



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E  
HEPATOLOGIA

PAPEL DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES EN LA PROGRESIÓN DE LA  
ENFERMEDAD HEPÁTICA ESTEATÓTICA ASOCIADA A DISFUNCIÓN  
METABÓLICA (*MASLD*)

MELINA BELÉN KEINGESKI

Tesis de Doctorado

PORTO ALEGRE, BRASIL

2023

Melina Belén Keingeski

PAPEL DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES EN LA PROGRESIÓN DE LA  
ENFERMEDAD HEPÁTICA ESTEATÓTICA ASOCIADA A DISFUNCIÓN  
METABÓLICA (MASLD)

Tesis de doctorado presentada al Programa de Pós-  
Graduação: Ciências em Gastroenterologia e  
Hepatologia da Universidade Federal do Rio Grande  
do Sul, como requisito parcial para obtener el título de  
Doctor

Directora: Dra. Carolina Uribe-Cruz

Co-directora: Dra. Larisse Longo

### CIP - Catalogação na Publicação

Keingeski, Melina B  
PAPEL DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES EN LA  
PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD HEPÁTICA ESTEATÓTICA  
ASOCIADA A DISFUNCIÓN METABÓLICA (MASLD) / Melina B  
Keingeski. -- 2023.  
95 f.  
Orientadora: Carolina Uribe-Cruz.

Coorientadora: Larisse Longo.

Tese (Doutorado) -- 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. Enfermedad hepática esteatótica asociada a  
disfuncción metabólica (MASLD). 2. Vesículas  
Extracelulares (EVs). 3. microRNAs. 4. Biomarcadores.  
I. Uribe-Cruz, Carolina, orient. II. Longo, Larisse,  
coorient. III. Título.

*“La suerte es lo que sucede cuando la preparación  
se encuentra con la oportunidad”*

*Seneca-Filosofo Romano*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi familia, Lucía Kachanoski, José Keingeski y Noam Keingeski (padres y hermano), por el apoyo incondicional. Por ser mi pilar e incentivarme a cumplir todas y cada una de mis ideas y metas. A Francisco Segovia, Facundo Caballero y Dayana Frutos Bottega gracias por el amor, la amistad y el compañerismo. A todos ellos, les agradezco por estar todos estos años tomándome de la mano y festejar cada uno de mis logros.

Al Prof. Dr. Mario Reis Alvarez-da-Silva, el jefe del grupo, guía y ejemplo; a quien admiro muchísimo y quien desde el inicio confió en mí. Gracias por permitirme alcanzar tantos conocimientos y por abrirme las puertas para trabajar con su grupo. Grupo que tanto amo.

A la Prof. Dra. Carolina Uribe Cruz, gracias por la enseñanza de estos años. Por ser una directora, pero también, colega y amiga. Gracias por escucharme, aconsejarme y porque, aún en la distancia, siempre estar presente. Jamás sentí que estuviese lejos. Llevo conmigo todas las enseñanzas, tanto profesionales como personales que me ha dado.

A la Dra. Larisse Longo, por permitirme ser parte de su vida. Gracias por enseñarme tanto. Por estar presente en cada momento, ayudando e incentivando. Por los paseos, viajes compartidos y días de trabajo. No solo es una excelente compañera de trabajo sino también, una amiga que la vida me regaló.

Agradezco a los amigos que me dio el Laboratorio Experimental de Hepatología e Gastroenterología, Anelise Silva da Pinto, Valessa Emanoele Gabriel, Gabriel

Guerreiro, Bruno de Souza Basso y Elisa Lange por la ayuda en los experimentos, por ser mi sostén siendo una Argentina fuera de su país. Son personas/amistades increíbles que las tendré de ahora en adelante.

Gracias a mis colaboradores de Bioquímica, Vitoria Nunes, Juliete Scholl, Danieli Dallemolle y Fabricio Figueiro, por la enseñanza y el soporte. Sin ellos, iba a ser complicado finalizar este estudio.

Finalmente, agradezco al Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), por el constante auxilio y aprendizaje enseñado. Al Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), por todo el soporte para el desarrollo de este estudio. Agradezco a los profesionales del Centro de Pesquisa Experimental, en especial, al secretario Everaldo Almeida y al equipo de Unidade de Pesquisa Laboratorial, Marina Sieber, Hugo Bock, Aline Dos Reis Da Silva por auxiliarme y enseñarme siempre. Al Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), Pró-Reitoria de Pesquisa – UFRGS y a la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por el soporte financiero para que este estudio pueda ser finalizado.

En general, agradezco a todos aquellos que de alguna forma ayudaron para la realización de este estudio y mi tránsito por el doctorado en estos cuatro años.

## SUMARIO

RESUMEN .....	1
TÍTULO E RESUMO EM PORTUGUÊS .....	4
ABSTRACT.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS .....	10
LISTA DE FIGURAS .....	12
1. INTRODUCCIÓN .....	13
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	13
2.1. Enfermedad hepática esteatótica asociada a disfunción metabólica (MASLD).....	13
2.1.1. Nomenclatura y Epidemiología de MASLD.....	13
2.1.2. Patogénesis y progresión de MASLD.....	15
2.1.3. Diagnóstico Clínico.....	17
2.1.4. Modelos animales de MASLD .....	18
2.2. Vesículas Extracelulares (EVs): <i>Biogénesis y carga molecular</i> .....	19
2.2.1. Expresión y transporte de microRNAs, EVs y MASLD .....	22
3. JUSTIFICATIVA .....	25
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	26
5. HIPÓTESIS.....	26
6. OBJETIVOS.....	26
6.1. Objetivo General.....	26
6.2. Objetivos Específicos .....	26
7. ARTÍCULOS ORIGINALES EN INGLÉS .....	28
7.1. Artículo I .....	28
7.2. Artículo II .....	53
8. CONCLUSIONES .....	81
8.1. Conclusión General .....	81
8.2. Conclusiones Específicas .....	81
9. PERSPECTIVAS.....	84
10.PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DURANTE EL PERÍODO DEL DOCTORADO (2020-2023). ANEXO I .....	86
10.1. Artículos publicados:.....	86

<b>10.2. Trabajos presentados en Congresos y Jornadas .....</b>	<b>86</b>
<b>10.3. Artículos enviados a publicación.....</b>	<b>87</b>
<b>11. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>90</b>
<b>12. ANEXO II .....</b>	<b>95</b>



## RESUMEN

**Antecedentes/Objetivos:** *MASLD* comprende un espectro de patologías, que van desde la esteatosis hasta el carcinoma hepatocelular. Por lo tanto, identificar las primeras etapas es importante para evitar la progresión de la enfermedad. Así Vesículas extracelulares y *microRNAs*, importantes en la comunicación celular e involucrados en los mecanismos de la *MASLD*, han surgido como posibles indicadores sensibles y específicos de la progresión de la enfermedad para auxiliar en el diagnóstico precoz. Sin embargo, aún faltan estudios que ayuden a confirmar su uso como biomarcadores. Este estudio tiene como objetivo evaluar el papel de las *EVs* y *microRNAs* en modelos experimentales y en pacientes con *MASLD* en sus diferentes etapas evolutivas. **Metodología:** En el estudio experimental, Ratas Sprague Dawley adultas machos fueron asignadas aleatoriamente a dos modelos experimentales de *MASLD*: animales *MASLD*-16 y *MASLD*-28 recibieron dieta hiperlipídica y deficiente en colina (DHDC) y animales Control-16 y Control-28 recibieron una dieta estándar (SD) durante 16 y 28 semanas, respectivamente. De los modelos animales *MASLD* se utilizaron muestras biológicas y variables recolectadas previamente. Las *EVs* del tejido hepático se caracterizaron mediante microscopía confocal. Del suero, se aislaron *EVs* por ultracentrifugación diferencial y se caracterizaron por *Nanosight*. Adicionalmente, datos de *EVs* séricas se correlacionaron con parámetros bioquímicos, moleculares e histopatológicos de *MASLD*. En el estudio clínico, se incluyeron 167 pacientes con *MASLD* y 50 controles. Las *EVs*, se aislaron del suero por cromatografía por exclusión de tamaño y se caracterizaron con *Nanosight*, citometría de flujo y *WB*. Con *EVs* aisladas

previamente de animales *MASLD* y sus controles, se evaluó la expresión de miR-122 y la comparamos con su expresión en suero. La expresión de miR-122, miR-4758, miR-188 y miR-1226 se evaluó dentro de *EVs* y en suero de pacientes con *MASLD* y controles. **Resultados: En el estudio experimental** se identificaron *EVs* en el tejido hepático de animales *MASLD*. Hubo una disminución de la concentración de *EVs* séricas en MASLD-28 vs Control-28 ( $p < 0.01$ ) y un aumento significativo en la concentración de *EVs* séricas en Control-28 comparado con Control-16 ( $p < 0.01$ ). En MASLD-16, hubo fuerte correlación entre concentración de *EVs* séricas y expresión génica hepática de citocinas inflamatorias *Il6* ( $r^2 = 0,685$ ,  $p < 0.05$ ), *Il1b* ( $r^2 = 0,697$ ,  $p < 0.05$ ) y *Tnfa* ( $r^2 = 0,636$ ,  $p < 0.05$ ). En MASLD-28 hubo fuerte correlación entre el tamaño de *EVs* séricas y la citocina antiinflamatoria *Il10* ( $r^2 = 0,762$ ,  $p < 0.05$ ). **En el estudio clínico**, el tamaño y la concentración de las *EVs* variaron significativamente según la etapa de la enfermedad ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ ). La expresión de miR-122 en *EVs* fue menor y de miR-4758 fue mayor, al compararlos con sus expresiones en suero ( $p < 0.05$ ). MiR-188 y miR-1226 se expresaron exclusivamente en el suero ( $p < 0.05$ ). Dentro de las etapas de *MASLD*, miR-122 aumentó significativamente en el suero vs *EVs* en el grupo Esteatosis ( $p < 0.05$ ), sin diferencias en etapas posteriores. MiR-4758 se expresó significativamente dentro de *EVs* en Esteatosis y Cirrosis ( $p < 0.05$ ), y en HCC, se expresó exclusivamente en el suero ( $p < 0.05$ ). **En los animales MASLD**, miR-122 aumentó significativamente vs sus respectivos controles; y el grupo MASLD-28, mostró un aumento significativo vs MASLD-16 ( $p < 0.001$ ). Además, en MASLD-28, miR-122 aumentó significativamente en el suero comparado en *EVs* ( $p < 0.05$ ). **Conclusión:** las *EVs* tienen un papel en la progresión de la *MASLD* debido a que se

