

MARIANA DE MENDONÇA

Potencial das vesículas extracelulares circulantes de camundongos exercitados no tratamento da obesidade

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2023

MARIANA DE MENDONÇA

**Potencial das vesículas extracelulares circulantes de camundongos exercitados no
tratamento da obesidade**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Alice Cristina Rodrigues

Versão Original

São Paulo

2023

RESUMO

DE MENDONCA, M. **Potencial das vesículas extracelulares circulantes de camundongos exercitados no tratamento da obesidade.** 2023. 157 p. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

O exercício físico é uma estratégia não farmacológica amplamente utilizada no tratamento da obesidade. Por meio da secreção de moléculas, carregadas ou não por vesículas extracelulares (EVs), o músculo esquelético pode se comunicar com outros órgãos e vice-versa e promover efeitos benéficos do exercício físico na obesidade. Recentemente, mostrou-se que microRNAs (miRNAs) liberados em EVs tanto participam da fisiopatologia da obesidade, como podem ter ação fisiológica no fígado e tecido adiposo após treinamento físico aeróbio. O objetivo desse trabalho foi avaliar se os efeitos benéficos promovidos pelo exercício físico na obesidade envolvem a liberação de miRNAs em EVs na circulação, que são entregues à tecidos alvos e assim participam na comunicação interórgãos. Primeiramente avaliamos possíveis mudanças no perfil de miRNAs contidos em EVs circulantes em resposta ao treinamento aeróbico em esteira por 8 semanas de camundongos machos C57BL/6J controle e com obesidade por dieta. Demonstramos que em camundongos obesos há o aumento de expressão de miRNAs (miR-122, miR-192 e miR-22) em EVs do soro, que é revertido pelo exercício aeróbio crônico. Associado à reversão da expressão dos miRs, o protocolo de exercício aeróbio foi capaz de reverter o quadro de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), resgatar a termogênese do tecido adiposo marrom e promover a adipogênese do tecido adiposo branco. Em camundongos controles, o exercício aeróbio crônico aumentou os miRNAs miR-330 e miR-133a nas EVs circulantes. A fim de avaliar o mecanismo pelo qual os miRNAs em EVs atuam na obesidade, tratamos camundongos C57BL/6J com obesidade induzida por dieta com EVs de camundongos controles que realizaram exercício aeróbio por 8 semanas. Demonstramos que o tratamento de camundongos obesos com EVs do soro de camundongos exercitados simula alguns dos efeitos observados em camundongos obesos treinados, como a melhora da sensibilidade à insulina, atenuação da DHGNA e diminuição dos depósitos de gordura. Ademais, o tratamento promoveu um remodelamento do tecido adiposo com aumento da proporção de adipócitos menores e aumento de expressão de genes envolvidos nos processos de adipogênese, termogênese e marcadores de adipócitos bege, além do aumento expressivo do conteúdo de UCP1. No tecido adiposo, tais efeitos foram associados ao aumento de expressão de miR-330 e miR-133a, entregues pelas EVs circulantes dos animais exercitados usadas no tratamento. Em conclusão, nossos dados fornecem evidências significativas que EVs medeiam o efeito do exercício físico no metabolismo do tecido adiposo em camundongos obesos e esses efeitos possivelmente envolvem a ação de miRNAs contidos em EVs que são entregues ao tecido adiposo.

Palavras-chave: Exercício físico, Metabolismo, Obesidade, Vesículas Extracelulares, microRNAs.

ABSTRACT

DE MENDONÇA, M. **Potential of circulating extracellular vesicles from exercised mice in the treatment of obesity.** 2023. 157 p. Thesis (Ph.D. Thesis in Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Physical exercise is a non-pharmacological strategy widely used in the treatment of obesity. Through the secretion of molecules, loaded or not by extracellular vesicles (EVs), the skeletal muscle can communicate with other organs and vice versa and promote beneficial effects of physical exercise in obesity. Recently, it was shown that microRNAs (miRNAs) released in EVs both participate in the pathophysiology of obesity and may have a physiological action on the liver and adipose tissue after aerobic physical training. The objective of this work was to evaluate whether the beneficial effects promoted by physical exercise in obesity involve the release of miRNAs in EVs in the circulation, which are delivered to target tissues and thus participate in interorgan communication. We first evaluated possible changes in the profile of miRNAs contained in circulating EVs in response to aerobic training on a treadmill for 8 weeks in male C57BL6/J mice, control and diet obese. We demonstrated that in obese mice there is an increase in the expression of miRNAs (miR-122, miR-192 and miR-22) in serum EVs, which is reversed by chronic aerobic exercise. Associated with the reversion of miRNAs expression, the aerobic exercise protocol was able to reverse the non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), rescue brown adipose tissue thermogenesis and promote white adipose tissue adipogenesis. In control mice, chronic aerobic exercise increased miR-330 and miR-133a miRNAs in circulating EVs. In order to evaluate the mechanism by which miRNAs in EVs act on obesity, we treated C57BL/6J mice with diet-induced obesity with EVs from control mice that performed aerobic exercise for 8 weeks. We demonstrate that treatment of obese mice with EVs from exercised mice serum simulates some of the effects seen in trained obese mice, such as improved insulin sensitivity, attenuation of NAFLD and decreased fat deposits. Furthermore, the treatment promoted remodeling of the adipose tissue with an increase in the proportion of smaller adipocytes and an increase in the expression of genes involved in the processes of adipogenesis, thermogenesis and markers of beige adipocytes, in addition to a significant increase in UCP1 content. In adipose tissue, such effects were associated with increased expression of miR-330 and miR-133a, delivered by circulating EVs from exercised animals used in the treatment. In conclusion, our data provide significant evidence that EVs mediate the effect of physical exercise on adipose tissue metabolism in obese mice and furthermore, these effects possibly involve the action of miRNAs contained in EVs that are delivered to adipose tissue.

Keywords: Physical exercise, Metabolism, Obesity, Extracellular Vesicles, microRNAs.

1. INTRODUÇÃO

1.1. OBESIDADE E POSSÍVEIS INTERVENÇÕES

A obesidade é uma doença crônica, recidivante e multifatorial e fatores como genética, comportamento e ambiente podem contribuir para seu desenvolvimento, promovendo o desequilíbrio entre consumo e gasto energético, resultando na expansão do tecido adiposo branco e acúmulo ectópico de gordura (1, 2). Dados do *World Obesity Atlas 2023* mostram que em 2020 aproximadamente 988 milhões de pessoas com mais de 5 anos no mundo eram acometidas pela obesidade, ou seja, aproximadamente 14 % da população mundial e em 2025 é estimado que esse número chegue a 1,249 bilhão, aproximadamente 17% da população mundial (3). Especificamente no Brasil, de acordo com dados do Ministério da Saúde, em 2020 a obesidade acometia 25,9 % da população adulta, ou seja, aproximadamente 41,2 milhões de pessoas (4). A obesidade é um fator de risco para diversas doenças crônicas não transmissíveis como diabetes, doenças cardiovasculares e câncer e o fato da prevalência dessa doença crescer cada vez mais a torna um importante problema de saúde pública, especialmente em países emergentes, como o Brasil, que também enfrentam o problema da desnutrição (5).

Atualmente no Brasil a Anvisa aprova 4 fármacos para o tratamento da obesidade: sibutramina, orlistate, liraglutida e semaglutida (6, 7). A sibutramina é um inibidor de recaptação de norepinefrina, serotonina e dopamina de ação central, que atua como um inibidor de apetite, aumentando a sensação de saciedade (8, 9) e apesar de ainda ser uma opção de tratamento no Brasil, seu uso foi descontinuado na Europa e em diversos outros países como Austrália e EUA devido a associação com o aumento de eventos cardiovasculares (10). Orlistate atua como um inibidor de lipase, interferindo na atividade das lipases pancreática e gástrica e impedindo a absorção de cerca de 30% da gordura ingerida e das calorias nela contidas (11).

Já liraglutida e semaglutida são análogos de GLP-1 (do inglês, *Glucagon-like peptide-1*) e atuam estimulando a liberação de insulina através do aumento dos níveis de glicose no sangue, o que retarda o esvaziamento gástrico e suprime a secreção prandial de glucagon, promovendo a redução de apetite e conseqüentemente a redução da ingestão calórica (12, 13). Importante ressaltar que é altamente recomendável que o tratamento medicamentoso seja acompanhado por intervenções não farmacológicas como uma alimentação saudável, para reduzir a ingestão calórica e a prática regular de exercício físico que age aumentando a

resistência muscular e força, promovendo gasto calórico e diminuindo a massa de tecido adiposo.

1.2. TECIDO ADIPOSEO E EXERCÍCIO FÍSICO

O tecido adiposo é composto por adipócitos maduros e a fração vascular estromal, os adipócitos maduros consistem em 65%-90% do volume do tecido e tem como principal característica o acúmulo de gordura na forma de uma ou várias gotículas lipídicas, já a fração vascular estromal é heterogênea consistindo em diversos tipos celulares como pré-adipócitos, células endoteliais, células-tronco mesenquimais e células imunes (14, 15) . Os adipócitos podem ser classificados em 3 diferentes tipos, adipócito branco, adipócito marrom e adipócito bege (16).

O tecido adiposo branco tem como função primária o armazenamento de energia e são os adipócitos brancos que armazenam essa energia na forma de triglicerídeos como uma gota lipídica unilocular que ocupa a maior parte do volume celular, além disso, esses adipócitos possuem poucas mitocôndrias e baixa taxa metabólica (17). A distribuição do tecido adiposo branco ocorre de maneira ampla se concentrando majoritariamente nas regiões subcutânea e visceral (18). No contexto da obesidade a expansão do tecido adiposo branco pode ocorrer tanto através da hiperplasia com surgimento de novos adipócitos como através da hipertrofia que resulta no aumento do tamanho do adipócito através do aumento da gota lipídica (17, 19).

O tecido adiposo marrom é um tecido metabolicamente ativo no qual os adipócitos marrons são capazes de dissipar energia na forma de calor (20-22). Esses adipócitos possuem múltiplas gotas lipídicas, muitas mitocôndrias e elevada taxa de captação e oxidação de lipídeos e glicose (23). Uma característica relevante dos adipócitos marrons é a alta expressão da proteína desacopladora 1 (UCP1) que está localizada na membrana interna da mitocôndria e forma um canal de vazamento de prótons, desacoplando o potencial do gradiente de prótons gerado pela cadeia de transporte de elétrons, resultando na dissipação de energia na forma de calor (22, 24). O tecido adiposo marrom em humanos já foi descrito em seis depósitos: cervical, supraclavicular, axilar, mediastinal, paraespinal e abdominal (25), já em camundongos está distribuído em vários depósitos e o interescapular é o que apresenta maior volume (26). Na obesidade o tecido adiposo marrom pode sofrer um processo conhecido como *whitening*, no qual o tecido passa a ter mais características do tecido adiposo branco, perdendo sua principal atribuição, a promoção de termogênese (27, 28).

No tecido adiposo branco podem surgir os adipócitos bege, que possuem gotículas lipídicas multiloculares, núcleo central e alta densidade de mitocôndrias, semelhantes aos adipócitos marrons. Os adipócitos bege funcionam de maneira semelhante aos adipócitos marrons, pois expressam UCP1 e são capazes de gerar energia diretamente na forma de calor, contribuindo para a termogênese (29). Diversos estímulos, como o exercício físico, podem induzir o surgimento desses adipócitos e grande parte desses estímulos parece agir através da ativação do sistema nervoso simpático (30, 31).

