Otero, M. Trapero y L. García Buey

Unidad de Hepatología. Hospital Universitario de La Princesa. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. España.

INTRODUCCIÓN

La fibrosis hepática es un proceso de acumulación patológica de proteínas de matriz extracelular (ME), incluido el colágeno (tipos I, III, IV y otros), la fibronectina, la laminina y los proteoglicanos, que ocurre en diferentes hepatopatías crónicas. A partir de varios estudios sobre los mecanismos patogénicos celulares y moleculares, se sabe que las células estrelladas hepáticas (CEH) activadas, los fibroblastos portales y los miofibroblastos son los principales agentes productores de proteínas de ME, así como que dichas células son activadas por distintas citocinas fibrogénicas (tabla I) en el hígado con daño crónico¹⁻³. En respuesta a un agente lesivo tisular se inician la activación de las CEH y la subsecuente perpetuación que comportan cambios fenotípicos y funcionales responsables de un estado profibrótico (tabla I). En términos teóricos, el desarrollo de potenciales agentes terapéuticos antifibróticos se podría dirigir contra cada una de estas vías fisiopatogénicas con el objetivo de interrumpir, revertir o abolir la fibrogénesis intrahepática^{4,5}.

La fibrosis avanzada deviene en cirrosis con insuficiencia hepatocelular e hipertensión portal. Hasta no hace muchos años se consideraba que esta progresión era inexorable, «estación termini» de la historia natural de toda hepatopatía crónica. Pero recientemente se ha enunciado el concepto de reversibilidad de la fibrosis, con evidencias documentadas en pacientes⁶⁻¹², que han disparado las investigaciones enfocadas al desarrollo de fármacos antifibróticos. Los objetivos primordiales se centran en inhibir la acumulación intrahepática de células implicadas en la fibrogénesis y en prevenir el depósito de proteínas de ME. Aunque los tratamientos parecen efectivos en modelos animales de fibrosis hepática, está por definir su eficacia y seguridad en humanos¹³⁻¹⁵.

El factor decisivo para la resolución de la fibrosis radica en el incremento de la actividad colagenolítica¹⁻⁴, reflejada por la degradación de los colágenos fibrilares (I y III) por las metaloproteinasas de matriz (MMP) 1, 8 y 13, cuya actividad aumenta por el descenso rápido de la

expresión del inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP-1). La apoptosis de las CEH activadas precede a la resolución de la fibrosis. Dicha apoptosis se precipita y favorece al alterarse la relación entre CEH activadas y proteínas de ME, así como por la estimulación de los factores de necrosis en las CEH activadas y la reducción de los factores de supervivencia, como el TIMP-1^{16,17}.

En patología humana, la resolución de la fibrosis hepática puede ocurrir si se obtiene un resultado favorable en el tratamiento de la enfermedad subyacente; así se ha observado en pacientes con enfermedades por depósito (hierro o cobre), hepatitis virales⁸⁻¹⁰, hepatitis autoinmune⁷, cirrosis biliar secundaria⁶ o esteatohepatitis alcohólica y no alcohólica^{18,19}. La regresión de la fibrosis necesita más o menos tiempo, según el tipo de hepatopatía subyacente y la gravedad de la lesión hepática definida por el estadio de fibrosis. Un agente antifibrótico efectivo puede retardar significativamente la fibrogénesis o promover la regresión de la fibrosis establecida. La terapéutica antifibrótica óptima pretende la eliminación del estímulo profibrótico (tabla II) y la alteración del equilibrio, favoreciendo el proceso de fibrólisis. No obstante, estos aspectos teóricos están dificultados por diferentes razones de índole práctica (tabla III).