asocian con citocinas inflamatorias en etapas iniciales y antiinflamatorias en etapas posteriores en modelos animales, contribuyendo a la progresión o resolución de la enfermedad. Por otra parte, las *EVs* varían su biogénesis de acuerdo a cada etapa de *MASLD*. Los *microRNAs* relacionados con la enfermedad, varían en su expresión y transporte (en *EVs* y suero) dependiendo la progresión de la enfermedad. Esto nos lleva a sugerir que es importante evaluar *EVs* y *microRNA* en conjunto para entender mejor su rol y sugerirlos como potenciales biomarcadores de la progresión de *MASLD*. Sabemos que aún es necesario una mejor comprensión de su dinámica y papel en las etapas de la *MASLD*, pero este es el primer estudio que caracteriza las *EVs* y el transporte de *microRNA* en distintas etapas de la enfermedad.

## TÍTULO E RESUMO EM PORTUGUÊS

### PAPEL DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES NA PROGRESSÃO DA DOENÇA HEPÁTICA ESTEATÓTICA ASSOCIADA A DISFUNÇÃO METABÓLICA (MASLD)

**Antecedentes/Objetivos:** A MASLD compreende um espectro de patologias, que vão desde esteatose até carcinoma hepatocelular. Portanto, identificar as primeiras etapas é importante para evitar a progressão da doença. Assim, vesículas extracelulares (*EVs*) e *microRNAs*, importantes na comunicação celular e envolvidos nos mecanismos da *MASLD*, surgiram como possíveis indicadores sensíveis e específicos da progressão da doença para auxiliar no diagnóstico precoce. No entanto, ainda faltam estudos que ajudem a confirmar seu uso como biomarcadores. Este estudo tem como objetivo avaliar o papel das *EVs* e *microRNAs* em modelos experimentais e em pacientes com *MASLD* em suas diferentes etapas evolutivas.

**Metodologia:** No estudo experimental, ratos *Sprague Dawley* adultos machos foram aleatoriamente designados a dois modelos experimentais de *MASLD*: animais MASLD-16 e MASLD-28 receberam uma dieta hiperlipídica deficiente em colina (DHDC), enquanto animais Controle-16 e Controle-28 receberam uma dieta padrão (SD) por 16 e 28 semanas, respectivamente. Amostras biológicas e variáveis previamente coletadas dos modelos animais *MASLD* foram utilizadas. As *EVs* do tecido hepático foram caracterizadas por microscopia confocal. Do soro, *EVs* foram isoladas por ultracentrifugação diferencial e caracterizadas por Nanosight. Além disso, dados das *EVs* séricas foram correlacionados com parâmetros bioquímicos, moleculares e histopatológicos da *MASLD*. No estudo clínico, foram incluídos 167

pacientes com *MASLD* e 50 controles. As *EVs* foram isoladas do soro por cromatografia de exclusão de tamanho e caracterizadas com Nanosight, citometria de fluxo e WB. Usando *EVs* previamente isoladas de animais *MASLD* e seus controles, a expressão de miR-122 foi avaliada e comparada com sua expressão no soro. A expressão de miR-122, miR-4758, miR-188 e miR-1226 foi avaliada dentro das *EVs* e no soro de pacientes com *MASLD* e controles. **Resultados: No estudo experimental,** foram identificadas *EVs* no tecido hepático de animais *MASLD*. Houve uma diminuição na concentração de *EVs* séricas em MASLD-28 vs Controle-28 ( $p < 0.01$ ) e um aumento significativo na concentração de *EVs* séricas no Controle-28 comparado com o Controle-16 ( $p < 0.01$ ). Em MASLD-16, houve uma forte correlação entre a concentração de *EVs* séricas e a expressão gênica hepática das citocinas inflamatórias Il6 ( $r_2 = 0,685$ ,  $p < 0.05$ ), Il1b ( $r_2 = 0,697$ ,  $p < 0,05$ ) e Tnfa ( $r_2 = 0,636$ ,  $p < 0,05$ ). Em MASLD-28, houve uma forte correlação entre o tamanho das *EVs* séricas e a citocina anti-inflamatória Il10 ( $r_2 = 0,762$ ,  $p < 0,05$ ). **No estudo clínico,** o tamanho e a concentração das *EVs* variaram significativamente de acordo com o estágio da doença ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ ). A expressão de miR-122 nas *EVs* foi menor, e a de miR-4758 foi maior, em comparação com suas expressões no soro ( $p < 0.05$ ). MiR-188 e miR-1226 foram expressos exclusivamente no soro ( $p < 0.05$ ). Dentro dos estágios da *MASLD*, miR-122 aumentou significativamente no soro em comparação com as *EVs* no grupo Esteatose ( $p < 0.05$ ), sem diferenças nos estágios posteriores. MiR-4758 foi expresso significativamente dentro das *EVs* em Esteatose e Cirrose ( $p < 0.05$ ), e em HCC, foi expresso exclusivamente no soro ( $p < 0.05$ ). Nos animais *MASLD*, miR-122 aumentou significativamente em comparação com seus respectivos controles, e o

grupo MASLD-28 mostrou um aumento significativo em relação ao MASLD-16 ( $p < 0.001$ ). Além disso, em MASLD-28, miR-122 aumentou significativamente no soro comparado em *EVs* ( $p < 0.05$ ). **Conclusão:** As *EVs* têm um papel na progressão da *MASLD*, pois estão associadas a citocinas inflamatórias em estágios iniciais e anti-inflamatórias em estágios posteriores em modelos animais, contribuindo para a progressão ou resolução da doença. Além disso, as *EVs* variam em sua biogênese de acordo com cada estágio da *MASLD*. Os microRNAs relacionados à doença variam em sua expressão e transporte (dentro das *EVs* e no soro) dependendo da progressão da doença. Isso nos leva a sugerir que é importante avaliar *EVs* e *microRNAs* em conjunto para entender melhor seu papel e sugerir como potenciais biomarcadores da progressão da *MASLD*. Sabemos que ainda é necessária uma melhor compreensão de sua dinâmica e papel nas diferentes etapas da *MASLD*, mas este é o primeiro estudo que caracteriza as *EVs* e o transporte de *microRNAs* em diferentes estágios da doença.

## ABSTRACT

**Background/Objectives:** Metabolic-associated fatty liver disease (MASLD) encompasses a spectrum of pathologies ranging from steatosis to hepatocellular carcinoma. Identifying the early stages is crucial to prevent disease progression. Extracellular vesicles (EVs) and microRNAs, pivotal in cellular communication and implicated in MASLD mechanisms, have emerged as potential sensitive and specific indicators of disease progression aiding early diagnosis. However, further studies confirming their utility as biomarkers are lacking. This study aims to evaluate the role of EVs and microRNAs in experimental models and patients at different stages of MASLD progression. **Methodology: In the experimental study,** male adult Sprague Dawley rats were randomly assigned to two MASLD experimental models: MASLD-16 and MASLD-28 received a hyperlipidic and choline-deficient diet (CHFD), while Control-16 and Control-28 received a standard diet (SD) for 16 and 28 weeks, respectively. Biological samples and variables were collected from MASLD animal models. Hepatic tissue EVs were characterized using confocal microscopy. EVs were isolated from serum via differential ultracentrifugation and characterized using Nanosight. Additionally, serum EVs data were correlated with biochemical, molecular, and histopathological parameters of MASLD. **In the clinical study,** 167 MASLD patients and 50 controls were included. Serum EVs were isolated using size-exclusion chromatography and characterized using Nanosight, flow cytometry, and WB. EVs previously isolated from MASLD animals and their controls were used to evaluate the expression of miR-122, comparing its expression in serum. Expression of miR-122, miR-4758, miR-188, and miR-1226 was assessed within EVs and serum of MASLD

