

KARINA CUNHA E ROCHA

**Perfil de microRNAs de vesículas extracelulares do soro de animais obesos e seu possível
envolvimento na regulação do metabolismo energético**

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

2021

KARINA CUNHA E ROCHA

**Perfil de microRNAs de vesículas extracelulares do soro de animais obesos e seu possível
envolvimento na regulação do metabolismo energético**

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

2021

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Cunha e Rocha, Karina
Perfil de microRNAs de vesículas extracelulares
do soro de animais obesos e seu possível
envolvimento na regulação do metabolismo energético
/ Karina Cunha e Rocha; orientadora Alice Cristina
Rodrigues. -- São Paulo, 2021.
208 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Metabolismo. 2. Caracterização. 3. Obesidade.
4. Vesículas Extracelulares. 5. microRNAs. I.
Rodrigues, Alice Cristina, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Karina Cunha e Rocha

Título da Tese: Perfil de microRNAs de vesículas extracelulares do soro de animais obesos e seu possível envolvimento na regulação do metabolismo energético

Orientador (a): Profa. Dra. Alice Cristina Rodrigues

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*MicroRNAs como mediadores metabólicos na comunicação entre tecido adiposo branco, fígado e músculo esquelético em camundongos obesos*", registrado sob o protocolo nº **54/2017**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **20/04/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Alice Cristina Rodrigues**

- Departamento: *Farmacologia*

- Membros da Equipe: *Karina Cunha e Rocha (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretária da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*MicroRNAs as metabolic mediators in the communication among white adipose tissue, liver and skeletal muscle in obese mice*", protocol nº **54/2017**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **4/20/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Alice Cristina Rodrigues**

- Team members: *Karina Cunha e Rocha (Graduate Student)*.

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	C57BL/6	<i>Macho/male</i>	<i>8 semanas/weeks</i>	100

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

São Paulo, 26 de abril de 2017.

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretário CEUA-ICB/USP

Ao caos e ao acaso, meus companheiros diários.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Alice Rodrigues, cujos ensinamentos permearam todo o meu crescimento dentro do mundo acadêmico. Obrigada pela orientação, apoio, oportunidades, confiança, parceria, disponibilidade e por jogar junto comigo ao longo desses anos.

À minha mãe, por ter me dado quatro das coisas mais fundamentais: a vida, o exemplo, a coragem e o apoio - Mãe, obrigada por ter lutado contra todas as estatísticas e estar vivendo este momento junto comigo.

À vovó Nadyr, que me criou e me fez ser quem eu sou. E, o mais legal de tudo: vive todos os momentos junto comigo, como se fosse a primeira vez. Todos os dias.

À tia Marilena (minha Susu Vieira) que é minha inspiração de animação e leveza, além de ser uma segunda mãe para mim, e ao Tio Linneu que sempre fez tudo por mim, além de me alegrar com suas piadas. Obrigada por tudo! Não tenho palavras para descrever a importância de vocês em todos os aspectos da minha vida.

Ao meu pai, vovó Lurdes, tia Ana, Edu, Shirley e Belinha que me apoiam sempre e que, mesmo de longe, me acompanham em todas as minhas aventuras. Obrigada por tudo.

Aos meus primos Alê, Paul e Sisi que estiveram sempre presente, me tratando como uma irmã mais nova e, por vezes, como uma filha mais velha. Só tenho memórias felizes com vocês, obrigada por tudo.

Aos "bebês" da família, que me alegram totalmente e me salvam de todas as "conversas de adultos" nas festas de família: Marcelinho, Bubu, Luli, Fê, Cami, Caião e Lili, amo todos vocês.

À minha outra metade dentro do laboratório, Mariana de Mendonça (*a.k.a.* Mari, Mary, Marcão, Big Mark), pela parceria, confiança, discussões, sessões de terapia, almoços, jantares e viagens. Obrigada por permitir tudo isso e por ser minha dupla! Você é uma peça-chave no meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos meus colegas do laboratório de Farmacogenômica que fizeram toda a experiência de doutorado mais agradável. Em especial à Anaysa e Érica, as mães do grupo; ao Alê, a melhor pessoa para trocar ideias; ao Lucas, nossa fonte de informações & relações públicas do laboratório e à Ailma, que topa as ideias mais loucas de última hora. Muito obrigada, gente.

À Flávia Helena, meu bebezinho, que tanto me ensinou dentro do laboratório e que, agora, é uma grande amiga. Obrigada pelas trocas, pelos conselhos, por ser uma inspiração para mim e por ser uma pessoa que eu sei que eu posso contar.

À cientista nata, Beatriz Veloso, pelos ensinamentos e trocas, pelas discussões sobre a vida, ciência, filmes e séries, por me inspirar a ser feliz com o que a vida nos proporciona e por me fazer enxergar que a vida pode ser mais leve. Obrigada, Bibão.

À Bruna Genisa (*a.k.a.* Brunão), a primeira pessoa que conheci no ICB e ao Léo, pelas discussões não só científicas e políticas, mas também sobre a vida, sobre o nosso futuro e sobre reality shows de culinária. Obrigada pelo apoio durante todos esses anos.

Aos meus amigos do ICB que me ajudaram em momentos cruciais. Ao Lucas Hoffman, pelas dicas com a padronização das vesículas extracelulares, à Monique pelas conversas e pelo apoio em momentos difíceis e ao Francis pelas trocas científicas.

À Bárbara Falchetto, pelas discussões, risadas, desabafos e por me ajudar em momentos difíceis. Obrigada, amiga.

Aos meus "migos da monitoria", Lucas e Cecília que chegaram para ficar. É muito bom compartilhar a minha vida com vocês, obrigada.

À Dra. Vânia, Karen e Vanessa, que me deram a chance de iniciar uma carreira dentro da ciência e ao Gustavo, por ter dividido parte do projeto dele comigo. Eu tenho certeza de que se não fossem vocês eu não teria considerado a área acadêmica como opção. Vocês fazem parte da minha formação como cientista e serei sempre muito grata.

À Marion e Joyce (Mc Joy) que me ensinaram o básico do básico e como sobreviver dentro de um laboratório de pesquisa. E a Anandinha, que acompanha meu crescimento desde o início e é uma amiga maravilhosa. Obrigada meninas, eu não estaria aqui sem vocês.

À minha parceira de vida, Nicole Ferreira, pela companhia, pelas indicações de música, pelas noites em claro assistindo filmes suspeitos, pela pipoca doce do Tucuruvi, pela ajuda psicológica e acadêmica e por saber mais sobre mim do que eu mesma - “Quando I’m Cool...”.

À minha empresária favorita e meu exemplo de determinação, Rosana Gonçalves, pelos inúmeros momentos de apoio, conselhos e risadas em diferentes bares e restaurantes, e por me ensinar os Estados e Capitais do sul do Brasil - Estaremos sempre juntas, em busca de um bom rodízio de pizza e de um *petit gâteau* perfeito.

À Daniela Gabarrão, pelos muitos anos de parceria, amizade, conversas e aprendizado, por me considerar da família, por aceitar minhas ideias malucas e por todas as “filadas de boia” que dei na sua casa. Agradecimentos adicionais ao Rodrigo, Marys e Alice (não me escreva aquela carta de amor).

À "minha pessoa", Natália Novo, por ser companheira, compreensível e prestativa, e por tornar possível um dos momentos mais cruciais do meu doutorado.

À Thais Palumbo (e ao seu *delay*), que mesmo super compromissada, abre espaço para as minhas ideias loucas, meus dramas e minhas escolhas de restaurantes. Obrigada por ter vivido a experiência do doutorado comigo bem de pertinho, desde o começo.

Aos meus amigos das "6 da manhã", que topam os desafios mais loucos junto comigo e que me fazem ter energia para sair da cama, começar o dia e não enlouquecer: Will, Ana, Pri, Kim, Alex, Shirloca, Léo, Mi e Tati. Obrigada, gente. Adoro vocês.

Ao Professor Jerrold M. Olefesy por ter me aceitado durante um ano e meio em seu laboratório durante meu estágio no exterior, proporcionando umas das melhores experiências científicas que já tive. E aos Professores Wei Ying e Olivia Osborn, pela orientação e confiança em diferentes projetos.

Ao Roi, Hong, Long, YuDong, Rizaldy, DingHong, JaeSu, Theresa, Kamya, Bandy e Miles, pelas trocas, pelos ensinamentos, pelas risadas, pelos dias felizes, pelo Whopper de 1 dólar e pelos conselhos nos dias tristes - Thank you, 谢谢, 감사, Danke, धन्यवाद, Salamat, תודה .

Ao Felipe, que considero como um irmão mais velho, por todas as conversas, risadas, ensinamentos e puxões de orelha. À Carol, por todo o carinho e à Juju, minha parceira de Roblox e Nintendo Switch, por me alegrar sempre.

Às minhas migas traíras, Flavitcha e Mirão, que não eram nem para ser amigas, mas fazer o quê. Amo vocês e não tenho palavras para agradecer tudo o que vocês fizeram por mim. Agradecimentos extras ao Tyler, que já aceitou os momentos de trisal em dia de *Trivia Night*.

Aos meus amigos que fizeram San Diego ter cara de casa: Robin, Lana, Ritica, Ashiwn, DangDang, Wendelin, Anna, Ali, Rice Girl, Pilot, Camila, Frank, Jaenny e Arizona. Agradecimentos especiais à Sara, que virou a minha vida de ponta cabeça.

Aos professores e funcionários do Departamento de Farmacologia do ICB, em especial à Mônica, por ser completamente paciente com todas as milhões de dúvidas e pedidos que tive ao longo dos anos e às professoras Rosana Camarini e Carolina Munhoz por terem me supervisionado nos meus estágios PAE.

Ao professor Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto por permitir que eu usasse o espaço e os equipamentos do seu laboratório.

À professora Luciana Biagini Lopes que me ensinou a técnica de *dynamic light scattering* e me acompanhou no uso do Zetasizer.

À Professora Lúcia Rossetti Lopes pelos conselhos e conversas, e por permitir o uso do seu espectrofotômetro.

Ao professor Dr. José Donato Junior por abrir as portas do seu laboratório para a realização do experimento de ressonância magnética nuclear e à Aninha, que além de prestativa, é ótima amiga e conselheira.

Ao professor Dr. Ronaldo de Carvalho Araújo por permitir a utilização do calorímetro e aos técnicos Cláudio e Alexandre que me acompanharam durante os experimentos.

À professora Dr. Lila Missae Oyama por abrir as portas do seu laboratório, me ensinar e me acompanhar no experimento de atividade enzimática. Ao Nelson, que virou um amigo, e à Ana Cláudia que também me ajudaram no preparo e leitura das amostras.

Ao Adilson e Sidney, que além de técnicos excepcionais me ensinaram e auxiliaram muito ao longo dos anos. Não consigo nem imaginar esse trabalho sem vocês, obrigada.

Aos Bioteristas Cláudio e Braz, que foram sempre muito solícitos, me ajudando em diversos momentos, ensinando muito também. Obrigada.

À Martinha do Laboratório Multiusuário de Microscopia do departamento de Anatomia do ICB, por me ensinar muito sobre histologia e por me fazer companhia nos longos períodos de experimento com a melhor trilha sonora possível.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro durante a realização deste trabalho e pela concessão da Bolsa de Doutorado Direto (processo nº 2018/05426-0) e da Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (processo nº 2019/14999-6).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Não vemos as coisas como elas são, mas como nós somos”

(Anaïs Nin)

RESUMO

ROCHA, K.C.E. **Perfil de microRNAs de vesículas extracelulares do soro de animais obesos e seu possível envolvimento na regulação do metabolismo energético.** 2021. 208 p. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

As células podem se comunicar com células vizinhas ou distantes através de vesículas extracelulares (EVs) que podem transportar microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs não-codificantes que regulam a expressão gênica. Uma vez que o conteúdo de miRNAs e o número de EVs liberadas pelas células podem ser alterados durante a obesidade, nossa hipótese foi a de que EVs do soro de animais obesos poderiam regular o metabolismo energético de animais controle pela possível transferência de miRNAs entre os diferentes tecidos. O objetivo deste trabalho foi investigar o papel de EVs na regulação do metabolismo energético na obesidade e identificar os possíveis miRNAs em EVs envolvidos na comunicação entre tecidos. Para tal, camundongos machos da linhagem C57BL/6 foram induzidos à obesidade com dieta hiperlipídica e leite condensado por 12 semanas. As EVs do soro foram obtidas e utilizadas para o tratamento de camundongos C57BL/6 machos alimentados com uma dieta controle. Em comparação com os grupos controle (animais tratados com PBS e com EVs do soro de animais controle), o tratamento resultou em preferência por oxidação de lipídeos e diminuição do gasto energético e do *heat*. Esses resultados sugerem que EVs liberadas no soro de animais obesos podem modular o metabolismo energético de camundongos controle. A seguir, foi realizado o sequenciamento de miRNAs das EVs de um pool de amostras do soro de animais controle e obesos. Após validação dos miRNAs obtidos no sequenciamento em amostras individuais, cinco miRNAs (miR-22-3p, miR-29c-3p, miR-122-5p, miR-192-5p e miR-802-5p) apresentaram expressão aumentada em EVs do soro de animais obesos. Análise da expressão desses miRNAs no fígado, músculo gastrocnêmio e gordura epididimal apontam para uma provável comunicação entre tecidos via miRNAs de EVs. De maneira geral, nosso trabalho mostra a participação de EVs séricas na regulação do metabolismo energético na obesidade e descreve potenciais miRNAs contidos nas EVs do soro de animais obesos que podem participar da comunicação entre tecidos.

Palavras-chave: Metabolismo. Caracterização. Obesidade. Vesículas Extracelulares. microRNAs.

ABSTRACT

ROCHA, K.C.E. **MicroRNAs profile of serum extracellular vesicles and their possible involvement in energy metabolism regulation in obese animals**. 2021. 208 p. Thesis (Ph.D. Thesis in Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Cells can communicate with neighboring or distant cells through extracellular vesicles (EVs) that can carry microRNAs (miRNAs), small non-coding RNAs that regulate gene expression. Since the content of miRNAs and the number of EVs released by cells can be altered during obesity, we hypothesized that EVs from the serum of obese animals could regulate the energy metabolism of control animals by a possible transfer of miRNAs between different tissues. This work aimed to investigate the role of EVs in the regulation of energy metabolism in obesity and to identify possible EV-miRNAs involved in tissue communication. For this purpose, we induced obesity in male C57BL/6 mice with a high-fat diet supplemented with condensed milk for 12 weeks. Serum EVs were obtained from the obese mice and used to treat male C57BL/6 mice fed with a control diet. Compared to the control groups (animals treated with PBS and with serum EVs from control animals), EV treatment increased lipid oxidation preference and decreased energy expenditure and heat. These results suggest that EVs released in the serum of obese animals can modulate the energy metabolism of control mice. Next, we performed sequencing of miRNAs EVs from a pool of serum samples from control and obese animals. After validating the miRNAs obtained from sequencing in individual samples, five miRNAs miR-22-3p, miR-29c-3p, miR-122-5p, miR-192-5p, and miR-802-5p were shown to be increased in serum EVs from obese animals. Analysis of the expression of these miRNAs in the liver, gastrocnemius muscle, and epididymal fat point to a possible communication between tissues through EV-miRNAs. Overall, our work shows the participation of serum EVs in the regulation of energy metabolism in obesity and describes potential EV-miRNAs contained in the serum EVs of obese individuals that may participate in tissue communication in obesity.

Keywords: Metabolism. Characterization. Obesity. Extracellular Vesicles. microRNAs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biogênese de microRNAs e seus mecanismos de regulação gênica.....	34
Figura 2. Biogênese de vesículas extracelulares liberadas de células saudáveis	37
Figura 3. Mecanismos de captação das vesículas extracelulares pelas células receptoras.....	39
Figura 4. Desenho experimental – Indução de obesidade por dieta hiperlipídica suplementada com leite condensado.....	44
Figura 5. Copinhos contendo leite condensado antes e após serem ofertados aos animais do grupo H.....	45
Figura 6. Avaliação do peso corpóreo de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.	56
Figura 7. Avaliação da composição corporal de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.	57
Figura 8. Avaliação do consumo alimentar de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.	59
Figura 9. Avaliação da glicemia de jejum e da responsividade à glicose de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.	60
Figura 10. Avaliação da responsividade ao piruvato de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.....	61
Figura 11. Avaliação da responsividade à insulina de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.....	62
Figura 12. Peso úmido do fígado e músculos gastrocnêmio e sóleo de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.....	63
Figura 13. Peso úmido das gorduras coletadas de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.	64
Figura 14. Análise bioquímica do soro de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.	65

Figura 15. Expressão relativa de RNAm do fígado e do músculo gastrocnêmio de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.	66
Figura 16. Expressão relativa de RNAm das gorduras epididimal, retroperitoneal e inguinal de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.	68
Figura 17. Atividade de enzimas lipogênicas da gordura retroperitoneal de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.	69
Figura 18. Conteúdo hepático de lipídeos de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.	70
Figura 19. Análise morfológica hepática e avaliação do escore de esteatose e de inflamação em camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.	71
Figura 20. Análise do acúmulo hepático de lipídeos em camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.	72
Figura 21. Análise morfológica da gordura marrom interescapular de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.	73
Figura 22. Análise morfológica da gordura inguinal de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.	74
Figura 23. Desenho experimental – Tratamento com vesículas extracelulares (EVs)	80
Figura 24. Quantificação do conteúdo proteico do soro, do sobrenadante e de EVs isoladas	85
Figura 25. Concentração <i>versus</i> tamanho e foto representativa da população de partículas presentes nas preparações de EVs isoladas do soro de camundongos	87
Figura 26. Expressão de marcadores proteicos: ALIX, TSG101 e CD63	89
Figura 27. Expressão do marcador proteico CD9 – Diferentes concentrações	89
Figura 28. Expressão de Grp94, marcador de EVs grandes	89

Figura 29. Detecção de albumina nas preparações de EVs e soro	90
Figura 30. Caracterização de EVs por microscopia eletrônica de transmissão.....	91
Figura 31. Distribuição de tamanho de EVs do soro analisado por <i>Dynamic Light Scattering</i>	93
Figura 32. Avaliação do peso corpóreo de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H; n=4) ou PBS (n=5).	95
Figura 33. Avaliação da porcentagem de gordura, massa magra e fluido de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H; n=4) ou PBS (n=5).	96
Figura 34. Consumo de ração de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H; n=4) ou PBS (n=5).	98
Figura 35. Responsividade ao piruvato, à glicose e à insulina de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H; n=4) ou PBS (n=5).....	100
Figura 36. Peso úmido de tecidos coletados de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H; n=4) ou PBS (n=5).	101
Figura 37. Análise bioquímica do soro de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H; n=4) ou PBS (n=5).	102
Figura 38. Parâmetros avaliados por calorimetria indireta em camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV- H; n=4) ou PBS (n=5).....	104
Figura 39. Expressão relativa de RNAm de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H; n=4) ou PBS (n=5).	106

Figura 40. Atividade enzimática das enzimas Málica e ATP Citrato Liase na gordura epididimal de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H; n=4) ou PBS (n=5).	107
Figura 41. Conteúdo lipídico do fígado de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H; n=4) ou PBS (n=5).	108
Figura 42. Análise morfológica hepática e avaliação do escore de esteatose e de inflamação em camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H; n=4) ou PBS (n=5).....	109
Figura 43. Desenho experimental – Novo tratamento com vesículas extracelulares (EVs) .	111
Figura 44. Avaliação do peso corpóreo de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H), animais magros (EV-C) ou PBS (n=4/grupo).....	115
Figura 45. Avaliação da porcentagem de gordura, massa magra e fluido de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H), animais magros (EV-C) ou PBS (n=4/grupo).....	116
Figura 46. Consumo de ração de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H), animais magros (EV-C) ou PBS (n=4/grupo).....	118
Figura 47. Responsividade à glicose e à insulina de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H), animais magros (EV-C) ou PBS (n=4/grupo).	119
Figura 48. Peso úmido de tecidos coletados de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H), animais magros (EV-C) ou PBS (n=4/grupo).....	121
Figura 49. Parâmetros avaliados por calorimetria indireta em camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H), animais magros (EV-C) ou PBS (n=4/grupo).	124
Figura 50. <i>Heat map</i> dos microRNAs diferentemente expressos em vesículas extracelulares isoladas do soro de animais do grupo H, em comparação com o grupo C.....	131

Figura 51. Análise de vias reguladas pelos miRNAs diferentemente expressos – Agrupamento hierárquico e <i>heat map</i>	136
Figura 52. Rede gênica - microRNAs diferentemente expressos e seus genes alvo	137
Figura 53. Validação - Expressão relativa de miRNAs de vesículas extracelulares do soro de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.	142
Figura 54. Expressão relativa de miRNAs no fígado de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.....	143
Figura 55. Expressão relativa de miRNAs na gordura epididimal de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.....	144
Figura 56. Expressão relativa de miRNAs no músculo gastrocnêmio de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.	145
Figura 57. Expressão relativa de miRNAs no fígado de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H), animais magros (EV-C) ou PBS (n=4/grupo).	146
Figura 58. Expressão relativa de miRNAs na gordura epididimal de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H), animais magros (EV-C) ou PBS (n=4/grupo).	147
Figura 59. Rede gênica - microRNAs validados que foram diferentemente expressos e seus genes alvo	149
Figura 60. Expressão do hsa-miR-22-3p em diferentes tecidos	151
Figura 61. Expressão do hsa-miR-29c-3p em diferentes tecidos	152
Figura 62. Expressão do hsa-miR-122-5p em diferentes tecidos	153
Figura 63. Expressão do hsa-miR-192-5p em diferentes tecidos	154
Figura 64. Esquema representativo dos resultados da validação da expressão de microRNAs das EVs do soro e expressão dos microRNAs validados no fígado, músculo gastrocnêmio e gordura epididimal de camundongos obesos.....	169

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. miRNAs descritos na circulação e envolvidos com obesidade e resistência à insulina	166
--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das dietas experimentais de acordo com o fabricante - dieta controle e hiperlipídica.	43
Tabela 2. Sequências dos primers utilizados para quantificação da expressão de RNAm por PCR em tempo Real.	50
Tabela 3. Concentração de partículas presentes nas preparações de EVs isoladas do soro de camundongos	86
Tabela 4. Tamanho de partículas presentes nas preparações de EVs isoladas do soro de camundongos	87
Tabela 5. Parâmetros da população de EVs analisadas por microscopia eletrônica de transmissão.	91
Tabela 6. Diâmetro e Intensidade das EVs extraídas no soro.....	92
Tabela 7. Diâmetro médio e Índice de Polidispersão de EVs extraídas do soro.	93
Tabela 8. Resumo dos microRNAs encontrados nas vesículas extracelulares do soro dos animais do grupo C e H.	129
Tabela 9. MicroRNAs de vesículas extracelulares do soro que foram diferentemente expressos entre os grupos C e H.	130
Tabela 10. MicroRNAs conhecidos diferentemente expressos (H <i>versus</i> C).....	130
Tabela 11. Vias KEGG alvo dos microRNAs de EVs do soro diferentemente expressos – Análise <i>a priori</i>	133
Tabela 12. Vias KEGG alvo dos microRNAs de EVs do soro diferentemente expressos – Análise <i>a posteriori</i>	134
Tabela 13. Vias KEGG alvo dos cinco microRNAs validados de EVs do soro diferentemente expressos – Análise <i>a priori</i>	148

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrómetro
x g	Unidade de gravidade
36b4	<i>Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0</i>
Acc	Acetil-CoA Carboxilase
ACL	ATP-citrato liase
ALIX	<i>Programmed cell death 6-interacting protein</i>
AUC	<i>Area under de curve</i> (Área sob a curva)
BSA	Albumina de soro bovino
Cat.	Catálogo
cDNA	DNA Complementar
Cebpα	<i>CCAAT enhancer binding protein alpha</i>
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CT	Colesterol Total
dL	Decilitro
DLS	<i>Dinamic light scattering</i> (Espalhamento dinâmico de luz)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EM	Enzima Máfica

EVs	<i>Extracellular Vesicles</i> (Vesículas Extracelulares)
<i>Fabp3</i>	<i>Fatty acid binding protein 3</i>
<i>Fabp4</i>	<i>Fatty acid binding protein 4</i>
<i>Fasn</i>	<i>Fatty acid sintase</i>
FC	<i>Fold Change</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
g	grama
<i>Glut4</i>	<i>Solute carrier family 2 member 4</i>
Grp94	<i>Heat shock protein Hsp90 family protein</i>
GTT	Teste de tolerância à glicose
h	hora
HDL-C	Colesterol da lipoproteína de alta densidade
HE	Hematoxilina e eosina
<i>Hprt1</i>	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
i.p.	Intraperitoneal
iBAT	Tecido adiposo marrom interescapular
Il6	Interleucina-6
ILVs	Vesículas intraluminais
<i>Irs1</i>	<i>Insulin receptor substrate 1</i>
ITT	Teste de tolerância à insulina
kcal	Quilocaloria
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilodalton
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
kg	Quilograma
kITT	Constante de decaimento de glicose

LDL-C	Colesterol da lipoproteína de baixa densidade
mA	Miliampère
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min	Minuto
miRNA	microRNA
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MVBs	Corpos Multivesiculares
NaCl	Cloreto de sódio
NALFD	<i>Non-alcoholic fatty liver disease</i> (doença hepática gordurosa não alcoólica)
Nm	Nanômetro
nSMase 2	Esfingomielinase neutra 2
NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i> (Análise de Rastreamento de Nanopartículas)
OCT	<i>Optimal cutting temperature</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORO	<i>Oil Red-O</i>
PBS	Solução salina em tampão fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDI	<i>Polydispersity index</i> (Índice de polidispersão)
PES	Polietersulfona
PFA	Paraformaldeído
<i>Pgc1a</i>	<i>Pparg coactivator 1 alpha</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
<i>Ppara</i>	<i>Peroxisome proliferator activated receptor alpha</i>
<i>Pparg</i>	<i>Peroxisome proliferator activated receptor gamma</i>

pri-miRNA	microRNA primário
PTT	Teste de tolerância ao piruvato
RER	<i>Respiratory energy ratio</i>
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RNases	Ribonucleases
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
rpm	Rotação por minuto
RT-qPCR	<i>Reverse transcriptase-polymerase reaction chain</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS- PAGE	Eletroforese em gel de acrilamida contendo SDS
TBST	Tampão salina-borato com tween
TCA	Ácido tricloroacético
TD-NMR	<i>Time-domain nuclear magnetic resonance</i> (Ressonância magnética nuclear no domínio do tempo)
TG	Triglicerídeos
<i>Tnfa</i>	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
Tris-HCl	Hidroximetilaminometano contendo ácido clorídrico
TSG101	<i>Tumor susceptibility gene 101 protein</i>
U	Unidades internacionais
<i>Ucp1</i>	<i>Uncoupling protein 1</i>
VCO ₂	Volume de dióxido de carbono
VO ₂	Volume de oxigênio
vs.	<i>Versus</i>
WT	<i>Wild type</i>

Sumário

1. INTRODUÇÃO	32
1.1. MicroRNAs.....	33
1.2. VESÍCULAS EXTRACELULARES	36
2. OBJETIVO	41
2.1. OBJETIVO GERAL	41
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
PARTE I – INDUÇÃO DE OBESIDADE POR DIETA	42
3. METODOLOGIA	42
3.1. ANIMAIS	42
3.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL – INDUÇÃO DE OBESIDADE	42
3.3. INGESTÃO ALIMENTAR E GANHO DE PESO.....	45
3.4. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO CORPORAL.....	45
3.5. TESTE DE TOLERÂNCIA AO PIRUVATO	46
3.6. TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE.....	46
3.7. TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA.....	47
3.8. ANÁLISES BIOQUÍMICAS	47
3.8.1. Dosagem sérica de colesterol total	47
3.8.2. Dosagem sérica de triglicerídeos	48
3.8.3. Dosagem sérica de HDL-C	48
3.8.4. Cálculo para a concentração sérica de LDL-C	49
3.9. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL ...	49
3.10. ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	50
3.11. EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS - FÍGADO	51
3.12. ANÁLISES HISTOLÓGICAS	51
3.12.1. Fígado	51

3.12.2. Gordura inguinal e gordura marrom interescapular	52
3.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
3.13.1. Variáveis quantitativas	53
3.13.2. Variáveis qualitativas.....	53
3.13.3. Curva ROC	54
4. RESULTADOS.....	55
4.1. PESO CORPÓREO E COMPOSIÇÃO CORPORAL	55
4.2. CONSUMO DE RAÇÃO E LEITE CONDENSADO	58
4.3. GLICEMIA DE JEJUM E RESPONSABILIDADE À GLICOSE	59
4.4. RESPONSABILIDADE AO PIRUVATO	61
4.5. RESPONSABILIDADE À INSULINA	62
4.6. PESO ÚMIDO DOS TECIDOS	62
4.7. ANÁLISES BIOQUÍMICAS	64
4.8. EXPRESSÃO DE RNAm – FÍGADO, MÚSCULO E GORDURAS.....	65
4.9. ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	69
4.10. CONTEÚDO HEPÁTICO DE LIPÍDEOS.....	69
4.11. ANÁLISES HISTOLÓGICAS	70
4.11.1. Fígado	70
4.11.2. Gordura Marrom Interescapular	72
4.11.3. Gordura Inguinal	73
PARTE IIA – TRATAMENTO COM VESÍCULAS EXTRACELULARES	75
5. METODOLOGIA	75
5.1. EXTRAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DO SORO	75
5.2. CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	75
5.2.1. <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>	75
5.2.2. <i>Dynamic Light Scattering</i>	76

5.2.3.	Expressão de marcadores proteicos de vesículas extracelulares.....	76
5.2.4.	Deteção de albumina	78
5.2.5.	Microscopia eletrônica de transmissão.....	78
5.3.	PROTOCOLO EXPERIMENTAL – TRATAMENTO COM VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	78
5.4.	INGESTÃO ALIMENTAR E GANHO DE PESO.....	79
5.5.	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO CORPORAL.....	80
5.6.	TESTE DE TOLERÂNCIA AO PIRUVATO E À INSULINA	80
5.7.	TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE.....	80
5.8.	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	81
5.8.1.	Dosagem sérica de glicerol.....	81
5.9.	CALORIMETRIA INDIRETA	81
5.10.	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL ...	82
5.11.	ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	83
5.12.	EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS – FÍGADO	83
5.13.	HISTOLOGIA FÍGADO	83
5.14.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	83
6.	RESULTADOS.....	84
6.1.	CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	84
6.1.1.	Caracterização quantitativa	84
6.1.2.	Caracterização geral	88
6.1.3.	Caracterização de vesículas únicas	90
6.2.	PESO CORPÓREO E COMPOSIÇÃO CORPORAL	94
6.3.	CONSUMO DE RAÇÃO	96
6.4.	GLICEMIA DE JEJUM E RESPONSIVIDADE AO PIRUVATO, À GLICOSE E À INSULINA	97
6.5.	PESO ÚMIDO DOS TECIDOS	99

6.6.	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	102
6.7.	CALORIMETRIA INDIRETA	103
6.8.	EXPRESSÃO DE RNAM – FÍGADO, MÚSCULO E GORDURA	105
6.9.	ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	107
6.10.	CONTEÚDO HEPÁTICO DE LIPÍDEOS.....	107
6.11.	HISTOLOGIA FÍGADO	108
PARTE IIB – TRATAMENTO COM VESÍCULAS EXTRACELULARES (INCLUSÃO GRUPO EV-C)		110
7.	METODOLOGIA	110
7.1.	EXTRAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DO SORO	110
7.2.	PROTOCOLO EXPERIMENTAL – NOVO TRATAMENTO COM VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	110
7.3.	INGESTÃO ALIMENTAR E GANHO DE PESO.....	112
7.4.	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO CORPORAL.....	112
7.5.	TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE E À INSULINA.....	112
7.6.	CALORIMETRIA INDIRETA	112
7.7.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	112
8.	RESULTADOS.....	114
8.1.	PESO CORPÓREO E COMPOSIÇÃO CORPORAL	114
8.2.	CONSUMO DE RAÇÃO	116
8.3.	GLICEMIA DE JEJUM E RESPONSABILIDADE À GLICOSE E À INSULINA..	117
8.4.	PESO ÚMIDO DOS TECIDOS	120
8.5.	CALORIMETRIA INDIRETA	121
PARTE III – SEQUENCIAMENTO DE MicroRNAs DERIVADOS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES E ANÁLISE BIOINFORMÁTICA.....		126
9.	METODOLOGIA	126

9.1.	EXTRAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DO SORO	126
9.2.	EXTRAÇÃO DE RNA DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES	126
9.3.	SEQUENCIAMENTO DE MicroRNAs	126
9.4.	ANÁLISE BIOINFORMÁTICA.....	126
10.	RESULTADOS.....	129
10.1.	SEQUENCIAMENTO DE MicroRNAs	129
10.2.	ANÁLISE BIOINFORMÁTICA – VIAS E GENES-ALVO DOS MicroRNAs...	131
PARTE IV – VALIDAÇÃO E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS MicroRNAs NOS TECIDOS DE INTERESSE		138
11.	METODOLOGIA	138
11.1.	EXTRAÇÃO DE RNA.....	138
11.1.1.	Vesículas Extracelulares	138
11.1.1.	Tecidos.....	138
11.2.	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MicroRNAs	138
11.3.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	139
11.4.	ANÁLISE BIOINFORMÁTICA.....	139
12.	RESULTADOS.....	141
12.1.	VALIDAÇÃO DE MicroRNAs EM VESÍCULAS EXTRACELULARES ISOLADAS DO SORO – ANIMAIS OBESOS E CONTROLE.....	141
12.2.	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MicroRNAs NOS TECIDOS – ANIMAIS OBESOS E CONTROLE	142
12.3.	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MicroRNAs NOS TECIDOS – ANIMAIS TRATADOS COM EVs DO SORO	145
12.4.	ANÁLISE BIOINFORMÁTICA – VIAS, GENES-ALVO E TECIDOS EM QUE OS MicroRNAs SÃO EXPRESSOS	147
12.4.1.	Análise de predição – Vias e genes-alvo dos microRNAs	147
12.4.2.	Expressão de microRNAs em diferentes tecidos	150

13. DISCUSSÃO.....	155
14. CONCLUSÃO	172
REFERÊNCIAS.....	174
APÊNDICE A – VIA KEGG: <i>PRION DISEASE</i>	189
APÊNDICE B – VIA KEGG: <i>ECM-RECEPTOR INTERACTION</i>	190
APÊNDICE C – VIA KEGG: <i>AMOEBIASIS</i>	191
APÊNDICE D – VIA KEGG: <i>MUCIN TYPE O-GLYCAN BIOSYNTHESIS</i>	192
APÊNDICE E – VIA KEGG: <i>THYROID HORMONE SYNTHESIS</i>	193
APÊNDICE F – VIA KEGG: <i>GLYCOSPHINGOLIPID BIOSYNTHESIS – LACTO AND NEOLACTO SERIES</i>	194
APÊNDICE G – VIA KEGG: <i>PI3K-AKT SIGNALING PATHWAY</i>	195
APÊNDICE H – VIA KEGG: <i>PROTEIN DIGESTION AND ABSORPTION</i>	196
APÊNDICE I – VIA KEGG: <i>GLIOMA</i>	197
APÊNDICE J – VIA KEGG: <i>FOXO SIGNALING PATHWAY</i>	198
APÊNDICE K –DADOS UTILIZADOS PARA CONSTRUÇÃO DA REDE GÊNICA	199
APÊNDICE L – DADOS UTILIZADOS PARA CONSTRUÇÃO DA REDE GÊNICA	204
ANEXO A – FIGURA ARTIGO – ATLAS DE MicroRNAs	208

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como o acúmulo excessivo de gordura que pode prejudicar a saúde (OMS, 2021). Ela é considerada como o principal fator de risco para doenças crônicas não transmissíveis e está associada com diminuição da expectativa de vida em cerca de 5 a 20 anos (FONTAINE et al., 2003; OMS, 2021). Os dados mais recentes da OMS mostram que a obesidade acomete aproximadamente 13% da população mundial adulta, ou seja, mais de 650 milhões de pessoas (OMS, 2021). Em 2014, o impacto econômico global da obesidade foi estimado em dois trilhões de dólares e 5% das mortes mundiais foram atribuídas à obesidade (DOBBS et al., 2014).

