

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM
GASTROENTEROLOGIA E HEPATOLOGIA

Dissertação de Mestrado

**ASPARTATO DE ORNITINA E ALTERAÇÕES DA MICROBIOTA
INTESTINAL EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA HEPÁTICA
ESTEATÓTICA ASSOCIADA À DISFUNÇÃO METABÓLICA**

Aluna: Elisa Carolina Lange

Orientador: Prof. Dr. Mário Reis Álvares-da-Silva

Coorientador: Dr. Pabulo Henrique Rampelotto

Porto Alegre, 2023

Elisa Carolina Lange

**Aspartato de ornitina e alterações da microbiota intestinal em
modelo animal de doença hepática esteatótica associada à
disfunção metabólica**

Dissertação de mestrado apresentada
como requisito parcial para obtenção
do título de mestre em Ciências em
Gastroenterologia e Hepatologia, do
Programa de Pós-Graduação
Ciências em Gastroenterologia e
Hepatologia da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Mário Reis Álvares-da-Silva

Coorientador: Dr. Pabulo Henrique Rampelotto

Porto Alegre, 2023

CIP - Catalogação na Publicação

Lange, Elisa Carolina
Aspartato de ornitina e alterações da microbiota
intestinal em modelo animal de doença hepática
esteatótica associada à disfunção metabólica / Elisa
Carolina Lange. -- 2023.
69 f.

Orientador: Mário Reis Álvares-da-Silva.

Coorientador: Pabulo Henrique Rampelotto.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e
Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. doença hepática esteatótica associada à
disfunção metabólica. 2. aspartato de ornitina. 3.
microbiota intestinal. I. Álvares-da-Silva, Mário
Reis, orient. II. Rampelotto, Pabulo Henrique,
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos pacientes com doença hepática esteatótica associada à disfunção metabólica, na expectativa de que a ciência em breve possa encontrar um tratamento medicamentoso efetivo e acessível, de modo que não dependam inteiramente do seu próprio esforço nas mudanças de estilo de vida. Desejo que as melhoras nos hábitos alimentares e a prática de atividade física não sejam causadores de sofrimento emocional e frustração, e sim fontes de prazer a serem mantidas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e, mais particularmente, ao orientador Dr. Mário Reis Álvares-da-Silva, pelas oportunidades de crescimento profissional e de poder contribuir na pesquisa científica voltada à Doença Hepática Esteatótica Associada à Disfunção Metabólica. Sou muito grata por todo o acolhimento e suporte ao longo do desenvolvimento desse trabalho. Ao coorientador Pabulo Henrique Rampelotto, por abrir portas e me ensinar o caminho das pedras na pesquisa científica.

A minha mãe, Heloísa Schüler Lange e minha irmã Eliana Laís Lange, por sempre vibrarem pelas minhas conquistas e incentivarem o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Ao meu pai, Carlos Gilberto Lange, *in memoriam*, que me guia até hoje nas minhas tomadas de decisão através de todos os ensinamentos compartilhados principalmente através de exemplos de vida.

A Deus, agradeço pela minha vida, por todas as oportunidades e pessoas que colocou no meu caminho. Agradeço por me permitir ter encontrado a minha vocação em ser ferramenta de conforto e de melhoria de saúde aos pacientes que me procuram e poder dar esperança através da pesquisa às pessoas que necessitam e dependem de novas descobertas da ciência.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIATURAS	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 DOENÇA HEPÁTICA ESTEATÓTICA ASSOCIADA À DISFUNÇÃO METABÓLICA.....	15
2.1.1 Etiologia e Fisiopatologia.....	15
2.1.2 Nomenclatura.....	17
2.1.3 Tratamento.....	17
2.2 ASPARTATO DE ORNITINA.....	18
2.3 EIXO INTESTINO-FÍGADO E O PAPEL DA MICROBIOTA.....	19
2.4 MODELOS EXPERIMENTAIS	23
3. JUSTIFICATIVA	24
4. QUESTÃO DE PESQUISA	25
5. HIPÓTESE	25
6. OBJETIVOS	25
6.1 OBJETIVO GERAL.....	25
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
8. CONCLUSÕES	26
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	26
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

RESUMO

Introdução: Pouco se sabe sobre a utilidade de aspartato de ornitina (LOLA) na doença hepática esteatótica associada ao metabolismo (MASLD). Considerando que LOLA está em contato direto com o intestino quando administrada por via oral, poderia interagir com a microbiota intestinal. Neste trabalho foi analisada a influência de LOLA na microbiota intestinal em um modelo experimental nutricional de MASLD. **Métodos:** Ratos machos adultos da linhagem *Sprague Dawley* foram randomizados em três grupos: Controle (10 ratos alimentados com dieta padrão), MASLD (10 ratos alimentados com dieta rica em gordura e deficiente em colina) e LOLA (10 ratos recebendo 200mg/kg/dia de LOLA, após a 16ª semana recebendo dieta rica em gordura e deficiente em colina). Após 28 semanas de experimento, os animais foram eutanasiados e as fezes presentes no intestino foram coletadas. Após extração do DNA fecal, a região V4 do gene 16S rRNA foi amplificada seguida por sequenciamento em um sistema Ion S5™. **Resultados:** As métricas de diversidade alfa e beta foram comparáveis entre MASLD e LOLA, 22 OTUs foram diferencialmente abundantes entre os grupos; entre eles, apenas 3 diferiram entre MASLD e LOLA, que pertencem às espécies *Helicobacter rodentium*, *Parabacteroides goldsteinii* e *Parabacteroides distasonis*. A previsão funcional forneceu dois perfis metabólicos diferentes entre MASLD e LOLA. As 9 vias diferencialmente abundantes em MASLD estão relacionadas a uma mudança na fonte de energia, degradação de adenosina/nucleotídeos de purina, bem como biossíntese de nucleotídeos de guanosina e desoxirribonucleotídeos de adenosina. As 14 vias diferencialmente abundantes em LOLA estão associadas a quatro principais funções metabólicas