EFFECTOS TERAPÉUTICOS DEL INTERFERÓN SOBRE LA FIBROSIS HEPÁTICA

El tratamiento de mantenimiento con interferón (IFN) puede indicarse en pacientes con hepatitis C crónica (HCC), en los que no ha alcanzado una respuesta virológica, con el objetivo de prevenir la progresión de la fibrosis hepática. Shiffman et al⁹ realizaron, en 1999, un estudio controlado para evaluar si, en los pacientes no respondedores al tratamiento estándar, la administración de IFN de forma prolongada era eficaz para evitar la progresión histológica de la HCC. En el análisis de 53 pacientes, que se aleatorizaron para recibir IFN α -2b (3 MU 3 veces por semana durante 2 años) o ningún tratamiento, se procedió a repetir una biopsia hepática al año y a los 2 años de seguimiento. Los resultados mostraron claramente que el tratamiento de mantenimiento con IFN se asoció con una mejoría, tanto en parámetros de necroinflamación como de fibrosis, en comparación con los hallazgos en el grupo control. Al suspender el tratamiento de mantenimiento con IFN se constató

Correspondencia: Dr. R. Moreno Otero.
Servicio de Gastroenterología y Hepatología.
Hospital de La Princesa.
Diego de León, 62. 28006 Madrid. España.
Correo electrónico: rmoreno.hlpr@salud.madrid.org

TABLA I. Activación de las células estrelladas hepáticas: procesos de iniciación y perpetuación (estado profibrotico)

Citocinas fibrogénicas
Factor transformante del crecimiento $\beta 1$
Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
Endotelina-1
Angiotensina II
Leptina
Osteopontina
Proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1 (MCP-1)
Inteleucina 1 β
RANTES
Cambios en la forma y función de las células estrelladas hepáticas
Proliferación
Aumento de contractibilidad
Pérdida de retinoides intracelulares
Aumento de la fibrogénesis
Degradación de la matriz
Quimiotaxis
Quimioatracción de leucocitos

TABLA II. Acciones terapéuticas inhibitoras del estímulo profibrogénico

Control de la activación de las CEH
Neutralización de los mediadores de proliferación y fibrogénesis
Incremento de la apoptosis de las CEH
Inhibición de la síntesis de ME y del ensamblaje de sus proteínas
Incremento de la degradación de la ME

CEH: células estrelladas hepáticas; ME: matriz extracelular.

TABLA III. Obstáculos para el desarrollo de terapéuticas antifibróticas

Dificultad para establecer <i>end points</i> clínicos aceptables
Imprecisión de los métodos para evaluar la fibrosis:
Técnicas de imagen
Estudios de hemodinámica
Elastografía de transición
Marcadores séricos, biológicos o inmunohistoquímicos
Marcadores genéticos
Morfometría computarizada
Biopsia hepática
Dificultad para analizar poblaciones homogéneas de pacientes
Indefinición de:
Perfiles de seguridad
Duración de los ensayos
Tamaño muestral
Incertidumbre financiera (coste-beneficio)

un agravamiento de los cambios necroinflamatorios e, incluso, la progresión de la fibrosis en una tercera parte de los pacientes. Aunque el tamaño muestral de este estudio era escaso, sirvió de base para el diseño de estudios prospectivos con IFN en tratamiento prolongado.

Posteriormente, se ha estudiado de forma más extensa el papel del tratamiento antiviral en la prevención de la progresión histológica de la HCC. Así, Poynard et al²⁰ analizaron las biopsias hepáticas obtenidas antes y después del tratamiento en 3.010 pacientes con HCC sin tratamiento previo, que habían sido incluidos en 4 estudios aleatorizados, cada uno de los cuales tenía 3 o 4 grupos de tratamiento con IFN (estándar o pegilado), en monoterapia o combinado con ribavirina; debido a la ausencia de un grupo control no tratado, utilizaron como grupo comparativo a los pacientes que habían recibido monoterapia con IFN α -2b durante tan sólo 24 semanas. Se observó una mejoría