A obesidade é uma doença multifatorial, influenciada por fatores genéticos, ambientais, sociais, econômicos e comportamentais, que ocorre em decorrência de um desbalanço crônico entre consumo e gasto energético, acarretando no balanço energético positivo e, conseqüentemente, na expansão e disfunção do tecido adiposo branco (SPIEGELMAN; FLIER, 2001; BLUHER, 2009; KIM, E. et al., 2014; BLUHER, 2019). As alterações no tecido adiposo estão associadas a um estado de inflamação crônica de baixo grau, caracterizada pela ativação, em menor grau, do sistema imune inato, levando ao aumento de citocinas pró-inflamatórias na circulação, ativação de vias inflamatórias, recrutamento e ativação de leucócitos nos tecidos inflamados e aumento do estímulo para reparo tecidual (LUMENG; SALTIEL, 2011).

A inflamação participa do elo entre obesidade e resistência à insulina. O primeiro estudo a mostrar isso foi realizado por HOTAMISLIGIL et al. (1993), demonstrando que roedores obesos apresentaram, no tecido adiposo, maior expressão de TNF α (fator de necrose tumoral alfa), uma citocina pró-inflamatória que se mostrou capaz de diminuir a captação periférica de glicose e induzir resistência à insulina. Desde então, as evidências mostram que a obesidade está ligada à secreção de citocinas pró-inflamatórias e infiltração de células imunes que levam à disfunção do metabolismo de tecidos envolvidos com a homeostase da glicose, como o fígado, o tecido adiposo e o músculo esquelético, acarretando em acúmulo ectópico de gordura e resistência à insulina periférica e sistêmica (MCARDLE et al., 2013; LACKEY; OLEFSKY, 2016).

Sabe-se que a patogênese da obesidade e resistência à insulina não é restrita apenas a efeitos no tecido adiposo, contudo, o seu mecanismo completo ainda não foi elucidado. Diferentes trabalhos tentaram associar a comunicação entre tecido adiposo, músculo e fígado através de adipocinas e mediadores inflamatórios com a resistência à insulina observada durante

a obesidade (MOSCHEN et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2013). Entretanto, os resultados obtidos até então só respondiam parcialmente a complexa comunicação entre esses tecidos.

Um número crescente de evidências tem mostrado o papel dos microRNAs (miRNAs) como reguladores do metabolismo e de processos fisiopatológicos (FILIPOWICZ et al., 2008; VIENBERG et al., 2017). De fato, o quadro de obesidade se mostrou capaz de alterar a expressão de vários miRNAs em diferentes tecidos como fígado, tecido adiposo e músculo esquelético, mostrando um possível envolvimento desses na patogênese da obesidade (XIE et al., 2009; IACOMINO;SIANI, 2017).

Reportou-se, recentemente, que os miRNAs podem ser secretados para o plasma livremente ou seletivamente empacotados em vesículas extracelulares (EVs, do inglês *extracellular vesicles*) por vários tipos celulares (ZEN;ZHANG, 2012). Os miRNAs são, assim, transferidos para células vizinhas ou distantes, realizando uma função regulatória em outras células, desempenhando, assim, um papel importante na comunicação intercelular (CHEN et al., 2012; WANG, Y. C. et al., 2013; MORI et al., 2019).

Sabe-se que o tecido adiposo é uma importante fonte de miRNAs em EVs e esses, conforme descrito recentemente, podem regular a expressão de RNAm (RNA mensageiro) de outros tecidos (THOMOU et al., 2017). Adicionalmente, estudos demonstraram diferenças no conteúdo de miRNAs de EVs circulantes de animais obesos, em comparação com animais controle (CASTANO et al., 2018; DE MENDONÇA et al., 2020). Contudo, ainda não está bem estabelecido o envolvimento das EVs circulantes e seu conteúdo de miRNAs na patogênese da obesidade e resistência à insulina. Assim, esse trabalho avaliou o efeito de EVs do soro de animais obesos no metabolismo energético de animais controle e o possível envolvimento de miRNAs de EVs para investigar o seu papel na regulação metabólica e sua comunicação entre tecidos via EVs na obesidade.

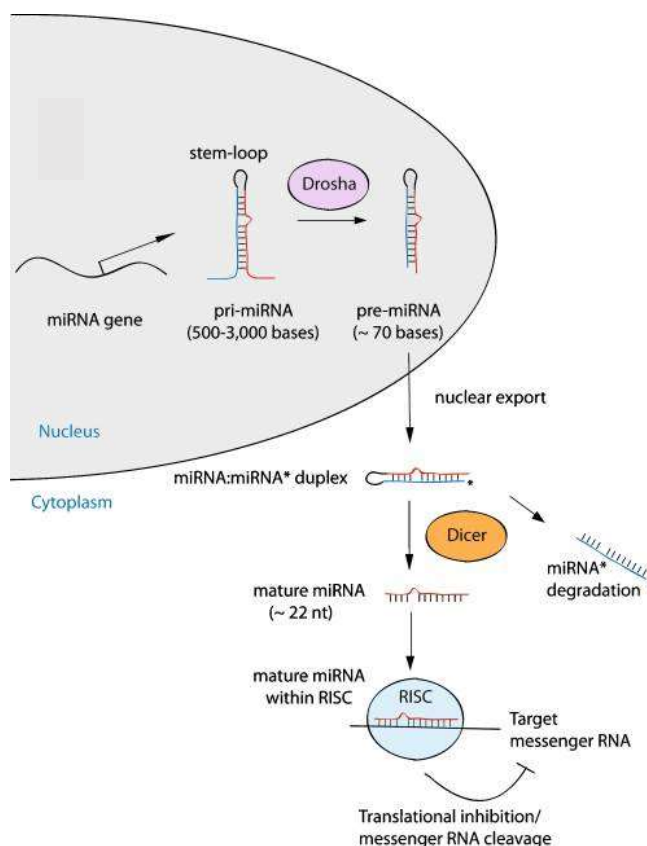
1.1. MICRORNAS

Descritos pela primeira vez em 1993, os miRNAs são moléculas endógenas de RNA não-codificante com, aproximadamente, 22 nucleotídeos de comprimento capazes de regular a expressão gênica em um nível pós-transcricional (LEE, R. C. et al., 1993; WIGHTMAN et al., 1993; BARTEL, 2018). Acredita-se que mais de 30% de todo RNAm humano seja regulado por miRNAs, mostrando seu importante papel no controle da homeostase do metabolismo (LEWIS et al., 2005; DUMORTIER et al., 2013).

A biogênese dos miRNAs pode ser dividida em quatro etapas: transcrição no núcleo da célula, exportação para o citoplasma, processamento e maturação, conforme ilustrado na **Figura 1** (SASSEN et al., 2008; SINGH et al., 2008). Os genes de miRNAs são evolutivamente conservados e podem estar localizados nas regiões intrônicas ou exônicas de genes codificadores de proteínas ou em regiões intergênicas (RODRIGUEZ et al., 2004).

Os genes de miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II, gerando um longo transcrito de microRNA primário (pri-miRNA) que possui uma extremidade cap 5' 7-metil guanosina e uma 3' cauda poli-A (CULLEN, 2004; LEE, Y. et al., 2004). O pri-miRNA forma uma estrutura secundária complexa em forma de grampo (*stem-loop* ou *hairpin*) a partir de regiões onde os pares de bases são complementares (*stem*) ou não (*loop*), formando uma haste dupla fita e uma alça, respectivamente (SUN, B. K.; TSAO, 2008).

Figura 1. Biogênese de microRNAs e seus mecanismos de regulação gênica.



Fonte: Retirado de SASSEN et al. (2008).

Ainda no núcleo, o pri-miRNA perde uma região da haste dupla fita pela ação da ribonuclease III Droscha e seu cofator DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region in gene*), originando o pré-miRNA (~70 nucleotídeos de comprimento) que, também com forma de grampo, é transportado para o citoplasma pela exportina-5 (Exp5), receptor nuclear dependente de RanGTP (LEE, Y. et al., 2003; LUND et al., 2004). No citoplasma, o pré-miRNA é processado por outra ribonuclease III, denominada Dicer, responsável por remover o *loop*, gerando um miRNA de fita dupla (~22 nucleotídeos de comprimento) que é incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), onde as duas fitas de RNA são separadas, sendo que uma permanece associada ao RISC e constitui o miRNA maduro e a outra sofre degradação (SUN, B. K.; TSAO, 2008).

A expressão gênica é regulada pelo complexo miRNA-RISC por meio de dois mecanismos que dependem do grau de complementaridade entre as bases do miRNA e do RNAm (SUN, B. K.; TSAO, 2008). Quando a complementaridade é perfeita ou quase perfeita o RNAm é clivado por uma ribonuclease presente no RISC e, quando a complementaridade é imperfeita, mecanismo principal de atuação dos miRNAs, há repressão inicial ou tardia do processo de tradução do RNAm sem a degradação de sua fita (ZHANG, W. et al., 2007). Desse modo, para correlacionar a expressão de determinado miRNA com seu gene-alvo, deve-se analisar tanto a expressão de RNAm como a expressão da proteína que o gene-alvo codifica.

Um único miRNA pode regular vários RNAm-alvos assim como vários miRNAs podem cooperar no controle da expressão gênica de um único RNAm, uma vez que os miRNAs apresentam sequências pequenas e não necessariamente precisam de um pareamento perfeito com seu RNAm-alvo (BRENNECKE et al., 2005). Tal fato reforça a importância dos miRNAs na regulação expressão gênica em diversos processos fisiológicos e patológicos.

A maioria dos miRNAs descritos foram encontrados no microambiente celular (miRNAs celulares), contudo miRNAs já foram detectados no ambiente extracelular (miRNAs circulantes ou extracelulares), incluindo diferentes fluidos (soro, plasma, leite materno, urina) e meios de cultura de células (WEBER et al., 2010; SOHEL, 2016). Os miRNAs circulantes são resistentes a temperatura e pH extremos e estáveis no plasma por horas (CHEN et al., 2008; MITCHELL et al., 2008). Assim, apesar da alta atividade das ribonuclease (RNases) os miRNAs circulantes conseguem se manter íntegros e em alta concentração nos fluidos biológicos.

Considerando a estabilidade dos miRNAs circulantes, foi sugerido que esses miRNAs devem adotar algum mecanismo de proteção para se manter estável no ambiente extracelular. Um dos primeiros mecanismos descritos mostrou que os miRNAs circulantes eram conjugados

com proteínas e que, assim, eram protegidos das RNases (SISCO, 2001). Em seguida, constatou-se que os miRNAs também eram ligados à complexos lipoproteicos e, mais recentemente, que os miRNAs poderiam ser secretados dentro de vesículas extracelulares (EL-HEFNAWY et al., 2004; VALADI et al., 2007; HUNTER et al., 2008). Tais achados reforçam a participação de EVs no potencial papel de miRNAs na comunicação entre tecidos.

1.2. VESÍCULAS EXTRACELULARES

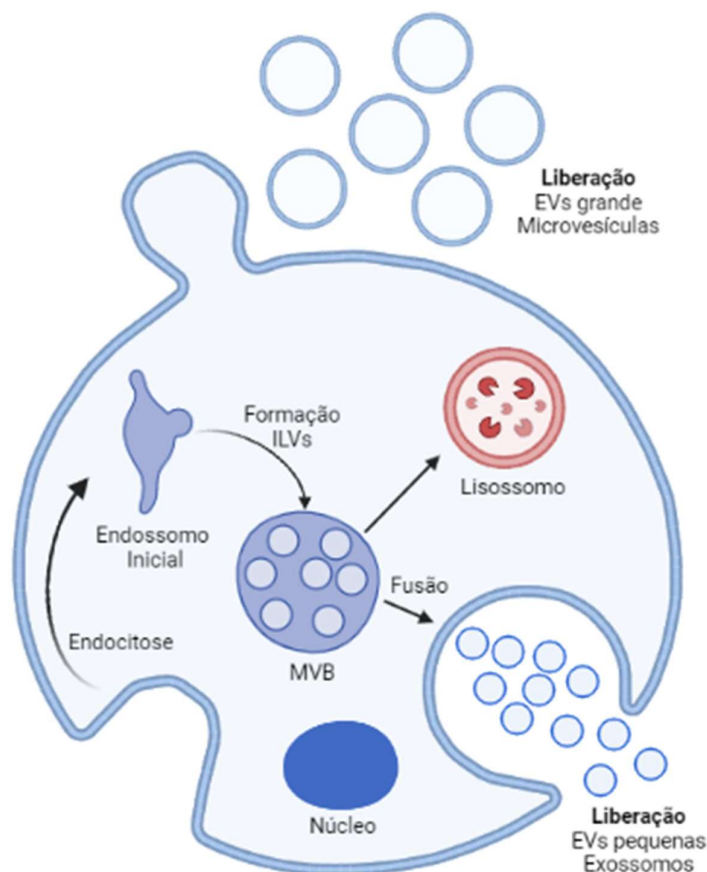
A maioria das células é capaz de secretar EVs e esse processo é conservado ao longo da evolução de bactérias a humanos e plantas (DEATHERAGE; COOKSON, 2012; ROBINSON et al., 2016). A classificação e nomenclatura de EVs tem sido uma questão de debate nos últimos anos (GOULD; RAPOSO, 2013). Por mais que as EVs possam ser classificadas com base na sua biogênese, no seu mecanismo de liberação e no seu tamanho, a obtenção de uma população homogênea de EVs é improvável e, como maioria dos trabalhos publicados estão focados na função das EVs e não em sua origem, a caracterização específica da população de EVs é raramente realizada (VAN NIEL et al., 2018). Além disso, não há consenso sobre marcadores específicos para cada subtipo de EV (THERY et al., 2018). Assim, considera-se que o termo “vesículas extracelulares” engloba as diferentes populações de vesículas, uma vez que foi considerado pela comunidade internacional como um termo genérico para partículas delimitadas por bicamada lipídica liberadas por células (THERY et al., 2018; WITWER; THERY, 2019).

Em geral, baseado no conhecimento disponível sobre sua biogênese, as EVs liberadas por células saudáveis podem ser amplamente divididas em duas categorias principais: 1) EVs pequenas (tamanho menor que 200 nm) geradas pela fusão com corpos multivesiculares (MVBs, do inglês *multivesicular bodies*) e a membrana plasmática, normalmente denominadas exossomos e 2) EVs maiores (tamanho maior que 200 nm) que são formadas por brotamento direto da membrana plasmática, normalmente denominadas microvesículas (VAN NIEL et al., 2018). Um esquema da biogênese dos dois processos pode ser visualizado na **Figura 2**. Adicionalmente, há os corpos apoptóticos, um tipo de EV com tamanho que pode variar entre 1-5 μm e que são liberados durante os estágios finais da apoptose.

Sem mecanismo muito bem elucidado, as microvesículas são formadas por brotamento externo direto da membrana plasmática com sua consequente liberação no espaço extracelular. Em contrapartida, a biogênese dos exossomos inicia-se pela invaginação da membrana celular durante a internalização de ligantes extracelulares ou componentes celulares que são

processados através da via endossomal para sua reciclagem ou degradação (GUAY;REGAZZI, 2017). Durante o processo de maturação dos endossomos, várias vesículas pequenas denominadas intraluminais (ILVs, do inglês *intraluminal vesicles*) são formadas por brotamento interno da membrana endossomal (GUAY;REGAZZI, 2017). Os endossomos precoces contendo as ILVs em seu interior são denominados corpos multivesiculares (MVB, do inglês *multivesicular bodies*) e estão envolvidos na seleção, reciclagem, armazenamento, transporte e liberação de proteínas (BORGES et al., 2013; GUAY;REGAZZI, 2017). Os MVBs podem fundir-se ou com os lisossomos e sofrer degradação, ou com a membrana celular, liberando as ILV, agora denominadas como exossomos, para o exterior (GUAY;REGAZZI, 2017). Os fatores que determinam o destino dos MVBs (degradação ou liberação) ainda não são compreendidos, contudo, estudos mostram influência do nível de colesterol nos MVBs, uma vez que MVBs com maior composição de colesterol foram secretados na circulação e os que não tinham colesterol foram degradados nos lisossomos (MOBIUS et al., 2002; MOBIUS et al., 2003).

Figura 2. Biogênese de vesículas extracelulares liberadas de células saudáveis



Esquema representativo da biogênese das duas classes principais de vesículas extracelulares (EVs). ILVs: veículas intraluminais. MVBs: corpos multivesiculares. Imagem criada com BioRender.com

As EVs se mostram particularmente importante pelo seu conteúdo, que pode variar em relação à biogênese, tipo celular e condições fisiológicas, mas que, no geral, é composto por proteínas, lipídeos, miRNAs e RNAm (ANAND et al., 2019). Estudos mostram que as EVs são particularmente enriquecidas com miRNAs e o mecanismo de incorporação de miRNAs específicos para as EVs ainda não está elucidado. Evidências sugerem o envolvimento de proteínas (como a argonata 2, ribonucleoproteínas e proteínas de ligação com RNA), modificações pós-transcricionais (uridilação) na extremidade 3' do miRNA e ceramida, por meio de sua produção via esfingomielinase neutra 2 (nSMase 2, do inglês *neutral sphingomyelinase 2*) (GUDURIC-FUCHS et al., 2012; VILLARROYA-BELTRI et al., 2013; KOPPERS-LALIC et al., 2014; CHA et al., 2015; SHURTLEFF et al., 2016).

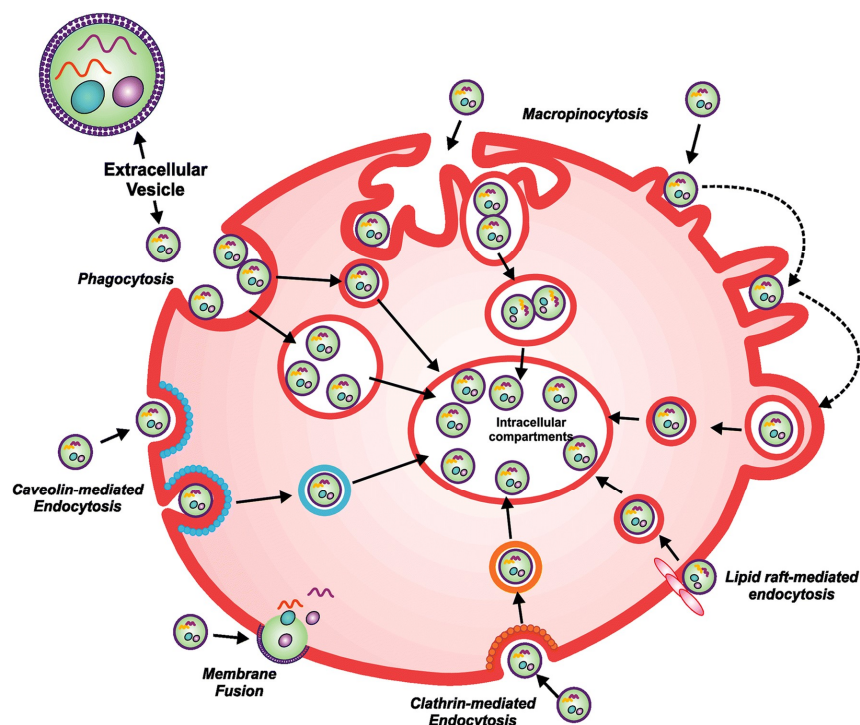
As funções das EVs nos processos fisiopatológicos dependem da capacidade de transferências das EVs, ou seja, capacidade de interagir com as células receptoras para liberar seu conteúdo (RAPOSO;STOORVOGEL, 2013). Embora o mecanismo de transferência ainda não seja completamente elucidado, sabe-se que, uma vez na circulação, as EVs podem ser captadas por outras células por fusão com a membrana plasmática ou por processos de endocitose, incluindo endocitose mediada por clatrina, caveolina e jangada lipídica, macropinocitose e fagocitose (**Figura 3**) (MULCAHY et al., 2014; JADLI et al., 2020).

Em 2007, um estudo transferiu EVs de mastócitos de camundongos contendo RNAm e miRNA para mastócitos humanos e, como resultado, os mastócitos humanos passaram a expressar proteínas específicas de camundongos (VALADI et al., 2007). Esse trabalho mostrou, pela primeira vez, que EVs poderiam conter miRNA e RNAm, serem liberadas por um tipo celular, captadas por outro e, uma vez captadas, as EVs poderiam liberar seu conteúdo e, então, alterar funções celulares da célula receptora. Após esse estudo, diversos outros mostraram mecanismos similares e, atualmente, as EVs são consideradas importantes mediadores da comunicação intercelular, envolvidas com diversas funções fisiopatológicas (MELDOLESI, 2018).

Dados recentes indicam que as EVs podem desempenhar um papel importante na obesidade e em suas complicações metabólicas, realizando a comunicação intercelular entre tecido adiposo, fígado, musculo esquelético e células do sistema imune (HUANG-DORAN et al., 2017; MORI et al., 2019). Adicionalmente, já foi demonstrado que o quadro de obesidade

está associado com um aumento no número de EVs circulantes e que há diferenças de expressão de miRNAs de EVs derivados do tecido adiposo entre indivíduos obesos e magros (STEPANIAN et al., 2013; FERRANTE et al., 2015).

Figura 3. Mecanismos de captação das vesículas extracelulares pelas células receptoras



Representação esquemática dos mecanismos de captação de vesículas extracelulares (EVs) por células receptoras. A adesão das EVs na membrana plasmática de células receptoras acontece por interação de receptores celulares com moléculas de superfície das EVs. Após adesão, as EVs são internalizadas ou por processos de endocitose (endocitose mediada por clatrina, caveolina e jangada lipídica, macropinocitose e fagocitose) ou por fusão com a membrana plasmática. Fonte: retirado de JADLI et al. (2020).

Com o intuito de entender melhor o envolvimento de miRNAs de EVs na comunicação entre tecidos na obesidade, objetivo desse trabalho foi o de investigar, na obesidade, o papel de vesículas extracelulares na regulação do metabolismo energético e identificar os miRNAs de EVs potencialmente envolvidos na comunicação entre os principais tecidos envolvidos com o metabolismo energético (fígado, músculo e tecido adiposo branco). A nossa hipótese foi a de que haveria diferença no conteúdo de miRNAs das EVs liberadas na circulação de camundongos obesos e, potencialmente, essas EVs poderiam ser captadas por diferentes tipos celulares. Uma vez captadas, o seu conteúdo de miRNA poderia ser liberado no citoplasma da célula-alvo, alterando sua função celular. Assim, ao isolar as EVs do soro, poder-se-ia

identificar miRNAs envolvidos na comunicação entre tecidos e seus potenciais efeitos metabólicos nos tecidos-alvo

Para responder as nossas perguntas, o trabalho foi dividido em quatro partes. A Parte I consistiu em induzir obesidade em camundongos da linhagem C57BL/6 por dieta hiperlipídica suplementada com leite condensado, caracterização do modelo e extração de EVs do soro desses animais. As EVs isoladas do soro de animais obesos foram utilizadas na Parte II (dividida em parte IIa e Parte IIb), que consistiu no tratamento de camundongos alimentados com dieta controle com o objetivo de investigar os possíveis efeitos metabólicos das EVs circulantes na obesidade. Uma vez que foi possível observar efeitos no metabolismo energético relacionados com as EVs, o seu conteúdo de miRNAs foi avaliado na Parte III do trabalho, que consistiu no sequenciamento de miRNAs das EVs do soro de animais controle e obesos e análise bioinformática das vias e genes-alvo dos miRNAs diferentemente expressos. A parte final, Parte IV, consiste na validação do sequenciamento e análises da expressão dos miRNAs validados nos tecidos de animais controle, obesos e tratados com EVs.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar, na obesidade, o papel de vesículas extracelulares na regulação do metabolismo energético e identificar os miRNAs de EVs potencialmente envolvidos na comunicação entre os principais tecidos envolvidos com o metabolismo energético (fígado, músculo e tecido adiposo branco).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e caracterizar EVs do soro de animais obesos e controle;
- Investigar a participação de EVs do soro de animais obesos no metabolismo energético de camundongos alimentados com dieta controle;
- Identificar potenciais miRNAs de EVs que participem da patogênese da obesidade e resistência à insulina.

PARTE I – INDUÇÃO DE OBESIDADE POR DIETA

3. METODOLOGIA

3.1. ANIMAIS

Camundongos machos da linhagem C57BL/6 foram obtidos do Biotério de Produção de Camundongos SPF da Faculdade de Medicina - Rede de Biotérios da Universidade de São Paulo com oito semanas de idade. Os animais, até o fim do experimento, foram mantidos em sala com ciclo claro/escuro de 12h, temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e 75% de umidade no Biotério de Experimentação do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Todos os procedimentos descritos foram submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (protocolo nº 54/2017).

3.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL – INDUÇÃO DE OBESIDADE

Animais com oito semanas de idade foram divididos de maneira aleatória em dois grupos experimentais:

- 1) Camundongos alimentados com dieta controle – Grupo controle (C);
- 2) Camundongos alimentados com dieta hiperlipídica suplementada com leite condensado – Grupo obeso (H).

Todos os animais receberam água e suas respectivas dietas (controle ou hiperlipídica suplementada com leite condensado) *ad libitum* por 12 semanas.

A composição detalhada das dietas pode ser observada na **Tabela 1**. Resumidamente, camundongos do grupo C receberam dieta controle (Cat.#156, PRAGSOLUÇÕES – Biociências, Jaú, SP, Brasil; 76% kcal carboidrato, 9% kcal gordura e 15% kcal proteínas), enquanto, os do grupo H receberam dieta hiperlipídica (Cat.#10, PRAGSOLUÇÕES – Biociências; 26% kcal carboidratos, 59% kcal gordura, 15% kcal proteínas) e leite condensado (Nestlé S.A., Vevey, Suíça; 55% kcal carboidratos, 8% kcal gordura, 7% kcal proteínas) com adição de 1% de mistura de vitaminas (Rhooster, São Paulo, Brasil). Cada grama de leite condensado contém 3,25 kcal.

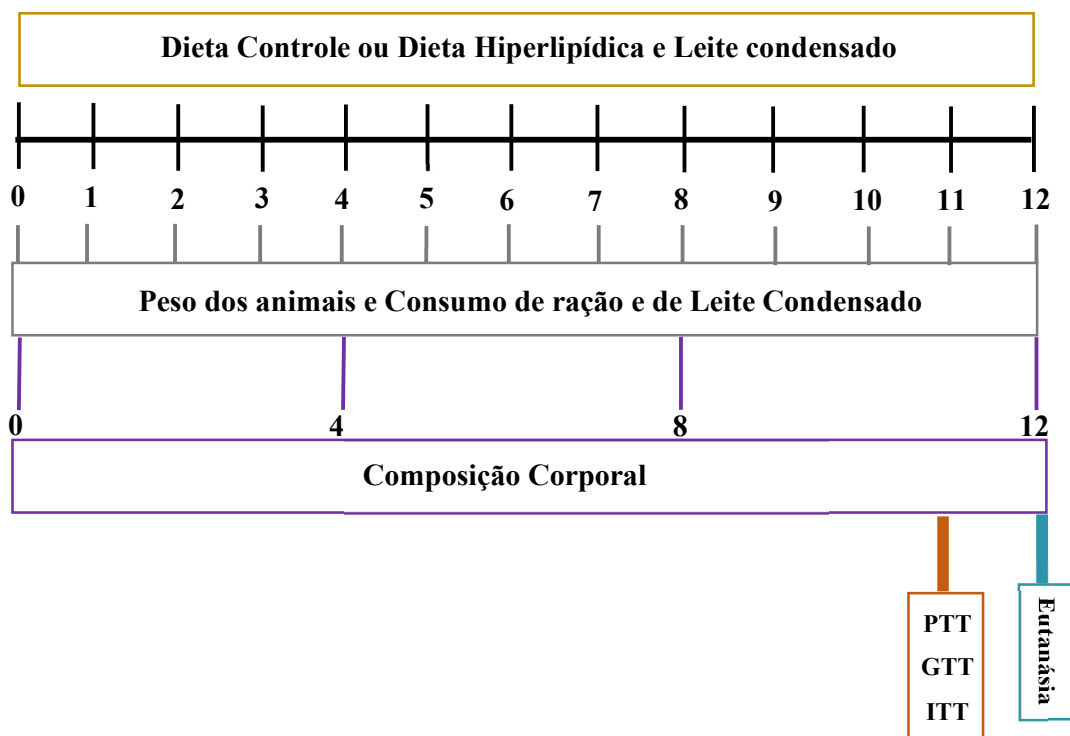
Ambas as dietas utilizadas seguem as recomendações do Instituto Americano de Nutrição para camundongos adultos (REEVES, 1997), diferindo na densidade energética – por conta de uma quantidade maior de banha suína e óleo de soja (dieta controle = 3.803kcal/kg de dieta e dieta hiperlipídica = 5.340 kcal/kg de dieta) e no conteúdo proteico (**Tabela 1**). Sabendo que camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, em comparação aos alimentados com dieta controle, comem uma quantidade menor de ração, aumentou-se a quantidade de proteína colocada na dieta hiperlipídica para evitar uma baixa ingestão proteica dos animais do grupo H.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais de acordo com o fabricante - dieta controle e hiperlipídica.