principalmente influenciadas por l-aspartato, incluindo vias do ciclo do ácido tricarbóxico, biossíntese de nucleotídeos de purina/guanosina, biossíntese e recuperação de ribonucleotídeos de pirimidina, bem como biossíntese de lipídeo IVA. **Conclusões:** embora a LOLA não tenha influência na diversidade alfa e beta neste modelo nutricional de MASLD, ela foi associada a mudanças em membros probióticos específicos da microbiota intestinal e suas vias metabólicas relacionadas.

Palavras-chave: LOLA; aspartato de ornitina; MASLD; microbiota, esteatose.

ABSTRACT

Background: Scant knowledge exists regarding the efficacy of ornithine aspartate (LOLA) in metabolism-associated non-alcoholic fatty liver disease (MASLD). Given that LOLA comes into direct contact with the intestinal tract upon oral administration, it could interact with the intestinal microbiota. This study analyzed the influence of LOLA on the intestinal microbiota in an experimental nutritional model of MASLD. **Methods:** Adult male Sprague Dawley rats were randomized into three groups: Control (10 rats fed with a standard diet), MASLD (10 rats fed with a high-fat and choline-deficient diet), and LOLA (10 rats receiving 200mg/kg/day LOLA, after the 16th week receiving high-fat and choline-deficient diet). After 28 weeks of the experiment, animals were euthanized and feces present in the intestine were collected. After fecal DNA extraction, the V4 region of the 16S rRNA gene was amplified followed by sequencing in an Ion S5™ System. **Results:** Alpha and beta diversity metrics were comparable between MASLD and LOLA, 22 OTUs were differentially abundant among groups; among them, only 3 differed between MASLD and LOLA, which belong to the species *Helicobacter rodentium*, *Parabacteroides goldsteinii*, and *Parabacteroides distasonis*. The functional prediction provided two different metabolic profiles between MASLD and LOLA. The 9 pathways differentially abundant in MASLD are related to a change in energy source, adenosine/purine nucleotides degradation as well as guanosine and adenosine deoxyribonucleotides biosynthesis. The 14 pathways differentially abundant in LOLA are associated with four major metabolic functions primarily influenced by l-aspartate, including tricarboxylic acid cycle pathways, purine/guanosine

nucleotides biosynthesis, pyrimidine ribonucleotides biosynthesis and salvage as well as lipid IVA biosynthesis.

Conclusions: Although LOLA had no influence on alpha and beta diversity in this nutritional model of MASLD, it was associated with changes in specific probiotic members of the gut microbiota and their related metabolic pathways.

Keywords: LOLA; ornithine aspartate; MASLD; microbiota, steatosis.

LISTA DE ABREVIATURAS

Arg	Arginina
CHC	Carcinoma hepatocelular
DHDC	Dieta Hiperlipídica Deficiente em Colina
DM	Diabetes mellitus
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EH	Encefalopatia hepática
FDA	Food and Drug Administration
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon-1
GPPG	Grupo de Pesquisa de Pós-Graduação
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HDL	Lipoproteína de alta densidade
LEHG	Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia
LOLA	Aspartato de ornitina
L-orn	L-ornitina
MASLD	Doença hepática esteatótica associada à disfunção metabólica
MAFLD	Doença hepática gordurosa associada à disfunção metabólica
MASH	Esteato-hepatite associada à disfunção metabólica
NAFLD	Doença hepática gordurosa não-alcoólica
NDA	New Drug Application
OTU	Unidade taxonômica operacional
PPAR	Proliferadores peroxissomais
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
SNC	Sistema nervoso central

LISTA DE FIGURAS

Fig1 Alpha diversity analysis according to different metrics. Observed (A), ACE (B), Shannon (C).

Fig2 (A) Principal coordinate analysis (PCoA) of bacterial community structures based on the Bray-Curtis distance metric. (B) Hierarchical clustering dendrogram based on the Bray-Curtis dissimilarity index.

Fig3 Venn diagram showing unique and shared taxa at the genus level among the groups (Control, MASLD, and LOLA).

Fig4 Differential abundant OTUs between LOLA and MASLD by Lefse.

Fig5 Differentially abundant metabolic pathways between MASLD and LOLA by Lefse analysis.

Fig6 Pathways differentially abundant in MASLD

Fig 7 Pathways differentially abundant in LOLA.

Fig8 Predicted metabolic pathways related to L-ornithine in each group.