significativa en los parámetros necroinflamatorios (puntuación METAVIR) en el 39% de los pacientes tratados con IFN α durante 24 semanas y en el 73% de los tratados con IFN pegilado más ribavirina ajustada según el peso. El agravamiento de la fibrosis hepática fue significativamente superior en el grupo control tratado con IFN α durante tan sólo 24 semanas (23%) en comparación con el grupo que recibió IFN pegilado más ribavirina (8%). Cabe destacar que todas las pautas terapéuticas antivirales consiguieron reducir significativamente la progresión de la fibrosis en comparación con el estadio previo al tratamiento. Adicionalmente, se observó una reversión de la cirrosis en 75 (49%) de los 153 pacientes con estadio F4 en la biopsia previa al tratamiento. La regresión de la fibrosis se relacionó de forma independiente con la respuesta virológica y, lógicamente, fue superior en los pacientes que presentaron una respuesta virológica sostenida. Aunque estos resultados son alentadores, la estimación inadecuada de la duración de la infección viral y la ausencia de linealidad en la progresión de la fibrosis hacen que las conclusiones del estudio no puedan ser completamente asumibles.

También se ha analizado el efecto del IFN pegilado sobre la progresión de la fibrosis mediante un metaanálisis de datos de pacientes individuales con biopsia hepática antes y después del tratamiento²¹. En este estudio se incluyeron más de 1.000 pacientes que habían sido tratados con IFN estándar o IFN pegilado α -2a en diferentes dosis, y se concluyó que en los pacientes que presentaron una respuesta virológica sostenida (y en menor medida en los pacientes que tuvieron una recidiva posterior) se produjo una regresión significativa en la fibrosis hepática. En cuanto a los pacientes cirróticos, la reducción del estadio de fibrosis se produjo en una proporción inferior (34%) a la observada en el anterior estudio²⁰ y en ningún caso se observó una regresión total de la cirrosis. Del análisis de los datos de ambos estudios^{20,21} se desprenden las cuestiones siguientes: a) la eficacia del tratamiento con IFN y ribavirina en la mejoría histológica (inflamación y fibrosis hepática) es evidente en los pacientes que presentan una respuesta virológica sostenida, y b) la mejoría histológica también se produce, aunque en menor escala, en los pacientes que presentan una respuesta virológica pero con recidiva subsiguiente. En este último grupo de pacientes, los estudios efectuados hasta el momento sólo han evaluado los cambios histológicos a los 6 meses de la interrupción del tratamiento y, por tanto, se desconoce el impacto real de dicha mejoría en la historia natural de la HCC. Por consiguiente, los datos sobre la mejoría en el estadio de la fibrosis hepática en pacientes con HCC no respondedores al tratamiento antiviral son más controvertidos.

ESTUDIOS PROSPECTIVOS SOBRE EL EFECTO ANTIFIBRÓTICO DEL INTERFERÓN EN PAUTAS DE MANTENIMIENTO

En la actualidad están en marcha 3 amplios estudios con el objetivo de evaluar el efecto del IFN en terapia de mantenimiento. El ensayo HALT-C²² es un estudio multi-

céntrico aleatorizado para determinar si la administración de IFN pegilado α -2a puede prevenir la progresión de la HCC en pacientes no respondedores con fibrosis avanzada. A estos pacientes, no respondedores al IFN estándar, con o sin ribavirina, se les administrará IFN pegilado α -2a más ribavirina durante 20 semanas; a los pacientes que no obtengan una respuesta virológica en este momento se les aleatorizará para seguimiento o para terapia de mantenimiento. Hay otro estudio de diseño similar, que se denomina EPIC-3²³, en el que se han incluido pacientes no respondedores al tratamiento antiviral previo y con fibrosis avanzada (F2 o superior). La pauta terapéutica consiste en IFN pegilado α -2b más ribavirina; los pacientes con ARN-VHC detectable a la semana 12 se aleatorizaran para recibir IFN pegilado α -2b en dosis bajas durante 3 años o ningún tratamiento. Los objetivos de ambos estudios son la evaluación de la progresión histológica de la HCC, así como el análisis de la evolución clínica (aparición de descompensación hepática o hepatocarcinoma). La comunidad científica está a la espera de que el próximo año se disponga ya de resultados concluyentes. En un tercer estudio, de diseño algo diferente, denominado COPILOT²⁴, se evaluó la eficacia del tratamiento de mantenimiento con IFN pegilado α -2b en pacientes no respondedores y con fibrosis avanzada. La progresión de la enfermedad se definió en este estudio como: *a*) el deterioro de la función hepática en más de 2 puntos de la puntuación de Child-Pugh; *b*) la presencia de descompensación clínica, y *c*) el desarrollo de carcinoma hepatocelular. Tras 2 años de seguimiento, los resultados muestran claramente un beneficio del tratamiento de mantenimiento con IFN pegilado α -2b en dosis bajas, con una reducción significativa en el número de complicaciones clínicas secundarias, especialmente el síndrome de hipertensión portal.