Além do surgimento de adipócitos bege, a prática de exercício físico pode promover diversos outros efeitos no tecido adiposo branco, como o aumento da captação de glicose e a sensibilidade à insulina (31, 32), aumento de expressão de genes e proteínas envolvidas no metabolismo da glicose (33, 34). Adicionalmente o exercício físico voluntário regula de forma positiva a expressão de genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos e no metabolismo de fosfolipídeos (31, 34, 35).

De forma geral, os resultados de estudos avaliando o papel do exercício físico na função do tecido adiposo marrom apresentam resultados conflitantes. Como citado anteriormente, o tecido adiposo marrom possui muitas mitocôndrias e enquanto alguns estudos relatam que o exercício promove um aumento da atividade mitocondrial (36, 37), outros não observaram nenhuma mudança (34, 38). Em relação ao metabolismo de glicose alguns estudos mostram que o exercício físico pode aumentar a expressão de genes envolvidos na sinalização de insulina e oxidação de glicose (34, 37, 39), outros estudos em humanos e camundongos mostram que o exercício físico não parece afetar a captação de glicose no tecido adiposo marrom (40, 41).

A prática regular de exercício físico é uma forma de intervenção não farmacológica que pode reverter ou atenuar o quadro de obesidade por alguns dos mecanismos apontados e que não podem ser explicados exclusivamente pelo gasto de calorias. É proposto que ocorre uma comunicação do tecido adiposo com outros tecidos como fígado e músculo esquelético através da liberação de adipocinas (42), ao mesmo tempo, que a contração do músculo esquelético durante a atividade física, libere moléculas que atuam de maneira endócrina em outros tecidos tais como fígado, tecido adiposo, coração, cérebro e vasculatura secretando uma variedade de moléculas e também sendo regulado por moléculas oriundas destes outros órgãos (43, 44).

1.3. EXERCÍCIO FÍSICO E COMUNICAÇÃO METABÓLICA

A hipótese do músculo esquelético ter um papel além do de locomoção e auxílio para manter a postura foi levantada na década de 60 em um estudo que sugeriu a existência de um componente humoral no músculo que ajudaria na regulação da homeostase da glicose (45), mas apenas décadas depois, nos anos 2000 que de fato foi demonstrado que o músculo esquelético atua como um órgão endócrino, quando estudos mostraram que a citocina interleucina-6 (IL-6) é produzida e posteriormente secretada pelo músculo esquelético durante o exercício (46, 47). Então o termo miocina foi criado, denotando uma citocina, peptídeo ou metabólito produzido e secretado pelo músculo esquelético e que subsequentemente exerce efeitos parácrinos e/ou endócrinos. Experimentos com IL-6 recombinante demonstraram que a IL-6 liberada durante o exercício contribui para o aumento da produção de glicose corporal em humanos (48), além disso outro estudo demonstrou que a IL-6 secretada pelo músculo está envolvida na comunicação entre o intestino e o pâncreas regulando a homeostase da insulina (49).

Além da IL-6 várias outras miocinas foram descritas posteriormente, como a IL-15 que parece afetar tanto a massa de tecido adiposo (50) quanto a capacidade dos adipócitos de secretar adiponectina (51), sugerindo assim uma interação entre músculo e tecido adiposo durante o exercício. Com a prática de exercício físico o fígado também é capaz de secretar moléculas que terão efeito em outro tecido, conhecidas como hepatocinas, o exemplo mais conhecido é FGF21, que é liberada em resposta a proporção de glucagon e insulina que são liberados pelo pâncreas durante o exercício (52). Além de FGF21, outra hepatocina liberada com a prática de exercício físico é a folistatina que parece atuar promovendo o aumento da massa muscular, inibindo a expressão de miostatina (53, 54).

Como mencionado, o tecido adiposo também tem um papel endócrino na prática de exercício físico, secretando moléculas, conhecidas como adipocinas, dentre elas uma das mais estudadas é adiponectina, que geralmente tem seus níveis diminuídos na obesidade, mas tem sua expressão aumentada após o treinamento físico em indivíduos com sobrepeso e com obesidade (55, 56). A adiponectina tem ação principalmente no músculo esquelético aumentando oxidação de ácidos graxos e captação de glicose e no fígado inibindo gliconeogênese (57). O tecido adiposo marrom também parece liberar moléculas com a prática de exercício físico e apesar de ser uma área ainda pouco estudada, um lipídeo secretado especificamente desse depósito foi recentemente descrito, o 12,13-diHOME que

primeiramente foi descrito como um lipídeo liberado do tecido adiposo marrom em resposta ao frio tanto em camundongos como em humanos. Ele age de maneira autócrina-parácrina promovendo aumento da absorção de ácidos graxos, lipólise e termogênese no tecido; além disso, o tratamento prolongado com esse lipídeo foi capaz de diminuir os níveis de triglicerídeos circulantes (58). Um estudo posterior mostrou que o exercício físico agudo em humanos e camundongos aumenta os níveis circulantes de 12,13-diHOME, e o tratamento agudo com esse lipídeo em camundongos aumenta a absorção e oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético (59).

A forma como essas moléculas liberadas pelo tecido adiposo, músculo esquelético e fígado são levadas na circulação para os seus tecidos alvo ainda é tema de discussão, no entanto, em 2015 um estudo mostrou pela primeira vez que a liberação de pequenas vesículas extracelulares é aumentada no soro de jovens adultos submetidos a um protocolo agudo de exercício físico (60). Desde então, estudos mostraram cada vez mais evidências de que as vesículas extracelulares (EVs) tem um importante papel na comunicação entre tecidos com a prática de exercício físico (61-63).

1.4. VESÍCULAS EXTRACELULARES

As vesículas extracelulares foram descritas pela primeira vez na década de 60, em estudos que mostraram a liberação de EVs em plaquetas e condrócitos (64, 65) posteriormente dois grupos de pesquisas independentes na década de 80 mostraram que os receptores de transferrina localizados em pequenos reticulócitos eram secretados no meio extracelular, conforme as células se diferenciavam em eritrócitos (66, 67). Então, por muitos anos as EVs foram consideradas como resíduos de organelas sem importância, usadas apenas para descartar moléculas indesejadas pelas células, no entanto, nos últimos anos os estudos com EVs mostram que elas possuem um importante papel na comunicação entre células e evidências mostram que todas as células são capazes de secretar EVs (68-70).

EVs são vesículas delimitadas por bicamada lipídica liberadas por células com a capacidade de transferir biomoléculas funcionais, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, alterando assim a função da célula receptora (71-73). Atualmente podemos classificar essas vesículas a partir de sua origem, endossomal, comumente chamadas de exossomos ou pequenas EVs ou de origem direta da membrana plasmática, comumente chamadas de microvesículas (**Figura 1**). Como não há marcadores específicos para cada subtipo de EV, a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares sugere o uso do termo genérico 'EVs'

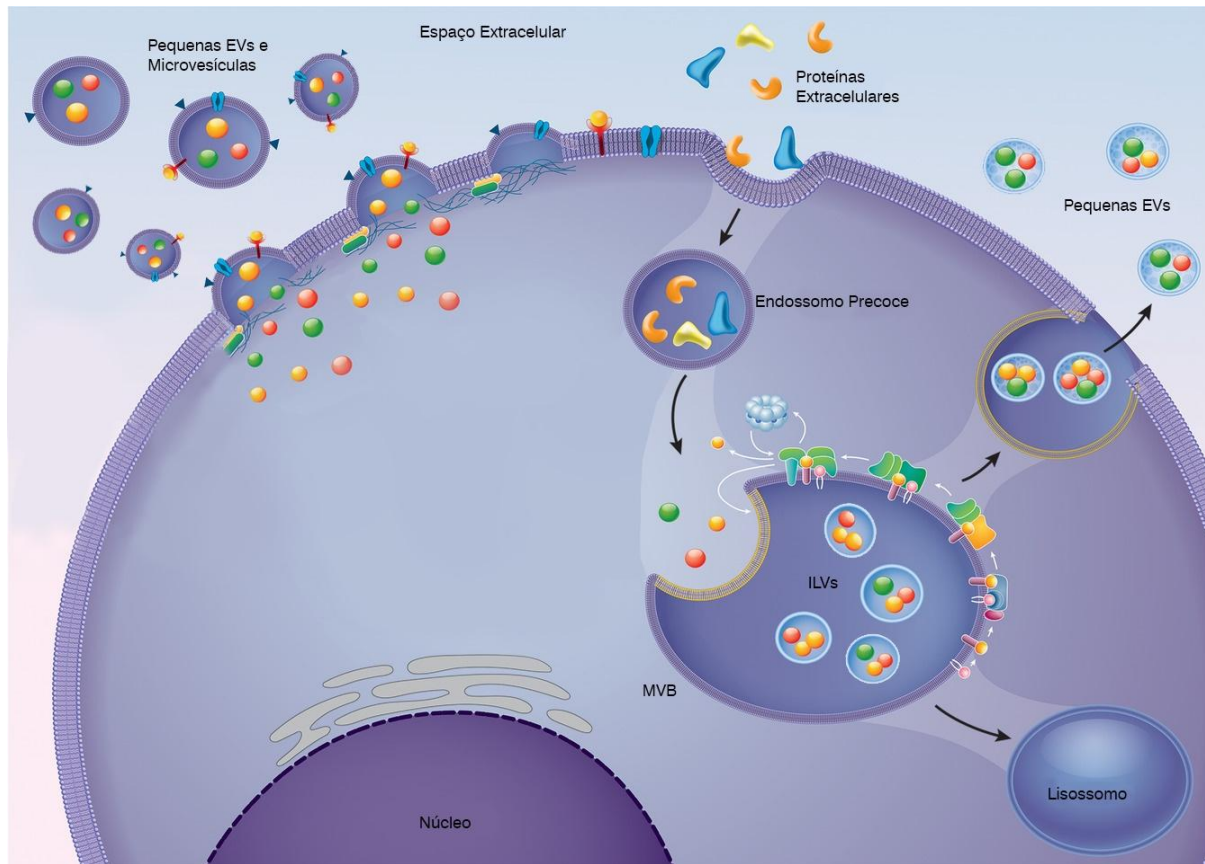
para englobar vesículas delimitadas por uma bicamada lipídica, liberadas naturalmente pelas células (74), além disso, os métodos atuais usados para isolar EVs não são capazes de isolar populações puras de cada subtipo de EV, especialmente se apenas um único método de isolamento for usado (75), mas o foco deste trabalho são as pequenas EVs ou exossomos (50-200 nm de diâmetro).

A biogênese das EVs de origem endossomal, como mostrado na **Figura 1** ocorre com a invaginação da membrana celular durante a internalização de ligantes extracelulares ou componentes celulares que são processados através da via endossomal para reciclagem ou degradação (76). No processo de formação de endossomos, pequenas vesículas denominadas intraluminais (ILV, do inglês *intraluminal vesicles*) são formadas por brotamento interno da membrana endossomal (76). Os endossomos precoces contendo as ILV em seu interior são denominados corpos multivesiculares (MVB, do inglês *multivesicular bodies*) que podem fundir-se ou com os lisossomos gerando sua degradação, ou com a membrana celular, liberando as ILVs para o exterior, que passam então a ser chamadas de EVs (76).