Fig. S1. OTUs that were differentially abundant relative to the Control group and increased at MASLD and LOLA.

Fig. S2. OTUs that were differentially abundant and decreased at MASLD and LOLA.

Fig. S3. Pathways differentially abundant in MASLD, related to a change in energy source, adenosine and purine nucleotides degradation, as well as guanosine and adenosine deoxyribonucleotides biosynthesis; pathways differentially abundant in LOLA, related to four major metabolic functions, including tricarboxylic acid cycle pathways and purine/guanosine nucleotides biosynthesis.

Fig. S4. Pathways differentially abundant in LOLA, related to pyrimidine ribonucleotides biosynthesis and salvage, as well as lipid IVA biosynthesis.

LISTA DE TABELAS

Table S1. General characteristics of the nutritional model of MASLD.

Table S2. List of taxa at the genus level unique to a group.

Table S3. List of taxa at the genus level shared between groups.

1. INTRODUÇÃO

A Doença Hepática Esteatótica Associada à Disfunção Metabólica (do inglês, MASLD) é um termo geral para uma manifestação hepática da síndrome metabólica, com uma fisiopatologia complexa, variando clinicamente desde esteatose isolada até carcinoma hepatocelular (HCC), incluindo Esteato-Hepatite Associada à Disfunção Metabólica (MASH), fibrose e cirrose. A doença geralmente é silenciosa e assintomática, manifestando-se em estágios mais avançados e irreversíveis de danos hepáticos (1-3).

Atualmente, não há terapia medicamentosa específica aprovada para a MASLD. Vários estudos estão investigando medicamentos promissores, como os agonistas de proliferadores peroxissomais (PPARs) e análogos de peptídeo semelhante ao glucagon-1(GLP-1)(4), e recentemente foi sugerido que o composto aspartato de ornitina (LOLA) pode ser útil (5). LOLA aumenta a capacidade do sistema de redução de amônia circulante através da dissociação e absorção de seus aminoácidos (6). Como LOLA é composto por dois aminoácidos envolvidos em várias vias metabólicas, o composto pode influenciar o resultado do tratamento da MASLD por outros mecanismos, ainda não bem explorados, além da regulação do ciclo da ureia.

Considerando que LOLA está em contato direto com o intestino quando administrado oralmente, ele pode interagir com a microbiota intestinal. A relação entre a microbiota intestinal e os aminoácidos ocorre de forma bidirecional; enquanto as bactérias desempenham um papel no metabolismo e síntese de aminoácidos (por exemplo, ornitina, glicina, treonina e ácido glutâmico podem ser metabolizados pelas bactérias em acetato, um ácido graxo de cadeia curta), os aminoácidos contribuem para a sobrevivência e

homeostase da microbiota (por exemplo, aspartato, arginina, ácido gama-aminobutírico, triptofano e serina são usados como fatores regulatórios da homeostase da microbiota intestinal) (7, 8). Além disso, devido à relação próxima entre o intestino e o fígado, a disbiose (ou seja, o desequilíbrio da microbiota intestinal) tem sido relacionada à progressão da MASLD, e um grande número de evidências sugere que a modulação da microbiota pode ser um alvo importante no tratamento de MASLD.

Até o momento, há apenas um estudo recente que avaliou as mudanças na microbiota sob o tratamento com LOLA. Neste estudo, pacientes com cirrose foram comparados, e os resultados indicam que a microbiota intestinal sofre mudanças na composição quando submetida à intervenção com LOLA, sem efeito nos índices de diversidade (9). Aqui, exploramos ainda mais a influência da ingestão de LOLA sobre o microbiota intestinal e vias metabólicas relacionadas, usando um modelo experimental de MASLD, fornecendo evidências sobre os mecanismos moleculares de como o LOLA induz mudanças em micróbios probióticos e seu metabolismo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DOENÇA HEPÁTICA ESTEATÓTICA ASSOCIADA À DISFUNÇÃO METABÓLICA

2.1.1 Etiologia e Fisiopatologia

MASLD é uma subcategoria da doença hepática esteatótica, que envolve a presença de gordura no fígado. É uma doença de etiologia multifatorial complexa, relacionada à genética, condições ambientais e metabólicas, e definida como a manifestação hepática da síndrome metabólica,

com presença de esteatose hepática em conjunto com um Fator de Risco Cardiometabólico e nenhuma outra causa discernível (10).

A evolução da MASLD começa com a deposição de gordura no fígado, seguida pelo surgimento de esteatose, podendo chegar à MASH e, em casos mais avançados, cirrose e CHC, mas pode também evoluir diretamente de MASH para CHC sem passar pelos estágios de fibrose (11, 12).

Existem, em paralelo com a MASLD, outras subcategorias da doença hepática esteatótica: e Doença Hepática Associada ao álcool (ALD) e uma sobreposição da alcoólica com a MASLD (MetALD) compõem as causas mais comuns da DHE. Dentro do grupo MetALD, existe um contínuo no qual a contribuição da MASLD e da ALD varia. As outras subcategorias são de origem desconhecida (criptogênica) e as de etiologia específicas, como a DILI, doenças genéticas, por vírus da hepatite C ou decorrente de doença celíaca (10).