Macro/micronutriente	Ingredientes	Dieta Controle (%)	Dieta Hiperlipídica (%)
Carboidrato	Amido de milho	42,97	14,75
Proteína	Caseína	14,0	20,0
Carboidrato	Amido de milho dextrinizado	15,5	10
Carboidrato	Sacarose	10,0	10,0
Lipídio	Óleo de soja	4,0	4,0
Lipídio	Banha	3,6	31,2
Proteína	L-Cistina	0,18	0,3
Vitamina	Bitartarato de colina	0,25	0,25
Fibra	Celulose microcristalina	5,0	5,0
Mineral	Mix mineral AIN 93	3,5	3,5
Vitamina	Mix vit AIN 93	1,0	1,0
Total		100%	100%

O consumo de ração dos animais foi mensurado duas vezes por semana e, o ganho de peso, semanalmente. Antes do início da dieta e a cada quatro semanas, após seu início, a composição corporal dos animais foi avaliada. Durante a última semana de dieta, os testes de tolerância à glicose (GTT), ao piruvato (PTT) e à insulina (ITT) foram realizados. Com 12 semanas completas de dieta os animais foram, após seis horas em jejum, eutanasiados. A **Figura 4** ilustra o desenho experimental. Amostras de sangue total foram coletadas para análises bioquímicas e extração de EVs (utilizados para o tratamento – Parte IIa e IIb). Amostras da gordura epididimal, retroperitoneal, inguinal e marrom interescapular, do fígado e dos músculos gastrocnêmio e sóleo foram pesadas e coletadas para análises moleculares e/ou histológicas. Para avaliação da adiposidade, a gordura mesentérica também foi pesada.

Figura 4. Desenho experimental – Indução de obesidade por dieta hiperlipídica suplementada com leite condensado.

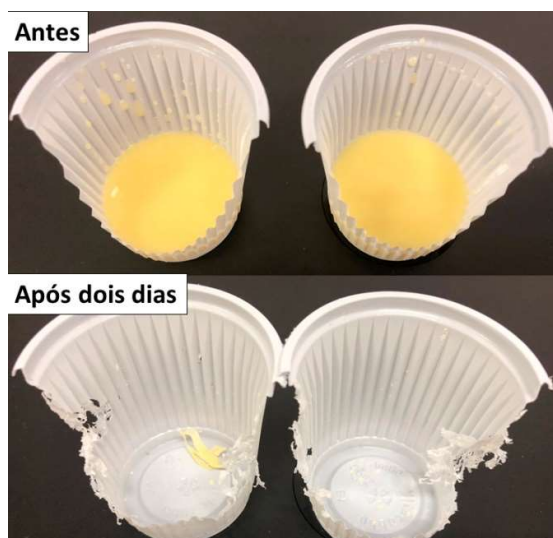


3.3. INGESTÃO ALIMENTAR E GANHO DE PESO

A ração era ofertada de acordo com os seguintes cálculos: 4g de ração controle/animal/dia e 3g de ração hiperlipídica/animal/dia. A partir do início da dieta, o peso dos animais foi mensurado semanalmente e, o consumo de ração, duas vezes por semana. O consumo de ração diária por animal foi calculado através da subtração da quantidade de ração ofertada pela sobra de ração, em gramas, por caixa. Esse valor foi posteriormente dividido pelo número de dias que a ração ficou disponível e pelo número de animais presentes na caixa.

O leite condensado foi ofertado em copinhos plásticos para os animais (**Figura 5**). Esse era adicionado aos copinhos que, então, eram pesados e colocados na caixa dos animais. O consumo de leite condensado foi calculado através da subtração da quantidade ofertada de leite condensado pela sobra presente nos copinhos e o conteúdo derramado na caixa, em gramas, por caixa. Esse valor foi posteriormente dividido pelo número de dias que o leite condensado ficou disponível e pelo número de animais presentes na caixa.

Figura 5. Copinhos contendo leite condensado antes e após serem ofertados aos animais do grupo H.



3.4. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO CORPORAL

A quantidade de fluidos corporais, gordura e massa magra foi determinada, nos animais vivos, por ressonância magnética nuclear no domínio do tempo (TD-NMR, do inglês *Time-domain nuclear magnetic resonance*), utilizando o analisador de composição corporal de

camundongos LF50 (Bruker Optics, Billerica, MA, EUA). As quantidades encontradas são comparadas com a massa corporal total para adquirir a percentagem relativa de gordura, massa magra e fluido. A composição corporal dos animais foi realizada antes do início da dieta (tempo 0) e a cada quatro semanas (semanas 4, 8 e 12) após o início da dieta.

3.5. TESTE DE TOLERÂNCIA AO PIRUVATO

Animais em restrição alimentar de 16 horas receberam sobrecarga de piruvato (2 mg/g de peso corpóreo) por injeção intraperitoneal. Retirou-se sangue da cauda dos animais e, utilizando um glicosímetro (Accu-Chek Performa - Bayer, Basileia, Suíça), determinou-se a glicemia nos tempos 0 (pré-injeção), 10, 20, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos após a injeção de piruvato. Os valores glicêmicos obtidos foram utilizados para construção de uma curva glicêmica, onde sua área sob a curva (AUC, do inglês *area under the curve*) foi calculada.

3.6. TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE

Animais em restrição alimentar de seis horas receberam sobrecarga de glicose (2 mg/g de peso corpóreo) por injeção intraperitoneal. Realizou-se coleta de 5 µL de sangue retirado da cauda dos animais nos tempos 0 (pré-injeção), 15, 30, 45, 60 e 90 minutos após a injeção de glicose. Após coleta, as amostras foram diluídas em 20 µL de ácido tricloroacético 5% (TCA 5%), um precipitante de proteínas utilizado com o intuito de impedir glicólise e, conseqüentemente, alteração na concentração plasmática de glicose após coleta do sangue. As amostras diluídas (1:5) em TCA 5% foram centrifugadas a 4.000 rpm por 2 minutos a 4°C e o sobrenadante foi armazenado (-30°C) em novo tubo para determinação da glicemia, realizada utilizando o *kit* Glicose Liquiform (Ref. 133 - Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. De maneira resumida, 2 µL do sobrenadante obtido e 200 µL do *Reagente 1* foram pipetados por poço em placas estéreis de 96 poços. Em seguida a placa foi encubada por 10 minutos a 37°C e lida no comprimento de onda de 505 nm no espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices, San Jose, CA, EUA). As absorbâncias obtidas foram utilizadas para o cálculo da glicemia por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \left(\frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do padrão}} \right) \times 500$$

Os valores glicêmicos obtidos foram utilizados para construção de uma curva glicêmica, onde sua AUC foi calculada.

3.7. TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA

Animais em restrição alimentar de seis horas receberam uma dose de 0,75 mU/g de peso corpóreo de insulina regular (Novolin R, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) por injeção intraperitoneal. Para construção da curva glicêmica, retirou-se sangue da cauda dos animais e, utilizando um glicosímetro (Accu-Chek Performa - Bayer) determinou-se a glicemia nos tempos 0 (pré-injeção), 4, 8, 12, 16 e 20 minutos após a injeção de insulina. A glicemia obtida foi utilizada para calcular a taxa de desaparecimento da glicose plasmática (kITT) por meio da seguinte fórmula:

$$kITT (\%/min) = \frac{0,693}{t_{1/2}}$$

Na fórmula o $t_{1/2}$ é a meia vida da glicose plasmática, ou seja, o tempo necessário para reduzir a glicemia basal pela metade, calculado a partir da inclinação da curva decaimento da glicose obtida nos tempos de 4 a 16 minutos durante sua fase linear (BONORA et al., 1989).

3.8. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Amostras de sangue total, obtidas após a eutanásia, foram coletadas em tubo seco e, após duas centrifugações, o soro foi obtido. A primeira centrifugação foi feita com rotação de 3.000 rpm por 10 minutos a 4°C onde o sobrenadante foi aspirado e transferido para um novo tubo para a realização da segunda centrifugação, realizada com rotação de 13.500 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado, transferido para um novo tubo e armazenado a -30°C até as dosagens de colesterol total (CT), triglicerídeos (TG) e colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-C). Os resultados obtidos das dosagens de CT, TG e HDL-C foram utilizados para o cálculo da concentração sérica de colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C).

3.8.1. Dosagem sérica de colesterol total

Para a determinação da concentração de CT do soro, foi utilizado o *kit* Colesterol Liquiform (Ref. 76 – Labtest Diagnóstica), seguindo as instruções do fabricante. De maneira resumida, 2 µL de soro (ou padrão) e 200 µL de *Reagente 1* foram pipetados por poço em placas estéreis de 96 poços. Em seguida a placa foi encubada por 10 minutos a 37°C e lida no comprimento de onda de 500 nm no espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices).

As absorvâncias obtidas foram utilizadas para o cálculo da concentração sérica de CT por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = \left(\frac{\text{Absorvância da amostra}}{\text{Absorvância do padrão}} \right) \times 200$$

3.8.2. Dosagem sérica de triglicerídeos

Para a determinação da concentração de triglicerídeos do soro, foi utilizado o *kit* Triglicérides Liquiform (Ref. 87 – Labtest Diagnóstica), seguindo as instruções do fabricante. Em síntese, 2 µL de soro (ou padrão) e 200 µL do *Reagente 1* foram pipetados por poço em placas estéreis de 96 poços. Em seguida a placa foi encubada por 10 minutos a 37°C e lida no comprimento de onda de 505 nm no espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices). As absorvâncias obtidas foram utilizadas para o cálculo da concentração sérica de TG por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Triglicerídeos (mg/dL)} = \left(\frac{\text{Absorvância da amostra}}{\text{Absorvância do padrão}} \right) \times 200$$

3.8.3. Dosagem sérica de HDL-C

Para a determinação da concentração de HDL-C no soro, foi utilizado o *kit* Colesterol HDL (Ref. 13 – Labtest Diagnóstica), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, 5 µL de soro e 5 µL do *Precipitante* foram adicionados em um tubo de 0,6 mL. O tubo foi agitado por 30 segundos e centrifugado a 3.500 rpm por 15 minutos a 4°C, formando um precipitado. A seguir, 2 µL do sobrenadante (ou padrão) e 200 µL do *Reagente 1* do *kit* Colesterol Liquiform (Ref. 76 – Labtest Diagnóstica) foram pipetados por poço em placas estéreis de 96 poços. Em seguida a placa foi encubada por 10 minutos a 37°C e lida no comprimento de onda de 500 nm no espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices). As absorvâncias obtidas foram utilizadas para o cálculo da concentração sérica de HDL-C por meio da seguinte fórmula:

$$\text{HDL (mg/dL)} = \left(\frac{\text{Absorvância da amostra}}{\text{Absorvância do padrão}} \right) \times 40$$

3.8.4. Cálculo para a concentração sérica de LDL-C

Para encontrar a concentração sérica de LDL-C (em mg/dL) aplicou-se os resultados de CT, TG e HDL-C na fórmula $LDL-C = CT - HDL-C - TG/5$ (FRIEDEWALD et al., 1972). Essa fórmula só é válida se $TG < 400$ mg/dL.

3.9. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL

Primeiramente, extraiu-se o RNA total da gordura retroperitoneal, da epididimal e do fígado utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A extração de RNA total da gordura inguinal e do músculo gastrocnêmio foi realizada utilizando o *kit* de extração mirVana™ PARIS™ (Cat.#AM1560; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A concentração do RNA total foi mensurada usando o espectrofotômetro BioDrop uLite (BioDrop, Cambridge, Reino Unido). A pureza foi determinada pela razão A260/A280nm e A260/A230nm.

Após extração e quantificação do RNA total dos quatro tecidos, a síntese de cDNA foi realizada por *kit* comercial *High-Capacity cDNA reverse transcription* (Cat. #4374967; Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) partido de 1 µg de RNA total das amostras de gordura epididimal, inguinal e retroperitoneal; 750 ng de RNA total do músculo gastrocnêmio e 2 µg de RNA total do fígado. A reação foi realizada em termociclador (Veriti, Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante.

O cDNA obtido foi diluído (1:10) e então utilizado na análise de expressão gênica por PCR em tempo real (RT-qPCR) pelo método de detecção Sbyr Green (Cat. #A25741; PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix; Thermo Fisher Scientific). Para os genes *Tnfa* (Mn00443259_g1) e *Il6* (Mn99999064_m1), utilizou-se o método de detecção TaqMan™ (Cat.#4326702; TaqMan™ Universal PCR Master Mix, Thermo Fisher Scientific). Os *primers* utilizados estão descritos na **Tabela 2**. As reações de RT-qPCR foram realizadas em duplicata no aparelho QuantStudio3 (Applied Biosystems) e os resultados analisados pelo software QuantStudio™ Design & Analysis (Applied Biosystems). A expressão gênica relativa foi determinada pelo método matemático $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK;SCHMITTGEN, 2001). O gene de referência utilizado para as gorduras e para o músculo gastrocnêmio foi o *Hprt1*. O gene de referência utilizado para o fígado foi o *36b4*.

Tabela 2. Sequências dos primers utilizados para quantificação da expressão de RNAm por PCR em tempo Real.

Gene	Primer Forward (5' - 3')	Primer Reverse (5' - 3')
<i>36b4</i>	TAAAGACTGGAGACAAGGTG	GTGTACTCAGTCTCCACAGA
<i>Acc</i>	CCAGCAGATTGCCAACATC	ACTTCGGTACCTCTGCACCA
<i>Cebpa</i>	TAGGTTTCTGGGCTTTGTGG	TAGGTTTCTGGGCTTTGTGG
<i>Fabp3</i>	ATGACCGGAAGGTCAAGTCAC	CCCGTTCCACTTCTGCACAT
<i>Fabp4</i>	TGAAATCACCGCAGACGACA	ACACATTCCACCACCAGCTT
<i>Fasn</i>	GATTCGGTGTATCCTGCTGTC	CATGCTTTAGCACCTGCTGT
<i>Glut4</i>	CATTCCCTGGTTCATTGTGG	GAAGACGTAAGGACCCATAGC
<i>Hprt1</i>	CCTAAGATGAGCGCAAGTTGAA	CCACAGGACTAGAACACCTGCTAA
<i>Irs1</i>	CCCTCTCAACAGCAGTCCCT	TTACGCTATTGACGATCCTC
<i>Pgc1a</i>	CACCAAACCCACAGAAAACAG	GGGTCAGAGGAAGAGATAAAGTTG
<i>Ppara</i>	TCGAATATGTGGGGACAAGG	TCTTGCAGCTCCGATCACAC
<i>Pparg</i>	CAAACCTGATGGCATTGTGAG	ATCTTAACTGCCGGATCCAC
<i>Ucp1</i>	CTGATGAAGTCCAGACAGACAG	CCAGCATAGAAGCCCAATGA

3.10. ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Após eutanásia, as amostras de gordura retroperitoneal foram rapidamente coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C até análise da atividade enzimática da ATP-citrato liase (ACL) e da málica (EM).

Cada amostra foi subdividida em duas alíquotas de 50 mg de tecido pulverizado para homogeneizar separadamente o tecido com 250 µL do tampão de extração da ACL (pH - 8,0; MgCl₂ 20 mM, EDTA 1 mM e Tris-aminometano 100 mM) e 250 µL do tampão de extração

da EM (pH - 7,6; Tris-HCl 20 mM, MgCl₂ 1 mM, KCl 100 mM e Sacarose 250 mM). Os homogenatos foram centrifugados a 13.000 rpm durante 2 minutos a 4°C e os sobrenadantes resultantes foram utilizados para os procedimentos seguintes. As atividades de EM e ACL foram medidas de acordo com o método descrito por NEWSHOLME e WILLIAMS (1978) e CORRIGAN e RIDER (1983). A atividade das enzimas foi corrigida pela quantidade de proteína das amostras, quantificada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.11. EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS - FÍGADO

Parte do lóbulo direito do fígado foi pulverizado em condições de refrigeração por nitrogênio líquido. Aproximadamente 50 mg de tecido foi separado para a realização extração de lipídeos. Resumidamente, o tecido foi homogeneizado com tampão fosfato-salino e em seguida foi adicionado clorofórmio: metanol (2:1, v/v). Após 15 segundos de agitação, 400 µL de água foram adicionados. A amostra foi então centrifugada (12,000 rpm por 5 min 4°C) e a fase orgânica inferior foi coletada. Em seguida, mais 1 mL de clorofórmio foi adicionado aos tubos que a fase orgânica tinha sido coletada. Esses tubos foram novamente centrifugados e a fase inferior orgânica coletada (no mesmo tubo da fase orgânica anteriormente coletada). Para evaporação do solvente as amostras foram colocadas no concentrador de amostras por 2 h sem aquecimento (Eppendorf Concentrator plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Os lipídios secos foram então ressuspensos em 200 µL de isopropanol. A solução final foi utilizada para quantificar a concentração de colesterol total e de triglicerídeos, utilizando *kits* colorimétricos específicos (conforme descrito nas seções 3.8.1 e 3.8.2, respectivamente). Os resultados obtidos foram normalizados pela massa de tecido usada para extração.

3.12. ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Análises histológicas do fígado, da gordura marrom interescapular e da gordura inguinal foram realizadas. Todas as fotografias foram obtidas usando uma câmera digital (Nikon DMX1200 - Nikon Instruments, Inc., Melville, EUA) acoplada a um microscópio (Leica DMIRB - Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha).

3.12.1. Fígado

O fígado foi incluindo em parafina e secções de 5 µm de espessura foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para análise histológica. A histologia hepática foi avaliada e

classificada de forma cega por dois observadores independentes utilizando um sistema de pontuação para doença hepática gordurosa não alcoólica (NALFD, do inglês *non-alcoholic fatty liver disease*) para roedores (LIANG et al., 2014). O escore da NALFD baseia-se em uma análise semiquantitativa de esteatose (esteatose macrovesicular, esteatose microvesicular e hipertrofia) e inflamação (número de focos inflamatórios/campo), onde cada subcategoria de esteatose e inflamação pode receber um escore que varia de 0 a 3. Portanto a o escore de esteatose total varia de 0 a 9 e, o de inflamação, de 0 a 3. Totalizando um escore de NALFD que pode variar entre 0 e 12.

Para a coloração *Oil Red-O* (ORO), parte do fígado foi fixada com paraformaldeído a 4% durante a noite e crioprotégida em 20% de sacarose. Solução estoque de ORO (3,5%) e solução de trabalho (três partes da solução estoque diluídas em duas partes de água destilada) foram preparadas. Crio secções com espessura de 10 μm foram secas, lavadas com água corrente por 3 minutos e então fixadas em formol 10% por 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas com 60% de isopropanol (10 minutos) e depois coradas com ORO (solução de trabalho, filtrada), durante 20 minutos. Após coloração, as lâminas foram lavadas e com água corrente durante 3 minutos, coradas com solução de hematoxilina (filtrada), durante 5 minutos e lavadas novamente com água corrente (3 minutos). A área com coloração positiva para ORO de cinco campos aleatórios de três cortes diferentes por animal foi quantificada usando o *plugin colour deconvolution* do software ImageJ (NIH, Bethesda, MD), conforme descrito por RUIFROK e JOHNSTON (2001).

3.12.2. Gordura inguinal e gordura marrom interescapular

A gordura inguinal e a gordura marrom interescapular foram fixadas em 4% de paraformaldeído (PFA) por 24 horas a 4°C. Após a fixação, as gorduras inguinal e marrom foram incubadas em 30% de sacarose e incorporadas no composto Tissue-Plus Optimal Cutting Temperature (OCT) (Fisher HealthCare, Houston, TX, EUA). Blocos de tecido congelados foram cortados em secções de 10 μm de espessura usando o criostato Leica CM3050 (Leica Biosystems) e corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise histológica. Para cada tecido, cinco campos aleatórios de três cortes diferentes por animal foram corados com HE foram fotografados em ampliação de 20x. As imagens da gordura inguinal foram analisadas segundo PARLEE et al. (2014).

3.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para todas as análises estatísticas o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Califórnia, USA) foi utilizado. O nível de significância foi estabelecido como $p < 0,05$. As legendas das figuras indicam o n amostral e a forma de expressão dos dados.

3.13.1. Variáveis quantitativas

Os dados foram testados em relação à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (teste F).

Para comparação entre os dois grupos de animais (H *versus* C), os testes t de Student bilateral para amostras independentes e U de Mann-Whitney bilateral para amostras independentes foram realizados, dependendo da normalidade e homogeneidade dos dados. Quando os dois grupos analisados apresentaram distribuição normal e populações homogêneas o teste t de Student foi realizado. Utilizou-se o teste U de Mann-Whitney nos casos em que esses parâmetros (normalidade e/ou homogeneidade) não foram atingidos.

Em algumas situações, o efeito da dieta (D) foi comparado ao longo do tempo (T) e, para isso, utilizou-se o teste de *Two-way* ANOVA em dados homogêneos quanto à variância e com distribuição normal. Quando se observou interação entre os dois fatores (DxT), o pós-teste de Bonferroni foi realizado.

3.13.2. Variáveis qualitativas

A variável contínua *tamanho dos adipócitos* (da gordura subcutânea inguinal) foi classificada em quatro categorias e o teste qui-quadrado de Pearson foi realizado para comparação entre os grupos C e H.

As variáveis discretas, *escore de esteatose*, *escore de inflamação* e *escore de NAFLD*, foram apresentadas em gráficos de frequência absoluta e, pelo n amostral não ser suficiente para o teste de qui-quadrado, não foi realizada análise estatística para comparação entre os grupos C e H.

3.13.3. Curva ROC

A partir da curva ROC (característica de operação do receptor do inglês, *receiver operating characteristic*), é possível saber se o modelo adotado (neste caso, o modelo de indução de obesidade por dieta) é capaz de distinguir duas populações distintas (animais magros e animais obesos). Essa distinção é feita por meio da determinação de um valor de corte. Nesse contexto, a curva ROC do ganho de peso foi utilizada para avaliar se animais alimentados com dieta hiperlipídica e leite condensado realmente desenvolveram obesidade. Assim, animais foram considerados como obesos quando seu ganho de peso era maior que o ponto de corte.

A curva ROC relacionou a sensibilidade e a especificidade para todos os pontos de corte possíveis. Uma vez plotada, a sua AUC é calculada. Os valores podem variar entre 0,5 (comportamento aleatório) e 1,0 (discriminação perfeita entre as populações). A escolha do melhor ponto de corte foi baseada na combinação dos maiores valores de sensibilidade e especificidade encontrados, refletindo na maior AUC possível.

4. RESULTADOS

4.1. PESO CORPÓREO E COMPOSIÇÃO CORPORAL

Realizou-se pesagem semanal para avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica suplementada com leite condensado no peso corpóreo dos animais (**Figura 6**). Para complementar os dados de peso, a composição corporal dos animais antes do início da dieta e a cada quatro semanas, também foi avaliada (**Figura 7**).

A **Figura 6** mostra a evolução do peso dos animais durante as 12 semanas do protocolo experimental, onde é possível observar que o peso inicial dos animais de ambos os grupos foi bastante similar. Entretanto, ao longo das semanas, os animais alimentados com dieta hiperlipídica e leite condensado (grupo H) foram apresentando peso maior, em comparação aos animais alimentados com dieta controle (grupo C) (**Figura 6A**; fator dieta, fator tempo e interação: $p < 0,001$). De fato, o peso corpóreo do grupo H, em comparação com o grupo C, foi considerado estatisticamente maior a partir da segunda semana de dieta (**Figura 6A**).

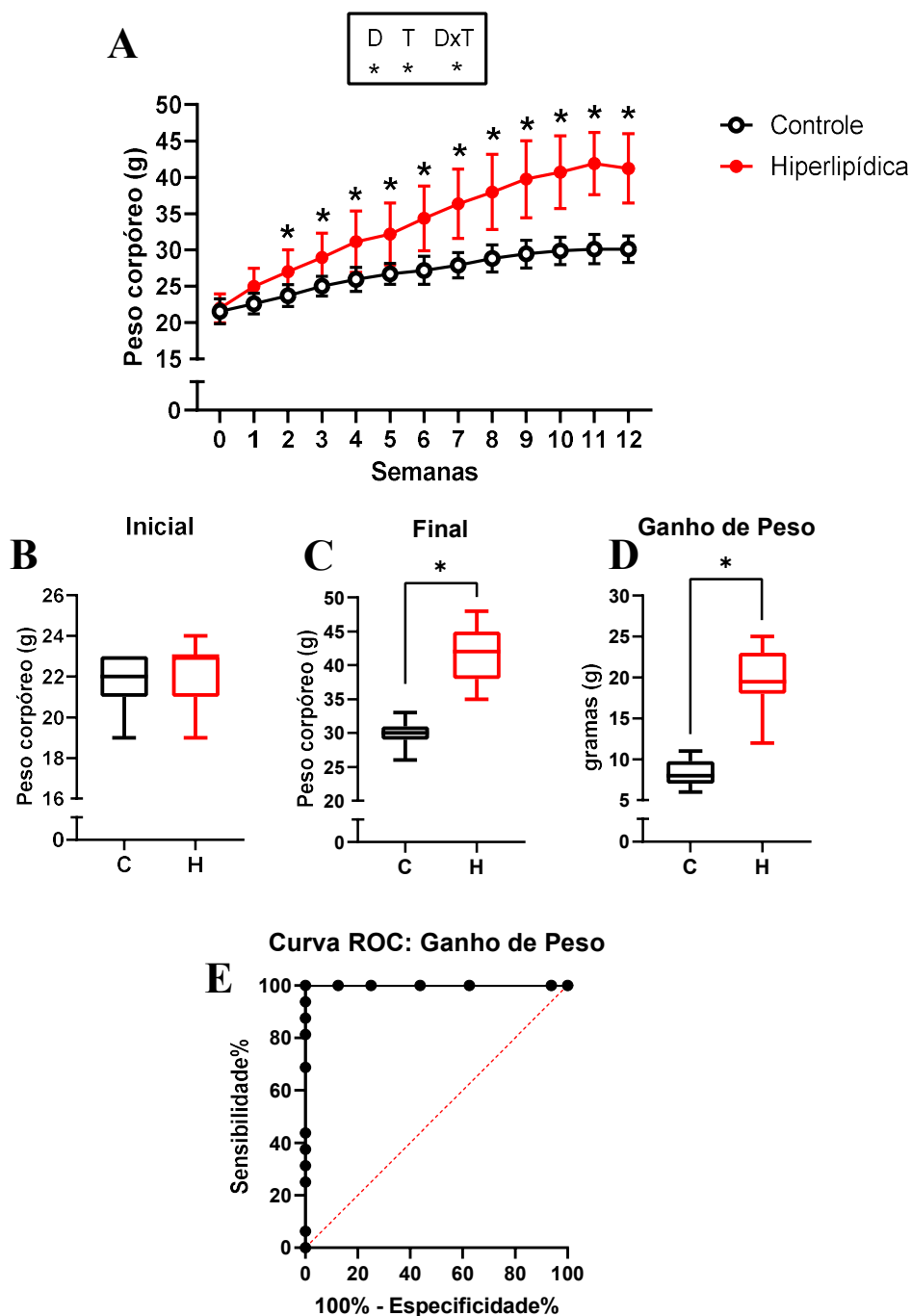
Para uma análise mais apurada da diferença de peso observada, comparou-se o peso inicial, o peso final e o ganho de peso entre os dois grupos experimentais. Não foi encontrada diferença estatística entre o peso inicial dos dois grupos (**Figura 6B**, $p = 0,590$), entretanto o peso final (**Figura 6C**, $p < 0,001$) e o ganho de peso (**Figura 6D**, $p < 0,001$) dos animais do grupo H foi, respectivamente, 40% e 135% maior do que o observado no grupo C.

Como o objetivo do trabalho envolve avaliar, na obesidade, a regulação do metabolismo energético via EVs, julgou-se necessário confirmar se animais alimentados com dieta hiperlipídica e leite condensado poderiam ser considerados como obesos. Assim, a curva ROC do ganho de peso foi uma alternativa estatística encontrada para encontrar o valor de corte do ganho de peso para separar as duas populações do estudo (animais obesos e magros). O resultado da análise da curva ROC do ganho de peso mostra que o ponto de corte de 11,50 g de ganho de peso reflete em uma especificidade e sensibilidade de 100%. Como consequência, a AUC correspondente é de 1,0, indicando que todos os animais que receberam dieta hiperlipídica e leite condensado poderiam ser considerados obesos (**Figura 6E**).

Em relação à composição corporal, pode-se observar que, antes do início da dieta, a composição percentual de gordura e massa magra era bastante semelhante entre os dois grupos (**Figura 7A**). Entretanto, após o início da dieta, nota-se que o grupo H apresentou um aumento mais acentuado na porcentagem de gordura, em comparação ao do grupo C, ao longo do

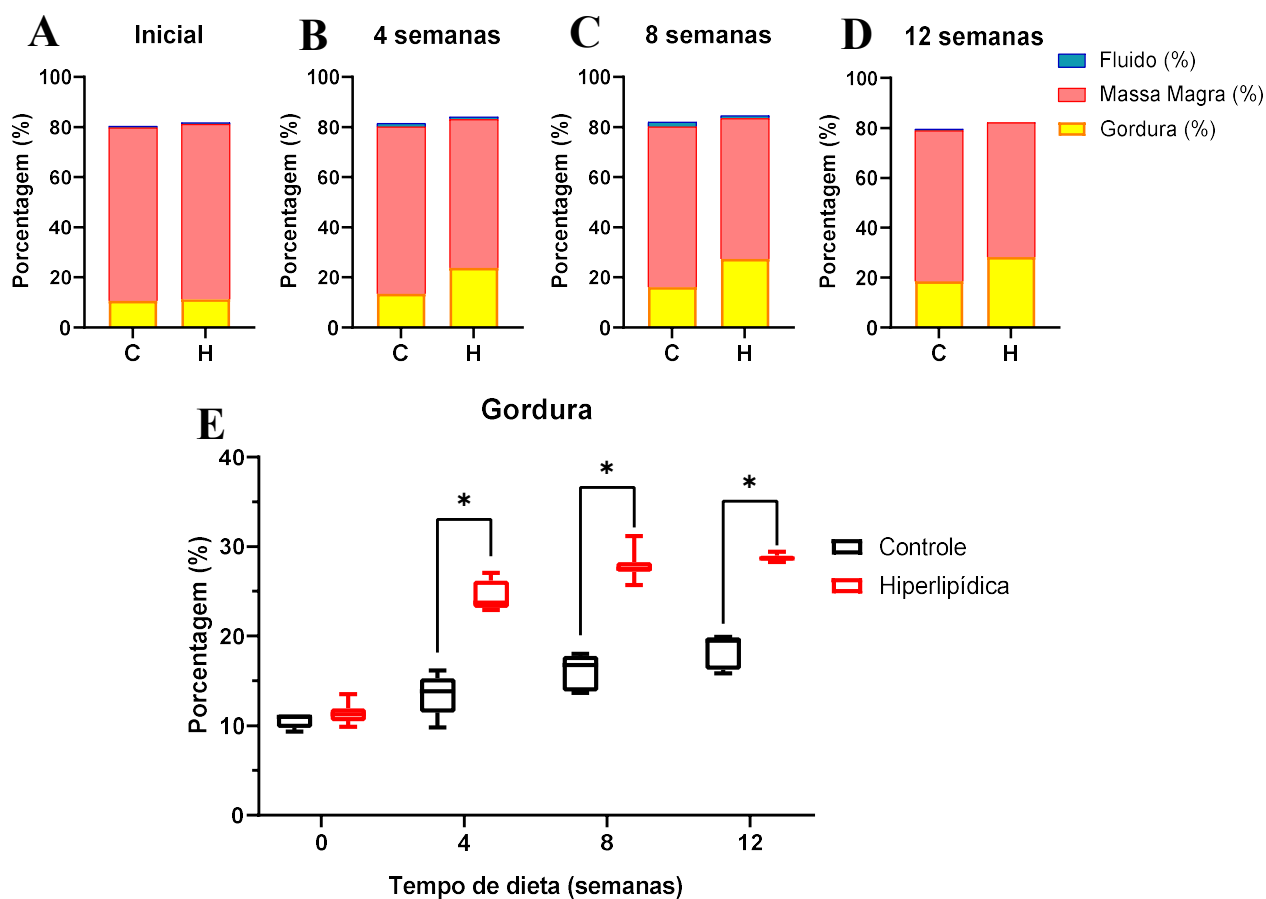
protocolo experimental (**Figura 7B-D**). De fato, não foi observada diferença estatística na composição de gordura entre os dois grupos experimentais antes do início da dieta (tempo 0; **Figura 7E**, $p = 0,200$). Entretanto, animais do grupo H, em comparação com o grupo C, apresentaram aumento na composição de gordura de 82%, 73% e 55% após quatro, oito e doze semanas de dieta, respectivamente (**Figura 7E**, $p < 0,001$ para os tempos de 4, 8 e 12 semanas).