ESCRT (do inglês *endosomal sorting complexes required for transport*) é o complexo utilizado pela célula para gerar EVs (77, 78) e é composto por aproximadamente 30 proteínas que se agrupam em quatro complexos (ESCRT-0, -I, -II e -III) e todos esses complexos estão envolvidos na formação dos MVBs e ILVs (79-83). No entanto, há evidências de que os MVBs são capazes de se formar na ausência de todos os quatro componentes ESCRT em uma via independente de ESCRT para a biogênese de EVs (84).

Embora a maioria dos estudos tenha se concentrado no mecanismo molecular envolvido na via de biogênese endossômica, estudos mostram que EVs também podem brotar diretamente da membrana plasmática (85-89) (**Figura 1**) e imagens oriundas de microscopia eletrônica mostraram pequenas EVs brotando de células-tronco diretamente da membrana plasmática (90). Apesar desses estudos mostrarem que de fato a biogênese das EVs pode ocorrer na membrana plasmática, ainda são necessários estudos para determinar a contribuição de cada uma dessas diferentes vias de biogênese para a produção total de pequenas EVs dentro da célula e como o papel de cada via envolvida na biogênese de EVs pode diferir entre os tipos de células e em resposta a diferentes estímulos.

Figura 1. Vias envolvidas na biogênese de vesículas extracelulares



(Adaptado de Vechetti, 2021) (62)

Em relação a captação das EVs pelas células receptoras, a maneira exata de como isso ocorre ainda não é totalmente compreendida, embora vários mecanismos possíveis já tenham sido relatados como endocitose mediada por clatrina, endocitose dependente de caveolina, macropinocitose e fagocitose (91, 92). Atualmente não há dados sobre se um desses mecanismos é preferencialmente usado para a captação de EVs, também se especula que a internalização de EVs possa ser específica do tipo de célula ou dependente do estado fisiológico da célula receptora e é provável que a heterogeneidade das EVs influencie no mecanismo de captação utilizado pela célula receptora.

Recentemente, foi demonstrado que, juntamente com outras moléculas, vesículas extracelulares (EVs), são liberadas na circulação durante o exercício como um meio potencial de comunicação entre tecidos (60, 63). Posteriormente diversos estudos buscaram compreender melhor o papel das EVs liberadas com exercício físico e estudos em humanos têm resultados divergentes, provavelmente decorrente dos diferentes protocolos de exercício escolhidos e as diferentes populações avaliadas.

Estudos demonstram que um protocolo de exercício agudo aeróbio ou resistido modula a liberação de EVs na circulação em indivíduos com obesidade e em indivíduos sem obesidade (93, 94). Um protocolo de exercício físico aeróbio de 12 semanas aumenta a concentração de EVs na circulação de indivíduos com T2D e indivíduos resistentes à insulina (95), no entanto a concentração de EVs na circulação de indivíduos com pré-diabetes não é alterada com prática de exercício agudo (96). Até mesmo na gravidez a prática de exercício físico parece aumentar a concentração de EVs na circulação quando comparado a mulheres não grávidas (97).

Estudos em modelo animal mostram que o tratamento de ratos diabéticos com EVs da circulação de camundongos exercitados promove uma melhora na cicatrização de feridas promovendo angiogênese (98), além disso EV liberadas com exercício parecem ter um papel na hematopoiese (99). Estudos *in vitro* mostram que o tratamento com EVs liberadas com a prática de exercício físico parece ter um papel positivo no processo de envelhecimento e na regeneração muscular (100, 101).

Portanto, as EVs liberadas durante o exercício podem ser um mecanismo pelo qual a atividade física pode retardar ou prevenir diversas patologias e o conteúdo das EVs, especialmente microRNAs, vem sendo um grande foco de estudo depois de um estudo de 2017 que mostrou que um microRNA contido em uma EV liberada do tecido adiposo marrom tem sua ação em um RNAm alvo no fígado (102).

1.5. MICRORNAS

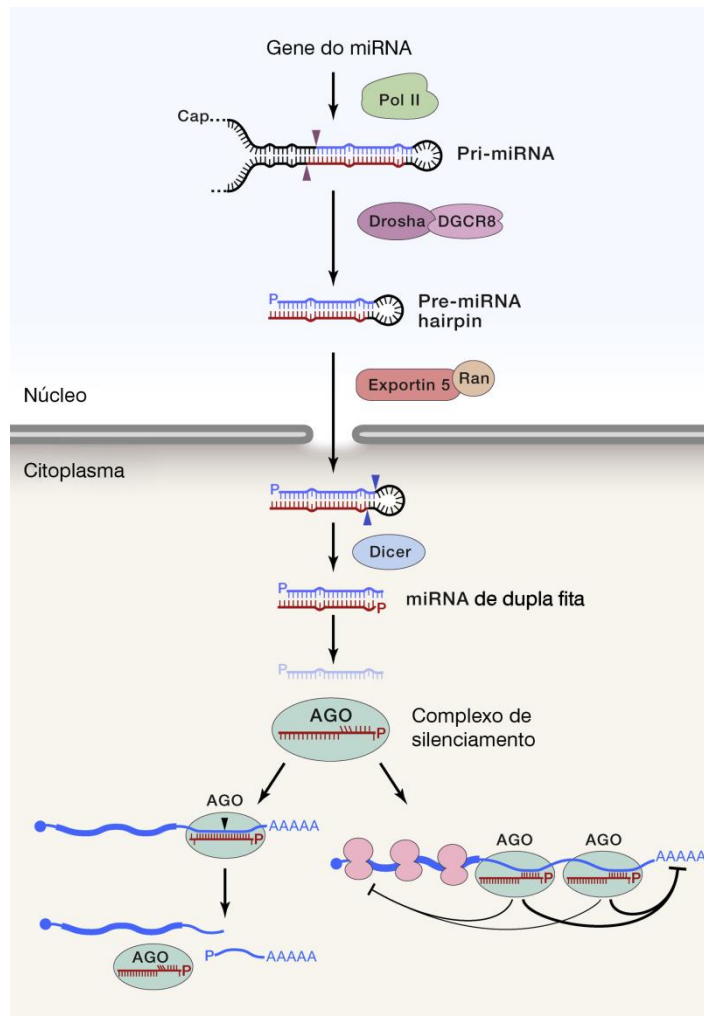
Os RNAs não-codificantes são moléculas de RNA que não são traduzidas em proteínas sendo uma classe de RNA composta por RNA ribossomal, RNA transportador, RNAs longos não codificantes e pequenos RNAs. Dentre os pequenos RNAs descritos, há os microRNAs (miRNAs), que apresentam por volta de 19-22 nucleotídeos (103) e podem ser codificados em regiões intergênicas ou em íntrons de outros genes e estão geralmente envolvidos na regulação pós-transcricional da expressão gênica (104).

O processo de biogênese canônico dos miRNAs envolve quatro etapas: transcrição no núcleo da célula, exportação para o citoplasma, processamento e maturação (105, 106) (Figura 2). O processo de transcrição dos miRNAs ocorre pela ação da RNA polimerase II, que gera o pri-miRNA, um transcrito longo de miRNA primário (107, 108), que forma uma estrutura em forma de grampo (*stem-loop* ou *hairpin*), originando uma haste dupla fita e uma alça (109).

Posteriormente, ainda no núcleo, pela ação da ribonuclease III Drosha e seu cofator DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region in gene*), o pri-miRNA perde uma região da haste dupla fita, originando o pré-miRNA com aproximadamente 70 nucleotídeos de comprimento que é transportado para o citoplasma pela exportina-5 (Exp5), receptor nuclear dependente de RanGTP (110, 111).

No citoplasma, a Dicer, uma outra endoribonuclease III, processará o pré-miRNA, removendo a alça da estrutura *stem-loop*, obtendo um miRNA de dupla fita, com aproximadamente 22 nucleotídeos. Esse miRNA de dupla fita é incorporado no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), onde as duas fitas de RNA são separadas, com uma permanecendo associada ao RISC e constituindo o miRNA maduro e a outra sofrendo degradação (109).

Figura 2. Via canônica da biogênese de microRNAs



(Adaptado de Bartel, 2018)(112)

A regulação da expressão gênica ocorre pela ação do complexo miRNA e RISC por dois mecanismos diferentes, quando ocorre uma complementaridade perfeita ou quase perfeita o RNAm é clivado por uma ribonuclease presente no RISC mas quando ocorre uma complementaridade parcial, o principal mecanismo de atuação dos miRNAs, há repressão inicial ou tardia do processo de tradução do RNAm sem a degradação da fita (113).

Aproximadamente um terço de todos os genes codificadores de proteínas constituem alvo dos miRNAs (114, 115) e um único miRNA pode ter como alvo vários RNAm já um RNAm pode ser regulado por diversos miRNAs (116-120), porque sítios próximos num mesmo RNAm podem resultar na cooperação entre vários miRNAs, exacerbando o efeito repressor (121).

1.6. MICRORNAS EM VESÍCULAS EXTRACELULARES E EXERCÍCIO FÍSICO

Muitos estudos já relataram a existência de miRNAs em vários fluidos corporais, incluindo soro, plasma, leite materno, urina, saliva e outros fluidos intersticiais e que o perfil destes miRNAs pode ser alterado nesses fluidos em certas condições, como na gravidez (122-124), além disso, a obesidade e o exercício físico podem alterar o perfil de microRNAs na circulação (125, 126). Estudos mostram que tanto um protocolo de exercício físico aeróbio como um de exercício físico resistido promovem regulação de expressão de miRs na circulação de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 (127), além disso a expressão de miR-192 e miR-193b, que é aumentada na circulação de camundongos e humanos pré-diabéticos é diminuída com a prática de exercício físico aeróbio (128).

Os miRNAs circulantes são estáveis, podendo resistir a variações de pH e temperatura (129, 130), isso ocorre porque muitos desses miRNAs podem estar conjugados a proteínas (131, 132), associados a lipoproteínas (133, 134) ou carregados em EVs (135) e embora os miRNAs ligados a lipoproteínas tenham sido descritos como relevantes na comunicação entre tecidos (133), o foco da maioria dos estudos são os miRNAs contidos em EVs (EV-miRs), especialmente após estudos mostrarem que esses miRs podem sair de EVs de um tecido para regular a expressão gênica em células receptoras em outro tecido (102, 136)

A liberação de EVs de células ou tecidos para o ambiente extracelular foi proposta como um mecanismo essencial de comunicação intercelular em resposta ao exercício (63). Um protocolo de exercício agudo em modelo animal promove aumento de concentração de EVs na circulação e a regulação de microRNAs contidos nessas EVs (137) e estudos em

humanos também mostram que um protocolo de exercício agudo é capaz de regular a expressão de EV-miRs (138, 139), além disso Sullivan e colaboradores, mostraram que em humanos, 1 semana de treinamento simultâneo de exercício aeróbico e exercício de resistência altera o conteúdo de miRNA de EVs derivadas do músculo esquelético (140). A prática de exercício físico pode até mesmo regular a expressão de EV-miRs do suor e da urina (141, 142).