Na história da doença hepática, a infecção crônica pelo vírus da hepatite C ou B (e não vírus C por exemplo) e doença hepática associada ao uso de álcool foram as etiologias mais frequentemente encontradas. Entretanto, com o avanço nas terapias para os vírus C e B, na atualidade, associado ao aumento da obesidade e outros fatores metabólicos estão sendo geradas mudanças na doença hepática (11). Entre estas mudanças está o surgimento da MASLD como uma importante etiologia no processo de dano hepático com indicadores que sugerem que até 2030 haverá um incremento no número de casos de cirrose descompensada em 168%, de carcinoma hepatocelular (CHC) em 137% e de 178% nos casos de morte hepática relacionados à MASLD

(13). A doença normalmente é silenciosa e assintomática, se manifestando, normalmente, em estágios mais avançados e irreversíveis do dano hepático (1,14,15). Portanto, a identificação de fatores de risco e o diagnóstico precoce são imprescindíveis para o manejo clínico (1,16).

2.1.2 Nomenclatura

Essa é uma doença que passou por recentes mudanças de nomenclatura. Em 2020, houve o primeiro consenso de se trocar NAFLD – doença hepática gordurosa não-alcoólica – para MAFLD – doença hepática gordurosa associada à disfunção metabólica, menos excludente e estigmatizada pela supressão do termo não-alcoólica e tornando o diagnóstico mais amplo, podendo incluir a presença de doenças virais e consumo de álcool associada à esteatose hepática. Mas como permanecia a estigmatização em função do termo gordurosa, foi definido esse ano a mudança para MASLD, em paralelo com essas outras subcategorias da doença hepática esteatótica, tornando o diagnóstico também mais específico (10, 17).

2.1.3 Tratamento

Atualmente, não há um tratamento medicamentoso com resultados significativos para a MASLD (11,18). Recentemente foram apresentados resultados dos estudos de fase III de Resmetirom, um agonista seletivo do receptor do hormônio tireoidiano (THR)- β . Sua administração é feita por via oral uma vez ao dia, cuja ação é focada nas causas subjacentes de MASH. O programa de desenvolvimento clínico para Resmetirom consiste em 18 estudos clínicos que respaldam a New Drug Application

(NDA): doze estudos de Fase 1, dois estudos de Fase 2 e quatro estudos de Fase 3. A Madrigal está buscando a aprovação do Resmetirom para o tratamento de pacientes com NASH e fibrose hepática sob o caminho de aprovação acelerada da Food and Drug Administration (FDA) (19).

Sabe-se que a MASLD é uma doença multifatorial complexa, relacionada à genética, condições ambientais e metabólicas. Existem diversos estudos sendo conduzidos em busca de um tratamento farmacológico eficiente, como ácido ursodesoxicólico, ômega 3 e até mesmo com probióticos, com resultados pouco promissores (20). Há dois medicamentos que podem ser utilizados, vitamina E e pioglitazona, de acordo com os resultados do estudo PIVENS (21). Ainda há, atualmente, vários estudos de fase III em andamento, avaliando diferentes drogas, como semaglutida, lanifibranor, cotadutida e dapaglifozina (22).

Também não há ainda terapia gênica para tal doença, portanto o controle de fatores de risco, perda de peso e mudança nos hábitos alimentares são considerados a primeira linha de tratamento a ser implementada nestes pacientes (17,22). A perda de peso indicada é de 10% ou mais do peso atual e o exercício físico deve ser aeróbico, por no mínimo 30 minutos, e com frequência de 5 vezes na semana; no entanto, por ambas as metas não serem facilmente tangíveis, menos de 15% dos pacientes conseguem alcançar (11,22). Visto que MASLD é uma doença sistêmica, faz também parte do tratamento a atenção à própria síndrome metabólica (23,24).

2.2 ASPARTATO DE ORNITINA

LOLA, sendo um composto formado por dois aminoácidos,

L-ornitina e L-aspartato, visa aumentar a capacidade do sistema de redução da amônia circulante. LOLA está incluído, juntamente com dissacarídeos não absorvíveis (lactulose) e antibióticos não absorvíveis (rifaximina), entre as opções de tratamento de encefalopatia hepática (HE), sendo essa uma das complicações mais debilitantes da cirrose. Em função de o fígado estar com redução na capacidade de desintoxicação, Os aminoácidos L-ornitina e L-aspartato em LOLA são dissociados e absorvidos, de modo que a administração de ornitina atua no restabelecimento do ciclo da ureia no fígado, enquanto o aspartato é utilizado como fonte de carbono para a síntese de glutamina no fígado, músculo e cérebro (9).

Um estudo do nosso grupo avaliou a utilidade de LOLA em pacientes com encefalopatia hepática mínima (25). É importante destacar que os pacientes que receberam LOLA apresentaram evolução clínica mais favorável do que aqueles que receberam placebo, relacionada à melhora da função hepática atestada pela classificação de Child-Pugh, o que sugere que a droga possa, por mecanismos ainda não bem explicados, atuar de uma forma mais ampla do que apenas no metabolismo da amônia. Horvath et al., 2022, sugerem a hipótese de que as funções adicionais de LOLA sejam de efeitos hepatoprotetores ou ainda na restauração da proteostase do músculo esquelético. Sugerem também que, como a administração de LOLA é feita por via oral e ocorre o contato com a microbiota intestinal, os efeitos clínicos de LOLA podem sofrer alterações pela microbiota.