patients and controls. **Results: In the experimental study**, EVs were identified in hepatic tissue of MASLD animals. There was a decrease in serum EVs concentration in MASLD-28 vs Control-28 ( $p < 0.01$ ) and a significant increase in serum EVs concentration in Control-28 compared to Control-16 ( $p < 0.01$ ). In MASLD-16, a strong correlation was observed between serum EVs concentration and hepatic gene expression of inflammatory cytokines Il6 ( $r^2 = 0.685$ ,  $p < 0.05$ ), Il1b ( $r^2 = 0.697$ ,  $p < 0.05$ ), and Tnfa ( $r^2 = 0.636$ ,  $p < 0.05$ ). In MASLD-28, a strong correlation was found between serum EV size and anti-inflammatory cytokine Il10 ( $r^2 = 0.762$ ,  $p < 0.05$ ). **In the clinical study**, EVs size and concentration varied significantly according to disease stage ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ ). MiR-122 expression in EVs was lower and miR-4758 was higher compared to their serum expressions ( $p < 0.05$ ). MiR-188 and miR-1226 were exclusively expressed in serum ( $p < 0.05$ ). Within MASLD stages, miR-122 significantly increased in serum vs EVs in the Steatosis group ( $p < 0.05$ ), with no differences in later stages. MiR-4758 was significantly expressed within EVs in Steatosis and Cirrhosis ( $p < 0.05$ ), while in HCC, it was exclusively expressed in serum ( $p < 0.05$ ). In MASLD animals, miR-122 significantly increased compared to their respective controls, and MASLD-28 showed a significant increase compared to MASLD-16 ( $p < 0.001$ ). Additionally, in MASLD-28, miR-122 increased significantly in serum compared to EVs ( $p < 0.05$ ). **Conclusion:** EVs play a role in MASLD progression as they are associated with inflammatory cytokines in early stages and anti-inflammatory cytokines in later stages in animal models, contributing to disease progression or resolution. Moreover, EVs vary in their biogenesis according to each MASLD stage. Disease-related microRNAs vary in their expression and transport (in EVs and serum) depending on



disease progression. This suggests the importance of jointly evaluating EVs and microRNAs to better understand their role and suggest them as potential biomarkers for MASLD progression. Though a better understanding of their dynamics and roles in MASLD stages is required, this study characterizes EVs and microRNA transport in distinct disease stages, marking it as the initial exploration in this field.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALD = enfermedad hepática alcohólica

ALT = alanina transaminasa

AST = aspartato transaminasa

CK = citoqueratina

DHDC = dieta hiperlipídica deficiente en colina

DNA = ácido desoxirribonucleico

EVs = vesículas extracelulares

EXO = exosomas

HCC = carcinoma hepatocelular

IL = interleucina

MASH = esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica

MASLD = enfermedad hepática esteatótica asociada a disfunción metabólica

MVB = cuerpos multivesiculares

MVs = microvesículas

MP = membrana plasmática

RI = resistencia a insulina

*RNA* = ácido ribonucleico

*SDL* = enfermedad hepática esteatótica

*SM* = síndrome metabólico

*miRNA* = *microRNA*

*WB* = *western blot*

## **LISTA DE FIGURAS**

1. ILUSTRACIÓN 1: .....	14
2. ILUSTRACIÓN 2.....	21

## 1. INTRODUCCIÓN

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Enfermedad hepática esteatótica asociada a disfunción metabólica (MASLD)

#### 2.1.1. Nomenclatura y Epidemiología de MASLD

La enfermedad hepática esteatótica asociada a disfunción metabólica (*del inglés, metabolic dysfunction associated steatotic liver disease, MASLD*), anteriormente conocida como enfermedad hepática grasa no alcohólica (*del inglés, non alcoholic fatty liver disease, NAFLD*) <sup>1</sup>, es una de las causas más comunes de enfermedad hepática crónica en el mundo <sup>2</sup>.

En el corriente año 2023, un grupo de expertos propuso cambiar la nomenclatura en base a los criterios que definen la enfermedad. La enfermedad hepática esteatótica (*del inglés, Steatotic Liver Disease, SLD*) es el término que engloba a los distintos subgrupos, dónde la esteatosis hepática es la característica basal. La *SDL* se divide en *MASLD* definida por la presencia de esteatosis hepática asociada a, por lo menos, un criterio cardiometabólico y separando los individuos con inflamación hepática dentro del subgrupo esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica (*del inglés: metabolic dysfunction associated steatohepatitis, MASH*). Además, *MASLD* excluye el consumo excesivo de alcohol y otras etiologías <sup>1</sup>. Por otra parte, individuos con características *MASLD* asociados a consumo excesivo de alcohol, se los clasifica y denomina en el grupo *MetALD*. Adicionalmente, aquellos individuos con alto consumo de alcohol (>50-60g diarios en mujeres y hombres, respectivamente) y sin asociación

a disfunción metabólica, son clasificados dentro de la enfermedad hepática alcohólica (*del inglés: alcohol-associated/related liver disease, ALD*). Finalmente, en grupos separados se encuentran aquellos individuos con *SLD* asociada a causas como enfermedades monogénicas, lesión hepática inducida por medicamentos (*del inglés: Drug-Induced Liver Injury, DILI*) y criptogénica <sup>1</sup>.

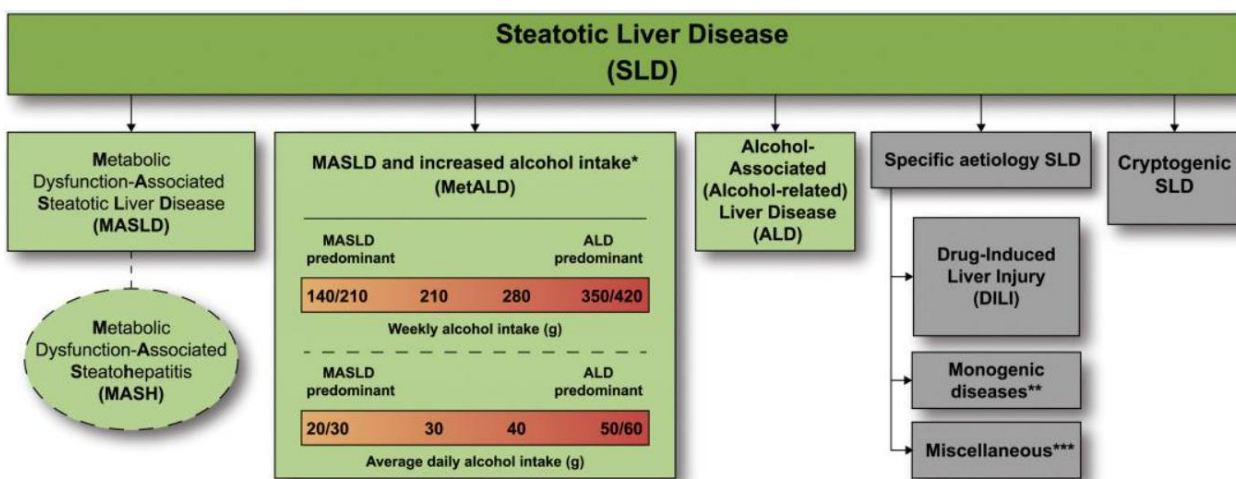


Ilustración 1: Esquema de la nueva nomenclatura de la enfermedad hepática. <sup>1</sup>.

*MASLD* es una enfermedad con prevalencia global del 30%, afectando un tercio de la población mundial <sup>2</sup>. Un metaanálisis reciente demostró que desde el año 1990 al 2019 la prevalencia mundial de *MASLD* aumentó un 50.4%, coincidiendo con la creciente epidemia global de obesidad y diabetes *mellitus* tipo 2 <sup>2,3</sup>. Además, se ha visto que la prevalencia varía regionalmente, siendo mayor en América Latina y África del Norte y Oriente Medio (MENA) con un 44.4% y 36.5%, respectivamente, seguida por Asia, América del Norte y Europa Occidental <sup>2</sup>.

Por otra parte, la prevalencia de *MASLD* se encuentra en constante aumento debido a su relación a comorbilidades metabólicas como la obesidad, resistencia a insulina (RI), diabetes y síndrome metabólico (SM), que actúan promoviendo la enfermedad <sup>2,4</sup>. Se estima que en individuos con *MASLD* la prevalencia de la obesidad es del 51%, 23% de diabetes *mellitus*, 41% de SM y 69% de dislipidemia; valores que aumentan a un 82%, 47%, 71% y 72%, respectivamente, en individuos con *MASH* <sup>5</sup>.

En las últimas tres décadas, la incidencia de *MASLD* ha aumentado drásticamente. Desde el año 1990 al 2019 la incidencia aumentó de 88,180 a 172,330 casos, respectivamente; afectando principalmente a adultos jóvenes de entre 15 y 49 años (6). Se estima que globalmente la incidencia es de aproximadamente 47 por cada 1000 personas/año, presentando una mayor tasa en hombres que en mujeres ( $\cong 71$  y  $\cong 30$ , respectivamente, por 1000 personas/año) <sup>6</sup>.

### 2.1.2. *Patogénesis y progresión de MASLD*

Como se sabe, diversos tipos celulares y mecanismos impulsan la progresión de la *MASLD* <sup>7,8</sup>. Esto se conoce como la "hipótesis de múltiples impactos", donde factores dietéticos y ambientales conducen a la obesidad y RI, resultando en la activación de células inmunes, inflamación hepática y el inicio de la fibrogénesis hepática <sup>7-9</sup>. En general, los componentes principales de la patogénesis son:

- Resistencia a insulina: considerada factor clave en el desarrollo de *MASLD*. La RI provoca el aumento de lipólisis en tejido adiposo, generando como consecuencia

un aumento de ácidos grasos libres en el hígado; estimulando la síntesis de triglicéridos y acumulación de grasa hepática <sup>9</sup>

- Inflamación y estrés oxidativo: el acúmulo de ácidos grasos en el hígado conduce a la producción de especies reactivas de oxígeno (*ROS*), causando estrés oxidativo y daño celular. Además, las citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa ( $\text{TNF-}\alpha$ ) y la interleucina 6 (*IL-6*), pueden ser liberadas por el tejido adiposo agravando la inflamación hepática <sup>9</sup>
- Daño Hepatocelular y Fibrosis: el estrés oxidativo y la inflamación causan daño a las células hepáticas y activan a los fibroblastos hepáticos, conduciendo a la fibrosis hepática y potencialmente progreso a cirrosis <sup>9</sup>
- Factores Ambientales y Estilo de Vida: dietas altas en calorías, carbohidratos refinados y grasas saturadas, junto con un estilo de vida sedentario, pueden contribuir al desarrollo de *MASLD* <sup>9</sup>
- Factores Gastrointestinales: una alteración en el microbiota intestinal puede aumentar la permeabilidad intestinal (mecanismo conocido como disbiosis); permitiendo que los productos bacterianos entren al hígado y contribuyan a la inflamación y al daño hepático <sup>4,9</sup>
- Liberación de Adipocinas: el tejido adiposo no solo almacena grasa, sino que también libera hormonas y citocinas, conocidas como adipocinas, que pueden influir en el metabolismo hepático y la inflamación <sup>9</sup>.