Perspectivas terapéuticas antifibróticas actuales y futuras

Un fármaco antifibrótico ideal ha de ser específico del hígado, bien tolerado en pautas terapéuticas prolongadas y efectivo para reducir el exceso de colágeno acumulado, sin afectar a la síntesis fisiológica de proteínas de ME. En las tablas IV y V se detallan las posibles alternativas actuales y futuras según excelentes revisiones sobre el tema²⁵⁻²⁷. Debido a que la inflamación precede a la fibrosis y estimula su progresión, la terapéutica antiinflamatoria está considerada como una opción válida, especialmente en la hepatitis autoinmune²⁸ y la hepatitis alcohólica aguda. Los agentes antioxidantes inhiben la activación de las CEH y, consiguientemente, frenan la síntesis de colágeno, según se ha demostrado en modelos de fibrosis hepática experimental; diferentes fármacos antioxidantes pueden ejercer efectos beneficiosos en las hepatopatías crónicas²⁹.

Aparte de la opciones terapéuticas que promueven la inhibición de la activación y la proliferación de las CEH, así como el estímulo de su apoptosis, la medidas enfocadas a interrumpir las vías de señalización de diversos fac-

TABLA IV. Estrategias terapéuticas actuales para la fibrosis hepática

Eliminar el estímulo causal
Virus
Alcohol
Sobrepeso
Hepatotóxicos
Hierro
Cobre
Colestasis
Agentes antiinflamatorios o inmunomoduladores
Interferón alfa
Corticoides
Antioxidantes (vitamina E, silimarina, SAMET, fosfatidilcolina)
Pentoxifilina
Análogos de nucleósidos/nucleótidos
Prostaglandinas (?)
Colchicina (?)
Interleucina 10 (?)

TABLA V. Estrategias futuras para la fibrosis hepática

Evitar la activación de las CEH
Inhibidores de la angiotensina
Antagonistas de PPAR γ (tiazolidonas)
Interferón γ
Retinoides
Promover la apoptosis de las CEH
Reductores de la expresión de TIMMP-1
Neutralizar factores de crecimiento o citocinas
Anticuerpos anti-TGF β_1
Antagonistas de receptores para citocinas
Proteínas recombinantes ligandos de citocinas (decorina)?
Inhibir la síntesis y ensamblaje de la ME
Inhibidores de la 4 prolil hidrolasa
Estimular la degradación de la ME
Inductores de proteasas endógenas (MMP 1, 8 y 13), como halofuginona
Inhibidores de la HMG-CoA-reductasa
Estatinas
Inhibidores de la histona diacetilasa
Aporte o inhibición de factores de crecimiento
IGF, HGF Cardiotrofina (\therefore riesgo de promover cáncer?)
Inhibir la síntesis y vías de señalización del TGF- β_1
Antagonistas del PDGF
Tratamiento inmunosupresor (micofenolato, rapamicina)
Terapia antiangiogénica
Antagonistas del receptor de VEGF
Antagonista de la integrina $\alpha v \beta 6$
Aporte de moduladores vasoactivos
Antagonistas del receptor de la endotelina A
Inhibidores del sistema de la angiotensina II
Donadores de óxido nítrico
Terapia génica

CEH: células estrelladas hepáticas; PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas; TGF: transformante del crecimiento.

tores fibrogénicos (p. ej., el factor transformante del crecimiento [TGF] β_1) comportan una importante alternativa terapéutica antifibrótica^{26,30}. Entre éstos, se incluyen pentoxifilina, amiloride, ácido S-farnesil-tiosalico o ligandos de PPAR α y PPAR γ (tiazolidonas). La inhibición del sistema renina-angiotensina constituye una prometedora opción antifibrótica, aunque la evidencias obtenidas en neuropatías y cardiopatías crónicas, están aún por determinar en la enfermedad hepática (HCC, esteatohepatitis no alcohólica o trasplante hepático).