Mostrando que a ação desses EV-miRs possivelmente é um importante mecanismo pelo qual a prática de exercício físico previne o desenvolvimento de doenças, um estudo em humanos constatou que há EV-miRs na circulação em comum em indivíduos que se exercitam há 6 meses e indivíduos que se exercitam há mais de 25 anos e grande parte desses miRs tem como alvo doenças crônicas, como câncer, doenças neurodegenerativas e metabólicas (143).

Estudos recentes mostram que microRNAs contidos em EVs liberadas com a prática de exercício físico tem um papel na melhora da capacidade cognitiva, de cardioproteção e também na melhora da sensibilidade à insulina (144-146). Recentemente foi demonstrado que o miR-342 é um miRNA contido em EVs presentes na circulação, que tem sua expressão aumentada com um protocolo longo de exercício físico em ratos, e que além disso ele parece ter um efeito protetor na isquemia cardíaca, regulando genes envolvidos na apoptose e na sobrevivência celular (147). Em modelo animal, EVs liberadas do tecido adiposo marrom com a prática de exercício físico contém os microRNAs miR-125b, miR-128 e miR-30d e esses miRs tem ação no coração agindo em múltiplos alvos da via pró-apoptótica MAPK, promovendo um efeito cardioprotetor (145).

Castaño e colaboradores mostraram em estudo de 2020 que o tratamento com EVs do soro de camundongos exercitados em camundongos controle promoveu a diminuição do depósito de gordura epididimal e a melhora da sensibilidade à insulina através da ação de miR-133b no gene *FoxO1* no fígado (146), no entanto o efeito dos microRNAs contidos em EV liberadas com exercício físico no contexto da obesidade ainda é um tema pouco estudado. Neste trabalho visamos entender os mecanismos moleculares pelos quais o exercício físico atua, para encontrar possíveis novos alvos terapêuticos para o tratamento da obesidade. Nossa hipótese é a de que a prática regular de exercício físico como estratégia não farmacológica para tratamento de obesidade promove a liberação de EVs contendo microRNAs e que essas EVs são direcionadas a tecidos específicos para que os microRNAs nelas contidos atuem em genes alvos, promovendo os efeitos benéficos associados a prática de exercício físico.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho demonstramos que os efeitos benéficos do exercício físico na obesidade envolvem a regulação de microRNAs contidos em vesículas extracelulares.

Na **Parte I** pudemos demonstrar que o exercício físico modula os miRNAs contidos em EVs do soro na obesidade. Observamos que em camundongos obesos há o aumento de expressão de microRNAs (miR-122, miR-192 e miR-22) em EVs do soro e que um protocolo de exercício aeróbio foi eficaz em restaurar os níveis de expressão desses miRs, além de reverter o quadro de DHGNA, melhorar tanto a inflamação quanto a esteatose hepática, resgatar a termogênese do tecido adiposo marrom e promover a adipogênese do tecido adiposo branco. Em conjunto, essas alterações promovidas pelo treinamento físico normalizam a glicemia e impedem o ganho de peso promovido por uma dieta hiperlipídica suplementada com leite condensado. Os dados obtidos na **Parte I** foram publicados na revista *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* tendo como título: "*Aerobic exercise training regulates serum extracellular vesicle miRNAs linked to obesity to promote their beneficial effects in mice*" (220).

Na **Parte II** pudemos demonstrar que o tratamento de camundongos obesos com EVs do soro de camundongos exercitados simula alguns dos efeitos observados em camundongos obesos treinados do Protocolo I. Observamos que o tratamento melhorou a sensibilidade à insulina, atenuou o quadro de DHGNA, diminuiu os depósitos de gordura e promoveu o remodelamento do tecido adiposo com aumento da proporção de adipócitos menores e aumento de expressão de genes envolvidos nos processos de adipogênese, termogênese e marcadores de adipócitos bege, além do aumento expressivo gênico e proteico de UCP1. No tecido adiposo, tais efeitos foram associados ao aumento de expressão de miR-330 e miR-133a que demonstram terem sido entregues pelas EVs e que possivelmente tem um papel nos efeitos observados. Concluindo, nossos dados fornecem evidências significativas que EVs medeiam o efeito do exercício físico no metabolismo do tecido adiposo em camundongos obesos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bray GA, Kim KK, Wilding JPH, World Obesity F. Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the World Obesity Federation. *Obes Rev.* 2017;18(7):715-23.
2. Organization WH. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 11th Ed2019.
3. World Obesity F. World Obesity Atlas 2023 2023.
4. Saúde Md. Promoção da Saúde e da Alimentação Adequada e Saudável: Excesso de peso e obesidade. Available from: <https://aps.saude.gov.br/ape/promocaoaude/excesso>.
5. Organization WH. Double burden of malnutrition [cited 2023]. Available from: <https://apps.who.int/nutrition/double-burden-malnutrition/en/index.html>.
6. ANVISA. Sibutramina e remédios para emagrecer: entenda 2022. Available from: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2018/sibutramina-e-remedios-para-emagrecer-entenda>.
7. ANVISA. Wegovy (semaglutida). 2022.
8. Hansen DL, Toubro S, Stock MJ, Macdonald IA, Astrup A. The effect of sibutramine on energy expenditure and appetite during chronic treatment without dietary restriction. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1999;23(10):1016-24.
9. Rolls BJ, Shide DJ, Thorwart ML, Ulbrecht JS. Sibutramine reduces food intake in non-dieting women with obesity. *Obes Res.* 1998;6(1):1-11.
10. James WP, Caterson ID, Coutinho W, Finer N, Van Gaal LF, Maggioni AP, et al. Effect of sibutramine on cardiovascular outcomes in overweight and obese subjects. *N Engl J Med.* 2010;363(10):905-17.
11. Drent ML, van der Veen EA. Lipase inhibition: a novel concept in the treatment of obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1993;17(4):241-4.
12. Friedrichsen M, Breitschaft A, Tadayon S, Wizert A, Skovgaard D. The effect of semaglutide 2.4 mg once weekly on energy intake, appetite, control of eating, and gastric emptying in adults with obesity. *Diabetes Obes Metab.* 2021;23(3):754-62.
13. Pi-Sunyer X, Astrup A, Fujioka K, Greenway F, Halpern A, Krempf M, et al. A Randomized, Controlled Trial of 3.0 mg of Liraglutide in Weight Management. *N Engl J Med.* 2015;373(1):11-22.
14. Lee MJ, Wu Y, Fried SK. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol Aspects Med.* 2013;34(1):1-11.
15. Ali AT, Hochfeld WE, Myburgh R, Pepper MS. Adipocyte and adipogenesis. *Eur J Cell Biol.* 2013;92(6-7):229-36.
16. Owens B. Cell physiology: The changing colour of fat. *Nature.* 2014;508(7496):S52-3.
17. Roncari DA, Hamilton BS. Cellular and molecular factors in adipose tissue growth and obesity. *Adv Exp Med Biol.* 1993;334:269-77.
18. Kwok KH, Lam KS, Xu A. Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications. *Exp Mol Med.* 2016;48(3):e215.

19. Tchoukalova YD, Votruba SB, Tchkonina T, Giorgadze N, Kirkland JL, Jensen MD. Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(42):18226-31.
20. Himms-Hagen J. Brown adipose tissue thermogenesis, energy balance, and obesity. *Can J Biochem Cell Biol*. 1984;62(7):610-7.
21. Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K, et al. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med*. 2011;17(2):200-5.
22. Lowell BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*. 2000;404(6778):652-60.
23. Cohen P, Spiegelman BM. Cell biology of fat storage. *Mol Biol Cell*. 2016;27(16):2523-7.
24. Golozoubova V, Hohtola E, Matthias A, Jacobsson A, Cannon B, Nedergaard J. Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold. *FASEB J*. 2001;15(11):2048-50.
25. Leitner BP, Huang S, Brychta RJ, Duckworth CJ, Baskin AS, McGehee S, et al. Mapping of human brown adipose tissue in lean and obese young men. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(32):8649-54.
26. Zhang F, Hao G, Shao M, Nham K, An Y, Wang Q, et al. An Adipose Tissue Atlas: An Image-Guided Identification of Human-like BAT and Beige Depots in Rodents. *Cell Metab*. 2018;27(1):252-62 e3.
27. Roberts-Toler C, O'Neill BT, Cypess AM. Diet-induced obesity causes insulin resistance in mouse brown adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)*. 2015;23(9):1765-70.
28. Sakamoto T, Nitta T, Maruno K, Yeh YS, Kuwata H, Tomita K, et al. Macrophage infiltration into obese adipose tissues suppresses the induction of UCP1 level in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2016;310(8):E676-E87.
29. Saltiel AR. New therapeutic approaches for the treatment of obesity. *Sci Transl Med*. 2016;8(323):323rv2.
30. Nedergaard J, Cannon B. The browning of white adipose tissue: some burning issues. *Cell Metab*. 2014;20(3):396-407.
31. Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL, Lee MY, Takahashi H, So K, et al. A novel role for subcutaneous adipose tissue in exercise-induced improvements in glucose homeostasis. *Diabetes*. 2015;64(6):2002-14.
32. Trevellin E, Scorzeto M, Olivieri M, Granzotto M, Valerio A, Tedesco L, et al. Exercise training induces mitochondrial biogenesis and glucose uptake in subcutaneous adipose tissue through eNOS-dependent mechanisms. *Diabetes*. 2014;63(8):2800-11.
33. Stephenson EJ, Lessard SJ, Rivas DA, Watt MJ, Yaspelkis BB, 3rd, Koch LG, et al. Exercise training enhances white adipose tissue metabolism in rats selectively bred for low- or high-endurance running capacity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013;305(3):E429-38.
34. Lehnig AC, Dewal RS, Baer LA, Kitching KM, Munoz VR, Arts PJ, et al. Exercise Training Induces Depot-Specific Adaptations to White and Brown Adipose Tissue. *iScience*. 2019;11:425-39.