Debido a estos mecanismos y células, la *MASLD* puede progresar de esteatosis hepática a una esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica, cirrosis y carcinoma hepatocelular (*HCC*) <sup>9</sup>



### 2.1.3. Diagnóstico Clínico

En la clínica, la biopsia hepática se considera el estándar de oro para la estadificación de la *MASLD*, aunque presenta limitaciones debido a su impracticidad en la evaluación de rutina, ser invasiva, costosa, existir variabilidad en la toma de muestras, dependencia del operador y baja aceptación por parte de los pacientes <sup>10</sup>. Por lo tanto, debido a estas limitaciones en los últimos años los métodos de diagnóstico no invasivos comenzaron a ser mayormente explorados <sup>10,11</sup>.

Los métodos no invasivos presentan dos enfoques: (a) "físicos", que utilizan técnicas de imagen hepática como la elastografía, la ultrasonografía convencional, entre otros; y (b) "biológicos", basados en la cuantificación de biomarcadores en muestras líquidas <sup>11</sup>. Los biológicos, a su vez, se podrían subclasificar en marcadores directos, aquellos que reflejan el depósito o eliminación del tejido fibrótico y los marcadores indirectos, que indican función hepática integral (como el aspartato transaminasa (AST), alanina transaminasa (ALT) y la citoqueratina (CK)-18/12, entre otros) <sup>10</sup>.

No obstante, las metodologías de diagnóstico no invasivas tienen limitaciones. Las técnicas de imagen y los biomarcadores en suero no pueden diferenciar de manera confiable entre la esteatosis simple y la esteatohepatitis. En el caso de las técnicas de imágenes, como la ultrasonografía convencional, detecta la esteatosis cuando el contenido de grasa es superior al 30%, lo que excluye a un número significativo de pacientes con una proporción menor. Y en cuanto a los biomarcadores, ninguno de los disponibles tiene una alta especificidad y sensibilidad en la identificación; no podrían detectar la fibrosis en estadio temprano y otros no son

específicos del hígado, como ALT y AST; por lo tanto, los resultados pueden ser influenciados por comorbilidades, lo que requiere una interpretación crítica de los resultados <sup>10,11</sup>.

Esta situación de creciente aumento y prevalencia de la enfermedad, sumada a las limitaciones de las técnicas de diagnóstico actuales, resulta en un bajo porcentaje de pacientes diagnosticados en las etapas iniciales <sup>12</sup>. En consecuencia, esto lleva a la imposibilidad de aplicar terapias para revertir la enfermedad, lo que disminuye la supervivencia del paciente y aumenta los costos en la salud pública. Por lo tanto, llevar a cabo el cribado y la vigilancia de los pacientes para lograr una evaluación temprana en la clínica, una estratificación de riesgos y aplicar intervenciones a largo plazo son conductas de fundamental importancia.

En este sentido se han reportado avances en la investigación molecular relacionada con los mecanismos de progresión de la *MASLD* y a nuevas herramientas de diagnóstico no invasivo. Sin embargo, aún se necesitan estudios para confirmar el papel de ciertas biomoléculas en el mecanismo de la enfermedad; así como también, su posible papel como objetivo terapéutico o biomarcadores de diagnóstico temprano para las diferentes etapas de la *MASLD*<sup>13</sup>.

#### *2.1.4. Modelos animales de MASLD*

Los modelos animales de la *MASLD* son fundamentales para replicar fenotipos humanos, comprender los mecanismos de la enfermedad, explorar biomarcadores e identificar posibles terapias <sup>14,15</sup>. Los modelos se pueden clasificar en: genéticos,

dietéticos y/o farmacológicos <sup>15</sup>. Poniendo el foco en los modelos dietéticos, estos implican la manipulación de diferentes tipos de dietas para inducir características de la *MASLD* <sup>16</sup>. Un tipo de dieta es la hiperlipídica deficiente en colina (DHDC) la cual es capaz de inducir esteatosis hepática y *MASH* con fibrosis, sirviendo como un modelo experimental para brindar una mejor comprensión de esta patología hepática <sup>17</sup>. Sin embargo, el modelo de DHDC requiere un período prolongado, aproximadamente 1 año, para el desarrollo de *HCC* <sup>18</sup>.

Nuestro grupo de investigación desarrolló con éxito un modelo experimental de *MASLD* evaluada en dos momentos diferentes, utilizando la DHDC <sup>19-21</sup>. Después de 16 semanas de inducción con dieta DHDC, los animales mostraron un aumento de peso corporal, niveles alterados de aminotransferasas sérica, esteatosis microvesicular y macrovesicular moderada, así como inflamación asociada con aumento del tamaño de las células hepáticas <sup>19</sup>. En el modelo de 28 semanas de inducción con DHDC, además de los hallazgos anteriores, se observó una fibrosis significativa y alteraciones en marcadores de disfunción endotelial, lo cual está relacionado con un mayor riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular <sup>21</sup>. Por lo tanto, a través de este modelo, tenemos una representación de las etapas iniciales de la enfermedad, permitiéndonos investigar nuevas metodologías no invasivas.

## **2.2. Vesículas Extracelulares (EVs): Biogénesis y carga molecular**

Las *EVs* son una población heterogénea de pequeñas partículas liberadas por las células al espacio extracelular, consideradas una "muestra instantánea" de la célula de origen <sup>22</sup>. Una característica importante es que las *EVs* pueden ser encontradas y

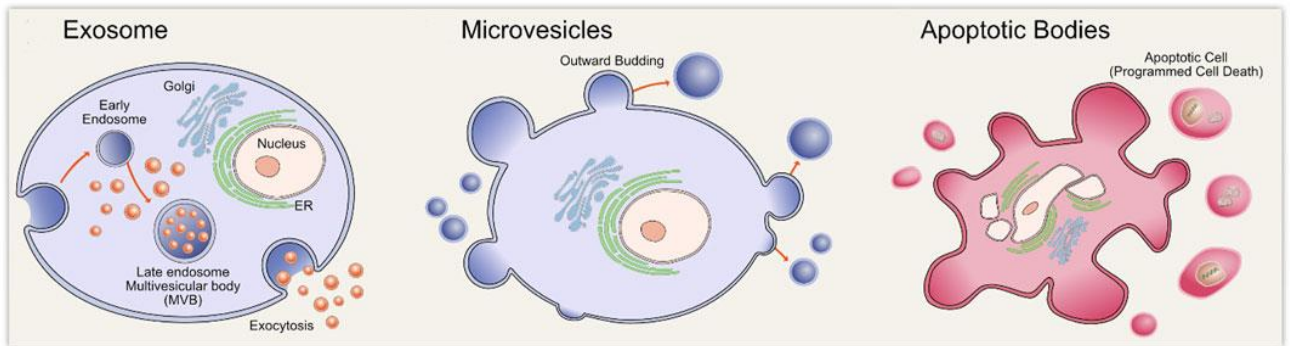
aisladas de varios fluidos biológicos como: orina, saliva, suero, plasma, entre otros<sup>22,23</sup>.

Según su biogénesis y tamaño, las *EVs* se pueden clasificar en tres tipos: exosomas (*EXO*), microvesículas (*MVs*) y cuerpos apoptóticos<sup>24-27</sup>.

Los *EXO*, con un tamaño entre 30-150 nm, surgen a través de la “vía endocítica”<sup>24,25</sup>. Inicialmente, en las células se forma una estructura en “forma de copa” por invaginación de la membrana plasmática (*MP*). En este punto también se incluyen proteínas de la superficie celular y solubles del medio<sup>26</sup>. Dentro de la célula, se inicia la formación de un endosoma temprano donde la red de Golgi y el retículo endoplasmático también pueden contribuir a la formación y el contenido de los mismos<sup>26</sup>. Los endosomas tempranos maduran convirtiéndose en endosomas tardíos y posteriormente, en los cuerpos multivesiculares (*MVB*)<sup>26</sup>. Los *MVB* son los que se van a fusionar a la *MP* y liberar su contenido al medio extracelular como *EXO*<sup>24,25</sup>. Además, en esta vía se encuentran varios tipos de proteínas y complejos como las proteínas Rab y el complejo de clasificación endosómico requerido para la maquinaria de transporte (*ESCRT*), que pueden interferir con otras actividades vesiculares dentro de las células como ser la autofagia, vías lisosomales y tráfico de vesículas desde el aparato de Golgi<sup>26</sup>.