Igualmente, de forma experimental, se sabe que el bloqueo de los receptores tipo A de la endotelina-1 y la administración de vasodilatadores (prostaglandina E2 y donantes de

óxido nítrico) ejercen un efecto antifibrótico³¹. También se han investigado tanto la inhibición de la síntesis de colágeno como el estímulo de su degradación. Otras posibles terapéuticas antifibróticas, cuya eficacia y seguridad en patología humana está por demostrar, son: compuestos herbales (Sho-saiko-to, glicirrina o savia *miltiorhiza*), inhibidores de la 4-prolil hidrolasa, halofuginona, MMP-8 y activador del plasminógeno tipo urocina (estimuladores de la degradación del colágeno), hepatoprotectores (silimarina) y, por último, la infusión de células madre mesenquimales. Un aspecto decisivo por resolver en varias de estas alternativas antifibróticas mencionadas radica en el hallazgo de *carriers* específicos, que transporten el principio activo hasta las CEH activadas; es obvio que esta opción podría evitar efectos colaterales indeseables.

Las decisiones terapéuticas más prometedoras han de basarse en promover el estudio de las células madre pluripotenciales, en facilitar la investigación trasnacional, en el hallazgo de sistemas cuya diana sean las CEH activadas y en identificar los factores genéticos determinantes de la progresión rápida de la fibrosis. Por último, deben diseñarse ensayos clínicos consistentes y desarrollar métodos hábiles para evaluar la progresión o regresión de la fibrosis hepática. La opinión más generalizada entre los investigadores básicos y clínicos es que la combinación de varios de estos agentes antifibróticos constituirá la alternativa terapéutica más realista en un futuro próximo.