Figura 6. Avaliação do peso corpóreo de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.



(A) Curva do peso corpóreo ao longo das 12 semanas do protocolo experimental; (B) Peso corpóreo no início do protocolo; (C) Peso corpóreo na semana final do protocolo; (D) Ganho de peso entre o começo e o final do protocolo; (E) Curva ROC do ganho de peso. *Two-Way* ANOVA seguida do pós-teste de Bonferroni (A) e Teste t de Student (B-D) foram realizados. *Two-Way* ANOVA avaliou o efeito da dieta (D), do tempo (T) e da interação (DxT). Dados apresentados como média \pm DP (A) e *boxplot* (B-D). C: n=16; H: n=18. *p < 0,05.

Figura 7. Avaliação da composição corporal de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.



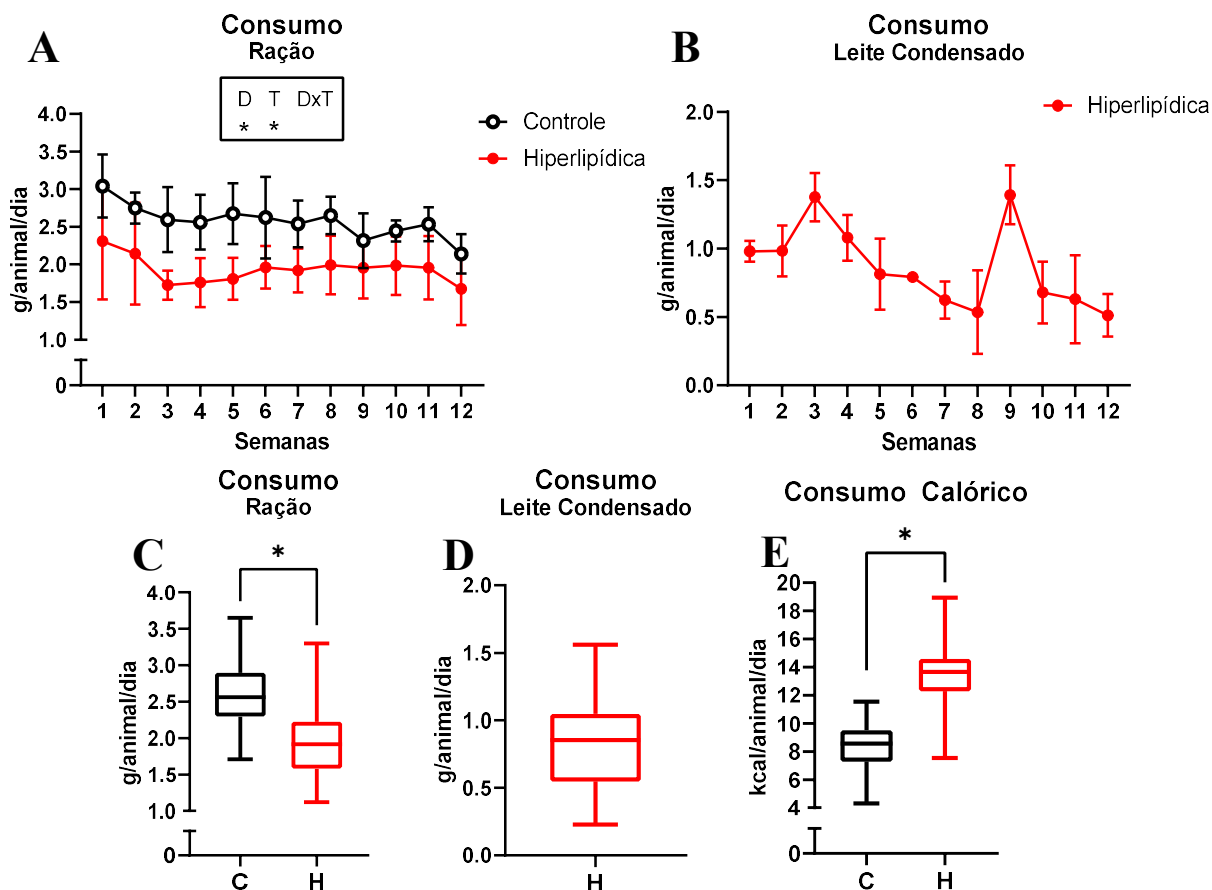
Composição percentual de gordura, massa magra e fluido (A) antes, (B) após quatro, (C) oito e (D) 12 semanas do início protocolo experimental; (E) Comparação do percentual de gordura entre os dois grupos experimentais nos mesmos tempos. Teste t de Student foi realizado (E). Dados apresentados como média (A-D) e *boxplot* (E). C: n=6; H: n=9. *p < 0,05.

4.2. CONSUMO DE RAÇÃO E LEITE CONDENSADO

As **Figura 8A** e **8B** ilustram, respectivamente, a média do consumo de ração (grupos C e H) e de leite condensado (apenas para o grupo H), em gramas, ao longo das semanas. A **Figura 8A** indica que os animais alimentados com dieta controle consumiram maior quantidade de ração, frente aos animais que receberam dieta hiperlipídica (fator dieta: $p < 0,001$; fator tempo: $p = 0,01$; interação: $p = 0,93$). Para confirmação, a média do consumo das 12 semanas foi calculada, onde foi possível mostrar que, de fato, o consumo de ração, em gramas, do grupo H foi 25% menor do que o consumo do grupo C (**Figura 8C**, $p < 0,001$). Em relação ao leite condensado, seu consumo médio, pelos animais do grupo H, foi de 0,87 g/animal/dia (**Figura 8D**), refletindo um consumo calórico médio de leite condensado de 2,83 kcal/animal/dia.

Com base no consumo alimentar, em gramas, e na quantidade de calorias por grama de ração (controle: 3,803 kcal; hiperlipídica: 5,34kcal) e de leite condensado (3,25 kcal), calculou-se o consumo calórico dos animais. Para os animais do grupo H, somou-se a quantidade de calorias da ração e de leite condensado ingeridas. Comparou-se então o consumo calórico dos animais do grupo C com o dos animais do grupo H e foi possível observar que os animais do grupo H consumiam uma quantidade calórica 63% maior, em comparação com o grupo C (**Figura 8E**, $p < 0,001$).

Figura 8. Avaliação do consumo alimentar de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.



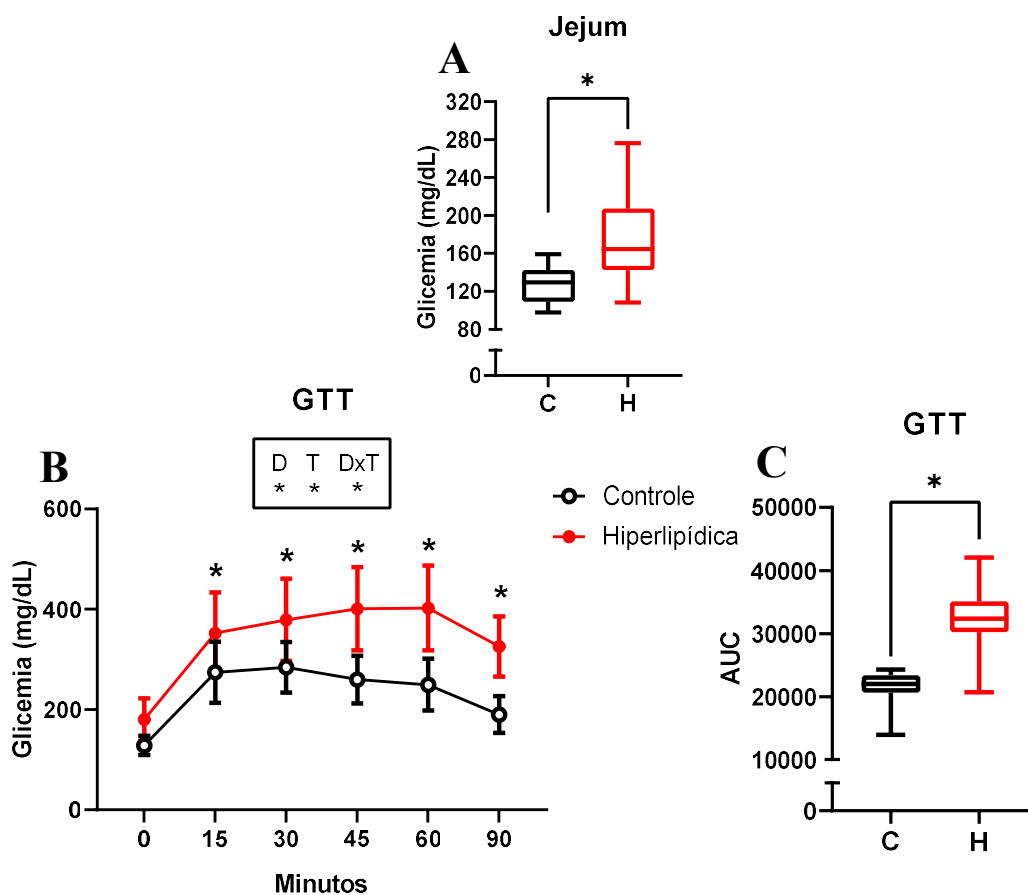
Curva do consumo em gramas de **(A)** ração e de **(B)** leite condensado ao longo das 12 semanas do protocolo experimental; Consumo médio de **(C)** ração e **(D)** leite condensado; **(E)** Consumo calórico (considerando ração e leite condensado). Dados avaliados por caixa, contendo entre 3-5 animais (C: 5 caixas; H: 6 caixas). *Two-Way* ANOVA (A) e Teste t de Student (C-E) foram realizados. *Two-Way* ANOVA avaliou o efeito da dieta (D), do tempo (T) e da interação (DxT). Dados apresentados como média \pm DP (A) e *boxplot* (C-E). * $p < 0,05$.

4.3. GLICEMIA DE JEJUM E RESPONSABILIDADE À GLICOSE

Durante a última semana experimental, os animais foram submetidos ao teste de tolerância à glicose (GTT). Os valores glicêmicos obtidos antes da injeção de glicose foram utilizados para a determinação da glicemia de jejum (**Figura 9A**). Os resultados obtidos antes (tempo 0) e após a injeção, foram utilizados para construção de uma curva glicêmica (glicemia vs. tempo) (**Figura 9B**) e da sua respectiva área sob a curva (AUC) (**Figura 9C**).

Animais do grupo H apresentaram hiperglicemia de jejum comparado aos do grupo C (**Figura 9A**, $p = 0,001$). Ao analisar a curva glicêmica do GTT, pode-se observar que animais do grupo H, em comparação com o grupo C, apresentaram, após a injeção de glicose, glicemia maior em todos os tempos analisados (**Figura 9B**; fator dieta: $p < 0,001$; fator tempo: $p < 0,001$; interação: $p = 0,03$). Refletindo o observado na curva glicêmica, os animais do grupo H apresentaram aumento de 52% na AUC do GTT em relação aos animais do grupo C (**Figura 9C**, $p < 0,001$). Assim, pode-se concluir que os animais apresentaram intolerância à glicose.

Figura 9. Avaliação da glicemia de jejum e da responsividade à glicose de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.



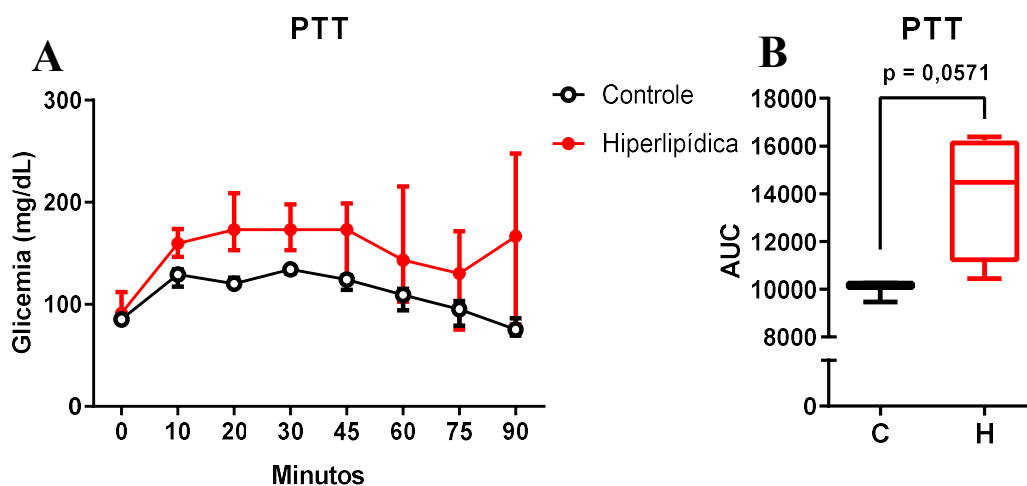
(A) Glicemia após seis horas de jejum; (B) Curva glicêmica do teste de tolerância à glicose (GTT); (C) Área sob a curva (AUC) do GTT. *Two-Way* ANOVA seguida do pós-teste de Bonferroni (A) e Teste t de Student (A e C) foram realizados. *Two-Way* ANOVA avaliou o efeito da dieta (D), do tempo (T) e da interação (DxT). Dados apresentados como média \pm DP (A) e *boxplot* (A e C). C: n=12; H: n=13. * $p < 0,05$.

4.4. RESPONSABILIDADE AO PIRUVATO

De maneira semelhante ao GTT, o teste de tolerância ao piruvato (PTT) foi realizado na última semana experimental. Os resultados obtidos antes (tempo 0) e após a injeção, foram utilizados para construção de uma curva glicêmica (glicemia *versus* tempo) (**Figura 10A**) e da sua AUC (**Figura 10B**).

Ao observar a curva glicêmica, é possível observar que os animais do grupo H apresentaram glicemia maior, em comparação com os animais do grupo C (**Figura 10A**), entretanto, como o tamanho da amostra utilizada para o teste foi pequeno, não foi possível analisar a curva glicêmica por *two-way* ANOVA. Refletindo o encontrado na curva glicêmica, a **Figura 10B** mostra que os animais do grupo H apresentaram uma tendência ($p = 0,0571$) em ter glicemia maior após estímulo com piruvato, uma vez que a AUC do PTT do grupo H foi 43% maior que o do grupo C, representando maior produção hepática de glicose.

Figura 10. Avaliação da responsividade ao piruvato de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.



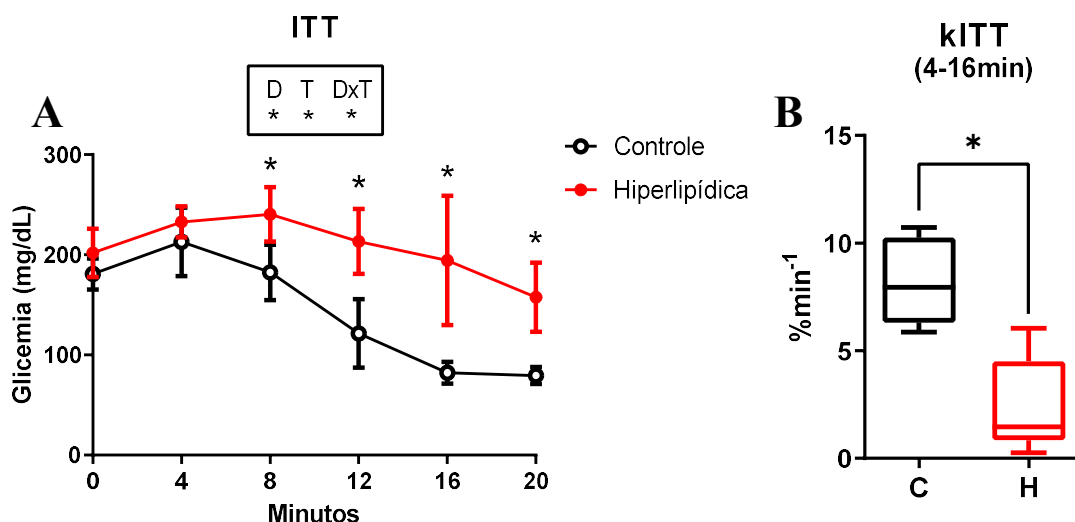
(A) Curva glicêmica do teste de tolerância ao piruvato (PTT); **(B)** Área sob a curva (AUC) do PTT. Teste U de Mann-Whitney (**B**) foi realizado. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil (**A**) e *boxplot* (**B**). C: n=3; H: n=4. * $p < 0,05$.

4.5. RESPONSABILIDADE À INSULINA

Os valores de glicemia obtidos após injeção de insulina foram utilizados para construção da curva de decaimento da concentração sanguínea de glicose (**Figura 11A**) e cálculo da constante de decaimento de glicose (kITT, **Figura 11B**).

Como pode ser observado na **Figura 11A**, animais do grupo H apresentaram glicemia maior que os animais do grupo C nos pontos de 8-20 minutos após a injeção (fator dieta, fator tempo e interação: $p < 0,001$). Refletindo o observado na curva de decaimento, animais do grupo H apresentaram valor de kITT 87% menor, em relação ao grupo C (**Figura 11B**, $p < 0,0002$). Tais resultados mostram maior uma resistência à insulina nos animais do grupo H.

Figura 11. Avaliação da responsividade à insulina de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.



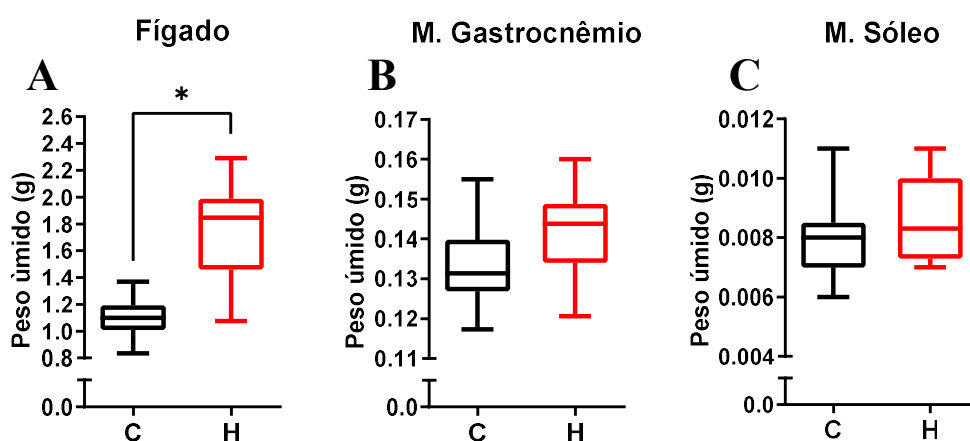
(A) Curva glicêmica do teste de tolerância à insulina (ITT); (B) Constante de decaimento da glicose (kITT). *Two-Way* ANOVA seguida do pós-teste de Bonferroni (A) e Teste t de Student (B) foram realizados. *Two-Way* ANOVA avaliou o efeito da dieta (D), do tempo (T) e da interação (DxT). Dados apresentados como média \pm DP (A) e *boxplot* (B). $n=7$ /grupo. * $p < 0,05$.

4.6. PESO ÚMIDO DOS TECIDOS

Para avaliar se o aumento do peso corpóreo e o maior percentual de gordura observado nos animais do grupo H foram acompanhados de um aumento do peso úmido dos depósitos de gordura, do músculo esquelético e do fígado, esses tecidos foram pesados.

O peso úmido do fígado foi 58,4% maior nos animais do grupo H, em comparação com o grupo C (**Figura 12A**, $p < 0,001$). Não foi observada diferença estatística entre os dois grupos experimentais no peso úmidos dos músculos gastrocnêmio (**Figura 12B**, $p = 0,14$) e sóleo (**Figura 12C**, $p = 0,17$).

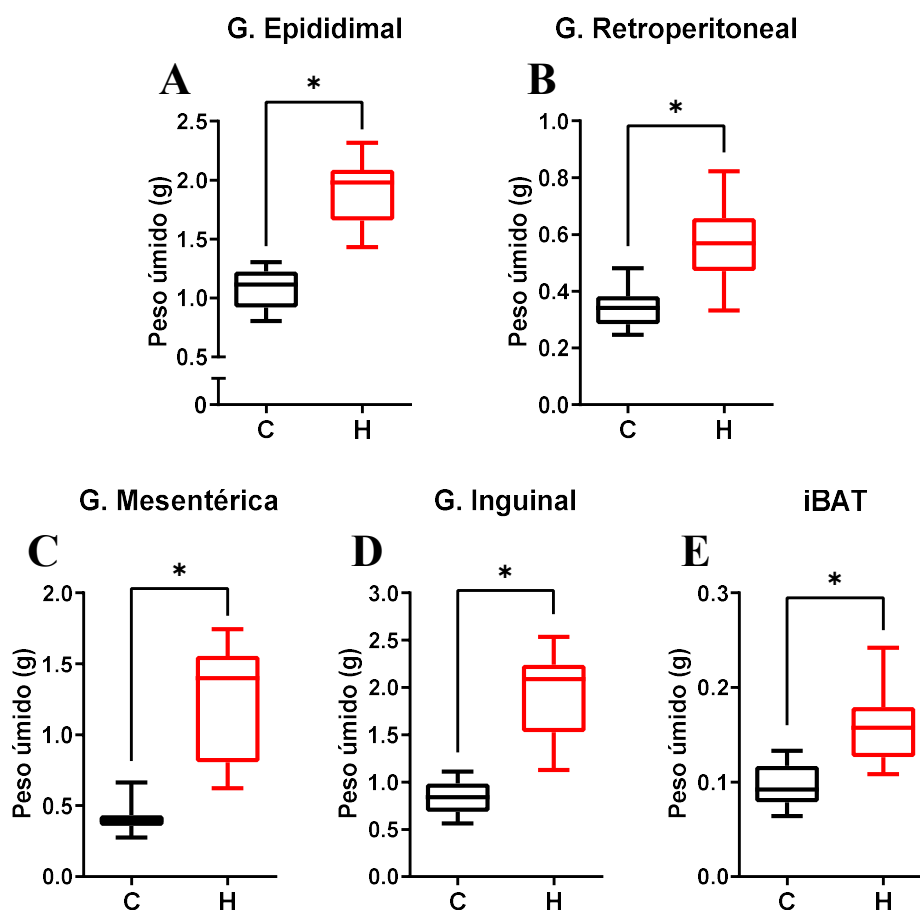
Figura 12. Peso úmido do fígado e músculos gastrocnêmio e sóleo de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.



(A) Fígado (C: n=13; H: n=14); (B) Músculo gastrocnêmio (C: n=12; H: n=15); (C) Músculo Sóleo (C: n=13; H: n=15). Teste t de Student foi realizado. Dados apresentados como *boxplot*. * $p < 0,05$.

Como esperado, o aumento do peso final, do ganho de peso e do percentual de gordura dos animais do grupo H também foi acompanhado por um aumento do peso úmido de todos os depósitos de gordura analisados (**Figura 13**). Animais do grupo H apresentaram aumento no peso úmido das gorduras epididimal (aumento de 76%; **Figura 13A**, $p < 0,001$), retroperitoneal (aumento de 65%; **Figura 13B**, $p < 0,001$), mesentérica (aumento de 217%; **Figura 13C**, $p < 0,001$), inguinal (aumento de 131%; **Figura 13D**, $p < 0,0001$) e gordura marrom interescapular (aumento de 65%; **Figura 13E**, $p < 0,001$), em comparação com o grupo C.

Figura 13. Peso úmido das gorduras coletadas de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.

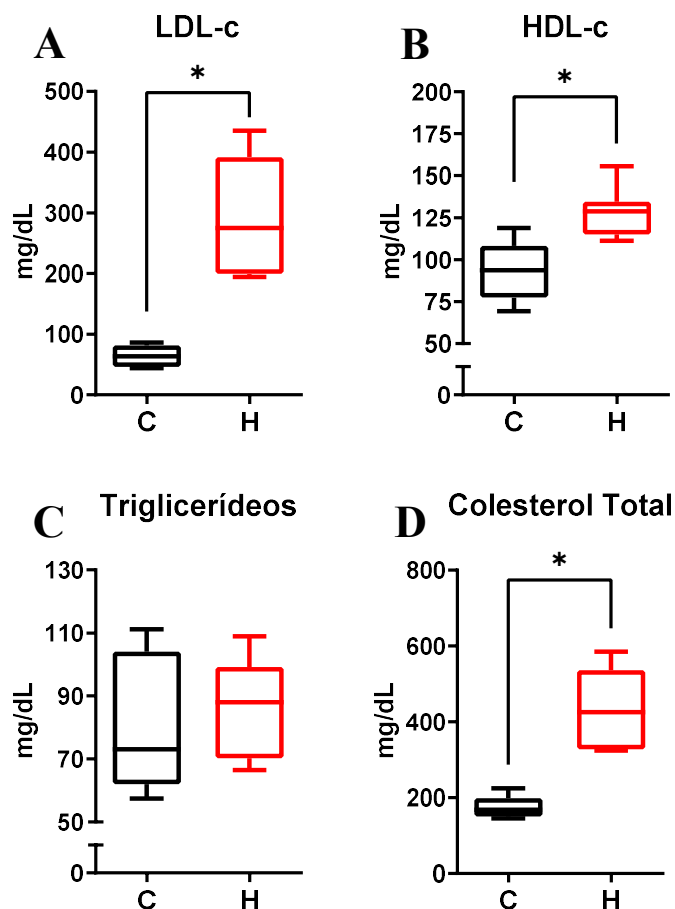


(A) Gordura Epididimal (C: n=13; H: n=15); **(B)** Gordura retroperitoneal n=13/grupo; **(C)** Gordura mesentérica (C: n=13; H: n=14); **(D)** Gordura inguinal (C: n=13; H: n=15); **(E)** Gordura marrom interescapular (C: n=13; H: n=14). Teste t de Student foi realizado. Dados apresentados como *boxplot*. *p < 0,05.

4.7. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Animais alimentados com dieta hiperlipídica e leite condensado apresentaram aumento de 152%, 38% e 331% dos níveis séricos de colesterol total (**Figura 14A**, $p = 0,0025$), HDL-C (**Figura 14B**, $p = 0,0101$) e LDL-C (**Figura 14D**, $p = 0,0025$), respectivamente. Não foi observada diferença entre os grupos H e C em relação aos níveis séricos de triglicerídeos (**Figura 14C**, $p = 0,6616$).

Figura 14. Análise bioquímica do soro de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.



Dosagens séricas de **(A)** LDL-c, **(B)** HDL-c, **(C)** Triglicerídeos e **(D)** Colesterol Total. Teste U de Mann-Whitney foi realizado. Dados apresentados como *boxplot*. C: n=5; H: n=7. *p < 0,05.

4.8. EXPRESSÃO DE RNAM – FÍGADO, MÚSCULO E GORDURAS

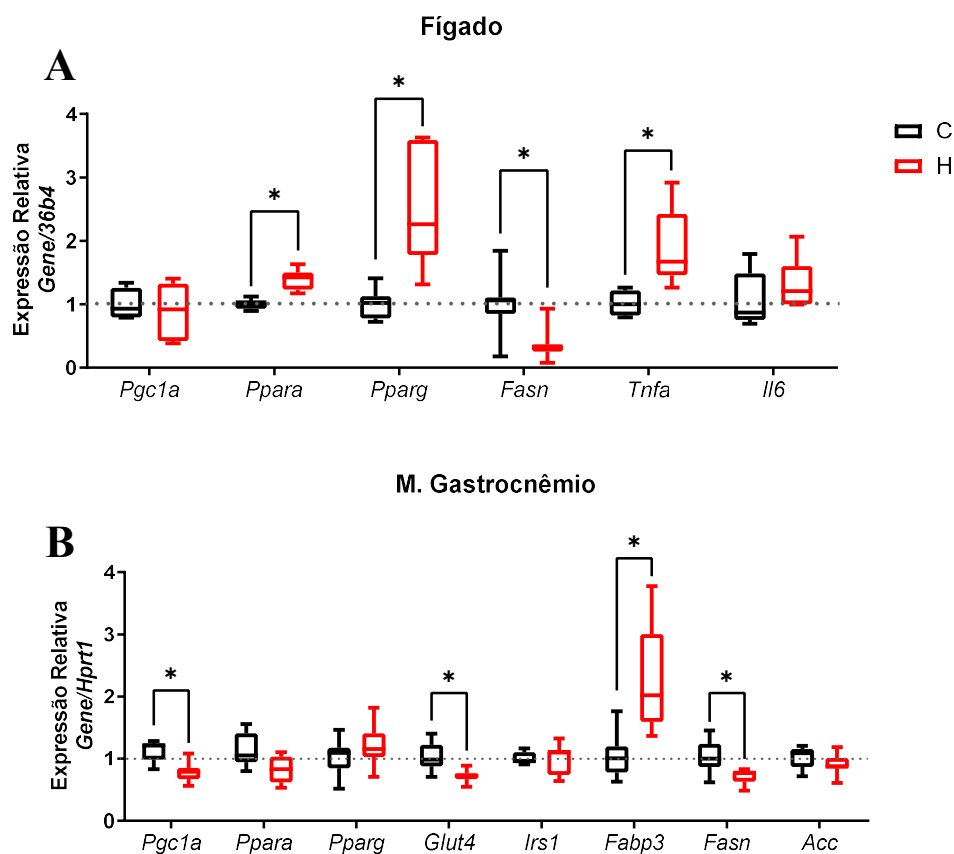
Analisou-se a expressão de genes relacionados com a oxidação de ácidos graxos (*Pgcl1* e *Ppara*), adipogênese e metabolismo de lipídeos (*Pparg*, *Cepba*), captação de glicose (*Glut4*), sinalização da insulina (*Irs1*), captação de ácidos graxos (*Fabp3* e *Fabp4*), lipogênese (*Fasn* e *Acc*), termogênese (*Ucp1*) e inflamação (*Tnfa* e *Il6*) nos depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e inguinal, no músculo gastrocnêmio e no fígado.

No fígado (**Figura 15A**), foi possível observar que o grupo H, em comparação com o grupo C, apresentou expressão 40%, 149% e 86% maior de *Ppara* (p = 0,0022), *Pparg* (p = 0,0022) e *Tnfa* (p = 0,0022), respectivamente. A expressão de *Fasn* foi 63% menor no grupo H

(Figura 15A, $p = 0,0022$). Não foi observada diferença na expressão de *Pgc1a* ($p = 0,69$) e *Il6* ($p = 0,32$) entre os dois grupos experimentais (Figura 15A).

No músculo gastrocnêmio (Figura 15B), a expressão de *Fabp3* ($p = 0,005$) foi 114% maior no grupo H, em relação com grupo C. Já a expressão de *Pgc1a* ($p = 0,003$), *Glut4* ($p = 0,009$) e *Fasn* ($p = 0,02$) foi, respectivamente, 31%, 29% e 31% menor no grupo H. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos C e H na expressão de *Ppara* ($p = 0,06$), *Pparg* ($p = 0,32$), *Irs1* ($p = 0,96$) e *Acc* ($p = 0,30$) (Figura 15B).

Figura 15. Expressão relativa de RNAm do fígado e do músculo gastrocnêmio de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.



(A) Fígado (C: n=4-7; H: n=5-7); (B) Músculo gastrocnêmio (C: n=6-7; H: n=7). *36b4* foi utilizado como constitutivo no fígado. *Hprt1* foi utilizado como constitutivo no músculo gastrocnêmio. Teste t de Student foi realizado. Dados apresentados como *boxplot*. * $p < 0,05$.