Por otro lado, según el autor, el tamaño de las *MVs* varía desde 100-150 a 1000 nm<sup>25</sup>. Las *MVs* surgen directamente de la *MP* a través de procesos de brotación o gemación. Aquí, proteínas y lípidos permiten la curvatura de la membrana y la posterior formación y liberación de las *MVs* al medio extracelular<sup>24,25</sup>. En cuanto a los cuerpos apoptóticos, estas son vesículas con tamaño mayor a 1000 nm; también se

originan directamente de la MP, pero de aquellas células con muerte celular programada <sup>27</sup>.



*Ilustración 2. Biogénesis y clasificación de las EVs. <sup>25</sup>.*

*Las EVs se clasifican en exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos. Los exosomas se originan desde el interior de las células, se asocian a los cuerpos multivesiculares (MVB) y son liberados por el mecanismo de exocitosis al medio extracelular. Luego, las microvesículas son liberadas desde la membrana plasmática por gemación. Finalmente, las células con muerte celular programada liberan al medio extracelular los cuerpos apoptóticos por gemación (apoptotic bodies).*

En cuanto a su carga molecular, las EVs contienen varios tipos de moléculas como proteínas, lípidos, RNA mensajero, *microRNA (miRNA)*, RNA ribosomal, RNA de transferencia, RNA no codificantes (*RNAnc*), DNA, DNA mitocondrial y metabolitos <sup>24,28</sup>. Dentro de las proteínas, las mayormente encontradas son las tetraspaninas (CD9, CD63, CD81), de choque térmico (HSP70, HSP90), proteínas del complejo de clasificación endosomal necesarias para el transporte (Alix y Tsg101), receptor del

factor de crecimiento epidérmico (EGFR), proteínas del tráfico de membranas (GTPasas, flotilina y anexinas), proteínas citoesqueléticas y citosólicas <sup>28</sup>; además, siendo posible con ellas, realizar una caracterización y distinción entre los subtipos de *EVs*.

### 2.2.1. *Expresión y transporte de microRNAs, EVs y MASLD*

Desde la década de 1980, las *EVs* son consideradas importantes mediadores de la comunicación intercelular. Esto se debe a que transportan y transfieren sus cargas/moléculas bioactivas, regulando actividades celulares como la expresión génica, proliferación, diferenciación y metabolismo. Actividades involucradas tanto en procesos fisiológicos normales como en la progresión de patologías <sup>23,24,27</sup>.

En el contexto de *MASLD*, esta comunicación celular es importante para el desarrollo y progresión de la enfermedad; mientras que los hepatocitos sanos producen *EVs* para la supervivencia y proliferación celular, los hepatocitos lipotóxicos estresados liberan *EVs* que promueven la progresión de la enfermedad, facilitan la inflamación y la fibrogénesis <sup>28</sup>. Así, parte de la comunicación es directa y ocurre a través de las cargas de las *EVs*, desde las células donadoras hacia las receptoras <sup>29,30</sup>. Así, estudios demostraron que las *EVs* aisladas de la circulación de animales con *MASLD* presentan una expresión proteica distinta en comparación con los animales de control. Esto permitió diferenciar entre los grupos experimentales y reflejar la alteración histológica y patológica <sup>31</sup>. Además, otro estudio demostró que a medida que la enfermedad progresa, varios tipos celulares del hígado liberan cantidades diferentes de *EVs* en la circulación <sup>32</sup>.

Con relación a los tipos de ácidos nucleicos asociados a las *EVs*, los *miRNAs* son los más estudiados. Los *miRNAs* son pequeños *RNAs* no codificantes de aproximadamente 22 pares de nucleótidos, que se transcriben a partir de secuencias de *DNA* a *miRNAs* primarios, se procesan a *miRNAs* precursores y finalmente a *miRNAs* maduros. Los *miRNAs* están implicados en múltiples procesos biológicos. Además, su expresión aberrante está relacionada con el desarrollo de muchas enfermedades <sup>33</sup>.

Los *microRNAs* pueden ser secretados extracelularmente de diferentes formas: libres en la circulación como unidos a la proteína Argonaute2 (Ago2) o dentro de *EVs* derivadas de las células, lo que puede reflejar el estado de la enfermedad. En algunos casos, resulta difícil interpretar los resultados de los *miRNAs* entre pacientes sanos y enfermos debido a la inestabilidad causada por las *RNAsas* circulantes, la variabilidad de las muestras y las vías no específicas activadas en diversas enfermedades <sup>34</sup>. Estudios demostraron que los niveles de miR-122 y miR-192 estaban significativamente elevados en las *EVs* del suero de animales y pacientes con *MASLD*, en comparación con sus controles sanos <sup>31,35,36</sup>; y que, el aumento en la expresión de estos *miRNAs* se asocia con lesiones de la progresión de la enfermedad <sup>31</sup>. En concordancia con estos datos, otros estudios demuestran que hay mayor expresión de *miRNAs* dentro de las *EVs*, no sólo entre saludable y enfermo, sino que también la expresión de *miRNAs* dentro de *EVs* comparado a los *miRNAs* transportados en suero <sup>35,37</sup>.

Estos datos sugieren varios puntos: primero, que usar *EVs* en el contexto de *MASLD* como posible biomarcador tiene su ventaja, ya que las *EVs* reflejan el estado

de la célula de origen y están protegidas por una bicapa lipídica que les otorga más estabilidad y protección a las moléculas internas. En segundo lugar, dado lo mencionado anteriormente, los *microRNAs* asociados a las *EVs* son más estables y resistentes, que aquellos libres en el suero; debido a que están más protegidos de la degradación de las enzimas en la sangre. Sin embargo, estos estudios resaltan, principalmente, la existencia de dos tipos de transportes que utilizan los *miRNAs* en la progresión de la *MASLD*, y que hasta el momento no se han evaluado de forma más exhaustiva a lo largo de la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, creemos que evaluar las *EVs* y el transporte de los *miRNAs* en la *MASLD* podría dar más información del contexto fisiopatológico de la enfermedad.



### 3. JUSTIFICATIVA

La enfermedad hepática esteatótica asociada a disfunción metabólica (*del inglés, metabolic dysfunction associated steatotic liver disease, MASLD*) comprende un espectro de patologías que van desde la esteatosis simple, esteatohepatitis, cirrosis y carcinoma hepatocelular. Afecta aproximadamente al 30% de la población mundial, lo que se convierte en un gran problema de salud.

Para el diagnóstico de esta enfermedad, la biopsia hepática es el estándar de oro. Sin embargo, a veces puede resultar inviable su realización. A pesar de que las primeras etapas evolutivas de la enfermedad son tratables y reversibles, la gran mayoría de los pacientes son diagnosticados en etapas avanzadas cuando la enfermedad es sintomática e irreversible. Por lo tanto, el análisis de nuevos biomarcadores capaces de identificar las diferentes etapas evolutivas de la enfermedad es de fundamental importancia para la detección temprana en pacientes con riesgo de progresión.

Evidencias recientes demuestran que las vesículas extracelulares y los *microRNAs*, son importantes en la comunicación celular y están involucradas en los mecanismos de progresión de la *MASLD*. Sin embargo, aún faltan estudios que ayuden a confirmar su uso como posibles indicadores sensibles y específicos de la progresión de la *MASLD* y/o que ayuden al diagnóstico temprano.

Basándonos en lo expuesto, este estudio tiene como objetivo evaluar el papel de las vesículas extracelulares y *microRNAs* en modelos experimentales, así como en pacientes con diagnóstico de *MASLD* en sus diferentes etapas evolutivas.

## **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Las *EVs* y los *microRNA* pueden ser distintos a lo largo de la progresión de la *MASLD*?

## **5. HIPÓTESIS**

Las *EVs* y *microRNA* presentan diferentes características y expresiones a lo largo de la progresión de la *MASLD*.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1. Objetivo General**

Evaluar el papel de las *EVs* y el transporte de *microRNA* en las distintas etapas de la *MASLD* (esteatosis, *MASH*, cirrosis y carcinoma hepatocelular) en modelos experimentales, así como en pacientes.

### **6.2. Objetivos Específicos**

- 6.2.1. Comparar las características de las *EVs* en dos modelos experimentales de distintas etapas de *MASLD*.
- 6.2.2. Relacionar las características de las *EVs* con características de patogénesis y progresión de la enfermedad en dos modelos experimentales de distintas etapas de *MASLD*.
- 6.2.3. Caracterizar *EVs* en pacientes *MASLD* y controles.

6.2.4. Comparar el transporte de los *microRNAs* en los distintos estadios de *MASLD* en pacientes.

## 7. ARTÍCULOS ORIGINALES EN INGLÉS

### 7.1. Artículo I

**Título:** *Extracellular vesicles and their correlation with inflammatory factors in an experimental model of steatotic liver disease associated with metabolic dysfunction.*

**Autores:** Melina Belén Keingeski, Larisse Longo, Vitória Brum da Silva Nunes, Danieli Rosane Dallemole, Fabrício Figueiró, Adriana Roffin Pohlmann, Thalia Michele Vier Schmitz, Patrícia da Costa Lopez, Mário Reis Álvares-da-Silva, Carolina Uribe-Cruz.