35. May FJ, Baer LA, Lehnig AC, So K, Chen EY, Gao F, et al. Lipidomic Adaptations in White and Brown Adipose Tissue in Response to Exercise Demonstrate Molecular Species-Specific Remodeling. *Cell Rep.* 2017;18(6):1558-72.
36. De Matteis R, Lucertini F, Guescini M, Polidori E, Zeppa S, Stocchi V, et al. Exercise as a new physiological stimulus for brown adipose tissue activity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2013;23(6):582-90.
37. de Las Heras N, Klett-Mingo M, Ballesteros S, Martin-Fernandez B, Escribano O, Blanco-Rivero J, et al. Chronic Exercise Improves Mitochondrial Function and Insulin Sensitivity in Brown Adipose Tissue. *Front Physiol.* 2018;9:1122.
38. Wu MV, Bikopoulos G, Hung S, Ceddia RB. Thermogenic capacity is antagonistically regulated in classical brown and white subcutaneous fat depots by high fat diet and endurance training in rats: impact on whole-body energy expenditure. *J Biol Chem.* 2014;289(49):34129-40.
39. Barbosa MA, Guerra-Sa R, De Castro UGM, de Lima WG, Dos Santos RAS, Campagnole-Santos MJ, et al. Physical training improves thermogenesis and insulin pathway, and induces remodeling in white and brown adipose tissues. *J Physiol Biochem.* 2018;74(3):441-54.
40. Raun SH, Henriquez-Olguin C, Karavaeva I, Ali M, Moller LLV, Kot W, et al. Housing temperature influences exercise training adaptations in mice. *Nat Commun.* 2020;11(1):1560.
41. Motiani P, Teuho J, Saari T, Virtanen KA, Honkala SM, Middelbeek RJ, et al. Exercise training alters lipoprotein particles independent of brown adipose tissue metabolic activity. *Obes Sci Pract.* 2019;5(3):258-72.
42. Babaei P, Hoseini R. Exercise training modulates adipokine dysregulations in metabolic syndrome. *Sports Med Health Sci.* 2022;4(1):18-28.
43. Chow LS, Gerszten RE, Taylor JM, Pedersen BK, van Praag H, Trappe S, et al. Exerkines in health, resilience and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 2022;18(5):273-89.
44. Murphy RM, Watt MJ, Febbraio MA. Metabolic communication during exercise. *Nat Metab.* 2020;2(9):805-16.
45. Goldstein MS. Humoral nature of the hypoglycemic factor of muscular work. *Diabetes.* 1961;10:232-4.
46. Steensberg A, van Hall G, Osada T, Sacchetti M, Saltin B, Klarlund Pedersen B. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *J Physiol.* 2000;529 Pt 1:237-42.
47. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev.* 2008;88(4):1379-406.
48. Febbraio MA, Hiscock N, Sacchetti M, Fischer CP, Pedersen BK. Interleukin-6 is a novel factor mediating glucose homeostasis during skeletal muscle contraction. *Diabetes.* 2004;53(7):1643-8.
49. Ellingsgaard H, Hauselmann I, Schuler B, Habib AM, Baggio LL, Meier DT, et al. Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells. *Nat Med.* 2011;17(11):1481-9.

50. Carbo N, Lopez-Soriano J, Costelli P, Alvarez B, Busquets S, Baccino FM, et al. Interleukin-15 mediates reciprocal regulation of adipose and muscle mass: a potential role in body weight control. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1526(1):17-24.
51. Quinn LS, Strait-Bodey L, Anderson BG, Argiles JM, Havel PJ. Interleukin-15 stimulates adiponectin secretion by 3T3-L1 adipocytes: evidence for a skeletal muscle-to-fat signaling pathway. *Cell Biol Int*. 2005;29(6):449-57.
52. Hansen JS, Clemmesen JO, Secher NH, Hoene M, Drescher A, Weigert C, et al. Glucagon-to-insulin ratio is pivotal for splanchnic regulation of FGF-21 in humans. *Mol Metab*. 2015;4(8):551-60.
53. Hansen J, Brandt C, Nielsen AR, Hojman P, Whitham M, Febbraio MA, et al. Exercise induces a marked increase in plasma follistatin: evidence that follistatin is a contraction-induced hepatokine. *Endocrinology*. 2011;152(1):164-71.
54. Schumann C, Nguyen DX, Norgard M, Bortnyak Y, Korzun T, Chan S, et al. Increasing lean muscle mass in mice via nanoparticle-mediated hepatic delivery of follistatin mRNA. *Theranostics*. 2018;8(19):5276-88.
55. Becic T, Studenik C, Hoffmann G. Exercise Increases Adiponectin and Reduces Leptin Levels in Prediabetic and Diabetic Individuals: Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Med Sci (Basel)*. 2018;6(4).
56. Yu N, Ruan Y, Gao X, Sun J. Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized, Controlled Trials on the Effect of Exercise on Serum Leptin and Adiponectin in Overweight and Obese Individuals. *Horm Metab Res*. 2017;49(3):164-73.
57. Yamauchi T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kadowaki T. Adiponectin receptors: a review of their structure, function and how they work. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2014;28(1):15-23.
58. Lynes MD, Leiria LO, Lundh M, Bartelt A, Shamsi F, Huang TL, et al. The cold-induced lipokine 12,13-diHOME promotes fatty acid transport into brown adipose tissue. *Nat Med*. 2017;23(5):631-7.
59. Stanford KI, Lynes MD, Takahashi H, Baer LA, Arts PJ, May FJ, et al. 12,13-diHOME: An Exercise-Induced Lipokine that Increases Skeletal Muscle Fatty Acid Uptake. *Cell Metab*. 2018;27(5):1111-20 e3.
60. Fruhbeis C, Helmig S, Tug S, Simon P, Kramer-Albers EM. Physical exercise induces rapid release of small extracellular vesicles into the circulation. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:28239.
61. Siqueira IR, Palazzo RP, Cechinel LR. Circulating extracellular vesicles delivering beneficial cargo as key players in exercise effects. *Free Radic Biol Med*. 2021;172:273-85.
62. Vechetti IJ, Jr., Valentino T, Mobley CB, McCarthy JJ. The role of extracellular vesicles in skeletal muscle and systematic adaptation to exercise. *J Physiol*. 2021;599(3):845-61.
63. Whitham M, Parker BL, Friedrichsen M, Hingst JR, Hjorth M, Hughes WE, et al. Extracellular Vesicles Provide a Means for Tissue Crosstalk during Exercise. *Cell Metab*. 2018;27(1):237-51 e4.
64. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*. 1967;13(3):269-88.

65. Anderson HC. Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J Cell Biol.* 1969;41(1):59-72.
66. Harding C, Stahl P. Transferrin recycling in reticulocytes: pH and iron are important determinants of ligand binding and processing. *Biochem Biophys Res Commun.* 1983;113(2):650-8.
67. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell.* 1983;33(3):967-78.
68. Kalra H, Drummen GP, Mathivanan S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *Int J Mol Sci.* 2016;17(2):170.
69. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics.* 2010;73(10):1907-20.
70. Deatherage BL, Cookson BT. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect Immun.* 2012;80(6):1948-57.
71. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia.* 2006;20(5):847-56.
72. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654-9.
73. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.* 2008;10(12):1470-6.
74. Thery C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles.* 2018;7(1):1535750.
75. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(8):E968-77.
76. Guay C, Regazzi R. Exosomes as new players in metabolic organ cross-talk. *Diabetes Obes Metab.* 2017;19 Suppl 1:137-46.
77. de Gassart A, Geminard C, Hoekstra D, Vidal M. Exosome secretion: the art of reutilizing nonrecycled proteins? *Traffic.* 2004;5(11):896-903.
78. Colombo M, Moita C, van Niel G, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 24):5553-65.
79. Babst M, Katzmann DJ, Estepa-Sabal EJ, Meerloo T, Emr SD. Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell.* 2002;3(2):271-82.
80. Babst M, Katzmann DJ, Snyder WB, Wendland B, Emr SD. Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell.* 2002;3(2):283-9.

81. Babst M, Wendland B, Estepa EJ, Emr SD. The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J.* 1998;17(11):2982-93.
82. Katzmann DJ, Stefan CJ, Babst M, Emr SD. Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol.* 2003;162(3):413-23.
83. Thery C, Boussac M, Veron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, et al. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol.* 2001;166(12):7309-18.
84. Stuffers S, Brech A, Stenmark H. ESCRT proteins in physiology and disease. *Exp Cell Res.* 2009;315(9):1619-26.
85. Anderson HC, Garimella R, Tague SE. The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Front Biosci.* 2005;10:822-37.
86. Bianchi E, Doe B, Goulding D, Wright GJ. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature.* 2014;508(7497):483-7.
87. Booth AM, Fang Y, Fallon JK, Yang JM, Hildreth JE, Gould SJ. Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J Cell Biol.* 2006;172(6):923-35.
88. Fang Y, Wu N, Gan X, Yan W, Morrell JC, Gould SJ. Higher-order oligomerization targets plasma membrane proteins and HIV gag to exosomes. *PLoS Biol.* 2007;5(6):e158.
89. Nager AR, Goldstein JS, Herranz-Perez V, Portran D, Ye F, Garcia-Verdugo JM, et al. An Actin Network Dispatches Ciliary GPCRs into Extracellular Vesicles to Modulate Signaling. *Cell.* 2017;168(1-2):252-63 e14.
90. Cantaluppi V, Gatti S, Medica D, Figliolini F, Bruno S, Deregibus MC, et al. Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia-reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells. *Kidney Int.* 2012;82(4):412-27.
91. Svensson KJ, Christianson HC, Wittrup A, Bourseau-Guilmain E, Lindqvist E, Svensson LM, et al. Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid Raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *J Biol Chem.* 2013;288(24):17713-24.
92. Tian T, Zhu YL, Zhou YY, Liang GF, Wang YY, Hu FH, et al. Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *J Biol Chem.* 2014;289(32):22258-67.
93. Rigamonti AE, Bollati V, Pergoli L, Iodice S, De Col A, Tamini S, et al. Effects of an acute bout of exercise on circulating extracellular vesicles: tissue-, sex-, and BMI-related differences. *Int J Obes (Lond).* 2020;44(5):1108-18.
94. Garner RT, Weiss JA, Nie Y, Sullivan BP, Kargl CK, Drohan CJ, et al. Effects of obesity and acute resistance exercise on skeletal muscle angiogenic communication pathways. *Exp Physiol.* 2022;107(8):906-18.
95. Apostolopoulou M, Mastrototaro L, Hartwig S, Pesta D, Strassburger K, de Filippo E, et al. Metabolic responsiveness to training depends on insulin sensitivity and protein content of exosomes in insulin-resistant males. *Sci Adv.* 2021;7(41):eabi9551.

96. Warnier G, De Groote E, Britto FA, Delcorte O, Nederveen JP, Nilsson MI, et al. Effects of an acute exercise bout in hypoxia on extracellular vesicle release in healthy and prediabetic subjects. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2022;322(2):R112-R22.
97. Mohammad S, Hutchinson KA, da Silva DF, Bhattacharjee J, McInnis K, Burger D, et al. Circulating small extracellular vesicles increase after an acute bout of moderate-intensity exercise in pregnant compared to non-pregnant women. *Sci Rep*. 2021;11(1):12615.
98. Liu H, Wu B, Shi X, Cao Y, Zhao X, Liang D, et al. Aerobic exercise-induced circulating extracellular vesicle combined decellularized dermal matrix hydrogel facilitates diabetic wound healing by promoting angiogenesis. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:903779.
99. Vanhie JJ, Kim W, Ek Orloff L, Ngu M, Collao N, De Lisio M. The role of exercise- and high fat diet-induced bone marrow extracellular vesicles in stress hematopoiesis. *Front Physiol*. 2022;13:1054463.
100. Mullen M, Williams K, LaRocca T, Duke V, Hambright WS, Ravuri SK, et al. Mechanical strain drives exosome production, function, and miRNA cargo in C2C12 muscle progenitor cells. *J Orthop Res*. 2022.
101. Chong MC, Silva A, James PF, Wu SSX, Howitt J. Exercise increases the release of NAMPT in extracellular vesicles and alters NAD(+) activity in recipient cells. *Aging Cell*. 2022;21(7):e13647.
102. Thomou T, Mori MA, Dreyfuss JM, Konishi M, Sakaguchi M, Wolfrum C, et al. Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature*. 2017;542(7642):450-5.
103. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004;431(7006):350-5.
104. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97.
105. Singh SK, Pal Bhadra M, Girschick HJ, Bhadra U. MicroRNAs--micro in size but macro in function. *FEBS J*. 2008;275(20):4929-44.
106. Sassen S, Miska EA, Caldas C. MicroRNA: implications for cancer. *Virchows Arch*. 2008;452(1):1-10.
107. Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell*. 2004;16(6):861-5.
108. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004;23(20):4051-60.
109. Sun BK, Tsao H. Small RNAs in development and disease. *J Am Acad Dermatol*. 2008;59(5):725-37; quiz 38-40.
110. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415-9.
111. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004;303(5654):95-8.
112. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell*. 2018;173(1):20-51.
113. Zhang W, Dahlberg JE, Tam W. MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. *Am J Pathol*. 2007;171(3):728-38.

114. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120(1):15-20.
115. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*. 2008;9(2):102-14.
116. Peter ME. Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: the next step. *Oncogene*. 2010;29(15):2161-4.
117. Selbach M, Schwanhaussner B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*. 2008;455(7209):58-63.
118. Wu S, Huang S, Ding J, Zhao Y, Liang L, Liu T, et al. Multiple microRNAs modulate p21Cip1/Waf1 expression by directly targeting its 3' untranslated region. *Oncogene*. 2010;29(15):2302-8.
119. Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*. 2005;37(5):495-500.
120. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003;115(7):787-98.
121. Saetrom P, Heale BS, Snove O, Jr., Aagaard L, Alluin J, Rossi JJ. Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(7):2333-42.
122. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*. 2010;101(10):2087-92.
123. Chim SS, Shing TK, Hung EC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem*. 2008;54(3):482-90.
124. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2008;141(5):672-5.
125. Silveira A, Gomes J, Roque F, Fernandes T, de Oliveira EM. MicroRNAs in Obesity-Associated Disorders: The Role of Exercise Training. *Obes Facts*. 2022;15(2):105-17.
126. Brandao BB, Lino M, Kahn CR. Extracellular miRNAs as mediators of obesity-associated disease. *J Physiol*. 2022;600(5):1155-69.
127. Oliosio D, Dauriz M, Bacchi E, Negri C, Santi L, Bonora E, et al. Effects of Aerobic and Resistance Training on Circulating Micro-RNA Expression Profile in Subjects With Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(4):1119-30.
128. Parrizas M, Brugnara L, Esteban Y, Gonzalez-Franquesa A, Canivell S, Murillo S, et al. Circulating miR-192 and miR-193b are markers of prediabetes and are modulated by an exercise intervention. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(3):E407-15.
129. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008;18(10):997-1006.
130. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(30):10513-8.

131. Turchinovich A, Samatov TR, Tonevitsky AG, Burwinkel B. Circulating miRNAs: cell-cell communication function? *Front Genet.* 2013;4:119.
132. Groot M, Lee H. Sorting Mechanisms for MicroRNAs into Extracellular Vesicles and Their Associated Diseases. *Cells.* 2020;9(4).
133. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol.* 2011;13(4):423-33.
134. Scicali R, Di Pino A, Pavanello C, Ossoli A, Strazzella A, Alberti A, et al. Analysis of HDL-microRNA panel in heterozygous familial hypercholesterolemia subjects with LDL receptor null or defective mutation. *Sci Rep.* 2019;9(1):20354.
135. Nik Mohamed Kamal N, Shahidan WNS. Non-Exosomal and Exosomal Circulatory MicroRNAs: Which Are More Valid as Biomarkers? *Front Pharmacol.* 2019;10:1500.
136. Ying W, Riopel M, Bandyopadhyay G, Dong Y, Birmingham A, Seo JB, et al. Adipose Tissue Macrophage-Derived Exosomal miRNAs Can Modulate In Vivo and In Vitro Insulin Sensitivity. *Cell.* 2017;171(2):372-84 e12.
137. Oliveira GP, Jr., Porto WF, Palu CC, Pereira LM, Petriz B, Almeida JA, et al. Effects of Acute Aerobic Exercise on Rats Serum Extracellular Vesicles Diameter, Concentration and Small RNAs Content. *Front Physiol.* 2018;9:532.
138. D'Souza RF, Woodhead JST, Zeng N, Blenkiron C, Merry TL, Cameron-Smith D, et al. Circulatory exosomal miRNA following intense exercise is unrelated to muscle and plasma miRNA abundances. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2018;315(4):E723-E33.
139. Nair VD, Ge Y, Li S, Pincas H, Jain N, Seenarine N, et al. Sedentary and Trained Older Men Have Distinct Circulating Exosomal microRNA Profiles at Baseline and in Response to Acute Exercise. *Front Physiol.* 2020;11:605.
140. Sullivan BP, Nie Y, Evans S, Kargl CK, Hettinger ZR, Garner RT, et al. Obesity and exercise training alter inflammatory pathway skeletal muscle small extracellular vesicle microRNAs. *Exp Physiol.* 2022;107(5):462-75.
141. Karvinen S, Sievanen T, Karppinen JE, Hautasaari P, Bart G, Samoylenko A, et al. MicroRNAs in Extracellular Vesicles in Sweat Change in Response to Endurance Exercise. *Front Physiol.* 2020;11:676.
142. Park S, Moon HY. Urinary extracellular vesicle as a potential biomarker of exercise-induced fatigue in young adult males. *Eur J Appl Physiol.* 2022;122(10):2175-88.
143. Garai K, Adam Z, Herczeg R, Banfai K, Gyebrovski A, Gyenesei A, et al. Physical Activity as a Preventive Lifestyle Intervention Acts Through Specific Exosomal miRNA Species-Evidence From Human Short- and Long-Term Pilot Studies. *Front Physiol.* 2021;12:658218.
144. Liang X, Fa W, Wang N, Peng Y, Liu C, Zhu M, et al. Exosomal miR-532-5p induced by long-term exercise rescues blood-brain barrier function in 5XFAD mice via downregulation of EPHA4. *Aging Cell.* 2023;22(1):e13748.
145. Zhao H, Chen X, Hu G, Li C, Guo L, Zhang L, et al. Small Extracellular Vesicles From Brown Adipose Tissue Mediate Exercise Cardioprotection. *Circ Res.* 2022;130(10):1490-506.

146. Castano C, Mirasierra M, Vallejo M, Novials A, Parrizas M. Delivery of muscle-derived exosomal miRNAs induced by HIIT improves insulin sensitivity through down-regulation of hepatic FoxO1 in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(48):30335-43.
147. Hou Z, Qin X, Hu Y, Zhang X, Li G, Wu J, et al. Longterm Exercise-Derived Exosomal miR-342-5p. *Circ Res*. 2019;124(9):1386-400.
148. Aiken CE, Tarry-Adkins JL, Penfold NC, Dearden L, Ozanne SE. Decreased ovarian reserve, dysregulation of mitochondrial biogenesis, and increased lipid peroxidation in female mouse offspring exposed to an obesogenic maternal diet. *FASEB J*. 2016;30(4):1548-56.
149. Masi LN, Martins AR, Crisma AR, do Amaral CL, Davanso MR, Serdan TDA, et al. Combination of a high-fat diet with sweetened condensed milk exacerbates inflammation and insulin resistance induced by each separately in mice. *Sci Rep*. 2017;7(1):3937.
150. Deng ZB, Poliakov A, Hardy RW, Clements R, Liu C, Liu Y, et al. Adipose tissue exosome-like vesicles mediate activation of macrophage-induced insulin resistance. *Diabetes*. 2009;58(11):2498-505.
151. Zhao H, Shang Q, Pan Z, Bai Y, Li Z, Zhang H, et al. Exosomes From Adipose-Derived Stem Cells Attenuate Adipose Inflammation and Obesity Through Polarizing M2 Macrophages and Being in White Adipose Tissue. *Diabetes*. 2018;67(2):235-47.
152. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
153. Hoydal MA, Wisloff U, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2007;14(6):753-60.
154. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18(6):499-502.
155. Masi LN, Martins AR, Rosa Neto JC, do Amaral CL, Crisma AR, Vinolo MA, et al. Sunflower oil supplementation has proinflammatory effects and does not reverse insulin resistance in obesity induced by high-fat diet in C57BL/6 mice. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:945131.
156. de Mendonca M, Dos Santos BAC, de Sousa E, Rodrigues AC. Adiponectin is required for pioglitazone-induced improvements in hepatic steatosis in mice fed a high-fat diet. *Mol Cell Endocrinol*. 2019;493:110480.
157. Zhang L, Bai M, Tang H, Zhou F, Zhu Q, Wang S, et al. Role of hepatic neuregulin 4 in the regulation of gluconeogenesis in mice. *Life Sci*. 2019;217:185-92.
158. Consortium E-T, Van Deun J, Mestdagh P, Agostinis P, Akay O, Anand S, et al. EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. *Nat Methods*. 2017;14(3):228-32.
159. Parlee SD, Lentz SI, Mori H, MacDougald OA. Quantifying size and number of adipocytes in adipose tissue. *Methods Enzymol*. 2014;537:93-122.
160. Liang W, Menke AL, Driessen A, Koek GH, Lindeman JH, Stoop R, et al. Establishment of a general NAFLD scoring system for rodent models and comparison to human liver pathology. *PLoS One*. 2014;9(12):e115922.

161. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol*. 2001;23(4):291-9.
162. Newsholme EA, Williams T. The role of phosphoenolpyruvate carboxykinase in amino acid metabolism in muscle. *Biochem J*. 1978;176(2):623-6.
163. Corrigan AP, Rider CC. Multiple chromatographic forms of ATP citrate lyase from rat liver. *Biochem J*. 1983;214(2):299-307.
164. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
165. Tang YT, Huang YY, Zheng L, Qin SH, Xu XP, An TX, et al. Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum. *Int J Mol Med*. 2017;40(3):834-44.
166. Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJ, Hole P, et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine*. 2011;7(6):780-8.
167. van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, Otto C, van Leeuwen TG, Nieuwland R. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost*. 2010;8(12):2596-607.
168. Castano C, Kalko S, Novials A, Parrizas M. Obesity-associated exosomal miRNAs modulate glucose and lipid metabolism in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(48):12158-63.
169. Diniz GP, Huang ZP, Liu J, Chen J, Ding J, Fonseca RI, et al. Loss of microRNA-22 prevents high-fat diet induced dyslipidemia and increases energy expenditure without affecting cardiac hypertrophy. *Clin Sci (Lond)*. 2017;131(24):2885-900.
170. Keipert S, Jastroch M. Brite/beige fat and UCP1 - is it thermogenesis? *Biochim Biophys Acta*. 2014;1837(7):1075-82.
171. Lee J, Ellis JM, Wolfgang MJ. Adipose fatty acid oxidation is required for thermogenesis and potentiates oxidative stress-induced inflammation. *Cell Rep*. 2015;10(2):266-79.
172. DIANA TOOLS. Available from: https://dianalab.e-ce.uth.gr/html/dianauniverse/index.php?r=microT_CDS.
173. Namwanje M, Liu L, Chan M, Aaron N, Kraakman MJ, Qiang L. The depot-specific and essential roles of CBP/p300 in regulating adipose plasticity. *J Endocrinol*. 2019;240(2):257-69.
174. Bradley RL, Jeon JY, Liu FF, Maratos-Flier E. Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;295(3):E586-94.
175. Kleindienst A, Battault S, Belaidi E, Tanguy S, Rosselin M, Boulghobra D, et al. Exercise does not activate the beta3 adrenergic receptor-eNOS pathway, but reduces inducible NOS expression to protect the heart of obese diabetic mice. *Basic Res Cardiol*. 2016;111(4):40.
176. Touati S, Meziri F, Devaux S, Berthelot A, Touyz RM, Laurant P. Exercise reverses metabolic syndrome in high-fat diet-induced obese rats. *Med Sci Sports Exerc*. 2011;43(3):398-407.