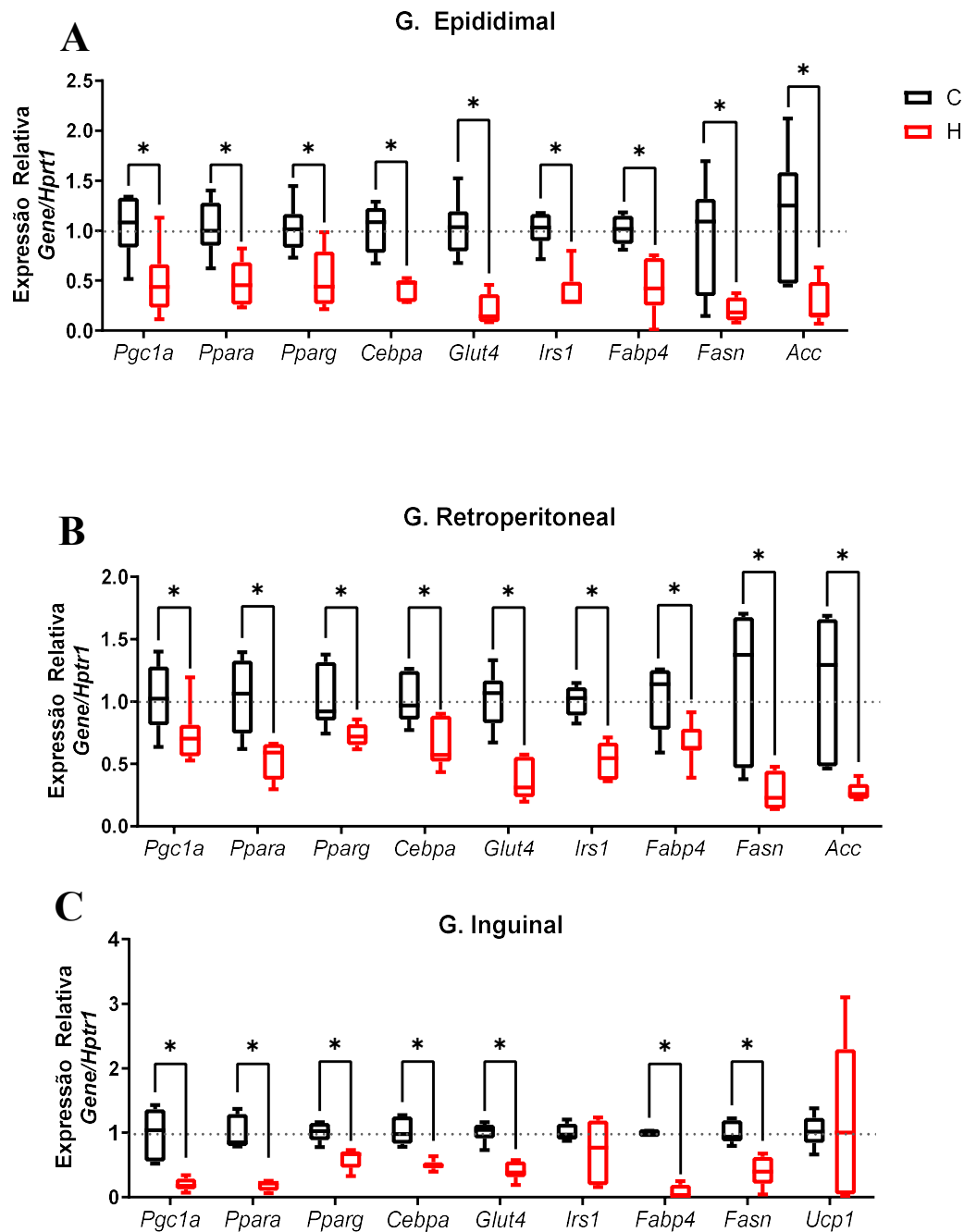
Na gordura epididimal (**Figura 16A**), todos os genes avaliados tiveram expressão reduzida no grupo H, em comparação com o grupo C: *Pgc1a* (redução de 54%; $p = 0,01$), *Ppara* (redução de 53%; $p = 0,002$), *Pparg* (redução de 50%; $p = 0,009$), *Cebpa* (redução de 59%; $p < 0,001$), *Glut4* (redução de 78%; $p < 0,001$), *Irs1* (redução de 60%; $p < 0,001$), *Fabp4* (redução de 56%; $p = 0,001$), *Fasn* (redução de 78%; $p = 0,006$), e *Acc* (redução de 78%; $p = 0,004$).

Os mesmos genes analisados na gordura epididimal foram analisados na gordura retroperitoneal (**Figura 16B**). De maneira semelhante, todos os genes avaliados tiveram expressão reduzida no grupo H, em comparação com o grupo C: *Pgc1a* (redução de 36%; $p = 0,01$), *Ppara* (redução de 49%; $p = 0,002$), *Pparg* (redução de 29%; $p = 0,01$), *Cebpa* (redução de 51%; $p < 0,001$), *Glut4* (redução de 63%; $p < 0,001$), *Irs1* (redução de 47%; $p < 0,001$), *Fabp4* (redução de 39%; $p = 0,009$), *Fasn* (redução de 77%; $p = 0,002$), e *Acc* (redução de 73%; $p = 0,005$).

Na gordura inguinal, além dos genes analisados nas gorduras epididimal e retroperitoneal, a expressão de *Ucp1* foi analisada. Não foi encontrada diferença estatística na expressão de *Irs1* ($p = 0,7922$) e *Ucp1* ($p > 0,99$) entre os dois grupos experimentais (**Figura 16C**). Entretanto, todos os outros genes avaliados (**Figura 16C**) tiveram expressão reduzida no grupo H, em comparação com o grupo C: *Pgc1a* (redução de 83%; $p = 0,0043$), *Ppara* (redução de 74%; $p = 0,010$), *Pparg* (redução de 35%; $p = 0,0022$), *Cebpa* (redução de 50%; $p = 0,0022$), *Glut4* (redução de 63%; $p = 0,0022$), *Fabp4* (redução de 98%; $p = 0,0238$) e *Fasn* (redução de 58%; $p = 0,0043$).

De modo geral, os resultados mostram que a dieta hiperlipídica suplementada com leite condensado foi capaz de alterar a expressão de genes importantes envolvidos com o metabolismo energético. No fígado, os resultados apontam para maior inflamação e acúmulo de gordura hepática. No músculo, para menor captação de glicose, oxidação de ácidos graxos e lipogênese, e maior captação de ácidos graxos. Já nas gorduras, tanto a captação de glicose como ativação da via da insulina se mostraram prejudicadas, além da diminuição de todos os genes envolvidos com o metabolismo de lipídeos. Tais resultados se deram provavelmente por um processo adaptativo em resposta do acúmulo de gordura excessivo e hipóxia e consequente lipotoxicidade, inflamação e resistência à insulina em decorrência da obesidade.

Figura 16. Expressão relativa de RNAm das gorduras epididimal, retroperitoneal e inguinal de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.

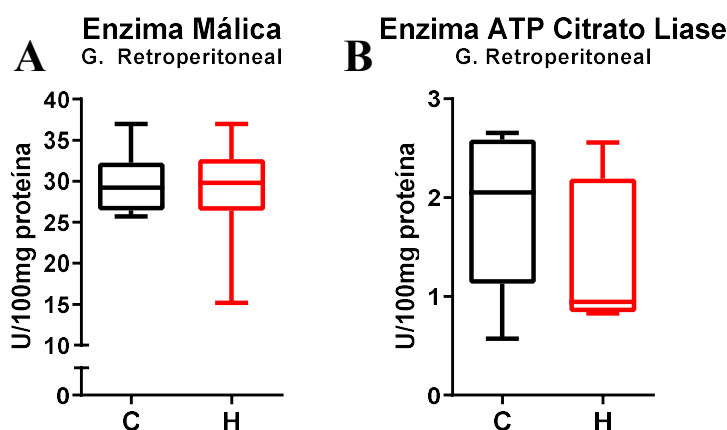


(A) Gordura epididimal (C: n=6; H: n=6-7); (B) Gordura retroperitoneal (C: n=6; H: n=7); (C) Gordura inguinal (C: n=3-6; H: n=4-6). O gene *Hprt1* foi utilizado como constitutivo para as três gorduras. Teste t de Student (A e B) e Teste U de Mann-Whitney (C) foram realizados. Dados apresentados como *boxplot*. * $p < 0,05$.

4.9. ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade das enzimas envolvidas com a lipogênese, enzima málica e ATP citrato liase, foi analisada na gordura retroperitoneal. Embora tenha sido observado menor expressão de genes relacionados com a lipogênese (*Fasn*, *Pparg*, *Acc*, *Cebpa*) na gordura epididimal, não foi observada diferença estatística na atividade da enzima málica (**Figura 17A**, $p = 0,9452$) e da ATP citrato liase (**Figura 17B**, $p = 0,3829$) entre os dois grupos experimentais.

Figura 17. Atividade de enzimas lipogênicas da gordura retroperitoneal de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.

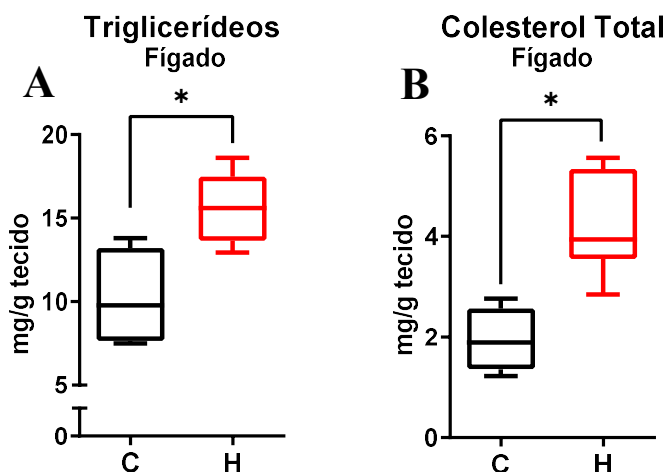


(A) Enzima málica e (B) Enzima ATP Citrato Liase. Teste U de Mann-Whitney foi realizado. Dados apresentados como *boxplot*. $n=7$ /grupo. $*p < 0,05$.

4.10. CONTEÚDO HEPÁTICO DE LIPÍDEOS

O conteúdo hepático de triglicerídeos (**Figura 18A**, $p = 0,0242$) e colesterol total (**Figura 18B**, $p = 0,0061$) foi, respectivamente, 52% e 124% maior no grupo H, em relação ao grupo C.

Figura 18. Conteúdo hepático de lipídeos de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.



(A) Triglicerídeos e **(B)** Colesterol Total. Teste t de Student foi realizado. Dados apresentados como *boxplot*. C: n=4; H: n=7. *p < 0,05.

4.11. ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Para investigar o impacto do consumo de dieta hiperlipídica suplementada com leite condensado por 12 semanas na morfologia do fígado e tecido adiposo de camundongos, realizou-se análise histológica do fígado, da gordura marrom interescapular e da gordura epididimal. No fígado, as análises foram realizadas para investigar esteatose hepática. Já nas gorduras, para investigar, principalmente, hipertrofia de adipócitos.

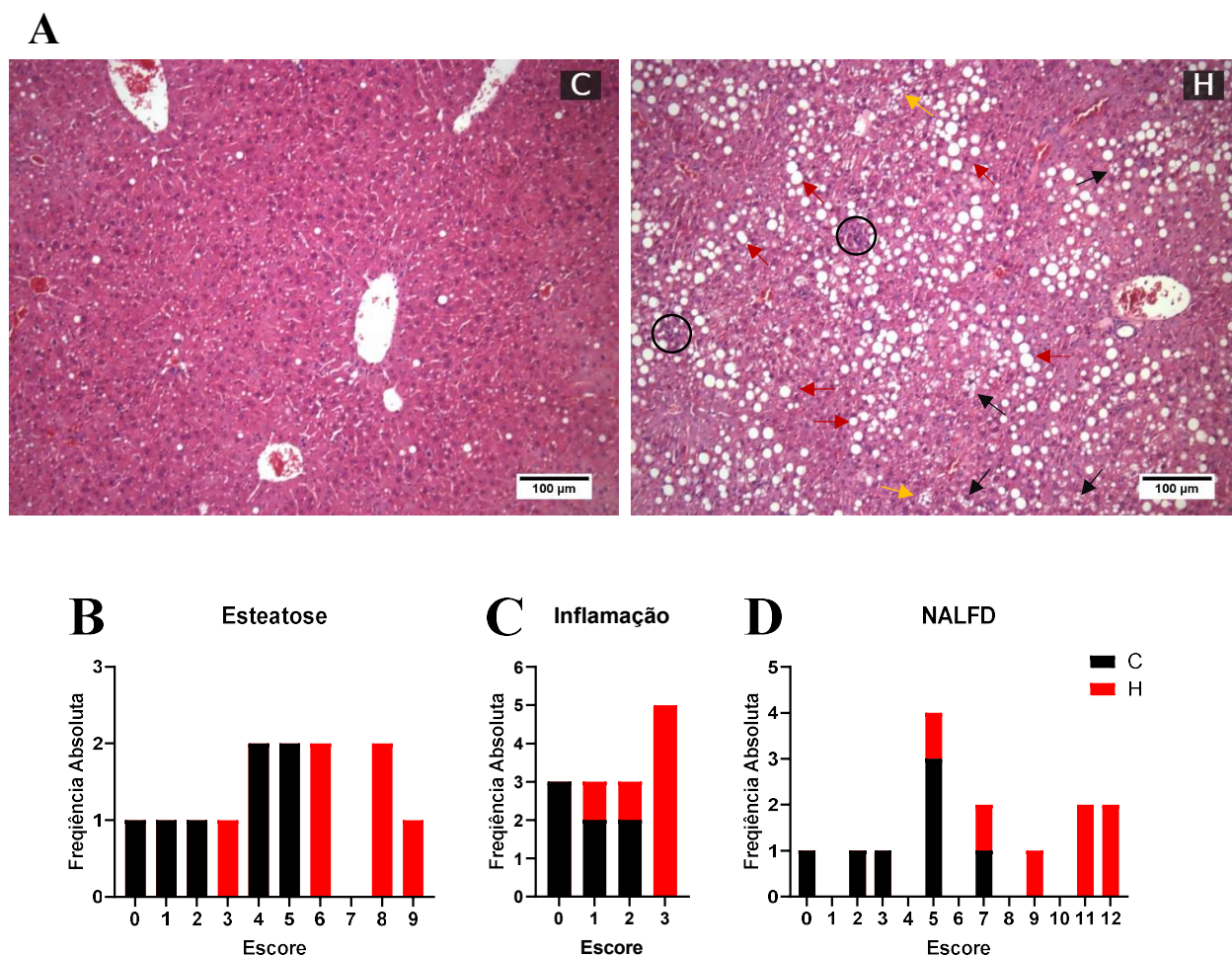
4.11.1. Fígado

Realizou-se histologia de fígado para analisar se camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e leite condensado apresentaram alterações morfológicas (**Figura 19**) e acúmulo de lipídeos (**Figura 20**), em comparação com os animais alimentados com dieta controle.

As fotos representativas da **Figura 19A** mostram a diferença morfológica entre os animais do grupo H e do grupo C. Refletindo o que foi observado pelas fotos, pode-se observar que, em comparação com o grupo C, um número maior de animais do grupo H apresentaram maior escore de esteatose (**Figura 19B**), de inflamação (**Figura 19C**) e, conseqüentemente, do escore de NALFD (**Figura 19D**).

Corroborando com os resultados morfológicos obtidos pela coloração de hematoxilina e eosina, as fotos representativas da **Figura 20A** mostram que animais do grupo H apresentaram maior marcação com *Oil Red O*, em relação ao grupo C. De fato, a análise de diferentes campos e cortes, de diferentes animais, mostrou que animais do grupo H, em comparação com o grupo C, apresentaram marcação 518% maior para o *Oil Red O* (**Figura 20B**, $p < 0,001$), indicando maior acúmulo hepático de lipídeos, principalmente triglicerídeos.

Figura 19. Análise morfológica hepática e avaliação do escore de esteatose e de inflamação em camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.

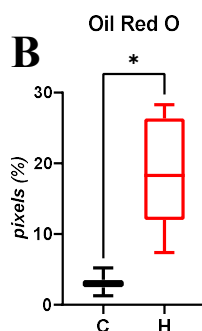
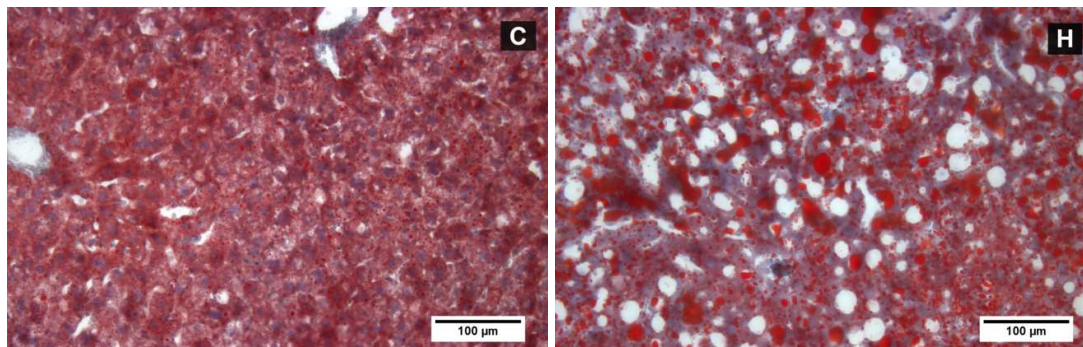


(A) Fotos representativas de cortes de fígado após coloração com hematoxilina e eosina – Tecido incluído em parafina; Espessura do corte = 5 μm ; Escala = 100 μm ; Aumento de 20x. Agregados inflamatórios: destacados em círculos; esteatose macrovesicular: setas de cor vermelha; esteatose microvesículas: setas de cor preta e hipertrofia: setas de cor. (B) Escore de

esteatose. (C) Escore de inflamação. (D) Escore de NALFD (soma dos escores de esteatose e inflamação). $n = 7/\text{grupo}$.

Figura 20. Análise do acúmulo hepático de lipídeos em camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.

A

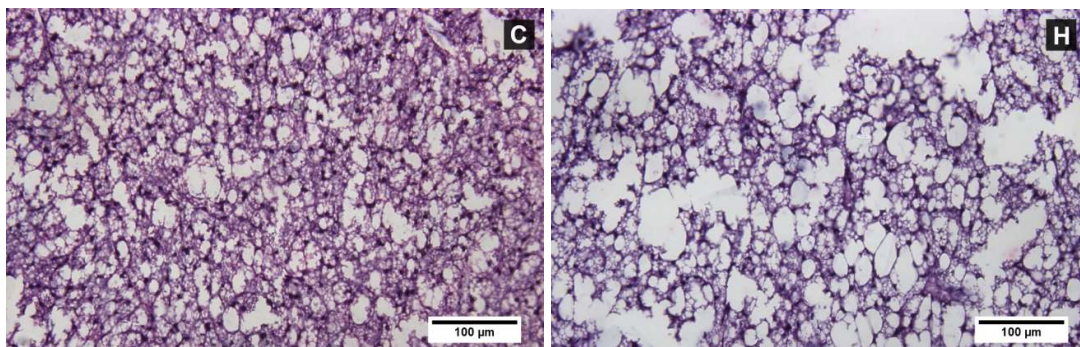


(A) Fotos representativas de cortes de fígado após coloração com Oil Red O – Corte em tecido congelado; Espessura do corte = 10 μm ; Escala = 100 μm ; Aumento de 20x; (B) Média da porcentagem de *pixels* corados com *Oil Red-O*. Teste t de Student foi realizado. Dados apresentados *boxplot* (B). $n=3/\text{grupo}$. * $p < 0,05$.

4.11.2. Gordura Marrom Interescapular

Realizou-se coloração de hematoxilina e eosina em lâminas da gordura marrom interescapular para comparar a morfologia dos adipócitos nos dois grupos experimentais. Pode-se observar, pelas fotos representativas na **Figura 21**, que os animais do grupo H apresentam adipócitos maiores com características de adipócitos brancos, em comparação com o grupo C, sugerindo o processo de whitening to tecido adiposo marrom.

Figura 21. Análise morfológica da gordura marrom interescapular de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.



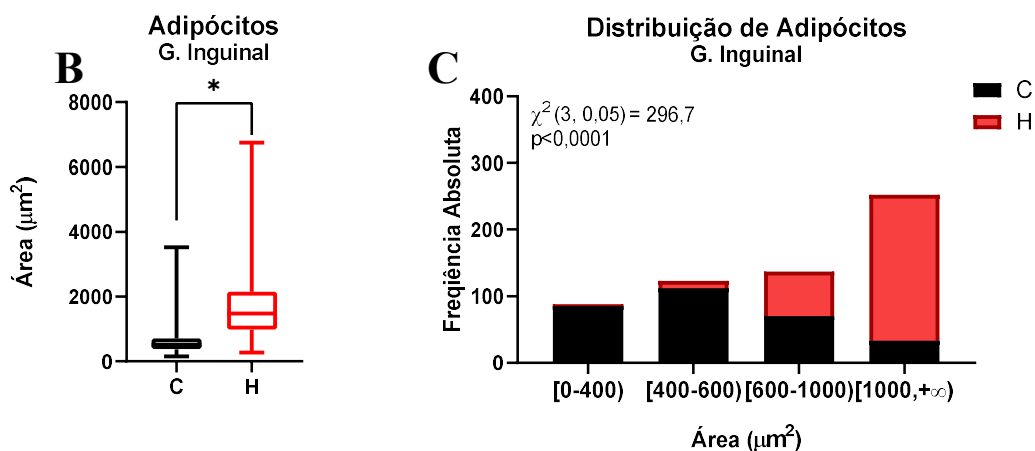
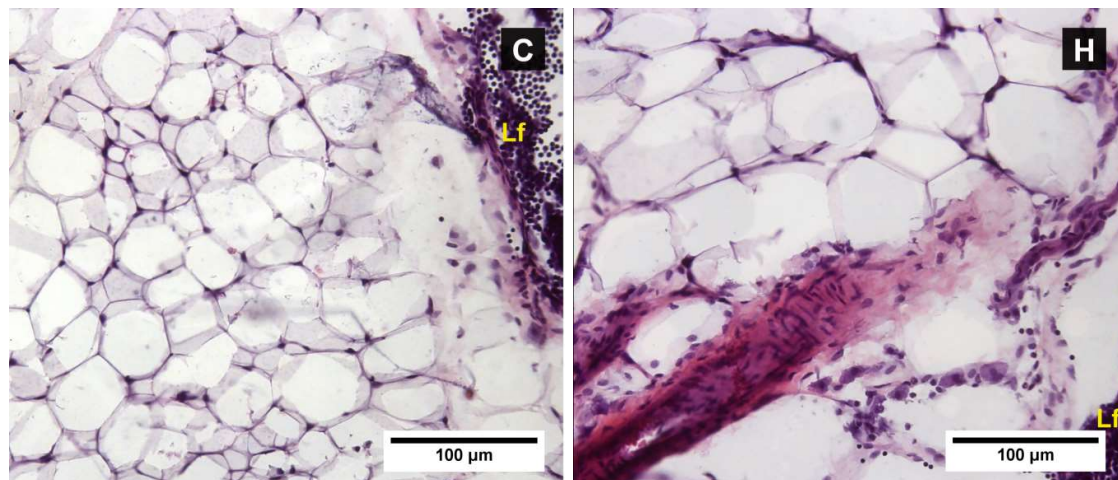
Fotos representativas de cortes da gordura marrom interescapular após coloração com hematoxilina e eosina – Corte em tecido congelado; Espessura do corte = 10 µm; Escala = 100 µm; Aumento de 20x. n=3/grupo.

4.11.3. Gordura Inguinal

A partir da coloração de hematoxilina e eosina, foi possível analisar a morfologia da gordura subcutânea inguinal dos dois grupos experimentais (**Figura 22A**). Após análise de diferentes campos e cortes, de diferentes animais, foi possível mensurar a área de 300 adipócitos, de ambos os grupos. A **Figura 22B** indica que os animais do grupo H apresentaram adipócitos com área 190,4% maior do que os adipócitos do grupo C, sugerindo hipertrofia dos adipócitos. Corroborando com esses dados, a análise da distribuição de frequência da área desses adipócitos, mostrou que, em comparação com o grupo C, um maior número de adipócitos do grupo H tinha área entre [600 - 1000) e [1000 - + ∞) (**Figura 22C**, $p < 0,0001$).

Figura 22. Análise morfológica da gordura inguinal de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.

A



(A) Fotos representativas de cortes de gordura inguinal após coloração com hematoxilina e eosina – Corte em tecido congelado; Espessura do corte = 10 μm ; Escala = 100 μm ; Aumento de 20x; (B) Área dos adipócitos (n= 300 adipócitos/animal); (C) Distribuição de frequência da área dos adipócitos. Teste U de Mann-Whitney (B) e Qui quadrado de Pearson (C) foram realizados. Dados apresentados como *boxplot* (B). n=3/grupo. Lf= linfonodo. *p < 0,05.

PARTE IIA – TRATAMENTO COM VESÍCULAS EXTRACELULARES

5. METODOLOGIA

5.1. EXTRAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DO SORO

O soro foi obtido (conforme descrito na seção 3.8) e armazenado a -70°C . A extração de vesículas extracelulares (EVs) do soro foi realizada utilizando o reagente ExoQuickTM-TC (System Biosciences, Palo Alto, CA, EUA), seguindo as especificações do fabricante. Resumidamente, o volume de soro foi estimado e o volume correspondente a 20% do volume de soro foi adicionado do reagente ExoQuickTM-TC, que contém polímero responsável por precipitar EVs, principalmente as de tamanho entre 30-200 nm. Após agitação, o tubo foi deixado na geladeira por pelo menos 12 horas. Centrifugou-se o tubo por 30 minutos a 1.500 x g em temperatura ambiente para obtenção de *pellet*. O sobrenadante foi descartado e uma nova centrifugação foi realizada (5 minutos, 1.500 x g) para remover qualquer resíduo de fluido. O *pellet* foi ressuspensionado em 400 μL de PBS 1X estéril e foi congelado até seu uso subsequente.

Para os experimentos de caracterização de EVs e para o preparado das doses utilizadas no tratamento, partiu-se sempre de 150 μL de soro, adicionando-se 30 μL do reagente ExoQuickTM-TC. Para o protocolo de microscopia eletrônica de transmissão, ao invés de ressuspender o *pellet* com PBS 1X estéril, adicionou-se glutaraldeído ao *pellet*.

5.2. CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

5.2.1. *Nanoparticle Tracking Analysis*

A distribuição de tamanho e a concentração de partículas foram avaliadas através do Nanosight NS300 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido) com um laser de 488 nm e bomba de seringa automatizada na velocidade 100 (unidades arbitrárias). O Nanosight NS300 utiliza a tecnologia de Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA, do inglês Nanoparticle Tracking Analysis). Essa técnica exclusiva utiliza as propriedades de espalhamento de luz e movimento browniano (movimento aleatório das partículas suspensas em um fluido, neste caso, em meio líquido) para obter a distribuição de tamanho e a contagem de partículas em suspensões. Para análise, todas as amostras foram diluídas em PBS 1x (1:50) para um volume final de 1 ml para obter uma concentração na faixa de 20-100 partículas/*frame*, recomendada pelo fabricante. A análise foi realizada usando o software Nanosight NTA versão

3.4 que processa o vídeo rastreando o movimento de todas as partículas individual e simultaneamente e calcula o diâmetro hidrodinâmico. O limite de detecção e nível de câmera foi definido como 5 e 9, respectivamente. Tipo de câmera: sCMOS; número de quadros: 749; tempo de medição: 30 s. Para cada amostra, o resultado mostrado é a média de um experimento realizado em triplicata experimental.

5.2.2. *Dynamic Light Scattering*

Para determinação do índice de polidispersão (PDI, do inglês polydispersity index) e diâmetro das EVs, utilizou-se o método de espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*) utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). Esse método se baseia no movimento Browniano que faz com que a luz laser que incide na solução seja espalhada com intensidades diferentes, criando o que é chamado de flutuações de intensidade da luz espalhada. A análise dessas flutuações resulta na velocidade do movimento das partículas. Pela relação entre a velocidade de movimentação das partículas, a intensidade e a mudança de frequência da luz espalhada, é possível mensurar tanto o tamanho quanto a distribuição do tamanho das partículas (SZATANEK et al., 2017).

Para um volume final de 1,5 mL, as EVs extraídas (ressuspendidas em PBS) foram diluídos (1:10) em PBS previamente filtrado em filtro seringa com membrana de polietersulfona – PES (0,22 µm). As amostras diluídas foram transferidas para uma cubeta de plástico e lidas no equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments).

5.2.3. Expressão de marcadores proteicos de vesículas extracelulares

Cinco importantes marcadores proteicos foram analisados por *Western Blot*: ALIX, TSG101, CD63, CD9 e Grp94.

Para a extração de proteínas totais, 100 µL das EVs extraídos (ressuspendidos em PBS) foram homogeneizados em 100 µL de tampão de lise gelado contendo NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), SDS 0.1%, Nonidet P-40 1%, desoxicolato de sódio 0,5% e inibidor de protease mix M (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Alemanha). Após a homogeneização, as amostras foram deixadas no gelo por 15 minutos e, posteriormente, centrifugadas (10 minutos, 12.000 rpm a 4°C). O sobrenadante (extrato proteico) foi coletado e

armazenado em novo tubo a -30°C . O conteúdo de proteínas do extrato proteico foi quantificado pelo método descrito por BRADFORD (1976), utilizando o reagente Bio-Rad Protein Assay (Cat. #500-0006, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) seguindo as especificações do fabricante. De maneira resumida, adicionou-se 200 μL do reagente diluído (1:5 em água destilada) e 10 μL do extrato proteico (ou padrão) por poço em uma placa de 96 poços estéril. A leitura foi feita no comprimento de onda de 595 nm no espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices).

O extrato proteico foi diluído em tampão de amostra contendo 9 partes de 4x Laemmlí Sample Buffer (Cat. #161-0747, Bio-Rad Laboratories) e 1 parte de 2-Mercaptoetanol (Cat. #M3148, Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, EUA) com ajuste na concentração de proteínas para então ser submetido à eletroforese em condições desnaturantes em gel de SDS-poliacrilamida 12% por 3 horas a 80 volts. Para análise de ALIX, TSG101, CD63 e Grp94: 50 μg de proteínas foram aplicadas do gel. Para CD9, três concentrações de uma mesma amostra foram colocadas no gel: 50 μg , 100 μg e 150 μg . As proteínas fracionadas em gel foram transferidas por eletroforese para membrana de nitrocelulose utilizando o equipamento Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad Laboratories; 100 Volts, 350 mA por 1 hora) e o tampão Tris-glicina (Tris base 25mM, glicina 192mM, 20% metanol). A eficiência de transferência foi avaliada pela coloração da membrana de nitrocelulose em Ponceau S (Cat. #P3504, Sigma-Aldrich®) a 0.1% (p/v) em 5% ácido acético por 10 minutos. A detecção das proteínas de interesse foi realizada inicialmente por bloqueio da membrana por 1 hora a temperatura ambiente, com leite desnatado a 5% em TBST [Tris-base 20 mM, (pH 7,5), NaCl 150mM e 0,1% de Tween 20] para minimizar as ligações inespecíficas. Após bloqueio, as membranas foram lavadas e incubadas, sob agitação, com anticorpos primários anti-CD9 (~25 kDa, Cat. #C993, Sigma-Aldrich®) diluído em TBST – 1:500, *overnight*, a 4°C , anti-CD63 (~25 kDa, Cat. #C556019, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) diluído em TBST – 1:1000, *overnight*, a 4°C , anti-ALIX (~100 kDa, Cat. #2171, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA) diluído em TBST – 1:1000, *overnight*, a 4°C , anti-TSG101 (~50 kDa, Cat. #612697, BD Biosciences) diluído em TBST – 1:1000, *overnight*, a 4°C e anti-Grp94 (~100 kDa, Cat. #2104, Cell Signaling Technology) diluído em TBST – 1:1000, *overnight*, a 4°C .

Após 3 lavagens por 10 min com TBST, as membranas foram incubadas sob agitação com o anticorpo secundário anti-rabbit conjugado com peroxidase diluído (1:100.000 em leite desnatado a 1% em TBST) por 45 minutos em temperatura ambiente. Após incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes por 10 min com TBST. As bandas marcadas com anticorpo

foram visualizadas utilizando Clarity™ Western ECL Substrate (Cat. #1705061, Bio-Rad), no equipamento C-Digit (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, EUA).

5.2.4. Detecção de albumina

Presença de albumina nas preparações de EVs, amostras de proteínas extraídas de EVs e soro (50 µg) foram submetidas a 10% SDS-PAGE seguido de coloração utilizando *kit* SilverQuest™ Silver Staining (Cat. #LC6070; Thermo Fisher Scientific). Albumina de soro bovino (BSA) foi utilizado como controle positivo. BSA.