Artículo enviado a ***Metabolic Syndrome and Related Disorders***

IMPACT FACTOR 2022 2.1

<https://home.liebertpub.com/publications/metabolic-syndrome-and-relateddisorders/115>

## 7.2. Artículo II

**Título:** *The biogenesis of Extracellular Vesicles and the transport of miRNAs-122, miR-4758, miR-188, and miR-1226 vary with the progression of Metabolic dysfunction associated steatotic liver disease.*

**Autores:** Melina Belén Keingeski, Larisse Longo, Anelise da Silva Pinto, Bruno de Souza Basso, Thalia Michele Vier Schmitz, Vitória Brum da Silva Nunes, Juliete Nathali Scholl, Camila Kehl Dias, Fabrício Figueiró, Danieli Rosane Dallemole, Adriana Raffin Pohlmann, José Eduardo Vargas, Patrícia Luciana da Costa Lopez, Isabel Veloso Pereira, Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira, Jose Tadeu Stefano, Mário Reis Álvares-da-Silva, Carolina Uribe-Cruz

Artículo que será enviado a ***Journal of Translational Medicine***

Impact Factor 7.4

<https://translational-medicine.biomedcentral.com>

## 8. CONCLUSIONES

### 8.1. Conclusión General

Nuestro estudio concluye que las *EVs* tienen un papel en la progresión de la *MASLD*, debido a que se asocian con citocinas inflamatorias en etapas iniciales y antiinflamatorias en etapas posteriores en modelos animales; es decir, pueden contribuir a la progresión o resolución de la enfermedad. Por otra parte, los *microRNAs* relacionados con la enfermedad varían en su expresión y tipo de transporte (dentro de *EVs* y libres en suero) dependiendo la progresión de la *MASLD*. Esto nos lleva a sugerir que tanto *EVs* y *microRNA* en conjunto pueden ser mejores biomarcadores de la progresión de *MASLD* que por separado. Sabemos que aún es necesario una mejor comprensión de su dinámica y papel en las etapas de la *MASLD*, pero este es el primer estudio que caracteriza las *EVs* y el transporte de *microRNA* en distintas etapas de la enfermedad.

### 8.2. Conclusiones Específicas

La concentración de las *EVs* en modelo animal en etapa avanzada de *MASLD* (28 semanas de inducción con DHDC) disminuye de su grupo control, sin embargo, en etapas iniciales de la enfermedad (16 semanas) no se observan cambios. Esto sugiere una posible asociación entre la dinámica de las vesículas extracelulares y la progresión de *MASLD*.

Las *EVs* se asocian con citocinas proinflamatorias en estadios iniciales de la enfermedad, pero al aumentar el tiempo de inducción con DHDC, la asociación de las

*EVs* es con citocinas antiinflamatorias. Este cambio en el patrón de asociación durante la progresión de la enfermedad sugiere una relación dinámica entre las *EVs* y el medio inflamatorio en la *MASLD*. En las primeras etapas de la enfermedad se indica un papel potencial en el inicio de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, con un tiempo de inducción prolongado utilizando una dieta DHDC, hay una transición notable en la asociación *EVs*-citocina hacia citocinas antiinflamatorias. Este cambio puede significar un papel regulador de las *EVs* en la modulación del entorno inflamatorio a medida que avanza *MASLD*, destacando la complejidad de la comunicación intercelular mediada por las *EVs* en el contexto de la enfermedad hepática metabólica. Se necesitan más investigaciones para dilucidar los mecanismos específicos subyacentes a estas asociaciones y sus implicaciones para la patogénesis de *MASLD*.

Nuestros hallazgos indican una relación significativa entre los cambios en el tamaño de las *EVs* y la progresión de la *MASLD*. En las primeras etapas, caracterizadas por esteatosis y esteatohepatitis no alcohólica (*MASH*), predominan las *EVs* de menor tamaño: exosomas. Por el contrario, las etapas más avanzadas de *MASLD*, incluidas la cirrosis y el carcinoma hepatocelular (*HCC*), se asocian con *EVs* de mayor tamaño: microvesículas. Los individuos sanos, por otro lado, presentan la presencia de microvesículas. La variación en el tamaño y la concentración de *EVs* observadas a lo largo de la progresión de la enfermedad sugiere que estas vesículas pueden desempeñar distintas funciones en diferentes etapas de *MASLD*.

Los patrones de expresión diferencial de *microRNAs* entre las *EVs* y muestras de suero en el contexto de la *MASLD*, sugieren variaciones dinámicas en el transporte de los *microRNAs* a lo largo de la progresión de la enfermedad. Este hallazgo resalta la

importancia de considerar la fuente de las muestras al estudiar los perfiles de *microRNAs* en *MASLD*. Las diferencias observadas pueden indicar distintas funciones como contribuciones de las *EVs* y el suero en el transporte y circulación de *microRNAs* durante las diversas etapas de *MASLD*. Una investigación adicional sobre el perfil de los *microRNAs* específicos asociados con cada tipo de muestra podría proporcionar información valiosa sobre los mecanismos moleculares que subyacen a la progresión de *MASLD* y potencialmente ofrecer nuevas vías para el desarrollo de estrategias diagnósticas o terapéuticas.



## 9. PERSPECTIVAS

En el estudio experimental, no fue posible realizar una caracterización de las proteínas clásicas de membrana de las *EVs* (CD9, CD63, CD81). Esto se debe a la pequeña cantidad de muestras de *EVs* que se pudieron extraer y recolectar de estos modelos. En la parte clínica, destacamos que los datos faltantes de la evaluación de mir-122 en muestras de HCC y la cuantificación del *Western Blot* están esperando la llegada de material al laboratorio.

Como perspectiva futura pretendemos seguir esta línea de investigación, sumando algunas evaluaciones como ser la identificación de marcadores proteicos propios de células hepáticas que permita identificar las vesículas provenientes del hígado. También, por el análisis de redes realizado para este trabajo, arrojó nuevos *microRNAs* asociados a la *MASLD*, aunque no observamos diferencias entre individuos controles y enfermos, creemos que estudiar los genes blancos de estos *microRNAs* puede ayudarnos a entender mejor la variación en el tipo de transporte utilizado por cada uno de ellos en las distintas etapas de la enfermedad.

Por otra parte, un proyecto para analizar la lipidómica en *EVs* derivadas de pacientes con diferentes etapas de *MASLD*, está siendo llevado a cabo, lo que nos daría más información sobre los lípidos relacionados a las primeras etapas de la enfermedad y verificar nuevos posibles biomarcadores;

Por último, dos nuevas líneas de investigación han surgido después de cerrar esta tesis. Por un lado, en recientes estudios hemos encontrado una relación entre el proceso de autofagia y la liberación de *EVs*. Analizar las moléculas presentes en

ambos procesos será una nueva línea de investigación que esperamos nos genere nuevas respuestas. Por otra parte, creemos que analizar la proteómica de estas *EVs*, para describir mejor su papel y sumará evidencias a su potencial como nuevos biomarcadores que permitan identificar y estadificar los pacientes con *MASLD* sería de gran interés.

Cabe destacar que este doctorado fue realizado en época de pandemia en donde el primer año (2020) fue periodo de cuarentena y en el segundo año (2021), los accesos a las instalaciones de la UFRGS/HCPA se encontraban prohibidos y/o limitados, dificultando así el desarrollo del proyecto. Por lo tanto, esta disertación fue realizada entre el año 2022 y 2023.

## 10. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DURANTE EL PERÍODO DEL DOCTORADO (2020-2023). ANEXO I

### 10.1. Artículos publicados:

1. Perlin, C. M., Longo, L., Keingeski, M. B., Picon, R. V., & Álvares-da-Silva, M. R. (2023). Gut mycobiota changes in liver diseases: A systematic review. *Medical mycology*, 61(8), myad071. <https://doi.org/10.1093/mmy/myad071><sup>38</sup>
2. Longo, L., de Castro, J. M., Keingeski, M. B., Rampelotto, P. H., Stein, D. J., Guerreiro, G. T. S., de Souza, V. E. G., Cerski, C. T. S., Uribe-Cruz, C., Torres, I. L. S., & Álvares-da-Silva, M. R. (2023). Nicotinamide riboside and dietary restriction effects on gut microbiota and liver inflammatory and morphologic markers in cafeteria diet-induced obesity in rats. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 110, 112019. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2023.112019><sup>39</sup>

### 10.2. Trabajos presentados en Congresos y Jornadas

1. CONGRESSO BRASILEIRO HEPATOLOGIA – HEPATO 2023. “Vesículas extracelulares como biomarcadores de progressão na doença hepática esteatótica associada à disfunção metabólica (MASLD) experimental”. (Exposición Oral).

2. CONGRESSO BRASILEIRO HEPATOLOGIA – HEPATO 2023. “Micobiota intestinal nas doenças hepáticas: revisão sistemática mostra que há ainda muito para investigar na área”. Exposição Oral de Pôster.
  
3. 16° CONGRESSO DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA DA REGIAO DUL- 2023. “Ribosídeo de Nicotinamida mitiga alterações cardiometabólicas e a fibrose hepática associadas a obesidade em ratos submetidos a dieta de cafeteria”, Pôster Eletrônico - selecionado para apresentação Oral e vencedor do "*Travel Grant*".
  
4. 1° JORNADA DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN – UCAMI 2021. O Efeito do Ribosídeo de Nicotinamida na Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica em um Modelo Experimental de Obesidade (Simpósio).
  
5. 40° SEMANA CIENTIFICA DO HCPA NO FORMATO DIGITAL 2020. O Efeito do Ribosídeo de Nicotinamida na Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica em um Modelo Experimental de Obesidade 2020 (Pôster).