2.3 EIXO INTESTINO-FÍGADO E O PAPEL DA MICROBIOTA

O conceito de eixo intestino-fígado começa com a interação anatômica entre estes dois órgãos. Esta interação tem início na fase embrionária de formação do corpo humano, quando o fígado se desenvolve a partir do mesmo folheto do intestino (26). Além disso, 75% do sangue que chega ao fígado é proveniente da circulação portal, ou seja, todo sangue que passa pelo intestino é destinado ao fígado (27). Portanto, o tecido hepático recebe mediadores inflamatórios, partículas de bactérias e endotoxinas derivados da permeabilidade intestinal (28).

O intestino está repleto de bactérias que compõem a microbiota e que vivem de modo sinérgico com o corpo humano, exercendo funções como digestão de alimentos, produção de vitaminas e modulação da resposta imune (28,29). De fato, o número de genes bacterianos é aproximadamente 100 vezes maior que os genes do hospedeiro, variando entre 500 e 1000 o número de espécies presentes no lúmen intestinal. Estes microrganismos se combinam com o epitélio intestinal a fim de formar a barreira biológica intestinal. Por outro lado, a disbiose intestinal está intimamente relacionada a doenças cardiovasculares, doenças metabólicas, doenças mentais e tumores (30,31).

A camada de muco intestinal tem função de barreira entre o lúmen, contendo a microbiota e seus metabólitos e a superfície celular do intestino, inibindo a translocação dos mesmos para a corrente sanguínea e tecidos. Diversos táxons microbianos participam do metabolismo dos aminoácidos e reciclagem de compostos nitrogenados, como *Bacteroides*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*, enquanto estes regulam a composição, a homeostase da

microbiota e a transdução de sinais e intermediários entre o hospedeiro e a microbiota; portanto, aminoácidos tem ação fundamental na proteção e função da barreira intestinal. O intestino é o principal local de absorção e o transporte dos aminoácidos para a biossíntese *de novo* das proteínas é feito pela microbiota. A importância da ingestão de aminoácidos pela dieta não se dá apenas pelo papel de síntese de proteínas, mas também em função da produção de diversas moléculas bioativas que participam de vias de sinalização e mantêm o metabolismo fisiológico. Enquanto a ornitina, glicina, treonina e ácido glutâmico podem ser metabolizados por bactérias em acetato, um ácido graxo de cadeia curta, o aspartato, arginina, ácido g-aminobutírico, triptofano e serina são utilizados como fatores regulatórios da homeostase da microbiota intestinal (29,30). A relação entre microbiota e aminoácidos ocorre de forma bidirecional. Enquanto as bactérias atuam no metabolismo e na síntese de aminoácidos, os aminoácidos contribuem para a sobrevivência e homeostase da microbiota intestinal. A partir de aminoácidos essenciais e não essenciais, as bactérias produzem diversos metabólitos, como amônia, poliaminas, ácidos graxos de cadeia curta, sulfeto de hidrogênio e compostos fenólicos e indólicos. Alguns desses produtos são prejudiciais à saúde do hospedeiro, enquanto outros influenciam a sinalização celular e possuem efeitos imunológicos e de barreira, o demonstra a importância da microbiota na nutrição e na saúde do hospedeiro (29).

Em um estudo clínico com pacientes com cirrose hepática tratados com LOLA versus pacientes cirróticos sem tratamento de LOLA,

conduzido por Horvath et al., 2022, *Flavonifractor* e *Oscillospira* foram mais abundantes nos pacientes tratados com LOLA em comparação ao grupo controle, podendo indicar LOLA como uma estratégia potencial de modulação da microbiota em pacientes com doença hepática. Os parâmetros de alfa- diversidade e beta-diversidade foram similares entre os grupos. Além disso, não foram encontradas diferenças significativas na permeabilidade intestinal ou nos marcadores de inflamação. Em outro estudo experimental recente, demonstrou-se que a combinação de dieta e um agente microbiano geneticamente modificado (*E coli nissle*) poderia ser útil no controle da doença. (32)

Apesar de ainda não ser conhecido exatamente o mecanismo de desenvolvimento da MASLD, sabe-se que a obesidade está intimamente relacionada à doença, assim como há evidências de que a caracterização da microbiota destes indivíduos facilita a absorção de açúcares, acelera a liponeogênese hepática e o acúmulo de triglicerídeos em adipócitos (31). Sabe-se, ainda, que a ingestão exacerbada de gorduras e carboidratos facilita a translocação bacteriana e aumenta a permeabilidade intestinal (33). A disbiose e o desequilíbrio da barreira intestinal estão relacionados à MASLD, permitindo que mais bactérias ou seus metabólitos cheguem na circulação portal, superando a capacidade das células de Kupffer de eliminá-los (34). O desequilíbrio da população de bactérias intestinais, com aumento de populações de *Lachnospiraceae*, *Bacteroidetes*, *Ruminococcus*, *Dorea* e *Blautia* e redução das populações de *Bacteroides vulgatus*, *Firmicutes* e *Prevotella* são fatores reportados em comum em pacientes com MASLD (35). O aumento da permeabilidade intestinal

permite que endotoxinas, peptidoglicanos e fragmentos de DNA bacteriano cheguem na circulação portal e, conseqüentemente, no fígado, gerando uma cascata inflamatória que acelera o processo de fibrose hepática (26).