BIBLIOGRAFÍA

- Friedman SL. Liver fibrosis: from bench to bedside. *J Hepatol*. 2003;38 Suppl 1:38-53.
- Cassiman D, Libbrecht L, Sinelli N, Desmet V, Deneef C, Roskams T. Beauty is in the eye of the beholder: emerging concepts and pitfalls in hepatic stellate cell research. *J Hepatol*. 2002;37:527-35.
- Knittel T, Kobold D, Saile B, Grundmann A, Neubauer K, Piscaglia F, et al. Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. *Gastroenterology*. 1999;117:1205-21.
- Bataller R, Brenner DA. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. *Semin Liver Dis*. 2001;21:437-51.
- Caligiuri A, De Franco RM, Romanelli RG, Gentilini A, Meucci M, Failli P, et al. Antifibrogenic effects of canrenone, an antialdosteronic drug, on human hepatic stellate cells. *Gastroenterology*. 2003;124:504-20.
- Hammel P, Couvelard A, O'Toole D, Ratouis A, Sauvanet A, Flejou JF, et al. Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. *N Engl J Med*. 2001;344:418-23.
- Dufour JF, DeLellis R, Kaplan MM. Reversibility of hepatic fibrosis in autoimmune hepatitis. *Ann Intern Med*. 1997;127:981-5.
- Dienstag JL, Goldin RD, Heathcote EJ, Hann HW, Woessner M, Stephenson SL, et al. Histological outcome during long-term lamivudine therapy. *Gastroenterology*. 2003;124:105-17.
- Shiffman ML, Hofmann CM, Contos MJ, Luketic VA, Sanyal AJ, Sterling RK, et al. A randomized, controlled trial of maintenance interferon therapy for patients with chronic hepatitis C virus and persistent viremia. *Gastroenterology*. 1999;117:1164-72.
- Poynard T, Munteanu M, Ratziu V, Benhamou Y, Di Martino V, Taieb J, et al. Truth survival in clinical research: an evidence-based requiem? *Ann Intern Med*. 2002;136:888-95.
- Terui Y, Saito T, Watanabe H, Togashi H, Kawata S, Kamada Y, et al. Effect of angiotensin receptor antagonist on liver fibrosis in early stages of chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36:1022.
- Rimola F, Guevara G, Landoro M, Navasa M, Forns X. Beneficial effects of drugs interfering with the renin-angiotensin system on the development of fibrosis on hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Am J Transplant* 2003;5:433.
- Siller-López F, Sandoval A, Salgado S, Salazar A, Bueno M, García J, et al. Treatment with human metalloproteinase-8 gene delivery ameliorates experimental rat liver cirrhosis. *Gastroenterology*. 2004;126:1122-33 [discussion 949].
- Yoshiji H, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Tsujinoue H, Nakatani T, et al. Inhibition of renin-angiotensin system attenuates liver enzyme-altered preneoplastic lesions and fibrosis development in rats. *J Hepatol*. 2002;37:22-30.
- Kurikawa N, Suga M, Kuroda S, Yamada K, Ishikawa H. An angiotensin II type 1 receptor antagonist, olmesartan medoxomil, improves experimental liver fibrosis by suppression of proliferation and collagen synthesis in activated hepatic stellate cells. *Br J Pharmacol*. 2003;139:1085-94.
- Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem*. 2000;275:2247-50.
- Issa R, Williams E, Trim N, Kendall T, Arthur MJ, Reichen J, et al. Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. *Gut*. 2001;48:548-57.
- Liz, Yang S, Lin H, Huang J, Watking PF, Maser FB, et al. Probiotics and antibodies to INF inhibit inflammatory activity and improve non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2003;37:343-50.
- Pares A, Caballería J, Bruguera M, Torres M, Rodes J. Histological Course of alcoholic hepatitis. Influence of abstinence, sex and extent of hepatic damage. *J Hepatol*. 1986;2:33-42.
- Poynard T, McHutchison J, Manns M, Trepo C, Lindsay K, Goodman Z, et al. Impact of pegylated interferon alpha-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2002;122:1303-13.
- Camma C, Di Bona D, Schepis F, Heathcote EJ, Zeuzem S, Pockros PJ, et al. Effect of peginterferon alpha-2a on liver histology in chronic hepatitis C: a meta-analysis of individual patient data. *Hepatology*. 2004;39:333-42.
- Shiffman ML, Di Bisceglie AM, Lindsay KL, Morishima C, Wright EC, Everson GT, et al. Hepatitis C Antiviral Long-Term Treatment Against Cirrhosis Trial Group. Peginterferon alpha-2a and ribavirin in patients with chronic hepatitis C who have failed prior treatment. *Gastroenterology*. 2004;126:1015-23.
- Poynard T, Schiff E, Terg R, Goncales F, Flamm S, Drago M, et al. Sustained virologic response with PEG interferon-alpha2b/ribavirin weight based dosing in previous interferon/ribavirin HCV failures: week 12 virology as a predictor of SVR in the EPIC3 trials [abstract]. *Gastroenterology*. 2005;128 Suppl 2: 681A.
- Curry M, Cardenas A, Afdhal NH. Effect of maintenance PEG-in therapy on portal hypertension and its complications: results from the COPILOT study [abstract]. *J Hepatol*. 2005;42 Suppl 2:40.
- Friedman SL. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med*. 1993;34:1828-35.
- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005;115:209.
- McHutchison J, Poynard T, Afdhal N. Fibrosis as an end point of clinical trials in liver disease: a report of the international fibrosis group. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4:1214-20.
- Medina J, Moreno Otero R. Pathophysiological basis for antioxidant therapy in chronic liver disease. *Drugs*. 2005;65:2445-61.
- Medina J, García-Buey L, Moreno-Otero R. Review article: immunopathogenetic and therapeutic aspects of autoimmune hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003;17:1-16.
- Maher JJ. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. *Semin Liver Dis*. 2001;21:417-26.
- Cho JJ. An oral endothelin-A receptor antagonist blocks collagen synthesis and deposition in advance rat liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2000;118:1169-78.