### **10.3. Artículos enviados a publicación**

1. Manuscript NO: 89519 - Journal title: ***World Journal of Hepatology***

**Title:** *Effects of Rifaximin on Epigenetic and Autophagy Markers in an Experimental Model of Hepatocellular Carcinoma Secondary to Non-alcoholic Fatty Liver Disease*

**Authors:** Matheus Truccolo Michalczuk, Larisse Longo, **Melina Belén Keingeski**, Bruno de Souza Basso, Gabriel Tayguara Silveira Guerreiro, Jessica T Ferrari, José Eduardo Vargas, Cláudia P Oliveira, Carolina Uribe-Cruz, Carlos Thadeu Schmidt Cerski, Eduardo Filippi-Chiela and Mario Reis Alvares-da-Silva

*Received Date: 2023-11-03*

*Date sent for review: 2023-11-03*

*Date reviewed: 2023-11-07*

*Reviewer ID: 06270204*

2. Manuscript No.: BBRC-23-4923 - Journal Title: ***Biochemical and Biophysical Research Communications***

**Title:** *Lipophagy and Epigenetic Alterations are Related to Metabolic Dysfunction-associated Steatotic Liver Disease Progression in an Experimental Model*

**Authors:** Felipe Schütz; Larisse Longo; **Melina Belén Keingeski**; Eduardo Filippi-Chiela; Carolina Uribe-Cruz; Mário Reis Álvares-da-Silva

*Submit Date: Sep 16 2023 04:25AM*

#### **10.4. Premiação**

1. Chamada CNPq/MCTI/FNDCT No 18/2021 - **Processo 423296/2021-3-UNIVERSAL**. “Avaliação da Lipidômica de Vesículas Extracelulares na Doença

Hepática Gordurosa Não Alcoólica: Estudo Experimental e Clínico”. Valor de R\$95.000

## 11. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Rinella ME, Lazarus J V, Ratziu V, et al. A multi-society Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature Authors. Published online 2023. doi:10.1097/HEP.0000000000000520
2. Younossi ZM, Golabi P, Paik JM, Henry A, Van Dongen C, Henry L. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review. *Hepatology*. 2023;77(4):1335-1347. doi:10.1097/HEP.0000000000000004
3. Tinajero MG, Malik VS. An Update on the Epidemiology of Type 2 Diabetes: A Global Perspective. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2021;50(3):337-355. doi:10.1016/J.ECL.2021.05.013
4. Arrese M, Arab JP, Barrera F, Kaufmann B, Valenti L, Feldstein AE. Insights into Nonalcoholic Fatty-Liver Disease Heterogeneity. *Semin Liver Dis*. 2021;41(4):421. doi:10.1055/S-0041-1730927
5. 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*. 2016;64(1):73-84. doi:10.1002/hep.28431
6. Chen H, Zhan Y, Zhang J, et al. The Global, Regional, and National Burden and Trends of NAFLD in 204 Countries and Territories: An Analysis From Global Burden of Disease 2019. *JMIR Public Health Surveill*. 2022;8(12). doi:10.2196/34809

7. Peiseler M, Tacke F. Inflammatory mechanisms underlying nonalcoholic steatohepatitis and the transition to hepatocellular carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2021;13(4):1-26. doi:10.3390/cancers13040730
8. Hernández A, Geng Y, Sepúlveda R, et al. Chemical hypoxia induces pro-inflammatory signals in fat-laden hepatocytes and contributes to cellular crosstalk with Kupffer cells through extracellular vesicles. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020;1866(6). doi:10.1016/j.bbadis.2020.165753
9. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016;65(8):1038-1048. doi:10.1016/j.metabol.2015.12.012
10. Jang W, Song JS. Non-Invasive Imaging Methods to Evaluate Non-Alcoholic Fatty Liver Disease with Fat Quantification: A Review. *Diagnostics*. 2023;13(11). doi:10.3390/diagnostics13111852
11. Castera L, Friedrich-Rust M, Loomba R. Noninvasive Assessment of Liver Disease in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2019;156(5):1264-1281.e4. doi:10.1053/j.gastro.2018.12.036
12. Sheka AC, Adeyi O, Thompson J, Hameed B, Crawford PA, Ikramuddin S. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Review. *JAMA*. 2020;323(12):1175-1183. doi:10.1001/JAMA.2020.2298
13. Sato K, Kennedy L, Liangpunsakul S, et al. Intercellular Communication between Hepatic Cells in Liver Diseases. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9):2180. doi:10.3390/ijms20092180



14. Fang T, Wang H, Pan X, Little PJ, Xu S, Weng J. Mouse models of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): pathomechanisms and pharmacotherapies. *Int J Biol Sci.* 2022;18(15):5681-5697. doi:10.7150/ijbs.65044
15. Oseini AM, Cole BK, Issa D, Feaver RE, Sanyal AJ. Translating scientific discovery: the need for preclinical models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Int.* 2018;12(1):6-16. doi:10.1007/s12072-017-9838-6
16. Wang H, Shen H, Seo W, Hwang S. Experimental models of fatty liver diseases: Status and appraisal. *Hepatol Commun.* 2023;7(7). doi:10.1097/HC9.0000000000000200
17. *ELIANA PINHEIRO DA SILVA.*
18. Hill-Baskin AE, Markiewski MM, Buchner DA, et al. Diet-induced hepatocellular carcinoma in genetically predisposed mice. *Hum Mol Genet.* 2009;18(16):2975-2988. doi:10.1093/hmg/ddp236
19. Longo L, Ferrari JT, Rampelotto PH, et al. Gut dysbiosis and increased intestinal permeability drive micrnas, nlrp-3 inflammasome and liver fibrosis in a nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis in adult male sprague dawley rats. *Clin Exp Gastroenterol.* 2020;13:351-368. doi:10.2147/CEG.S262879
20. 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(12):2052. doi:10.4254/WJH.V13.I12.2052

21. 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(12):1773. doi:10.3390/BIOM12121773/S1
22. Srinivas AN, Suresh D, Santhekadur PK, Suvarna D, Kumar DP. Extracellular Vesicles as Inflammatory Drivers in NAFLD. *Front Immunol*. 2021;11. doi:10.3389/fimmu.2020.627424
23. Devhare PB, Ray RB. Extracellular vesicles: Novel mediator for cell to cell communications in liver pathogenesis. *Mol Aspects Med*. 2018;60:115-122. doi:10.1016/j.mam.2017.11.001
24. Newman LA, Muller K, Rowland A. Circulating cell-specific extracellular vesicles as biomarkers for the diagnosis and monitoring of chronic liver diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2022;79(5):232. doi:10.1007/S00018-022-04256-8
25. Xu D, Di K, Fan B, et al. MicroRNAs in extracellular vesicles: Sorting mechanisms, diagnostic value, isolation, and detection technology. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10. doi:10.3389/fbioe.2022.948959
26. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020;367(6478). doi:10.1126/SCIENCE.AAU6977
27. Battistelli M, Falcieri E. Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. *Biology (Basel)*. 2020;9(1). doi:10.3390/BIOLOGY9010021

28. Hernández A, Arab JP, Reyes D, et al. Extracellular Vesicles in NAFLD/ALD: From Pathobiology to Therapy. *Cells*. 2020;9(4):817. doi:10.3390/cells9040817
29. Santangelo L, Battistelli C, Montaldo C, Citarella F, Strippoli R, Cicchini C. Functional Roles and Therapeutic Applications of Exosomes in Hepatocellular Carcinoma. *Biomed Res Int*. 2017;2017:2931813. doi:10.1155/2017/2931813
30. Jiang F, Chen Q, Wang W, Ling Y, Yan Y, Xia P. Hepatocyte-derived extracellular vesicles promote endothelial inflammation and atherogenesis via microRNA-1. *J Hepatol*. 2019;72(1):156-166. doi:10.1016/j.jhep.2019.09.014
31. Povero D, Eguchi A, Li H, et al. Circulating Extracellular Vesicles with Specific Proteome and Liver MicroRNAs Are Potential Biomarkers for Liver Injury in Experimental Fatty Liver Disease. Sookoian SC, ed. *PLoS One*. 2014;9(12):e113651. doi:10.1371/journal.pone.0113651
32. Li J, Liu H, Mauer AS, et al. Characterization of Cellular Sources and Circulating Levels of Extracellular Vesicles in a Dietary Murine Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatol Commun*. 2019;3(9):1235-1249. doi:10.1002/hep4.1404
33. Ge W, Yi M, Pak TR, et al. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology* | [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org). 2018;1:402. doi:10.3389/fendo.2018.00402
34. Momen-Heravi F, Saha B, Kodys K, Catalano D, Satishchandran A, Szabo G. Increased number of circulating exosomes and their microRNA cargos are potential novel biomarkers in alcoholic hepatitis. *J Transl Med*. 2015;13(1):1-13. doi:10.1186/s12967-015-0623-9

35. Jiang H, Qian Y, Shen Z, et al. Circulating microRNA-135a-3p in serum extracellular vesicles as a potential biological marker of non-alcoholic fatty liver disease. *Mol Med Rep.* 2021;24(1). doi:10.3892/MMR.2021.12137
36. Lee Y sun, Kim SY, Ko E, et al. Exosomes derived from palmitic acid-treated hepatocytes induce fibrotic activation of hepatic stellate cells. 2017;(January):1-10. doi:10.1038/s41598-017-03389-2
37. Sohn W, Kim J, Kang SH, et al. Serum exosomal microRNAs as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Med.* 2015;47(9). doi:10.1038/emm.2015.68
38. Perlin CM, Longo L, Keingeski MB, Picon R V., Álvares-Da-Silva MR. Gut mycobiota changes in liver diseases: A systematic review. *Med Mycol.* 2023;61(8). doi:10.1093/MMY/MYAD071
39. Longo L, de Castro JM, Keingeski MB, et al. Nicotinamide riboside and dietary restriction effects on gut microbiota and liver inflammatory and morphologic markers in cafeteria diet–induced obesity in rats. *Nutrition.* 2023;110:112019. doi:10.1016/J.NUT.2023.112019

## 12. ANEXO II

# Gut mycobiota changes in liver diseases: A systematic review

Cássio Marques Perlin<sup>1,2</sup>, Larisse Longo<sup>1,2</sup>, Melina Belén Keingeski<sup>1,2</sup>, Rafael V. Picon<sup>1,3</sup> and Mário Reis Álvares-da-Silva<sup>1,2,3,4,\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate Program in Gastroenterology and Hepatology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 90035-002, Brazil

<sup>2</sup>Experimental Laboratory of Hepatology and Gastroenterology, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, 90035-903, Brazil

<sup>3</sup>School of Medicine, Department of Internal Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Division of Gastroenterology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, 90035-903, Brazil

<sup>4</sup>CNPq researcher

\*To whom correspondence should be addressed. Mário Reis Álvares-da-Silva, MD and PhD in Gastroenterology and Hepatology at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil, Phone: +55-051-3359.8847, Fax: +55-051-3359.8760, E-mail: [marioreis@live.com](mailto:marioreis@live.com); Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia, Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350/ sala 12214, 2º andar, CEP 90035-903, Bairro Rio Branco, Porto Alegre, RS, Brazil.