2.3 MODELOS EXPERIMENTAIS

Os modelos experimentais são úteis para o entendimento da doença e avaliação de possíveis alvos terapêuticos, em estudos pré-clínicos (36,37). Diversos mamíferos podem ser utilizados no desenvolvimento de modelos experimentais para o estudo da doença, mas os camundongos e ratos são utilizados com maior frequência (38). Em relação aos ratos, os Sprague Dawley são mais suscetíveis ao desenvolvimento de esteato-hepatite não-alcoólica (EHNA) quando alimentados com dieta rica em gordura (39). Silva et al.,2012, realizaram um estudo com o objetivo de padronizar o modelo experimental e avaliar o efeito da dieta hiperlipídica deficiente em colina (DHDC) no desenvolvimento da esteatose hepática, EHNA e fibrose hepática em ratos Sprague-Dawley, sendo a característica de deficiência em colina responsável pelo aceleração do desenvolvimento da doença e redução do tempo necessário de experimento . Neste estudo foi demonstrado que os animais alimentados com DHDC por quatro meses apresentaram intensa balonização, esteatose microgoticular e inflamação lobular com discreta fibrose hepática, já os ratos alimentados com essa dieta por oito meses apresentaram intensa balonização, esteatose macro e microgoticular, inflamação lobular e estadiamento mais avançado de

fibrose hepática. Neste estudo, foi concluído que a DHDC foi capaz de induzir a esteatose hepática e MASH com fibrose, servindo de modelo experimental para proporcionar o melhor entendimento desta fisiopatologia hepática (36). Este modelo foi reproduzido recentemente no Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia (LEHG) (GPPG/HCPA n° 17-0021). Neste estudo foi ofertado aos ratos Sprague Dawley DHDC *ad libitum* durante 16 semanas. Ao término do experimento, os animais foram eutanasiados. Na avaliação histopatológica, os animais que receberam DHDC apresentaram esteatose predominantemente microvesicular associada à esteatose macrovesicular de intensidade moderada, com pouca atividade inflamatória e discreta presença de fibrose em alguns casos. Houve ainda melhora na doença hepática (bioquímica, deposição de colágeno, miRNAs) e cardiovascular (inflamação sistêmica e integridade de cardiomiócitos), no estado REDOX, ciclo de Krebs, inflamação cerebral e metabolismo tireoideo hepático (40-43).

3. JUSTIFICATIVA

Considerando o papel emergente da microbiota no desenvolvimento da MASLD e a ação fundamental dos aminoácidos na proteção e função da barreira intestinal, o estudo da interação de aminoácidos e microbiota é essencial, embora ainda pouco estudado. Apenas um estudo foi recentemente publicado com LOLA. Assim, estudar a relação de LOLA e microbiota em um modelo experimental de MASLD é

relevante para uma melhor compreensão dos fatores e mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia da doença, além de identificar possíveis alvos terapêuticos.

4. QUESTÃO DE PESQUISA

O uso da administração oral de LOLA é capaz de modificar a composição e rotas metabólicas da microbiota em MASLD?

5. HIPÓTESE

O uso da administração oral de LOLA modifica a composição e rotas metabólicas da microbiota em MASLD.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a microbiota intestinal sob efeito terapêutico da administração oral de LOLA em modelo experimental de MASLD induzida por dieta hiperlipídica deficiente em colina (DHDC).

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a diversidade, estrutura e composição da microbiota intestinal em animais com MASLD tratados ou não com LOLA e identificar quais táxons da microbiota estão relacionados à MASLD e LOLA.
2. Identificar e analisar as rotas metabólicas preditas da microbiota em animais com MASLD tratados ou não com LOLA.

8. CONCLUSÕES

Neste trabalho, demonstramos como o aspartato de ornitina pode influenciar membros específicos da microbiota intestinal e suas vias metabólicas em um modelo de MASLD em ratos. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas entre MASLD e LOLA na diversidade alfa e beta, um aumento na abundância de duas bactérias probióticas gram-negativas benéficas foi associado ao LOLA. Além disso, nossos resultados indicam que as diferenças bacterianas e metabólicas no tratamento com LOLA estão relacionadas ao l-aspartato, enquanto não foram observadas diferenças nas vias microbianas relacionadas à l-ornitina quando comparamos LOLA e MASLD.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho foi desenvolvido a partir dos dados obtidos para a tese de doutorado de Laura Bainy Rodrigues de Freitas, intitulada "O efeito da associação aspartato de ornitina e vitamina E no tratamento da doença hepática gordurosa não-alcoólica em modelo experimental em ratos", sob orientação do professor Mário Reis Álvares-da-Silva (GPPG/HCPA nº 2019-0297). Desenvolvido no Laboratório Experimental em Hepatologia e Gastroenterologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, o estudo demonstrou que a associação de LOLA e Vitamina E foi útil tanto na redução de dano hepático quanto na redução do risco cardiovascular. Na análise subsequente do motivo pelo qual houve benefício, LOLA pareceu estar relacionada aos principais resultados, como estado REDOX e ciclo de Krebs e o metabolismo tireoideo hepático. Esses estudos suplementares mostraram