5.2.5. Microscopia eletrônica de transmissão

Para avaliar integridade das EVs e tamanho do diâmetro, realizou-se a microscopia eletrônica de transmissão. O *pellet* de EVs obtido foi fixado em 2% glutaraldeído por duas horas. Após fixação, o *pellet* foi imerso em solução de peróxido de Ósmio 1% com sacarose 10,56% a 4°C por duas horas, seguido de incubação overnight em solução de uranila 0,5% com sacarose 10,56% (temperatura ambiente). No dia seguinte, o *pellet* foi desidratado em uma bateria de álcool (álcool 70% - 10 minutos/2 vezes; álcool 95% - 10 minutos/2 vezes; álcool 100% - 10 minutos/ 4 vezes) seguida de um estágio com óxido de propileno (10 minutos/2 vezes). Após desidratação, o *pellet* foi infiltrado com óxido de propileno na resina Spurr (50% v/v) por seis horas e, em seguida, a resina pura foi infiltrada por mais seis horas. As EVs infiltradas com resina foram colocadas em estufa (70-75°C) por 30 horas. Cortes ultrafinos (80 nm) foram coletados em grades de cobre que foram contra coradas com acetato de uranila saturado por 5 minutos e 0,4% de citrato de chumbo por 3 minutos. A análise foi realizada utilizando o microscópio eletrônico de transmissão de 200 kv FEI TECNAI G20 TEM, (Thermo Fisher Scientific), disponível no Setor de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP).

5.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL – TRATAMENTO COM VESÍCULAS EXTRACELULARES

A obtenção e a manutenção dos animais foi realizada conforme descrito na seção 3.1. Animais com oito semanas de idade foram alimentados durante quatro semanas com a mesma dieta utilizada pelos animais do grupo controle do protocolo experimental para indução de

obesidade (conforme descrito na seção 3.2). Após esse período, os animais foram divididos de maneira aleatória em dois grupos experimentais, conforme demonstrado a seguir:

- 1) Grupo PBS – Camundongos tratados com PBS (n=5) – Grupo controle;
- 2) Grupo EV-H – Camundongos tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (n=4) – Grupo tratado.

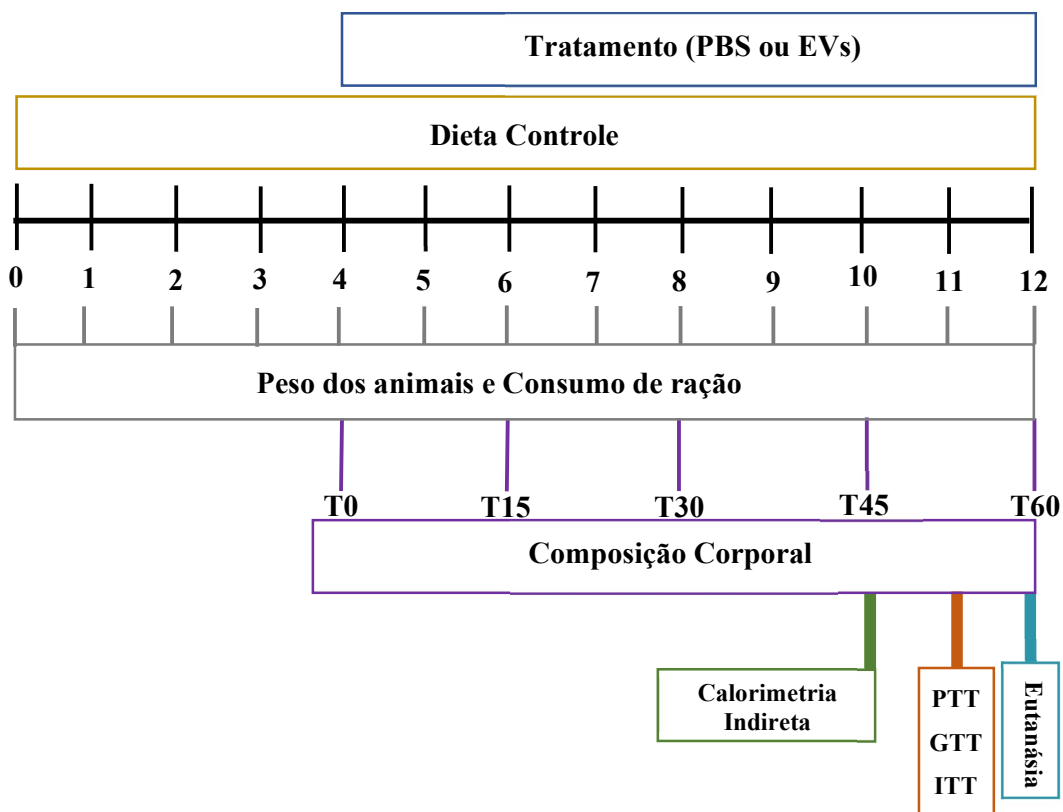
Após extração das EVs do soro de animais obesos, elas foram ressuspensas em PBS e quantificadas para então serem utilizadas no tratamento. A quantificação foi realizada pelo método descrito por BRADFORD (1976) utilizando o reagente Bio-Rad Protein Assay (Cat.#500-0006, Bio-Rad Laboratories). A dose do tratamento utilizada foi a de 400 µg e a via de administração, intraperitoneal (i.p.).

O tratamento foi realizado a cada três dias, durante oito semanas e todos os animais receberam água e dieta controle *ad libitum* por 12 semanas. O consumo de ração dos animais era mensurado duas vezes por semana e o ganho de peso, semanalmente. Antes do início do tratamento e quinzenalmente após seu início, a composição corporal dos animais foi avaliada. Na semana 10 do protocolo experimental, os animais foram submetidos à calorimetria indireta e na semana 11, aos testes de tolerância ao piruvato (PTT), tolerância à glicose (GTT) e tolerância à insulina (ITT). Após as 12 semanas experimentais, os animais foram eutanasiados. A **Figura 23** ilustra o desenho experimental. Amostras de sangue total foram coletadas para análises bioquímicas. Amostras do tecido adiposo epididimal, inguinal, retroperitoneal, do fígado e dos músculos gastrocnêmio e sóleo, foram pesadas e coletadas para análises moleculares e histológicas.

5.4. INGESTÃO ALIMENTAR E GANHO DE PESO

Os cinco animais do grupo controle foram colocados em duas caixas, uma com três e outra com dois animais. Os quatro animais no grupo tratado ficaram todos na mesma caixa. A ração era ofertada de acordo com os seguintes cálculos: 4g de ração controle por animal por dia. A partir do início da dieta, o peso dos animais foi mensurado semanalmente e o consumo de ração, duas vezes por semana. O consumo de ração diária por animal foi calculado com base na sobra de ração, em gramas, por caixa. Esse valor foi posteriormente dividido pelo número de dias que a ração ficou disponível e pelo número de animais presentes na caixa.

Figura 23. Desenho experimental – Tratamento com vesículas extracelulares (EVs)



5.5. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO CORPORAL

A análise da composição corporal dos animais foi realizada antes do início do tratamento (T0) e quinzenalmente (T15, T30, T45, T60) após início do tratamento. O protocolo foi realizado conforme descrito na seção 3.4.

5.6. TESTE DE TOLERÂNCIA AO PIRUVATO E À INSULINA

Os testes de tolerância ao piruvato e à insulina foram realizados conforme descrito nas seções 3.5 e 3.7, respectivamente.

5.7. TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE

Animais em restrição alimentar de seis horas receberam sobrecarga de glicose (2 mg/g de peso corpóreo) por injeção intraperitoneal. Retirou-se sangue da cauda dos animais e, utilizando um glicosímetro (Accu-Chek Performa, Bayer) determinou-se a glicemia nos tempos 0 (pré-

injeção), 15, 30, 45, 60 e 90 minutos após a injeção de glicose. Os valores glicêmicos obtidos foram utilizados para construção de uma curva glicêmica, onde sua AUC foi calculada.

5.8. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

A obtenção do soro foi realizada conforme descrito na seção 3.8. As dosagens de CT, TG e HDL-C foram realizadas conforme descrito nas seções 3.8.1, 3.8.2 e 3.8.3, respectivamente. O cálculo de LDL-C foi feito conforme descrito na seção 3.8.4. Adicionalmente, realizou-se dosagem sérica de glicerol.

5.8.1. Dosagem sérica de glicerol

Para a determinação da concentração de glicerol no soro, foi utilizado o *Free Glycerol Reagent* (Cat. #F6428; Sigma-Aldrich®) seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, 5 µL de soro e 200 µL do Reagente foram pipetados por poço em placas estéreis de 96 poços. Em seguida a placa foi encubada por 5 minutos a 37 °C e lida no comprimento de onda de 540 nm no espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices). As absorvâncias obtidas foram utilizadas para o cálculo da concentração sérica de glicerol por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Glicerol (mg/dL)} = \left(\frac{\text{Absorvância da amostra} - \text{Absorvância do branco}}{\text{Absorvância do padrão} - \text{Absorvância do branco}} \right)$$

5.9. CALORIMETRIA INDIRETA

O volume de oxigênio (VO₂) consumido, o volume de dióxido de carbono (VCO₂) liberado, a razão de troca respiratória (RER, do inglês *respiratory energy ratio*), a produção de calor (*heat*) e a atividade locomotora foram mensurados durante a décima semana experimental, ou seja, após 45 dias de tratamento. As medidas foram realizadas através de um sistema de calorimetria de circuito aberto indireto (CLAMS - Comprehensive Lab Animal Monitoring System: Oxymax - da Columbus Instruments, OH, EUA), disponível como equipamento multiusuário na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) – Departamento de Biofísica, tendo como responsável o Professor Ronaldo de Carvalho Araújo.

As medidas de VO₂ e VCO₂ foram expressas em mL/kg/h. A RER foi calculada a partir da razão entre o volume de CO₂ liberado e o volume de O₂ consumido e é utilizada para indicar

qual substrato (carboidrato ou gordura) é mais utilizado como fonte de energia. Os valores de RER para oxidação de carboidratos e lipídeos são 1,0 e 0,7, respectivamente. A produção de calor é expressa em kcal/h e a atividade locomotora espontânea é avaliada no período de 24 horas, utilizando sensores de movimentos presentes na gaiola.

Os animais (n=4/grupo) foram mantidos em gaiolas individuais (com ciclo claro/escuro de 12h e temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$). A ambientação ocorreu durante as primeiras 24 horas, os animais e, a coleta de dados, foi realizada nas 24 horas subsequentes. Assim, o tempo total dos animais no calorímetro foi de 48 horas. Antes da coleta de dados, os animais receberam o tratamento com EVs (grupo EV-H) ou com seu veículo (PBS, grupo controle).

O calorímetro foi calibrado antes de cada utilização, com mistura certificada de gases. Todos os experimentos foram realizados durante o mesmo período para evitar variações circadianas. Os dados obtidos foram calculados pelo software Oxymax Windows (Columbus Instruments).

5.10. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL

Extraíu-se o RNA total da gordura inguinal, da epididimal, do fígado e do músculo gastrocnêmio utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Após extração e quantificação do RNA total dos quatro tecidos, a síntese de cDNA foi realizada por *kit* comercial *High-Capacity cDNA reverse transcription* (Cat. #4374967; Applied Biosystems) partido de 1 µg de RNA total das amostras de músculo gastrocnêmio, gordura epididimal e inguinal e 2 µg de RNA total do fígado. A reação foi realizada em termociclador (Veriti, Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA obtido foi diluído (1:10) e então utilizado na análise de RT-qPCR pelo método de detecção Sbyr Green (PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix; Thermo Fisher Scientific). Os *primers* utilizados, o aparelho de PCR utilizado e a forma de análise dos dados foram realizados conforme descrito na seção 3.9. Como gene de referência, o *Hprt1* foi utilizado.

5.11. ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Após eutanásia, as amostras de gordura epididimal foram rapidamente coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C até análise da atividade enzimática da ATP-citrato liase (ACL) e da málica (EM), que foi realizada conforme descrito na seção 3.10.

5.12. EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS – FÍGADO

Realizada conforme descrito na seção 3.11.

5.13. HISTOLOGIA FÍGADO

Um pedaço do fígado foi incluindo em parafina e secções de $5\ \mu\text{m}$ de espessura foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para análise histológica. As lâminas foram avaliadas pelo método descrito na seção 3.12.1.

5.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram testados em relação à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (teste F). Como a amostra utilizada foi pequena, optou-se pelo teste U de Mann-Whitney bilateral para amostras independentes (não paramétrico) para comparação entre os dois grupos experimentais (tratado *versus* controle). Para todas as análises estatísticas o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software) foi utilizado. O nível de significância foi estabelecido como $p < 0,05$. Os títulos das figuras indicam o n amostral. Nas legendas, a forma de expressão dos dados está indicada.

6. RESULTADOS

6.1. CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

Com o objetivo de comprovar que o método de extração utilizado foi realmente capaz de isolar vesículas extracelulares (EVs) do soro, avaliou-se o tamanho, a homogeneidade, a presença de marcadores proteicos e a integridade das vesículas isoladas. Todos os experimentos de caracterização foram feitos com base na diretriz publicada em 2018 pela Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares, que recomenda informações mínimas e necessárias para serem incluídas nos estudos com EVs – Essa diretriz é denominada MISEV 2018 (THERY et al., 2018).

De maneira resumida, os requisitos mínimos para a caracterização são: 1) Caracterização quantitativa: descrever quantitativamente a fonte e a preparação de EVs, ou seja - no caso deste trabalho, descrever o volume de soro utilizado para isolar as EVs e fornecer a quantificação global das EVs isoladas, normalmente feita por quantificação de proteína e número de partículas; 2) Caracterização geral: presença de pelo menos três marcadores proteicos, um de cada categoria (proteínas transmembranas, proteínas citosólicas e proteínas relacionadas com controle de pureza, ou seja, proteínas que não são componentes de EVs (contaminantes) e que são comumente isolados em conjunto com as preparações de EVs. 3) Caracterização de vesículas únicas: utilizar duas técnicas diferentes, mas complementares, para estudar as vesículas como partículas únicas, incluindo técnicas que fornece imagens das EVs em alta resolução, como microscopia eletrônica, e técnicas que conseguem estimar características biofísicas nas EVs, como tamanho.

6.1.1. Caracterização quantitativa

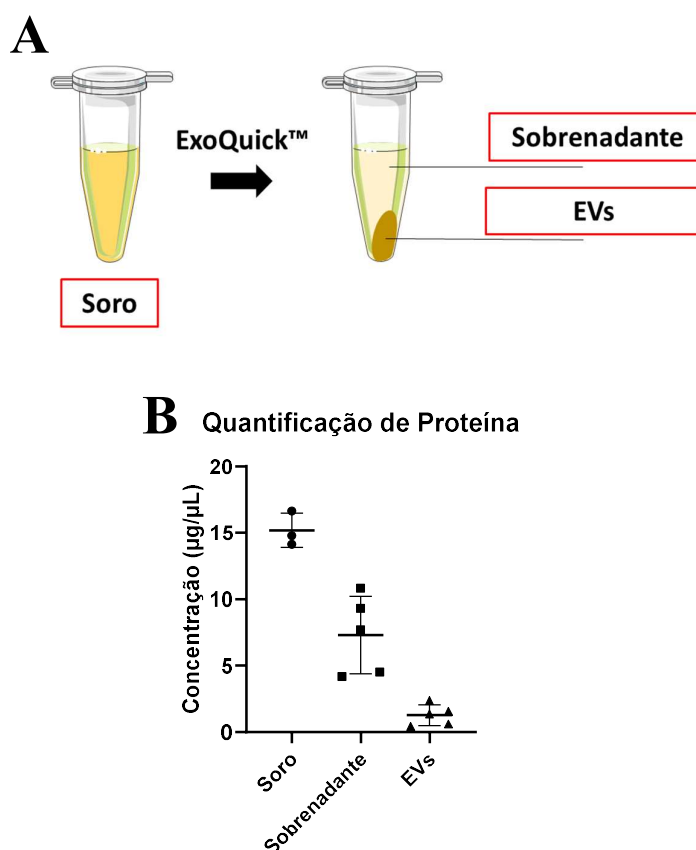
Para a quantificação em relação a caracterização quantitativa, afirma-se que para todos os experimentos que envolveram extração de EVs do soro (tanto para caracterização, quanto para preparado das doses de tratamento), utilizou-se soro de animais controle e sempre o mesmo volume de soro: 150 µl. Além disso, com as preparações de EVs já isoladas, realizou-se quantificação de proteínas e a avaliação do número de partículas.

Conforme descrito na metodologia (seção 5.1), as EVs foram isoladas utilizando o reagente ExoQuick™-TC (System Biosciences) e, após finalização do protocolo, o *pellet* de

EVs é obtido após descarte do sobrenadante. Para a caracterização envolvendo quantificação de proteína, utilizou-se além das EVs isoladas (*pellet*), o soro e o sobrenadante para comparação (**Figura 24A**). O esperado seria que a quantificação de proteína fosse maior no soro, tivesse valores intermediários no sobrenadante e fosse menor no *pellet* de EVs.

Conforme pode ser observado na **Figura 24B**, os resultados seguiram o que fora esperado: a concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) do conteúdo proteico no soro ($15,19 \pm 1,292$) foi maior do que a do sobrenadante ($7,311 \pm 2,920$), que foi maior que a das EVs ($1,270 \pm 0,7864$) – valores apresentados como média \pm DP. Os resultados indicam que a preparação contendo EVs isoladas estão menos contaminadas com proteínas (**Figura 24B**).

Figura 24. Quantificação do conteúdo proteico do soro, do sobrenadante e de EVs isoladas



(**A**) Esquema explicativo das amostras coletadas para o experimento de caracterização; (**B**) Quantificação de proteína realizada pelo método de Bradford - Valores apresentados como média \pm DP. Soro: n = 3; sobrenadante e EVs: n = 5. Experimento realizado com amostras de animais controle.

Para quantificação do número de partículas, utilizou-se equipamento NanoSight NS300 (Malvern Panalytical), que usa a tecnologia de Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) para obter a distribuição de tamanho das partículas além da contagem de partículas presentes nas preparações de EVs.

Para esse experimento, cinco amostras de preparações isoladas de EVs foram utilizadas. Conforme pode ser observado na **Tabela 3**, a média da concentração das cinco amostras foram $6.47E+10$ partículas/mL. Já a média do tamanho, 164.42 nm (**Tabela 4**).

O gráfico clássico de um experimento de NTA, comparando concentração e tamanho das partículas das cinco amostras utilizadas, pode ser observada na **Figura 25**, juntamente com a foto da população de vesículas analisada pelo NanoSight NS300 (Malvern Panalytical). Vale ressaltar que no gráfico, para cada amostra, o resultado mostrado é a média de um experimento realizado em triplicata experimental.

Tabela 3. Concentração de partículas presentes nas preparações de EVs isoladas do soro de camundongos

Amostras	Concentração (partículas/mL)	Média
1	$3.91E+10$	$6.47E+10$
2	$6.67E+10$	
3	$9.71E+10$	
4	$4.83E+10$	
5	$7.23E+10$	

Valores de cada amostra representam a média de experimentos realizados em triplicata experimental. Experimento realizado com amostras de animais controle.

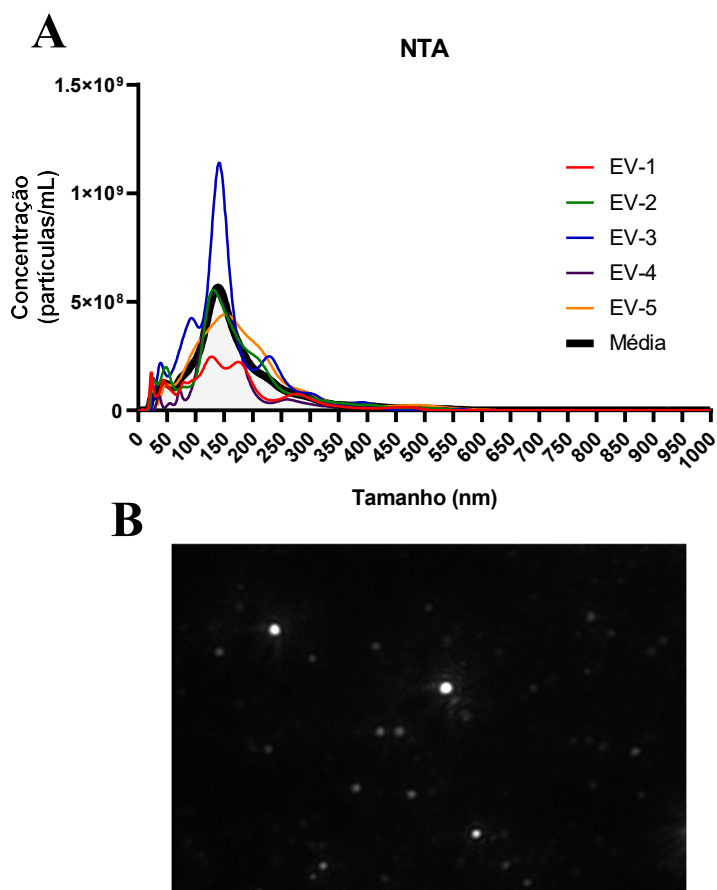
Os resultados de caracterização quantitativa apresentados mostram que partindo de 150 μ l de soro, obteve-se preparações de EVs que, em média, apresentam concentração proteica de 1,270 μ g por μ L, $6.47E+10$ partículas por mL e tamanho médio, analisado por NTA, de 164.42 nm. Com esses resultados e amostras de proteínas coletadas, seguiu-se para a caracterização geral, buscando a expressão de marcadores proteicos de EVs.

Tabela 4. Tamanho de partículas presentes nas preparações de EVs isoladas do soro de camundongos

Amostras	Tamanho (nm)	Média
1	140.1	164.42
2	171.3	
3	159.1	
4	165.4	
5	186.2	

Valores de cada amostra representam a média de experimentos realizados em triplicata experimental. Experimento realizado com amostra de animais controle.

Figura 25. Concentração *versus* tamanho e foto representativa da população de partículas presentes nas preparações de EVs isoladas do soro de camundongos



(A) Concentração *versus* tamanho de partículas presentes nas preparações de EVs ($n = 5$). Valores mostram a média de um experimento realizado em triplicata experimental; **(B)** Foto

representativa das populações de partículas presentes nas preparações de EVs. Experimento realizado com amostras de animais controle.

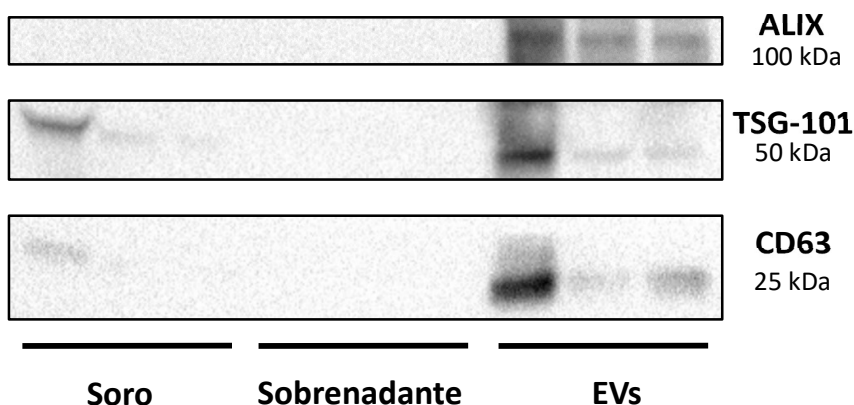
6.1.2. Caracterização geral

Seguindo o recomendado pela MISEV 2018 (THERY et al., 2018), avaliou-se a expressão de marcadores proteicos. Avaliou-se duas proteínas transmembranas (CD9 e CD63), duas proteínas citosólicas (ALIX e TSG101) e a presença de albumina – um contaminante comumente isolado com as preparações de EVs. Além das proteínas citadas, que fazem parte das três categorias necessárias para caracterização de vesículas (proteínas transmembranas, proteínas citosólicas e proteínas relacionadas com controle de pureza), avaliou-se também a proteína Grp94, que normalmente é encontrada no retículo endoplasmático e complexo de Golgi e pode ser considerado um marcador de EVs consideradas grande (tamanho maior que 200 nm).

A Grp94 faz parte de uma categoria adicional que é recomendada para quando autores querem especificar que a maioria das EVs estudadas são do subtipo pequena, isto é, menor que 200 nm – principalmente exossomos (THERY et al., 2018). Proteínas localizadas em compartimentos intracelulares que não são nem a membrana plasmática e nem endossomos, como a Grp94, não são normalmente encontradas em preparações enriquecidas com EVs pequenas.

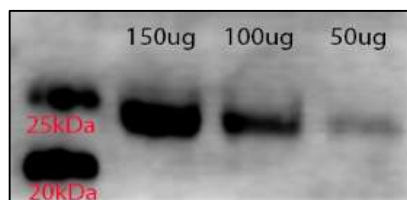
Para as proteínas CD63, ALIX e TSG101, o preparo das amostras utilizadas foi o mesmo descrito na **Figura 24** (Seção 6.1.1), onde se analisou separadamente o soro, o sobrenadante e a preparação de EVs isoladas. Conforme pode ser observado na **Figura 26**, a presença de CD63, ALIX e TSG101 foi quase exclusiva da preparação de EVs, em comparação com o soro e o sobrenadante. A expressão de CD9 também foi avaliada nas preparações de EVs em diferentes concentrações (50, 100 e 150 µg de proteína) e a sua expressão foi detectada de maneira dependente da concentração (**Figura 27**). A expressão de Grp94, marcador de EVs grande, foi avaliada em EVs, no soro e em células C2C12, utilizadas como controle positivo. Conforme a **Figura 28** mostra, não foi possível observar a expressão de Grp94 nas preparações de EVs.

Figura 26. Expressão de marcadores proteicos: ALIX, TSG101 e CD63



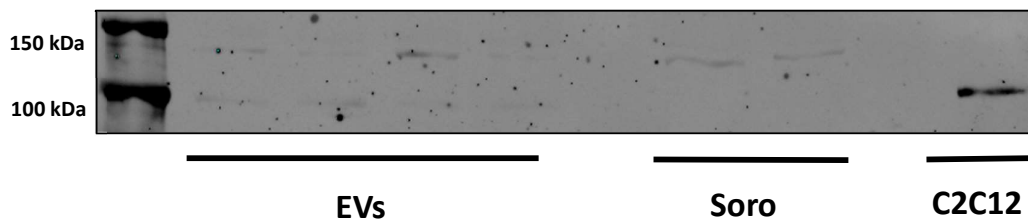
Western blot para ALIX, TSG101 e CD63. ALIX e TSG101 são proteínas citosólicas e CD63 é uma proteína transmembrana da família das tetraspaninas. Quantidade de proteína aplicada no gel: 30 μ g. n = 3/grupo. Experimento realizado com amostras de animais controle.

Figura 27. Expressão do marcador proteico CD9 – Diferentes concentrações



Western blot para CD9, proteína transmembrana da família das tetraspaninas. Quantidade de proteína aplicada no gel: 50,100 e 150 μ g. n=1/grupo.

Figura 28. Expressão de Grp94, marcador de EVs grandes

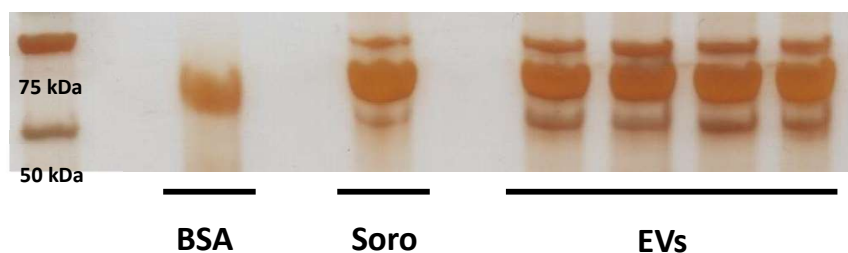


Western blot para Grp94, proteína de retículo endoplasmático e complexo de Golgi que é utilizada como marcador de EVs grandes. Ausência de expressão indica enriquecimento de EVs pequenas (tamanho menor de 200 nm) nas preparações de EVs. Quantidade de proteína aplicada no gel: 50 μ g. C2C12 utilizada como controle positivo. EVs: n=4; Soro: n=2; C2C12: n=1. As quatro amostras de EVs utilizadas foram provenientes do soro de animais obesos (n=1), controle

(n=1), exercitado (n=1) e sedentário (n=1) – conforme descrito em DE MENDONÇA et al. (2020).

Avaliou-se a presença de albumina nas preparações de EVs isoladas e soro, utilizando albumina de soro bovino (BSA) como controle positivo. Pode-se detectar presença de albumina tanto no soro quanto nas preparações de EVs (**Figura 29**).

Figura 29. Detecção de albumina nas preparações de EVs e soro



Amostras foram submetidas a 10% SDS-PAGE seguido de coloração utilizando kit SilverQuest™ Silver Staining (Thermo Fisher Scientific). Quantidade de proteína aplicada no gel: 50 µg. BSA (albumina de soro bovino) foi utilizado como controle positivo. BSA: n=1; Soro: n=1; EVs: n=4. As quatro amostras de EVs utilizadas foram provenientes do soro de animais obesos (n=1), controle (n=1), exercitado (n=1) e sedentário (n=1) – conforme descrito em DE MENDONÇA et al. (2020)

Os resultados da caracterização geral apontam que as EVs isoladas apresentam os marcadores positivos esperados (CD63, CD9, ALIX e TSG101), são, majoritariamente, EVs de tamanho pequeno (ausência da expressão de Grp94) e apresentam contaminação com albumina.

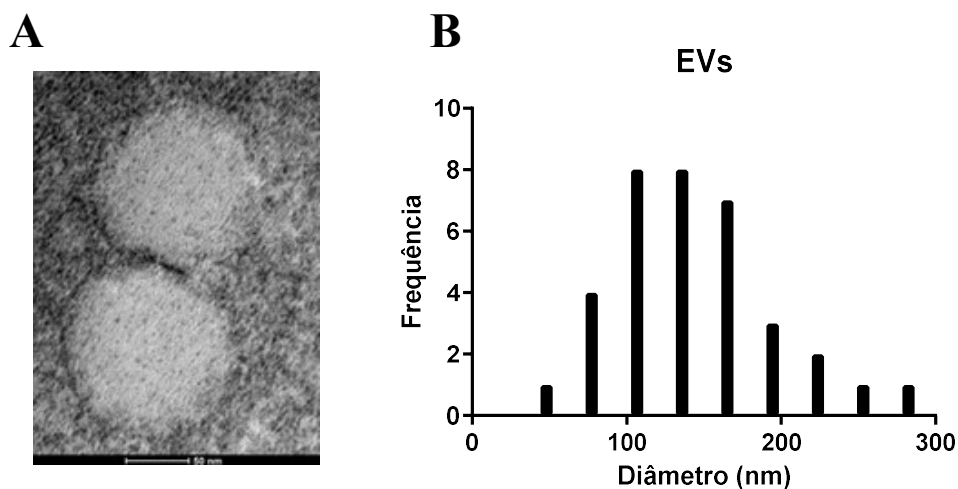
6.1.3. Caracterização de vesículas únicas

Para analisar as vesículas individualmente, realizou-se microscopia eletrônica de transmissão, DLS (*Dinamic Light Scattering*) e NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*).

Uma preparação contendo EVs isoladas do soro de animais controle foi submetida à microscopia eletrônica de transmissão. Além de tentar avaliar a integridade das EVs, 35 vesículas foram analisadas para ter seu tamanho (diâmetro) calculado. A **Figura 30A** mostra uma foto representativa das EVs avaliadas e, como pode ser observado, as EVs isoladas se mostraram íntegras. Além disso, em relação ao seu tamanho, das 35 EVs analisadas, a média de diâmetro encontrada foi de 132 nm (**Tabela 5**). As características da população de EVs e a

distribuição de frequência dos diferentes tamanhos encontrados podem ser consultados na **Tabela 5** e na **Figura 30B**, respectivamente.

Figura 30. Caracterização de EVs por microscopia eletrônica de transmissão



(A) Imagem representativa da microscopia eletrônica de transmissão de vesículas extracelulares (EVs; aumento de 50.000 vezes, escala: 50nm); (B) Distribuição de frequência do tamanho (diâmetro) de EVs analisados por microscopia eletrônica de transmissão (n=35). Experimento realizado com amostras de animais controle.

Tabela 5. Parâmetros da população de EVs analisadas por microscopia eletrônica de transmissão.