177. Yang ZH, Miyahara H, Takeo J, Katayama M. Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid response of genes involved in lipogenesis, insulin signalling and inflammation in mice. *Diabetol Metab Syndr*. 2012;4(1):32.
178. Fjaere E, Myrmel LS, Lutzhoft DO, Andersen H, Holm JB, Kiilerich P, et al. Effects of exercise and dietary protein sources on adiposity and insulin sensitivity in obese mice. *J Nutr Biochem*. 2019;66:98-109.
179. Frias Fde T, de Mendonca M, Martins AR, Gindro AF, Cogliati B, Curi R, et al. MyomiRs as Markers of Insulin Resistance and Decreased Myogenesis in Skeletal Muscle of Diet-Induced Obese Mice. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7:76.
180. Abdelmalek MF, Suzuki A, Guy C, Unalp-Arida A, Colvin R, Johnson RJ, et al. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010;51(6):1961-71.
181. Ouyang X, Cirillo P, Sautin Y, McCall S, Bruchette JL, Diehl AM, et al. Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2008;48(6):993-9.
182. Perfield JW, 2nd, Ortinau LC, Pickering RT, Ruebel ML, Meers GM, Rector RS. Altered hepatic lipid metabolism contributes to nonalcoholic fatty liver disease in leptin-deficient Ob/Ob mice. *J Obes*. 2013;2013:296537.
183. Reynolds THt, Banerjee S, Sharma VM, Donohue J, Couldwell S, Sosinsky A, et al. Effects of a High Fat Diet and Voluntary Wheel Running Exercise on Cidea and Cidec Expression in Liver and Adipose Tissue of Mice. *PLoS One*. 2015;10(7):e0130259.
184. Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, Cutson JJ, Johnson L, Dietz KR, et al. Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem*. 2003;278(36):34268-76.
185. Park EJ, Lee JH, Yu GY, He G, Ali SR, Holzer RG, et al. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell*. 2010;140(2):197-208.
186. Foster DO, Frydman ML. Tissue distribution of cold-induced thermogenesis in conscious warm- or cold-acclimated rats reevaluated from changes in tissue blood flow: the dominant role of brown adipose tissue in the replacement of shivering by nonshivering thermogenesis. *Can J Physiol Pharmacol*. 1979;57(3):257-70.
187. Eriksson-Hogling D, Andersson DP, Backdahl J, Hoffstedt J, Rossner S, Thorell A, et al. Adipose tissue morphology predicts improved insulin sensitivity following moderate or pronounced weight loss. *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(6):893-8.
188. Kim JI, Huh JY, Sohn JH, Choe SS, Lee YS, Lim CY, et al. Lipid-overloaded enlarged adipocytes provoke insulin resistance independent of inflammation. *Mol Cell Biol*. 2015;35(10):1686-99.
189. Laing BT, Do K, Matsubara T, Wert DW, Avery MJ, Langdon EM, et al. Voluntary exercise improves hypothalamic and metabolic function in obese mice. *J Endocrinol*. 2016;229(2):109-22.
190. Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2000;16:145-71.

191. Brennan K, Martin K, FitzGerald SP, O'Sullivan J, Wu Y, Blanco A, et al. A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. *Sci Rep.* 2020;10(1):1039.
192. Carnino JM, Lee H, Jin Y. Isolation and characterization of extracellular vesicles from Broncho-alveolar lavage fluid: a review and comparison of different methods. *Respir Res.* 2019;20(1):240.
193. Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov AV, Laktionov PP. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *Biomed Res Int.* 2018;2018:8545347.
194. Andreu Z, Rivas E, Sanguino-Pascual A, Lamana A, Marazuela M, Gonzalez-Alvaro I, et al. Comparative analysis of EV isolation procedures for miRNAs detection in serum samples. *J Extracell Vesicles.* 2016;5:31655.
195. Helwa I, Cai J, Drewry MD, Zimmerman A, Dinkins MB, Khaled ML, et al. A Comparative Study of Serum Exosome Isolation Using Differential Ultracentrifugation and Three Commercial Reagents. *PLoS One.* 2017;12(1):e0170628.
196. Serrano-Pertierra E, Oliveira-Rodriguez M, Rivas M, Oliva P, Villafani J, Navarro A, et al. Characterization of Plasma-Derived Extracellular Vesicles Isolated by Different Methods: A Comparison Study. *Bioengineering (Basel).* 2019;6(1).
197. Veerman RE, Teeuwen L, Czarnewski P, Gucluler Akpınar G, Sandberg A, Cao X, et al. Molecular evaluation of five different isolation methods for extracellular vesicles reveals different clinical applicability and subcellular origin. *J Extracell Vesicles.* 2021;10(9):e12128.
198. Gemoll T, Rozanova S, Roder C, Hartwig S, Kalthoff H, Lehr S, et al. Protein Profiling of Serum Extracellular Vesicles Reveals Qualitative and Quantitative Differences After Differential Ultracentrifugation and ExoQuick(TM) Isolation. *J Clin Med.* 2020;9(5).
199. Wu SC, Kuo PJ, Rau CS, Wu YC, Wu CJ, Lu TH, et al. Subpopulations of exosomes purified via different exosomal markers carry different microRNA contents. *Int J Med Sci.* 2021;18(4):1058-66.
200. Huang-Doran I, Zhang CY, Vidal-Puig A. Extracellular Vesicles: Novel Mediators of Cell Communication In Metabolic Disease. *Trends Endocrinol Metab.* 2017;28(1):3-18.
201. Freeman DW, Noren Hooten N, Eitan E, Green J, Mode NA, Bodogai M, et al. Altered Extracellular Vesicle Concentration, Cargo, and Function in Diabetes. *Diabetes.* 2018;67(11):2377-88.
202. Maggio S, Canonico B, Ceccaroli P, Polidori E, Cioccoloni A, Giacomelli L, et al. Modulation of the Circulating Extracellular Vesicles in Response to Different Exercise Regimens and Study of Their Inflammatory Effects. *Int J Mol Sci.* 2023;24(3).
203. Xhuti D, Nilsson MI, Manta K, Tarnopolsky MA, Nederveen JP. Circulating exosome-like vesicle and skeletal muscle microRNAs are altered with age and resistance training. *J Physiol.* 2023.
204. Thakral S, Ghoshal K. miR-122 is a unique molecule with great potential in diagnosis, prognosis of liver disease, and therapy both as miRNA mimic and antimir. *Curr Gene Ther.* 2015;15(2):142-50.
205. Jaeger A, Zollinger L, Saely CH, Muendlein A, Evangelakos I, Nasias D, et al. Circulating microRNAs -192 and -194 are associated with the presence and incidence of diabetes mellitus. *Sci Rep.* 2018;8(1):14274.

206. Wang Y, Liang H, Jin F, Yan X, Xu G, Hu H, et al. Injured liver-released miRNA-122 elicits acute pulmonary inflammation via activating alveolar macrophage TLR7 signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(13):6162-71.
207. Shah R, Murthy V, Pacold M, Danielson K, Tanriverdi K, Larson MG, et al. Extracellular RNAs Are Associated With Insulin Resistance and Metabolic Phenotypes. *Diabetes Care*. 2017;40(4):546-53.
208. Pirola CJ, Fernandez Gianotti T, Castano GO, Mallardi P, San Martino J, Mora Gonzalez Lopez Ledesma M, et al. Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut*. 2015;64(5):800-12.
209. Huang S, Wang S, Bian C, Yang Z, Zhou H, Zeng Y, et al. Upregulation of miR-22 promotes osteogenic differentiation and inhibits adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by repressing HDAC6 protein expression. *Stem Cells Dev*. 2012;21(13):2531-40.
210. Kaur K, Vig S, Srivastava R, Mishra A, Singh VP, Srivastava AK, et al. Elevated Hepatic miR-22-3p Expression Impairs Gluconeogenesis by Silencing the Wnt-Responsive Transcription Factor Tcf7. *Diabetes*. 2015;64(11):3659-69.
211. Watanabe S, Sudo Y, Makino T, Kimura S, Tomita K, Noguchi M, et al. Skeletal muscle releases extracellular vesicles with distinct protein and microRNA signatures that function in the muscle microenvironment. *PNAS Nexus*. 2022;1(4):pgac173.
212. Brahmer A, Neuberger E, Esch-Heisser L, Haller N, Jorgensen MM, Baek R, et al. Platelets, endothelial cells and leukocytes contribute to the exercise-triggered release of extracellular vesicles into the circulation. *J Extracell Vesicles*. 2019;8(1):1615820.
213. Mateescu B, Kowal EJ, van Balkom BW, Bartel S, Bhattacharyya SN, Buzas EI, et al. Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA - an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles*. 2017;6(1):1286095.
214. Garcia-Martin R, Wang G, Brandao BB, Zanutto TM, Shah S, Kumar Patel S, et al. MicroRNA sequence codes for small extracellular vesicle release and cellular retention. *Nature*. 2022;601(7893):446-51.
215. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*. 2005;309(5740):1577-81.
216. Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics*. 2007;8:166.
217. Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(11):4402-7.
218. Castano C, Meza-Ramos A, Batlle M, Guasch E, Novials A, Parrizas M. Treatment with EV-miRNAs Alleviates Obesity-Associated Metabolic Dysfunction in Mice. *Int J Mol Sci*. 2022;23(23).
219. Gollisch KS, Brandauer J, Jessen N, Toyoda T, Nayer A, Hirshman MF, et al. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297(2):E495-504.
220. de Mendonca M, Rocha KC, de Sousa E, Pereira BMV, Oyama LM, Rodrigues AC. Aerobic exercise training regulates serum extracellular vesicle miRNAs linked to obesity to

promote their beneficial effects in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2020;319(3):E579-E91.

221. Higgins JA, Jackman MR, Brown IL, Johnson GC, Steig A, Wyatt HR, et al. Resistant starch and exercise independently attenuate weight regain on a high fat diet in a rat model of obesity. *Nutr Metab (Lond).* 2011;8:49.

222. Sabag A, Way KL, Keating SE, Sultana RN, O'Connor HT, Baker MK, et al. Exercise and ectopic fat in type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Metab.* 2017;43(3):195-210.

223. Wedell-Neergaard AS, Lang Lehrskov L, Christensen RH, Legaard GE, Dorph E, Larsen MK, et al. Exercise-Induced Changes in Visceral Adipose Tissue Mass Are Regulated by IL-6 Signaling: A Randomized Controlled Trial. *Cell Metab.* 2019;29(4):844-55 e3.