que vitamina E algumas vezes exercia um efeito deletério, motivo pelo qual foi definido o foco nesta dissertação apenas nos animais que receberam LOLA. Coube à presente pesquisa determinar e avaliar diversidade, estrutura e composição da microbiota intestinal após a administração oral de LOLA, permanecendo ainda para estudos futuros a correlação dos resultados da microbiota com os marcadores moleculares, bioquímicos e histológicos que foram realizados no projeto inicial.

A composição e predição metabólica avaliadas neste trabalho podem ser complementadas com análises metabolômicas e de sequenciamento metagenômico em estudos futuros. Fica ainda como plano futuro a avaliação detalhada dos probióticos encontrados e sua utilização de forma profilática em MASLD. É importante ressaltar que neste trabalho não foram verificados possíveis efeitos colaterais na microbiota decorrentes do uso de LOLA, o que é um ponto bastante positivo para se considerar como possibilidade de tratamento de MASLD.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chao CY, Battat R, Al Khoury A, et al. Co-existence of non-alcoholic fatty liver disease and inflammatory bowel disease: a review article. *World J Gastroenterol.* 2016;22:7727–34. doi: 10.3748/wjg.v22.i34.7727.
2. Cusi K, Isaacs S, Barb D, et al. American association of clinical endocrinology clinical practice guideline for the diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease in primary care and endocrinology clinical settings: co-sponsored by the American Association for the Study of Liver

Diseases (AASLD). *Endocr Pract.* 2022;28:528–62. doi: 10.1016/j.eprac.2022.03.010.

3. Arab JP, Arrese M, Trauner M. Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu Rev Pathol.* 2018;13:321–50.

4. Fraile JM, Palliyil S, Barelle C, et al. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) - a review of a crowded clinical landscape, driven by a complex disease. *Drug Des Devel Ther.* 2021;15:3997–4009. doi: 10.2147/DDDT.S315724.

5. Butterworth RF, Canbay A. Hepatoprotection by L-ornithine L-aspartate in non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis.* 2019;37:63–8. doi: 10.1159/000491429.

6. Vela CIB, Ramírez JLP. Efficacy of oral L-Ornithine L-Aspartate in cirrhotic patients with hyperammonemic hepatic encephalopathy. *Ann. Hepatol.* 2011;10:55–9. doi: 10.1016/S1665-2681(19)31608-4.

7. Ma N, Ma X. Dietary amino acids and the gut-microbiome-immune axis: physiological metabolism and therapeutic prospects. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2019;18:221–42. doi: 10.1111/1541-4337.12401.

8. Lin R, Liu W, Piao M, Zhu H. A review of the relationship between the gut microbiota and amino acid metabolism. *Amino Acids.* 2017;49:2083–90. doi: 10.1007/s00726-017-2493-3.

9. Horvath A, Traub J, Aliwa B, et al. Oral intake of L-Ornithine L-Aspartate is associated with distinct microbiome and metabolome changes in cirrhosis. *Nutrients.* 2022;14:748. doi: 10.3390/nu14040748.

10. Rinella ME, Lazarus JV, Ratziu V, Francque SM, et al. A multi-society Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *J Hepatol*. 2023 Jun 20:S0168-8278(23)00418-X.doi: 10.1016/j.jhep.2023.06.003.
11. Sporea I, Popescu A, Dumitraşcu D, et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Status Quo. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2018;27(4):439–48.
12. Than NN, Newsome PN. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis*. 2015 Mar;239(1):192-202.
13. Estes C, Razavi H, Loomba R, Younossi Z SA. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology*. 2016;67(1):123– 33.
14. Poeta M, Pierri L, Vajro P. Gut-Liver Axis Derangement in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Children (Basel)*. 2017 Aug 2;4(8):66.
15. Jahn D, Kircher S, Hermanns HM, Geier A. Animal models of NAFLD from a hepatologist's point of view. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019 May 1;1865(5):943-953.
16. Arab JP, Arrese M, Trauner M. Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu Rev Pathol*. 2018;13:321–50.
17. Eslam M, Sanyal AJ, George J; International Consensus Panel. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2020 May;158(7):1999-2014.e1.

18. European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2016 Jun;64(6):1388-402.

19. Madrigal Pharmaceuticals. Madrigal Pharmaceuticals announces NDA acceptance and priority [Internet]. Disponível em: <https://ir.madrigalpharma.com/news-releases/news-release-details/madrigal-pharmaceuticals-announces-nda-acceptance-and-priority>. Acessado em: [29/10/2023].