Parâmetro	Amostra
n	35
Mínimo	48 nm
Quartil 1	100,8 nm
Mediana	125,9 nm
Média	132,0 nm
Quartil 3	151,6 nm
Máximo	282,5 nm

Experimento realizado com amostra de animal controle.

Para realização do DLS, duas amostras contendo preparações de EVs provenientes de duas amostras de soro diferentes foram diluídas (1:10) e submetidas ao DLS. Em ambas as amostras, três populações de vesículas com diferentes tamanhos foram encontradas em diferentes intensidades (**Tabela 6**). A média dos diâmetros e o índice de polidispersão (PDI) da amostra como um todo (considerando todas as populações de partículas) podem ser visualizados na **Tabela 7**. A **Figura 31** mostra o gráfico representativo de uma das amostras, onde é possível se observar as três populações de partículas (separadas com base na diferença de tamanho) e que a grande maioria das partículas apresentam tamanho um pouco maior que 100 nm.

Na primeira amostra (denominada Amostra 1), a maior parte da população de vesículas (97,5%) apresentou diâmetro de 147,5 nm e na segunda amostra (Amostra 2), 90,4% das vesículas possuem 196,7 nm de diâmetro (**Tabela 6**). O diâmetro médio encontrado para as duas amostras foi de aproximadamente 110 nm (**Tabela 7**).

Tabela 6. Diâmetro e Intensidade das EVs extraídas no soro.

	Amostra 1		Amostra 2	
	Diâmetro	Intensidade	Diâmetro	Intensidade
Pico 1	147,5 nm	95,7%	196,7 nm	90,4%
Pico 2	23,34 nm	2,8%	18,52 nm	9,1%
Pico 3	4.804 nm	1,5%	4.779 nm	0,5%

Experimento realizado com amostras de animais controle.

O PDI indica a homogeneidade da distribuição do diâmetro das partículas. Quanto menor o PDI, maior homogeneidade. Conforme observado na **Tabela 7**, o PDI da Amostra 2 foi praticamente o dobro do encontrado para a Amostra 1, indicando menor homogeneidade na distribuição do diâmetro das partículas. Uma possível explicação para essa diferença está no grau de hemólise das amostras. Não se observou indícios de hemólise na Amostra 1, porém a Amostra 2 estava nitidamente hemolisada. Com base no aumento de PDI da amostra hemolisada encontrada e com os dados da literatura que mostram que a hemólise é capaz de modificar o perfil de miRNAs circulantes encontrados no soro e no plasma (KIRSCHNER et al., 2013), as

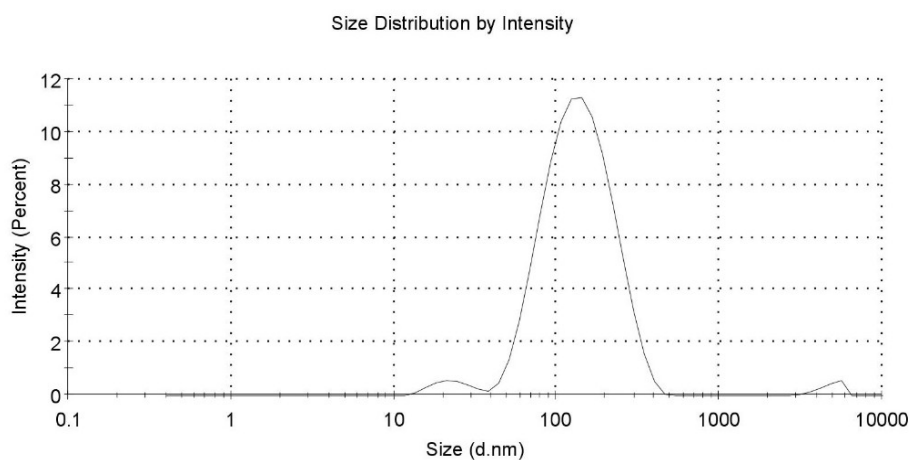
amostras nitidamente hemolisada não foram utilizadas para o preparo das doses do tratamento com EVs.

Tabela 7. Diâmetro médio e Índice de Polidispersão de EVs extraídas do soro.

	Amostra 1	Amostra 2
Diâmetro Médio	110,8 nm	110,5 nm
PDI	0,281	0,534

PDI: índice de polidispersão. Experimento realizado com amostras de animais controle.

Figura 31. Distribuição de tamanho de EVs do soro analisado por *Dynamic Light Scattering*



Experimento realizado com amostra de animal controle.

Os resultados do NTA já foram descritos na seção 6.1.1. deste trabalho, mas de maneira breve o tamanho médio de partículas encontrado nas cinco amostras de preparações contendo EVs isoladas foi de 164,42 nm.

Os resultados da caracterização de vesículas únicas mostram que EVs integras e com tamanho menor que 200 nm foi obtido, corroborando com resultados das caracterizações anteriores mostrando que a maioria da população de EVs isoladas são, de fato, EVs consideradas de tamanho pequeno (diâmetro menor que 200 nm).

De maneira resumida, os resultados de caracterização demonstram que o método de extração utilizado para obtenção das EVs que foram utilizado neste trabalho foi de fato capaz de isolar EVs que, em sua maioria, possuam tamanho menor de 200 nm.

6.2. PESO CORPÓREO E COMPOSIÇÃO CORPORAL

Para analisar o efeito do tratamento com EVs derivadas do soro de camundongos obesos no peso corpóreo de animais controle, os animais foram pesados semanalmente durante as 12 semanas experimentais. Para complementar os dados de peso corpóreo, nós avaliamos quinzenalmente a composição corporal dos animais. A primeira avaliação foi realizada antes do primeiro dia de tratamento (T0), a última foi realizada no último dia do protocolo experimental (T60), ou seja, com as oito semanas de tratamento completas.

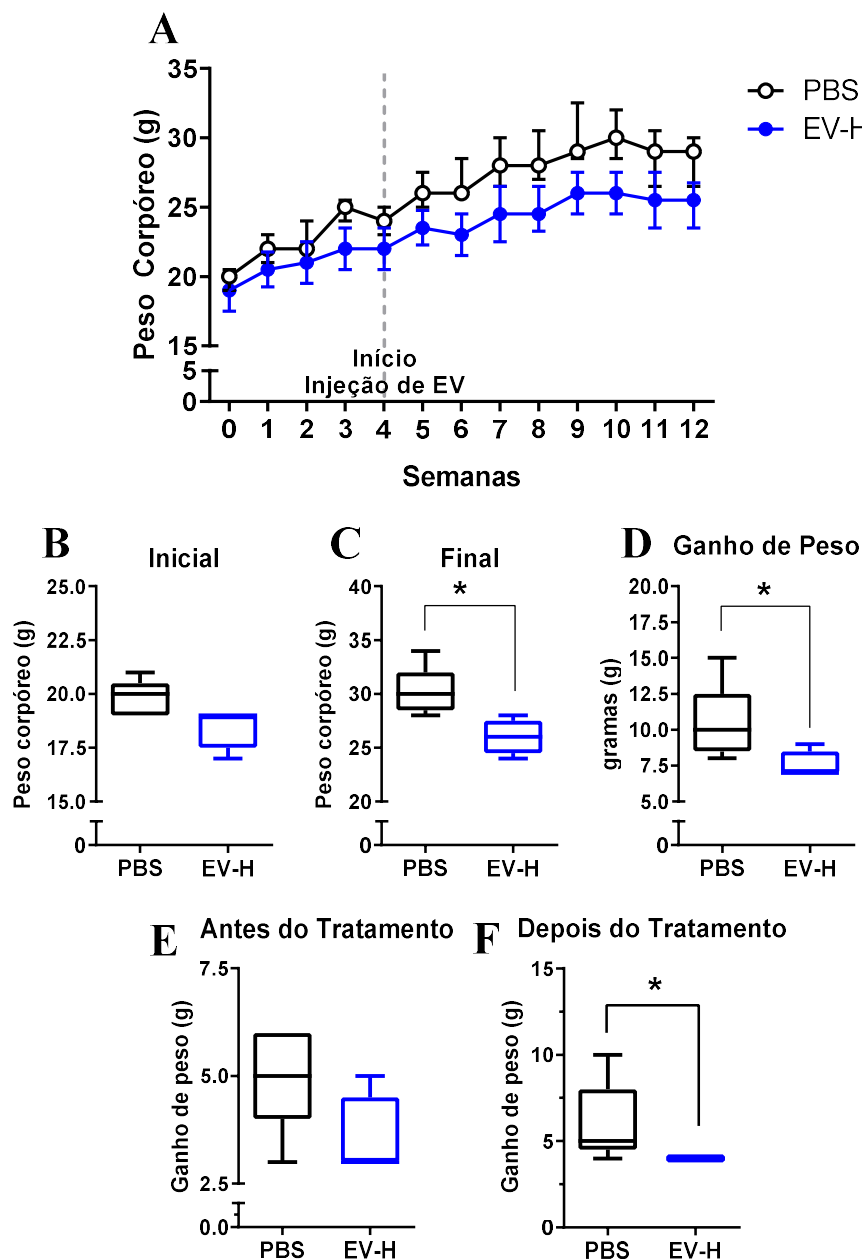
Vale ressaltar que durante as duas últimas semanas experimentais (semanas 11 e 12), realizaram-se diferentes experimentos que envolveram transporte dos animais (calorimetria indireta) e protocolos de jejum (PTT, GTT, ITT). Isso resultou na perda de peso dos animais, como pode ser observado na **Figura 32A**. Assim, a semana considerada como *final* para os resultados de peso final (**Figura 32C**), ganho de peso (**Figura 32D**) e composição corporal (**Figura 33A**) foi a semana 10, que corresponde a 45 dias de tratamento (T45).

Pode-se observar na **Figura 32A**, que o peso nos animais do grupo tratado, em relação ao grupo controle, foi ficando menor ao longo das semanas. Para uma análise mais apurada dessa diferença de peso, comparou-se o peso inicial, o peso final e o ganho de peso entre os dois grupos. Não houve diferença estatística entre o peso inicial do grupo controle e do tratado (**Figura 32B**, $p = 0,119$), entretanto o peso final (**Figura 32C**, $p = 0,0238$) e o ganho de peso (**Figura 32D**, $p = 0,0397$) dos animais tratados foi, respectivamente, 13% e 30% menor do que o que foi observado no grupo controle. Para avaliar se a perda de peso ocorria, de fato, no período do tratamento, decidimos comparar o ganho de peso dos animais antes e depois do tratamento. Não foi observada diferença estatística entre os dois grupos no período antes do tratamento (**Figura 32E**, $p = 0,1429$), entretanto, após o tratamento, o grupo tratado com EVs apresentou ganho de peso 20% menor do que o grupo controle (**Figura 32F**, $p = 0,0476$).

Em relação à composição corporal, pode-se observar um aumento na porcentagem de gordura dos dois grupos ao se comparar T0 com T45 (**Figura 33A e 33B**). No entanto, a **Figura 33C** mostra que não foi encontrada diferença estatística entre a porcentagem de gordura do grupo controle e do grupo tratado nos tempos T0 ($p = 0,9048$), T15 ($p > 0,9999$), T30 ($p =$

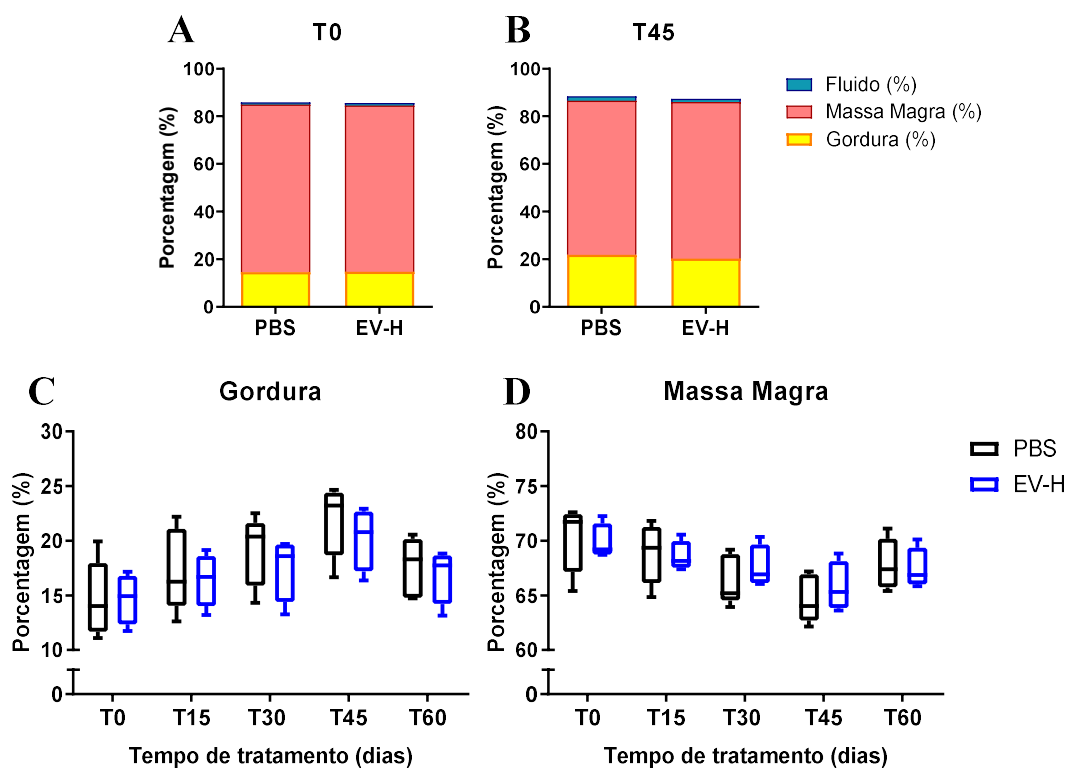
0,4127), T45 ($p = 0,2857$) e T60 ($p = 0,5556$). De maneira semelhante, a **Figura 33D** mostra que também não foram encontradas diferenças estatísticas na porcentagem de massa magra entre os dois grupos experimentais nos tempos T0 ($p = 0,7302$), T15 ($p = 0,7302$), T30 ($p = 0,4127$), T45 ($p = 0,5556$) e T60 ($p = 0,9048$).

Figura 32. Avaliação do peso corpóreo de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H; $n=4$) ou PBS ($n=5$).



(A) Curva de peso corpóreo ao longo das 12 semanas experimentais; (B) Peso corpóreo no início do protocolo experimental; (C) Peso corpóreo na semanal final do protocolo experimental; (D) Ganho de peso entre o começo e o final do protocolo experimental; (E) Ganho de peso antes do início do tratamento e (F) Ganho de peso após o início do tratamento. Para todas as análises, peso final foi considerado como o peso da décima semana. Teste U de Mann-Whitney (B-F) foi realizado. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil (A) e *boxplot* (B-F). * $p < 0,05$.

Figura 33. Avaliação da porcentagem de gordura, massa magra e fluido de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H; $n=4$) ou PBS ($n=5$).



Composição percentual de gordura, massa magra e fluido (A) antes do início do tratamento e (B) após 45 dias de tratamento; Comparação da composição percentual de (C) gordura e (D) massa magra entre os dois grupos experimentais em diferentes tempos de tratamento. Teste U de Mann-Whitney (C e D) foi realizado. Dados apresentados como média (A e B) e *boxplot* (C e D).

6.3. CONSUMO DE RAÇÃO

Para verificar se havia influência do tratamento no consumo alimentar dos animais, avaliou-se o consumo de ração por caixa durante todo o protocolo experimental. Conforme

explicado na seção anterior, foram excluídos os dados das semanas 11 e 12 das análises realizadas nos gráficos **B-G** da **Figura 34**.

Ao observar a curva de consumo ao longo das 12 semanas experimentais, percebeu-se um menor consumo de ração dos animais do grupo tratado (**Figura 34A**). De fato, considerando a média do consumo das 12 semanas experimentais, os animais do grupo tratado apresentaram um consumo em gramas (**Figura 34B**, $p < 0,0001$) e em kcal (**Figura 34C**, $p < 0,0001$) 19% e 20% menor, respectivamente, do que os do grupo controle.

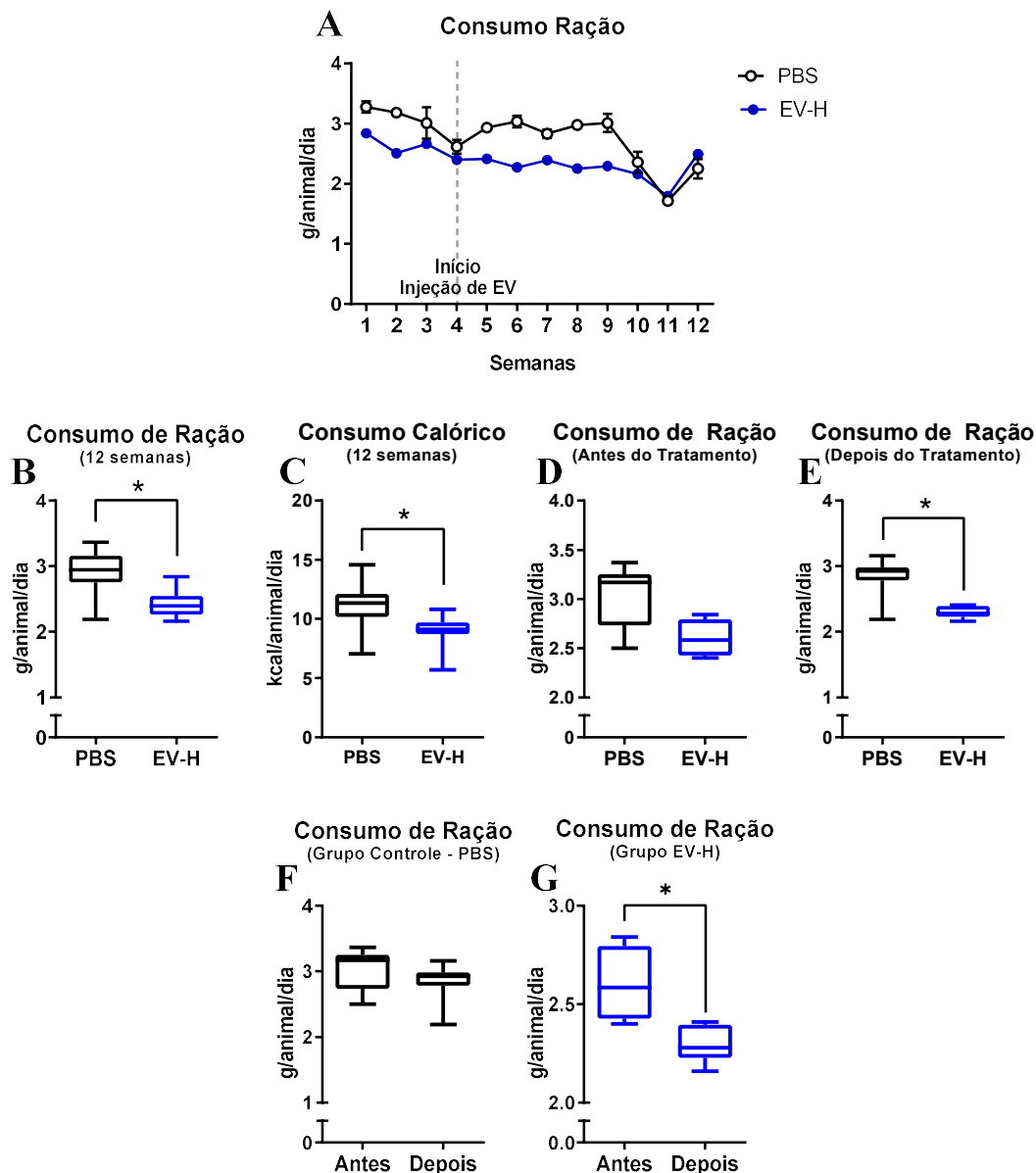
Para avaliar se o tratamento influenciava no consumo alimentar, comparou-se o consumo de ração antes e depois do tratamento com EVs entre os grupos controle e tratado. Não foi encontrada diferença estatística no consumo de ração antes do tratamento entre os grupos experimentais (**Figura 34D**, $p = 0,0727$), contudo, após o tratamento, o grupo tratado reduziu seu consumo em 22%, comparado ao grupo controle (**Figura 34E**, $p = 0,002$).

O grupo controle não apresentou diferença no consumo de alimento no período anterior ou posterior a injeção de PBS (**Figura 34F**, $p = 0,2153$). No entanto, o tratamento com EVs reduziu em 11% o consumo de ração do grupo tratado em comparação com o consumo observado no período antes do tratamento (**Figura 34G**, $p = 0,019$). Os resultados indicam que o tratamento com EVs está associado ao menor consumo de ração.

6.4. GLICEMIA DE JEJUM E RESPONSABILIDADE AO PIRUVATO, À GLICOSE E À INSULINA

Durante a última semana experimental, os animais foram submetidos aos testes de tolerância ao piruvato (PTT), à glicose (GTT) e à insulina (ITT). Os valores glicêmicos obtidos antes da injeção de piruvato foram utilizados para a determinação da glicemia de jejum. Os valores glicêmicos obtidos antes (tempo 0) e após a injeção de piruvato (para PTT), glicose (para GTT) e insulina (para ITT) foram utilizados para construção de uma curva glicêmica (glicemia x tempo). Para os testes de PTT e GTT, calculou-se a área sob a curva (AUC). Para o ITT, calculou-se a constante de desaparecimento da glicose plasmática (kITT).

Figura 34. Consumo de ração de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H; n=4) ou PBS (n=5).



(A) Curva do consumo de ração ao longo das 12 semanas experimentais; Consumo de ração médio das 12 semanas experimentais (B) em gramas e (C) em kcal; Comparação do consumo de ração (D) antes e (E) depois do tratamento com EVs. Consumo de ração dos animais do (F) grupo PBS e do (G) grupo EV-H antes e depois do tratamento com EVs. Para as análises estatísticas, os dados das semanas 11 e 12 foram excluídos. Teste U de Mann-Whitney (B-G) foi realizado. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil (A) e boxplot (B-G). * $p < 0,05$.

Não foi observada diferença estatística na glicemia de jejum entre os animais do grupo controle e do grupo tratado (**Figura 35A**, $p > 0,9999$). Ao observar as curvas dos testes de PTT e GTT, é possível constatar que as medianas das glicemias nos diferentes pontos, entre os dois grupos, são bastante similares (**Figura 35B e 35C**). De fato, não foi observada diferença entre os valores de AUC dos testes de PTT e GTT entre os dois grupos (**Figura 35C**, $p = 0,6857$; **Figura 35E**, $p > 0,9999$).

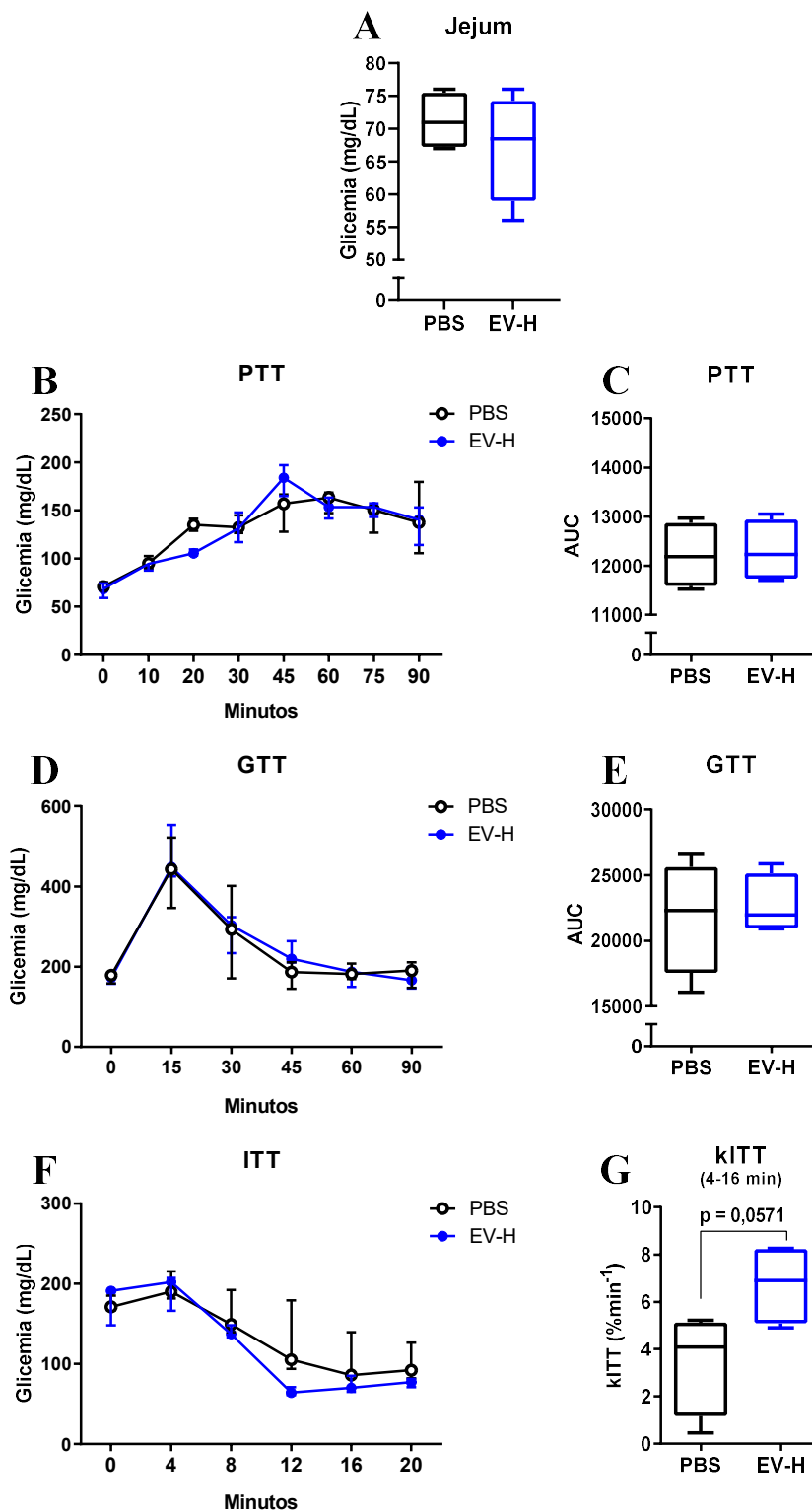
Em relação ao ITT, pode-se observar pela curva glicêmica (**Figura 35F**) que entre os tempos 8 e 16 minutos a glicemia dos animais tratados foi menor do que os animais do grupo controle. Como reflexo, a **Figura 35G** mostra que o tratamento com EVs tem uma tendência ($p = 0,0571$) em melhorar a sensibilidade à insulina, uma vez que o valor de kITT do grupo tratado foi 55% maior que o do grupo controle.

6.5. PESO ÚMIDO DOS TECIDOS

Conforme já descrito, o tratamento com EVs atenuou o ganho de peso dos animais, entretanto não foi observada diferença estatística, em relação ao grupo controle, no percentual de gordura e massa magra dos animais tratados. Para avaliar se o menor ganho de peso apresentado pelo grupo tratado foi devido à diminuição do peso de algum depósito de gordura específico, do fígado ou de músculo esquelético, as gorduras epididimal, inguinal, marrom, mesentérica, retroperitoneal, o fígado e os músculos gastrocnêmio e sóleo foram pesados.

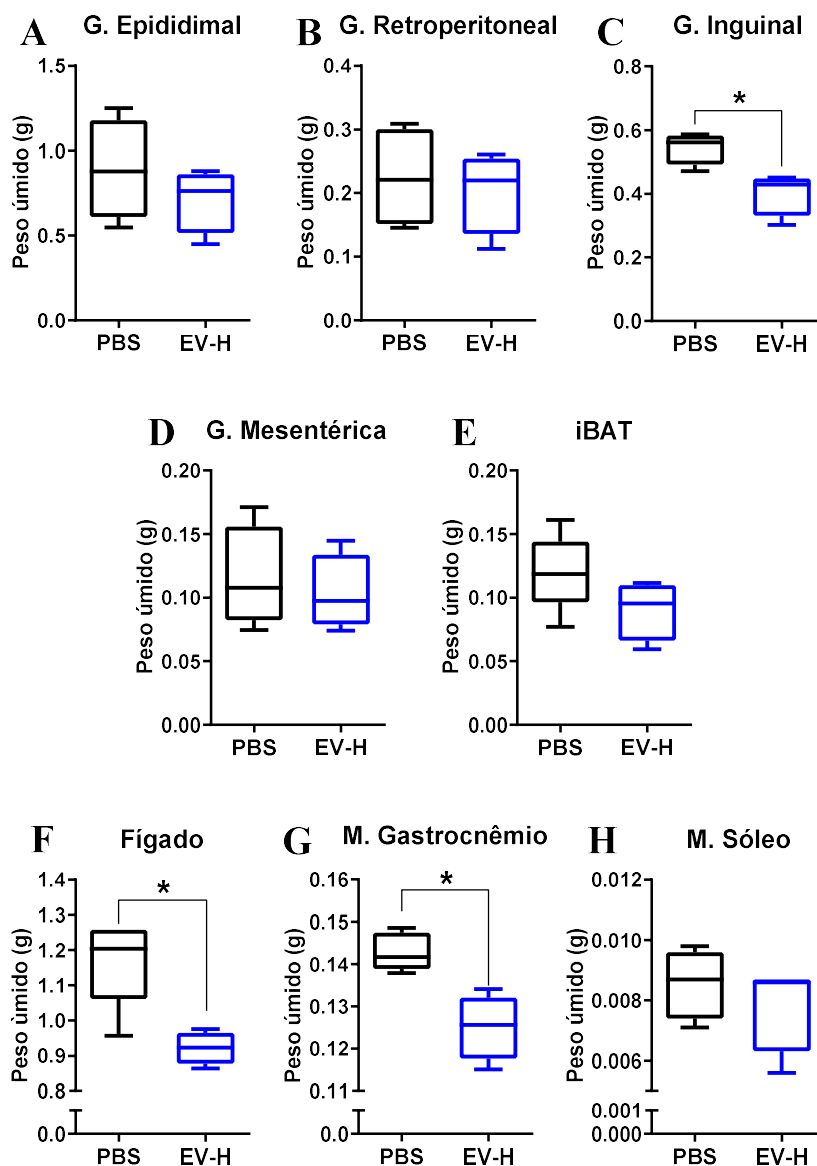
Não observamos diferenças significativa no peso das gorduras brancas epididimal (**Figura 36A**, $p = 0,4857$), retroperitoneal (**Figura 36B**, $p = 0,6857$) e mesentérica (**Figura 36D**, $p = 0,4857$), na gordura marrom interescapular (**Figura 36E**, $p = 0,1111$) e no músculo sóleo (**Figura 36H**, $p = 0,5476$) entre os dois grupos. Entretanto, o peso da gordura subcutânea inguinal (**Figura 36C**, $p = 0,0286$), do fígado (**Figura 36F**, $p = 0,0317$) e do músculo gastrocnêmio (**Figura 36G**, $p = 0,0159$) foi 23%, 23% e 11% menor no grupo tratado, respectivamente.

Figura 35. Responsividade ao piruvato, à glicose e à insulina de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H; n=4) ou PBS (n=5).



(A) Glicemia de jejum; (B) Curva do teste de tolerância ao piruvato (PTT); (C) Área sob a curva (AUC) do PTT; (D) Teste de tolerância à glicose (GTT); (E) AUC do GTT; (F) Teste de intolerância à insulina (ITT); (G) Constante de decaimento da glicose (kITT). Teste U de Mann-Whitney (A, C, E e G) foi realizado. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil (B, D e F) e *boxplot* (A, C, E e G).

Figura 36. Peso úmido de tecidos coletados de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H; n=4) ou PBS (n=5).