224. Choi MS, Kim YJ, Kwon EY, Ryoo JY, Kim SR, Jung UJ. High-fat diet decreases energy expenditure and expression of genes controlling lipid metabolism, mitochondrial function and skeletal system development in the adipose tissue, along with increased expression of extracellular matrix remodelling- and inflammation-related genes. *Br J Nutr.* 2015;113(6):867-77.

225. Reilly SM, Chiang SH, Decker SJ, Chang L, Uhm M, Larsen MJ, et al. An inhibitor of the protein kinases TBK1 and IKK-varepsilon improves obesity-related metabolic dysfunctions in mice. *Nat Med.* 2013;19(3):313-21.

226. Komai AM, Musovic S, Peris E, Alrifaiy A, El Hachmane MF, Johansson M, et al. White Adipocyte Adiponectin Exocytosis Is Stimulated via beta3-Adrenergic Signaling and Activation of Epac1: Catecholamine Resistance in Obesity and Type 2 Diabetes. *Diabetes.* 2016;65(11):3301-13.

227. Valentine JM, Ahmadian M, Keinan O, Abu-Odeh M, Zhao P, Zhou X, et al. beta3-Adrenergic receptor downregulation leads to adipocyte catecholamine resistance in obesity. *J Clin Invest.* 2022;132(2).

228. Himms-Hagen J, Melnyk A, Zingaretti MC, Ceresi E, Barbatelli G, Cinti S. Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;279(3):C670-81.

229. Danysz W, Han Y, Li F, Nicoll J, Buch P, Hengl T, et al. Browning of white adipose tissue induced by the ss3 agonist CL-316,243 after local and systemic treatment - PK-PD relationship. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018;1864(9 Pt B):2972-82.

230. Zheng Z, Liu X, Zhao Q, Zhang L, Li C, Xue Y. Regulation of UCP1 in the Browning of Epididymal Adipose Tissue by beta3-Adrenergic Agonist: A Role for MicroRNAs. *Int J Endocrinol.* 2014;2014:530636.

231. Himms-Hagen J, Cui J, Danforth E, Jr., Taatjes DJ, Lang SS, Waters BL, et al. Effect of CL-316,243, a thermogenic beta 3-agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats. *Am J Physiol.* 1994;266(4 Pt 2):R1371-82.

232. Vechetti IJ, Jr., Peck BD, Wen Y, Walton RG, Valentino TR, Alimov AP, et al. Mechanical overload-induced muscle-derived extracellular vesicles promote adipose tissue lipolysis. *FASEB J.* 2021;35(6):e21644.

233. TOOLS D. microT-CDS. Available from: https://dianalab.e-ce.uth.gr/html/dianauniverse/index.php?r=microT_CDS.

234. TargetScan 8.0. Available from: https://www.targetscan.org/vert_80/.

235. Liu C, Wang J, Wei Y, Zhang W, Geng M, Yuan Y, et al. Fat-Specific Knockout of *Mecp2* Upregulates *Slpi* to Reduce Obesity by Enhancing Browning. *Diabetes*. 2020;69(1):35-47.
236. Bai Z, Chai XR, Yoon MJ, Kim HJ, Lo KA, Zhang ZC, et al. Dynamic transcriptome changes during adipose tissue energy expenditure reveal critical roles for long noncoding RNA regulators. *PLoS Biol*. 2017;15(8):e2002176.
237. Hu L, He F, Huang M, Peng M, Zhou Z, Liu F, et al. NFATc3 deficiency reduces the classical activation of adipose tissue macrophages. *J Mol Endocrinol*. 2018;61(3):79-89.
238. Picard F, Gehin M, Annicotte J, Rocchi S, Champy MF, O'Malley BW, et al. SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell*. 2002;111(7):931-41.
239. Fairbridge NA, Southall TM, Ayre DC, Komatsu Y, Raquet PI, Brown RJ, et al. Loss of CD24 in Mice Leads to Metabolic Dysfunctions and a Reduction in White Adipocyte Tissue. *PLoS One*. 2015;10(11):e0141966.
240. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest*. 2006;116(1):115-24.
241. Cheung SY, Sayeed M, Nakuluri K, Li L, Feldman BJ. MYH9 facilitates autoregulation of adipose tissue depot development. *JCI Insight*. 2021;6(9).
242. Memetimin H, Zhu B, Lee S, Katz WS, Kern PA, Finlin BS. Improved beta-cell function leads to improved glucose tolerance in a transgenic mouse expressing lipoprotein lipase in adipocytes. *Sci Rep*. 2022;12(1):22291.
243. Wang Z, Gao X, Li Q, Zhu H, Zhao X, Garcia-Barrio M, et al. Inhibition of a Novel CLK1-THRAP3-PPARgamma Axis Improves Insulin Sensitivity. *Front Physiol*. 2021;12:699578.
244. Mikkonen L, Hirvonen J, Janne OA. SUMO-1 regulates body weight and adipogenesis via PPARgamma in male and female mice. *Endocrinology*. 2013;154(2):698-708.
245. Lu Z, Hou J, Li X, Zhou J, Luo B, Liang S, et al. Exosome-Derived miRNAs as Potential Biomarkers for Prostate Bone Metastasis. *Int J Gen Med*. 2022;15:5369-83.
246. Lawson A, Snyder W, Peeples ES. Intranasal Administration of Extracellular Vesicles Mitigates Apoptosis in a Mouse Model of Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Neonatology*. 2022;119(3):345-53.
247. Yang Z, Wang W, Zhao L, Wang X, Gimple RC, Xu L, et al. Plasma cells shape the mesenchymal identity of ovarian cancers through transfer of exosome-derived microRNAs. *Sci Adv*. 2021;7(9).
248. Liu H, Fang Y, Hou B, Lin Q, Zhang W, Wang X, et al. CircPACRGL promoted cell proliferation, migration and invasion as well as inhibited cell apoptosis in colorectal cancer via regulation of the miR-330-3p/CNBP axis. *Mol Cell Biochem*. 2022.
249. Jafarzadeh A, Paknahad MH, Nemati M, Jafarzadeh S, Mahjoubin-Tehran M, Rajabi A, et al. Dysregulated expression and functions of microRNA-330 in cancers: A potential therapeutic target. *Biomed Pharmacother*. 2022;146:112600.
250. Pfeiffer S, Sanchez-Lechuga B, Donovan P, Halang L, Prehn JHM, Campos-Caro A, et al. Circulating miR-330-3p in Late Pregnancy is Associated with Pregnancy Outcomes Among Lean Women with GDM. *Sci Rep*. 2020;10(1):908.

251. Nielsen S, Akerstrom T, Rinnov A, Yfanti C, Scheele C, Pedersen BK, et al. The miRNA plasma signature in response to acute aerobic exercise and endurance training. *PLoS One*. 2014;9(2):e87308.
252. McCarthy JJ. The MyomiR network in skeletal muscle plasticity. *Exerc Sport Sci Rev*. 2011;39(3):150-4.
253. Nielsen S, Scheele C, Yfanti C, Akerstrom T, Nielsen AR, Pedersen BK, et al. Muscle specific microRNAs are regulated by endurance exercise in human skeletal muscle. *J Physiol*. 2010;588(Pt 20):4029-37.
254. Chalchat E, Charlot K, Garcia-Vicencio S, Hertert P, Bauge S, Bourdon S, et al. Circulating microRNAs after a 24-h ultramarathon run in relation to muscle damage markers in elite athletes. *Scand J Med Sci Sports*. 2021;31(9):1782-95.
255. Baggish AL, Hale A, Weiner RB, Lewis GD, Systrom D, Wang F, et al. Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. *J Physiol*. 2011;589(Pt 16):3983-94.
256. Meza CA, Amador M, McAinch AJ, Begum K, Roy S, Bajpeyi S. Eight weeks of combined exercise training do not alter circulating microRNAs-29a, -133a, -133b, and -155 in young, healthy men. *Eur J Appl Physiol*. 2022;122(4):921-33.
257. Schmitt A, Herzog P, Rochner F, Brandle AL, Fragasso A, Munz B. Skeletal muscle effects of two different 10-week exercise regimens, voluntary wheel running, and forced treadmill running, in mice: A pilot study. *Physiol Rep*. 2020;8(20):e14609.
258. Silver JL, Alexander SE, Dillon HT, Lamon S, Wadley GD. Extracellular vesicular miRNA expression is not a proxy for skeletal muscle miRNA expression in males and females following acute, moderate intensity exercise. *Physiol Rep*. 2020;8(16):e14520.
259. Lovett JAC, Durcan PJ, Myburgh KH. Investigation of Circulating Extracellular Vesicle MicroRNA Following Two Consecutive Bouts of Muscle-Damaging Exercise. *Front Physiol*. 2018;9:1149.
260. Nie Y, Sato Y, Wang C, Yue F, Kuang S, Gavin TP. Impaired exercise tolerance, mitochondrial biogenesis, and muscle fiber maintenance in miR-133a-deficient mice. *FASEB J*. 2016;30(11):3745-58.
261. Oikawa S, Lee M, Motohashi N, Maeda S, Akimoto T. An inducible knockout of Dicer in adult mice does not affect endurance exercise-induced muscle adaptation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2019;316(2):C285-C92.
262. Trajkovski M, Ahmed K, Esau CC, Stoffel M. MyomiR-133 regulates brown fat differentiation through Prdm16. *Nat Cell Biol*. 2012;14(12):1330-5.
263. Liu W, Bi P, Shan T, Yang X, Yin H, Wang YX, et al. miR-133a regulates adipocyte browning in vivo. *PLoS Genet*. 2013;9(7):e1003626.
264. Oliveira MS, Rheinheimer J, Moehlecke M, Rodrigues M, Assmann TS, Leitao CB, et al. UCP2, IL18, and miR-133a-3p are dysregulated in subcutaneous adipose tissue of patients with obesity. *Mol Cell Endocrinol*. 2020;509:110805.
265. Kim NH, Ahn J, Choi YM, Son HJ, Choi WH, Cho HJ, et al. Differential circulating and visceral fat microRNA expression of non-obese and obese subjects. *Clin Nutr*. 2020;39(3):910-6.

266. Li X, Zhang H, Wang Y, Li Y, Wang Y, Zhu J, et al. Screening of key miRNAs related with the differentiation of subcutaneous adipocytes and the validation of miR-133a-3p functional significance in goats. *Anim Biosci.* 2023;36(1):144-55.
267. Estrada AL, Valenti ZJ, Hehn G, Amorese AJ, Williams NS, Balestrieri NP, et al. Extracellular vesicle secretion is tissue-dependent ex vivo and skeletal muscle myofiber extracellular vesicles reach the circulation in vivo. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2022;322(2):C246-C59.
268. Garner RT, Solfest JS, Nie Y, Kuang S, Stout J, Gavin TP. Multivesicular body and exosome pathway responses to acute exercise. *Exp Physiol.* 2020;105(3):511-21.
269. Brandao BB, Madsen S, Rabiee A, Oliverio M, Ruiz GP, Ferrucci DL, et al. Dynamic changes in DICER levels in adipose tissue control metabolic adaptations to exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(38):23932-41.
270. De Gasperi R, Hamidi S, Harlow LM, Ksiezak-Reding H, Bauman WA, Cardozo CP. Denervation-related alterations and biological activity of miRNAs contained in exosomes released by skeletal muscle fibers. *Sci Rep.* 2017;7(1):12888.