## Abstract

Intestinal fungi play an important role in the health-disease process. We observed that in liver diseases, fungal infections lead to high mortality. In this review, we were able to gather and evaluate the available scientific evidence on intestinal mycobiota and liver diseases. We searched PubMed and Embase, using a combination of several entry terms. Only studies in adults  $\geq 18$  years old with liver disease and published after 2010 were included. We observed that individuals with liver disease have an altered intestinal mycobiome, which accompanies the progression of these diseases. In cirrhotic patients, there are a high number of *Candida* sp. strains, especially *Candida albicans*. In early chronic liver disease, there is an increase in alpha diversity at the expense of *Candida* sp. and conversely, in advanced liver disease, there is a negative correlation between alpha diversity and model for end-stage liver disease score. On the other hand, patients with non-alcoholic fatty liver disease demonstrate greater diversity compared to controls. Our study concluded that the evidence on the subject is sparse, with few studies and a lack of standardization of outcome measures and reporting, and it was not possible to perform a meta-analysis capable of synthesizing relevant parameters of the human mycobiome profile. However, certain fungal genera such as *Candida* play an important role in the context of liver disease and that adults with liver disease have a distinct gut mycobiome profile from healthy controls.

## Lay summary

In people with end-stage liver disease, there is a high mortality from fungal infections. In this context, the genus *Candida* plays an important role in the context of liver disease, and adults with liver disease have a distinct gut mycobiota profile from healthy controls.

**Key words:** gut microbiome, mycobiome, mycobiota, liver diseases, systematic review.

## Introduction

Liver disease and complications are a leading cause of death worldwide.<sup>1-3</sup> Fine dissections of the pathophysiology of liver diseases should be elucidated, which boosts the development of new therapeutic modalities and tackles the socioeconomic burden of these liver diseases.<sup>4</sup>

The human intestine contains many microbes, including bacteria, fungi, archaea, and viruses, collectively termed the gut microbiota.<sup>2,5</sup> They live symbiotically in the gastrointestinal tract and play an important role in the health of the individual and in the development of diseases.<sup>6,7</sup> This microbiota is unique to each individual and its composition can be influenced by many factors such as geography, lifestyle, diet, medication, disease, environment, and genetics.<sup>8</sup> Although bacteria are more abundant and better studied, fungi are important because they form biofilms, produce toxic metabolites (mycotoxins), and have morphological versatility with single-celled, usually commensal forms (such as yeasts) and

multicellular, usually invasive and pathogenic forms (hyphae) that are more common.<sup>2,9</sup>

The incidence of fungal infections is increasing in patients with end-stage liver disease, causing high mortality rates.<sup>10,11</sup> Through the portal vein, when there is a permeable intestinal barrier or a deficient immune system, intestinal fungi (gut mycobiome) can reach the liver and initiate a local immune response with injury to this organ.<sup>2,12,13</sup> Emerging evidence indicates that the mycobiome may be more important than previously thought.<sup>14</sup> In immunocompromised patients (e.g., acquired immunodeficiency syndrome), infection with fungi such as *Candida* sp., *Aspergillus* sp., *Cryptococcus* sp., and *Pneumocystis* sp. turns out to be deadly.<sup>15</sup> Despite its importance, there is a paucity of scientific literature investigating the relationship between intestinal mycobiome and liver disease. Thus, this study aims to review and evaluate the available scientific evidence to understand the role of fungi in the context of liver disease.



## Basic nutritional investigation

# Nicotinamide riboside and dietary restriction effects on gut microbiota and liver inflammatory and morphologic markers in cafeteria diet–induced obesity in rats



Larisse Longo Ph.D. <sup>a,b</sup>, Josimar Macedo de Castro M.Sc. <sup>c,d</sup>, Melina Belén Keingeski B.Sc. <sup>a,b</sup>, Pabulo Henrique Rampelotto Ph.D. <sup>b,e</sup>, Dirson João Stein Ph.D. <sup>c,d</sup>, Gabriel Tayguara Silveira Guerreiro M.Sc. <sup>a,b</sup>, Valessa Emanoele Gabriel de Souza B.Sc. <sup>b</sup>, Carlos Thadeu Schmidt Cerski Ph.D. <sup>a,f</sup>, Carolina Uribe-Cruz Ph.D. <sup>a,b</sup>, Iraci L.S. Torres Ph.D. <sup>c,d,h</sup>, Mário Reis Álvares-da-Silva M.D., Ph.D. <sup>b,g,h,\*</sup>

<sup>a</sup> Graduate Program in Gastroenterology and Hepatology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup> Experimental Laboratory of Hepatology and Gastroenterology, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Pain Pharmacology and Neuromodulation: Preclinical Investigations, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>d</sup> Graduate Program in Medicine, Faculty of Medical Sciences, Universidade Federal Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>e</sup> Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>f</sup> Unit of Surgical Pathology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>g</sup> Division of Gastroenterology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>h</sup> Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq researcher

## ARTICLE INFO

## Article History:

Received 8 November 2022

Received in revised form 10 February 2023

Accepted 20 February 2023

## Keywords:

Cafeteria diet

Dietary restriction

Metabolic dysfunction–associated fatty liver disease

Nicotinamide riboside

Obesity

Microbiota

## ABSTRACT

**Objectives:** No specific therapy is available for metabolic dysfunction–associated fatty liver disease. We investigated nicotinamide riboside (NR) and dietary restriction (DR) effects in liver lipids, inflammation, histology, intestinal permeability, and gut microbiota in a cafeteria diet (CAFD)–induced obesity model.

**Methods:** Adult male Wistar rats were randomly assigned to standard diet (SD) or CAFD. After 6 wk, they were subdivided into six groups—SD + vehicle (Veh) (distilled water), SD + NR (400 mg/kg), DR + Veh, DR + NR, CAFD + Veh, and CAFD + NR—for 4 wk more until euthanasia.

**Results:** CAFD increased the hepatic content of lipids, triacylglycerols, and total cholesterol and promoted hepatomegaly, steatosis, steatohepatitis, and liver fibrosis. DR intervention successfully delayed the onset of CAFD–induced liver abnormalities except for steatosis and fibrosis. CAFD suppressed *Sirt1* expression in the liver and DR increased *Sirt3* expression. CAFD did not affect hepatic inflammatory genes but DR enhanced *Il10* expression while decreasing *Il1β* expression. CAFD reduced *Firmicutes* and increased *Bacteroidetes* and *Cyanobacteria*, with no changes in intestinal permeability. Gut microbiota patterns in animals exposed to DR were similar to those of animals in SD. NR, specifically in CAFD, reduced hepatic triacylglycerols and total cholesterol deposition and collagen fiber accumulation in the liver and limited the colonization of CAFD–induced *Cyanobacteria*. NR combined with DR decreased the liver's relative weight and *Tnfα* expression and suppressed *Sirt1* and *Sirt3* hepatic expression.

**Conclusions:** This study suggests that NR can be a potential adjuvant to metabolic dysfunction–associated fatty liver disease therapy, encouraging further research in this field.

© 2023 Published by Elsevier Inc.

### Abbreviations:

MAFLD, Metabolic dysfunction–associated fatty liver disease. This study was supported by the following Brazilian funding agencies: National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (M. R. Álvares-da-Silva and I. L. S. Torres), FAPERGS/CAPES (J. M. de Castro), CAPES/PNPD (L. Longo and D. J. Stein), and the Research Incentive Fund from Hospital de Clínicas de Porto Alegre (M. R. Álvares-da-Silva, grant no. 2018–0663, and I. L. S. Torres, grant no. 2018–0049).

L. Longo and J. M. de Castro contributed equally to this report and are regarded as co–first authors.

\*Corresponding author. Tel.: +55–051–3359.8847; fax: +55–051–3359.8760

E-mail address: [marioreis@live.com](mailto:marioreis@live.com) (M.R. Álvares-da-Silva).

### Introduction

Due to changes in dietary habits and the increased availability of high-calorie foods, obesity has become one of the most prevalent human health problems, affecting >40% of the population in some industrialized countries. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the hepatic manifestation of the metabolic syndrome associated with obesity [1]. The natural course of the NAFLD