20. Barcelos STA, Silva-Sperb AS, Moraes HA, Longo L, de Moura BC, Michalczyk MT, Uribe-Cruz C, Cerski CTS, da Silveira TR, Dall'Alba V, Álvares-da-Silva MR. Oral 24-week probiotics supplementation did not decrease cardiovascular risk markers in patients with biopsy proven NASH: A double-blind placebo-controlled randomized study. *Ann Hepatol*. 2023 Jan-Feb;28(1):100769. doi: 10.1016/j.aohep.2022.100769.

21. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM, Neuschwander-Tetri BA, Lavine JE, Tonascia J, Unalp A, Van Natta M, Clark J, Brunt EM, Kleiner DE, Hoofnagle JH, Robuck PR; NASH CRN. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2010 May 6;362(18):1675-85. doi: 10.1056/NEJMoa0907929.

22. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). [Data de início do estudo] - [Número de Identificação do Estudo]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/>. Acessado em: [30/10/2023].

23. Chan et al. Clin Gastroenterol Hepatol. 2023 Sep 28:S1542-3565(23)00754-1. doi: 10.1016/j.cgh.2023.09.018.;
24. Chan et al, J Obes Metab Syndr. 2023 Sep 30;32(3):197-213. doi: 10.7570/jomes23052)
25. Alvares-da-Silva MR, de Araujo A, Vicenzi JR, et al. Oral l-ornithine-l-aspartate in minimal hepatic encephalopathy: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Hepatol Res. 2014 Sep;44(9):956-63.
26. Kolodziejczyk AA, Zheng D, Shibolet O, Elinav E. The role of the microbiome in NAFLD and NASH. EMBO Mol Med. 2018;e9302. doi:10.15252/emmm.201809302.
27. Koukias N, Buzzetti E, Tsochatzis EA. Intestinal hormones, gut microbiota and non-alcoholic fatty liver disease. Minerva Endocrinol. 2017 Jun;42(2):184-194.
28. Gkolfakis P, Dimitriadis G, Triantafyllou K. Gut microbiota and non-alcoholic fatty liver disease. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2015 Dec;14(6):572-81.
29. Borrelli A, Bonelli P, Maria F, et al. Role of gut microbiota and oxidative stress in the progression of non-alcoholic fatty liver disease to hepatocarcinoma: Current and innovative therapeutic approaches. redox biol. 2018;15(January):467–79.
30. Ma, N, Ma, X. Dietary Amino Acids and the Gut-Microbiome-Immune Axis: Physiological Metabolism and Therapeutic Prospects. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2018;18(1), 221–242.
31. Yang Y, Bin P, Tao S, et al. Evaluation of the Mechanisms Underlying Amino Acid and Microbiota Interactions in Intestinal Infections Using

Germ-Free Animals, Infectious Microbes & Diseases: June 2021 -Volume 3-Issue 2-p79-86.

32. Iannone V, Babu AF, Lok J, et al. Changes in liver metabolic pathways demonstrate efficacy of the combined dietary and microbial therapeutic intervention in MASLD mouse model. *Mol Metab.* 2023 Oct 14;78:101823. doi: 10.1016/j.molmet.2023.101823.

33. Houghton D, Stewart CJ, Day CP, Trenell M. Gut microbiota and lifestyle interventions in NAFLD. *Int J Mol Sci.* 2016;17:447. doi: 10.3390/ijms17040447.

34. Ma J, Zhou Q, Li H. Gut Microbiota and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Insights on Mechanisms and Therapy. *Nutrients.* 2017 Oct 16;9(10):1124.

35. Lau LHS, Wong SH. Microbiota, Obesity and NAFLD. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1061:111-125.

36. Oseini AM, Cole BK, Issa D, Feaver RE, Sanyal AJ. Translating scientific discovery: the need for preclinical models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Int.* 2018 Jan;12(1):6-16.

37. Asgharpour A, Cazanave SC, Pacana T, et al. A preclinical mouse model of nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular cancer that mimics human disease. *J Hepatol.* 2016;65(3):579– 88.

38. Van Herck MA, Vonghia L, Francque SM. Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-A Starter's Guide. *Nutrients.* 2017 Sep 27;9(10):1072.

39. Larter CZ, Yeh MM. Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008 Nov;23(11):1635-48.

40. de Freitas LBR, Longo L, Filippi-Chiela E, et al. Ornithine aspartate and Vitamin-E combination has beneficial effects on cardiovascular risk factors in

an animal model of nonalcoholic fatty liver disease in rats. *Biomolecules*. 2022;12:1773. doi: 10.3390/biom12121773.

41. Longo L, Ferrari J, Rampelotto PH, et al. Gut dysbiosis and increased intestinal permeability drive microRNAs, nlrp-3 inflammasome and liver fibrosis in a nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis in adult male Sprague Dawley rats. *Clin Exp Gastroenterol*. 2020;13:351–68. doi: 10.2147/CEG.S262879.

42. Longo L, Rampelotto PH, Filippi-Chiela E, et al. Gut dysbiosis and systemic inflammation promote cardiomyocyte abnormalities in an experimental model of steatohepatitis. *World J Hepatol*. 2021;13:2053–20. doi: 10.4254/wjh.v13.i12.2052.

43. “Houve ainda melhora [...] no estado REDOX, ciclo de Krebs, inflamação cerebral e metabolismo tireoideo hepático” (Alvares-da-Silva MR, comunicação pessoal, 2023).