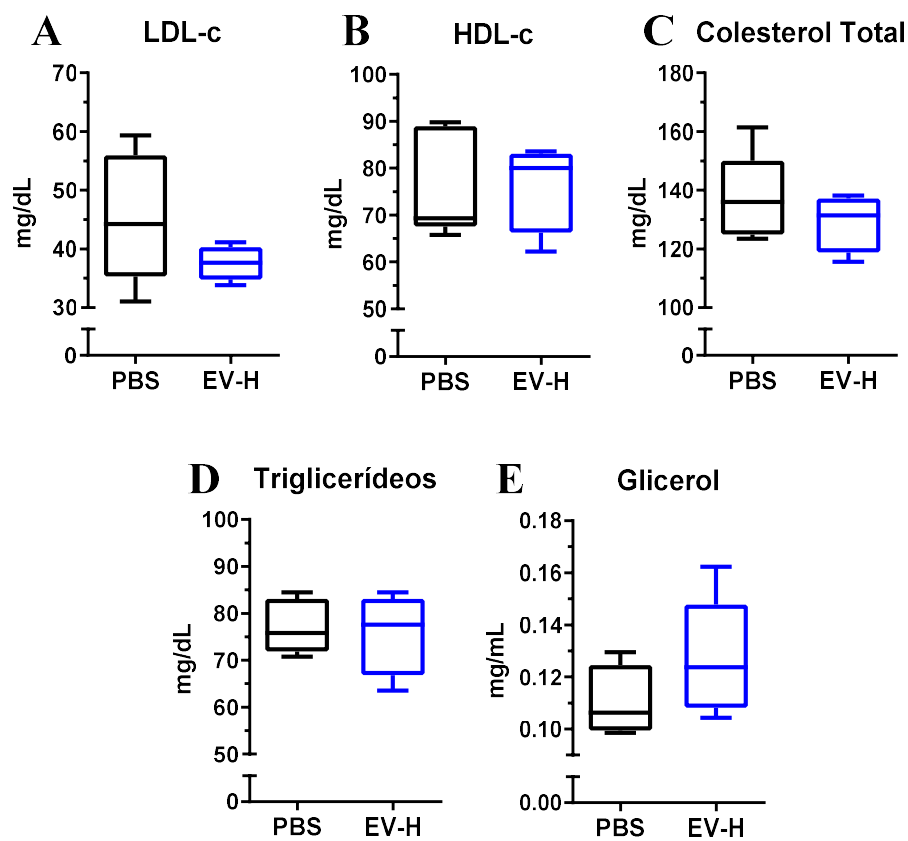


(A) Gordura epididimal; (B) Gordura retroperitoneal; (C) Gordura inguinal; (D) Gordura mesentérica; (E) Gordura marrom interescapular; (F) Fígado; (G) Músculo gastrocnêmio; (H) Músculo sóleo. Teste U de Mann-Whitney foi realizado. Dados apresentados como *boxplot*. *p < 0,05.

6.6. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Em comparação com o grupo controle, o tratamento com EVs não modificou os níveis séricos de LDL-c (**Figura 37A**, $p = 0,2857$), HDL-c (**Figura 37B**, $p = 0,8492$), colesterol total (**Figura 37C**, $p = 0,5556$), triglicerídeos (**Figura 37D**, $p = 0,9762$) e glicerol (**Figura 37E**, $p = 0,1905$).

Figura 37. Análise bioquímica do soro de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H; $n=4$) ou PBS ($n=5$).



(A) LDL-c; (B) HDL-c; (C) Colesterol total; (D) Triglicerídeos e (E) Glicerol. Teste U de Mann-Whitney foi realizado. Dados apresentados como *boxplot*.

6.7. CALORIMETRIA INDIRETA

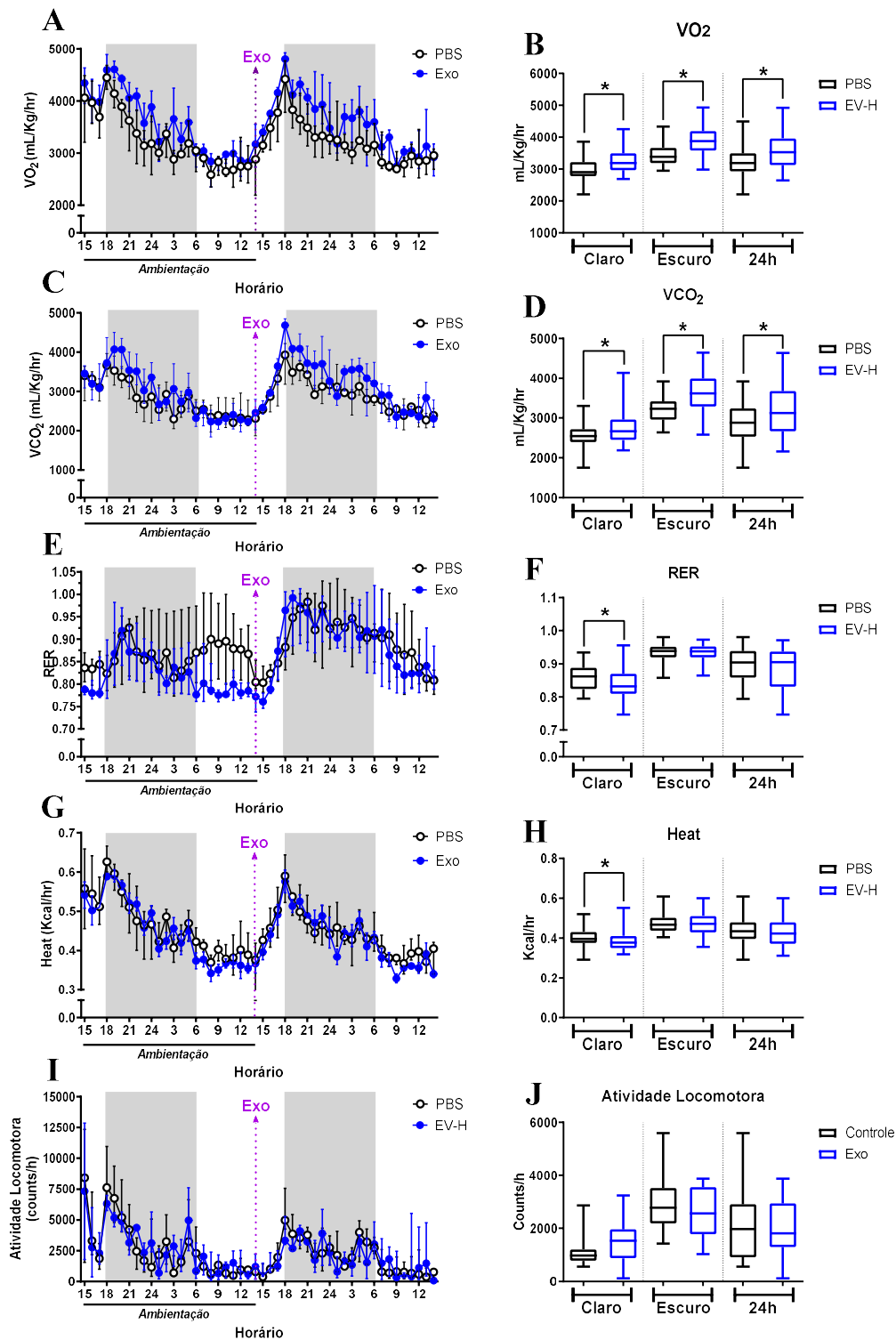
Realizou-se a calorimetria indireta para avaliarmos o gasto energético dos animais. Conforme pode ser observado na **Figura 38A**, os animais do grupo tratado consumiram uma quantidade aparentemente maior de oxigênio (O_2) durante todo o tempo que estiveram no calorímetro. Corroborando com esses dados, o consumo de O_2 dos animais tratados com EVs foi maior, em comparação com o grupo controle, no ciclo claro (aumento de 8,5%, $p < 0,0001$), no ciclo escuro (aumento de 15%, $p < 0,0001$) e no período de 24 horas (aumento de 11%, $p < 0,0001$). Com um padrão semelhante, a liberação de gás carbônico (CO_2) também pareceu maior durante o tempo do experimento (**Figura 38C**). De fato, conforme pode ser observado na **Figura 38D**, o grupo tratado liberou mais CO_2 do que o grupo controle no ciclo claro (aumento de 5%, $p = 0,0223$), no ciclo escuro (aumento de 12%, $p < 0,0001$) e em 24 horas (aumento de 8%, $p = 0,0002$).

Analisando a **Figura 38E**, pode-se observar que a razão de troca respiratória (RER) dos animais tratados é menor em relação ao grupo controle. Confirmando os resultados da **Figura 38E**, a RER foi 4% menor no grupo tratado no ciclo claro, indicando uma preferência pela oxidação de lipídeos, ao invés de carboidratos (**Figura 38F**, $p = 0,0156$). Não foi observada diferença estatística nos valores de RER no ciclo escuro (**Figura 38F**, $p = 0,8970$) e no período de 24 horas (**Figura 38F**, $p = 0,3821$) entre os dois grupos.

Analisando a **Figura 38G**, podemos observar a produção de calor (*heat*) foi em geral similar entre os grupos, com exceção no período do ciclo claro (**Figura 29H**). Camundongos tratados apresentaram produção de calor 5% menor do que os animais do grupo controle no ciclo claro (**Figura 38H**, $p = 0,0015$). Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os dois grupos no ciclo escuro (**Figura 38H**, $p = 0,9571$) e no período de 24 horas (**Figura 38H**, $p = 0,0775$).

O maior gasto energéticos dos animais tratados não foi devido às alterações na atividade locomotora (**Figura 38I**). Não foi encontrada diferença significativa na atividade locomotora entre os dois grupos nos períodos claro (**Figura 38J**, $p = 0,2035$), escuro (**Figura 38J**, $p = 0,3777$), e no de 24 horas (**Figura 38J**, $p = 0,8475$).

Figura 38. Parâmetros avaliados por calorimetria indireta em camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H; n=4) ou PBS (n=5).



(A) Volume de oxigênio (VO_2) e de (C) CO_2 (VCO_2) ao longo do experimento; (B) Média de VO_2 ; e de (D) VCO_2 no ciclo claro, escuro e em 24 horas; (E) *Respiratory exchange ratio*

(RER), (G) *heat* e (I) atividade locomotora ao longo do experimento; (F) média do RER, do (H) *heat* e da (J) atividade locomotora no ciclo claro, escuro e em 24 horas. Teste U de Mann-Whitney (B, D, F, H e J) foi realizado. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil (A, C, E, G e I) e *boxplot* (B, D, F, H e J). * $p < 0,05$.

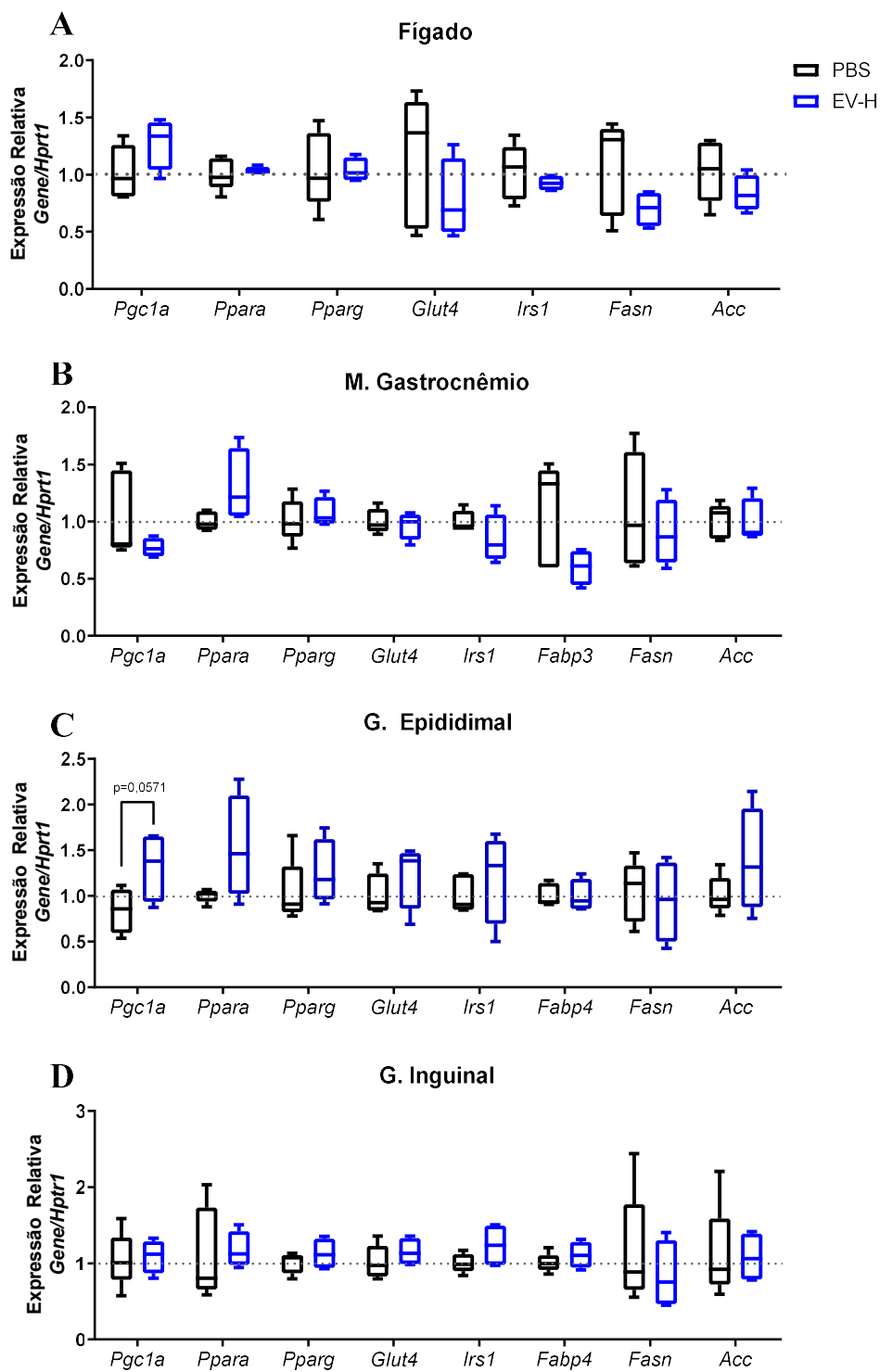
6.8. EXPRESSÃO DE RNAM – FÍGADO, MÚSCULO E GORDURA

O peso da gordura subcutânea inguinal, do músculo gastrocnêmio e do fígado foi menor no grupo tratado e, somado a isso, o tratamento mostrava uma tendência em melhorar a sensibilidade à insulina. Com base nesses dados, analisamos a expressão de genes relacionados com a oxidação de ácidos graxos (*Pgcl1* e *Ppara*), adipogênese e metabolismo de lipídeos (*Pparg*), captação de glicose (*Glut4*), sinalização da insulina (*Irs1*), captação de ácidos graxos (*Fabp3* e *Fabp4*) e lipogênese (*Fasn* e *Acc*), nos três tecidos acima mencionados e na gordura epididimal.

No fígado (**Figura 39A**), a expressão de *Pgcl1* ($p = 0,1905$), *Ppara* ($p = 0,7302$), *Pparg* ($p > 0,9999$), *Glut4* ($p = 0,1111$), *Irs1* ($p = 0,7302$), *Fasn* ($p = 0,4127$), e *Acc* ($p = 0,2857$) foi avaliada. Entretanto, nenhuma diferença estatística foi encontrada (**Figura 39A**). Já no músculo gastrocnêmio (**Figura 39B**), avaliou-se a expressão de *Pgcl1* ($p = 0,2857$), *Ppara* ($p = 0,1905$), *Pparg* ($p = 0,7302$), *Glut4* ($p > 0,9999$), *Irs1* ($p = 0,1905$), *Fabp3* ($p = 0,1905$), *Fasn* ($p = 0,5556$), e *Acc* ($p = 0,9048$). Novamente, nenhuma diferença estatística foi observada (**Figura 39B**).

Na gordura epididimal (**Figura 39C**), analisou-se a expressão de *Pgcl1* ($p = 0,0571$), *Ppara* ($p = 0,1905$), *Pparg* ($p = 0,1905$), *Glut4* ($p = 0,2857$), *Irs1* ($p = 0,2857$), *Fabp4* ($p = 0,7302$), *Fasn* ($p = 0,9048$), e *Acc* ($p = 0,4127$) (**Figura 39C**). Embora tenha se encontrado uma tendência do tratamento em aumentar em 31% a expressão de *Pgcl1* (**Figura 39C**, $p=0,0571$), nenhuma diferença estatística foi encontrada. De maneira semelhante, os genes *Pgcl1* ($p = 0,7302$), *Ppara* ($p = 0,5556$), *Pparg* ($p = 0,5556$), *Glut4* ($p = 0,4127$), *Irs1* ($p = 0,2857$), *Fabp4* ($p = 0,4127$), *Fasn* ($p = 0,5556$), e *Acc* ($p > 0,9999$) foram avaliados na gordura, contudo nenhum dos genes analisados apresentou diferença estatística (**Figura 39D**).

Figura 39. Expressão relativa de RNAm de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H; n=4) ou PBS (n=5).

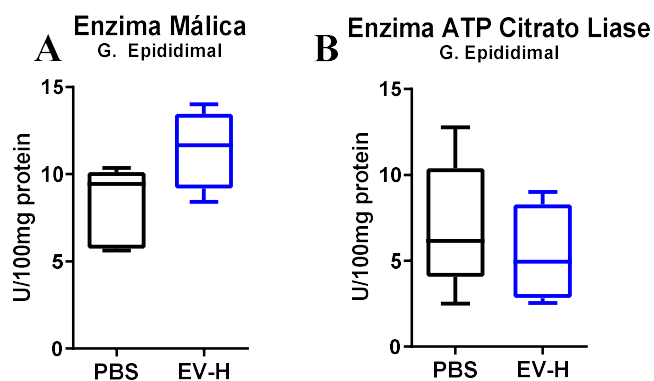


(A) Gordura inguinal; (B) Gordura epididimal; (C) Músculo gastrocnêmio e (D) Fígado. Teste U de Mann-Whitney foi realizado. Dados apresentados como *boxplot*.

6.9. ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade das enzimas envolvidas com a lipogênese, málica e ATP citrato liase, foi analisada na gordura epididimal. Não foi observamos diferença estatística na atividade da enzima málica (**Figura 40A**, $p = 0,1111$) e da ATP citrato liase (**Figura 40B**, $p = 0,7302$) entre os dois grupos.

Figura 40. Atividade enzimática das enzimas Málica e ATP Citrato Liase na gordura epididimal de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H; $n=4$) ou PBS ($n=5$).

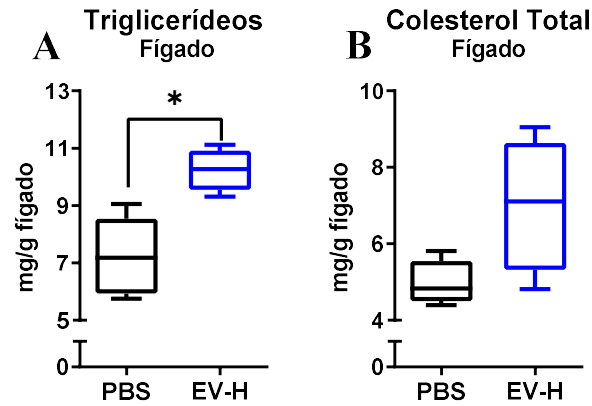


(A) Enzima Málica e (B) Enzima ATP Citrato Liase. Teste U de Mann-Whitney foi realizado. Dados apresentados como *boxplot*.

6.10. CONTEÚDO HEPÁTICO DE LIPÍDEOS

O conteúdo hepático de colesterol total e triglicerídeo foi avaliado. Embora não tenha sido observada uma diferença estatística no conteúdo de colesterol total (**Figura 41A**, $p = 0,1111$), o conteúdo de triglicerídeos foi 43% maior no grupo tratado, em relação ao grupo controle (**Figura 41B**, $p = 0,0159$).

Figura 41. Conteúdo lipídico do fígado de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H; n=4) ou PBS (n=5).

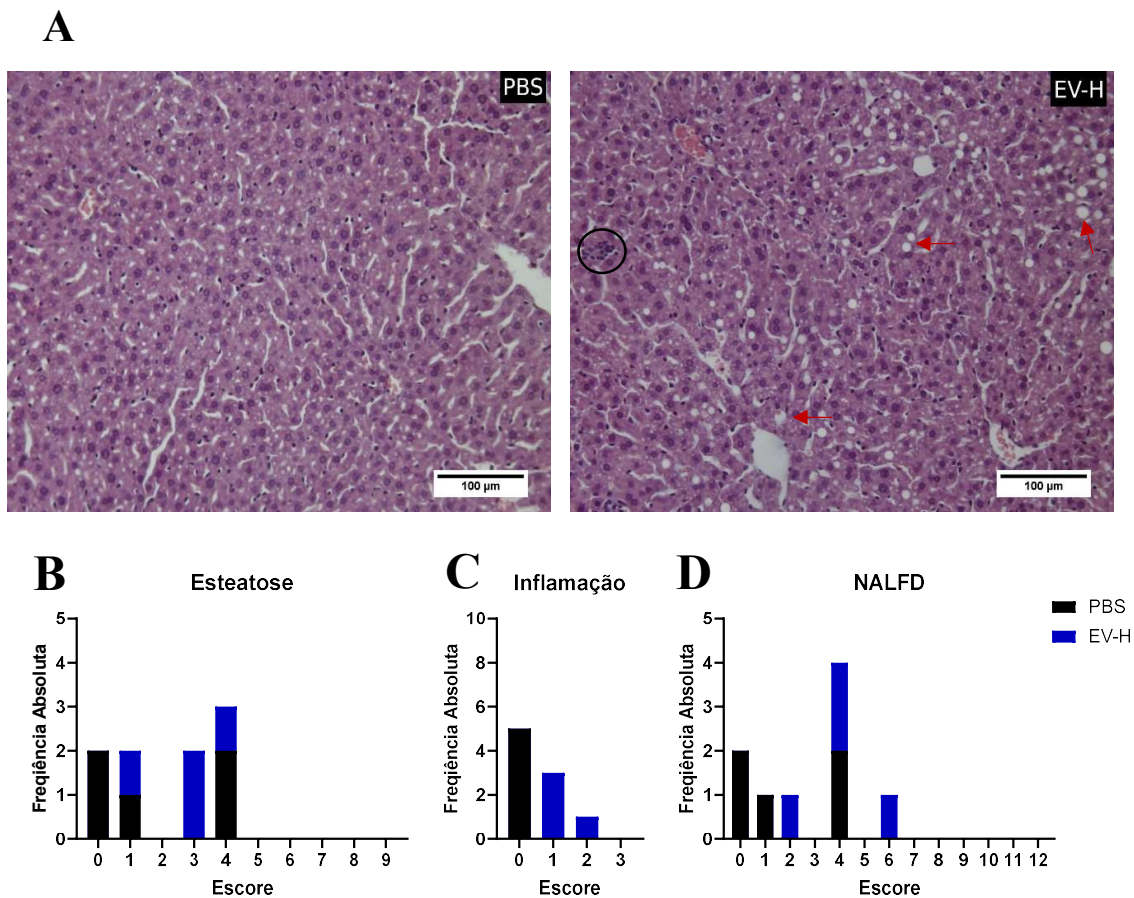


(A) Colesterol Total e (B) Triglicerídeos. Teste U de Mann-Whitney foi realizado. Dados apresentados como *boxplot*. *p < 0,05.

6.11. HISTOLOGIA FÍGADO

As fotos representativas da **Figura 42A** mostram a diferença morfológica entre os animais do grupo H e do grupo C. Pelas fotos, pode-se observar que os animais do grupo controle apresentam grau de esteatose um pouco maior do que o grupo tratado. Refletindo o que foi observado pelas fotos, pode-se observar que, em comparação com o grupo PBS, um número maior de animais do grupo EV-H apresentaram maior escore de esteatose (**Figura 42B**), de inflamação (**Figura 42C**) e, conseqüentemente, do escore de NALFD (**Figura 42D**).

Figura 42. Análise morfológica hepática e avaliação do escore de esteatose e de inflamação em camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H; n=4) ou PBS (n=5).



(A) Fotos representativas de cortes de fígado após coloração com hematoxilina e eosina – Tecido incluído em parafina; Espessura do corte = 5 µm; Escala = 100 µm; Aumento de 20x. Agregados inflamatórios: destacados em círculos; esteatose macrovesicular: setas de cor vermelha. **(B)** Escore de esteatose. **(C)** Escore de inflamação. **(D)** Escore de NALFD (soma dos escores de esteatose e inflamação).

PARTE IIB – TRATAMENTO COM VESÍCULAS EXTRACELULARES (INCLUSÃO GRUPO EV-C)

Os resultados obtidos a partir do primeiro lote de tratamento (Parte IIa) foram considerados como resultados preliminares e julgou-se necessário repetir o tratamento em um novo lote de animais para verificar a reprodutibilidade dos experimentos e, assim, confirmar os resultados obtidos. Além disso, reconheceu-se que a principal limitação do primeiro lote de tratamento foi utilizar apenas o tratamento com PBS (veículo) como controle e, por conta disso, adicionou-se um novo grupo experimental: animais tratados com EVs do soro de animais magros (EV-C). Então, para este novo lote de tratamento, foi seguido o mesmo protocolo experimental com a adição do grupo experimental EV-C. Comparou-se os três grupos experimentais em todas as análises realizadas com o intuito principal de avaliar o efeito *per se* de EVs.

7. METODOLOGIA

7.1. EXTRAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DO SORO

Um novo lote de animais alimentados com dieta controle e dieta hiperlipídica suplementada com leite condensado foi realizado (mesmo protocolo da Parte I). A extração de EVs do soro foi realizada conforme descrito na seção 5.1.

7.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL – NOVO TRATAMENTO COM VESÍCULAS EXTRACELULARES

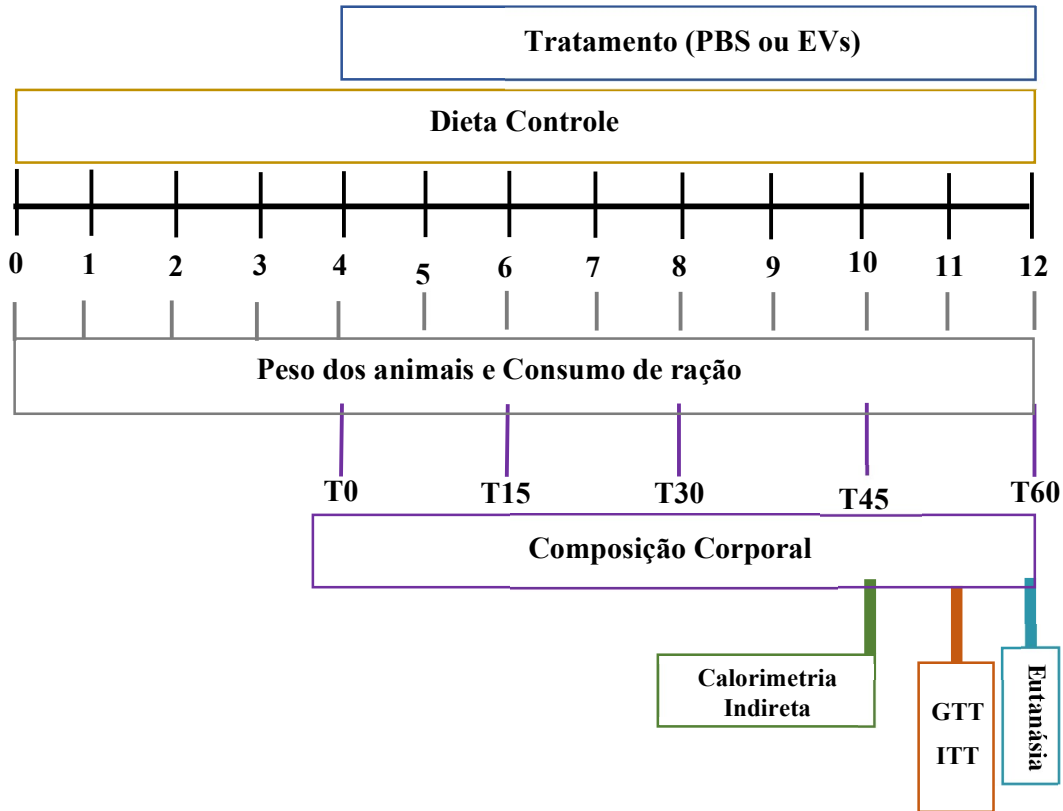
A obtenção e a manutenção dos animais foi realizada conforme descrito na seção 3.1. Animais com oito semanas de idade foram alimentados durante quatro semanas com a mesma dieta utilizada pelos animais do grupo controle do protocolo experimental para indução de obesidade (conforme descrito na seção 3.2). Após esse período, os animais foram divididos de maneira aleatória em três grupos experimentais, conforme demonstrado a seguir:

- 1) Grupo PBS – Camundongos tratados com PBS (n=4) – Grupo controle;
- 2) Grupo EV-C – Camundongos tratados com EVs derivadas do soro de animais controle (n=4);
- 3) Grupo EV-H – Camundongos tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (n=4).

As EVs isoladas do soro dos animais foram ressuspensas e quantificadas conforme descrito na seção 5.3. A dose de tratamento e a via de administração foram mantidas: 400 μ g, por via intraperitoneal (i.p.).

O tratamento foi realizado a cada três dias, durante oito semanas e todos os animais receberam água e dieta controle *ad libitum* por 12 semanas. O consumo de ração dos animais foi mensurado duas vezes por semana e o ganho de peso, semanalmente. Antes do início do tratamento e quinzenalmente após seu início, a composição corporal dos animais foi avaliada. Na semana 10 do protocolo experimental, os animais foram submetidos à calorimetria indireta e na semana 11, aos testes de tolerância à glicose (GTT) e tolerância à insulina (ITT). Após as 12 semanas experimentais, os animais foram eutanasiados. A **Figura 43** ilustra o desenho experimental. Amostras de sangue total foram coletadas para análises bioquímicas. Amostras do tecido adiposo epididimal, inguinal, retroperitoneal, do fígado e dos músculos gastrocnêmio e sóleo, foram pesadas e coletadas para análises moleculares e histológicas.

Figura 43. Desenho experimental – Novo tratamento com vesículas extracelulares (EVs)



7.3. INGESTÃO ALIMENTAR E GANHO DE PESO

Os quatros animais de cada grupo foram colocados em uma mesma caixa, totalizando uma caixa por grupo com quatro animas. A ração era ofertada de acordo com os seguintes cálculos: 4g de ração controle por animal por dia. A partir do início da dieta, o peso dos animais foi mensurado semanalmente e o consumo de ração, duas vezes por semana. O consumo de ração diária por animal foi calculado com base na sobra de ração, em gramas, por caixa. Esse valor foi posteriormente dividido pelo número de dias que a ração ficou disponível e pelo número de animais presentes na caixa.

7.4. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO CORPORAL

A análise da composição corporal dos animais foi realizada antes do início do tratamento (T0) e quinzenalmente (T15, T30, T45, T60) após início do tratamento. O protocolo foi realizado conforme descrito na seção 3.4.

7.5. TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE E À INSULINA

Os testes de tolerância à insulina e a glicose foram realizados conforme descrito nas seções 3.7 e 5.7, respectivamente.

7.6. CALORIMETRIA INDIRETA

Experimento realizado conforme descrito na seção 5.9. Resumidamente, os animais (n=4/grupo) foram mantidos em gaiolas individuais (com ciclo claro/escuro de 12h e temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$). A ambientação ocorreu durante as primeiras 24 horas, os animais e, a coleta de dados, foi realizada nas 24 horas subsequentes. Assim, o tempo total dos animais no calorímetro foi de aproximadamente 48 horas. Antes da coleta de dados, os animais receberam o tratamento com EVs (grupo EV-C e EV-H) ou com seu veículo (grupo PBS).

7.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram testados em relação à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (teste F). Como a amostra utilizada foi pequena, optou-se pelo teste de Kruskal Wallis (não paramétrico) para comparar os três grupos experimentais (PBS, EV-C e EV-H). Quando encontrada diferença estatística no teste de Kruskal Wallis, o pós-teste

de Dunn foi realizado. Algumas análises utilizaram apenas dois grupos experimentais e, então, o teste U de Mann-Whitney bilateral para amostras independentes (não paramétrico) foi realizado. Para todas as análises estatísticas o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software) foi utilizado. O nível de significância foi estabelecido como $p < 0,05$. Os títulos das figuras indicam o n amostral. Nas legendas, a forma de expressão dos dados está indicada.

8. RESULTADOS

8.1. PESO CORPÓREO E COMPOSIÇÃO CORPORAL

Os animais foram pesados semanalmente durante as 12 semanas experimentais e sua composição corporal foi avaliada no início do protocolo experimental (T-30), antes do primeiro dia de tratamento (T0) e quinzenalmente até o último dia de tratamento (T60). Assim, pôde-se avaliar o efeito do tratamento com EVs derivadas do soro de camundongos obesos no peso corpóreo e composição corporal de animais alimentados com dieta controle.

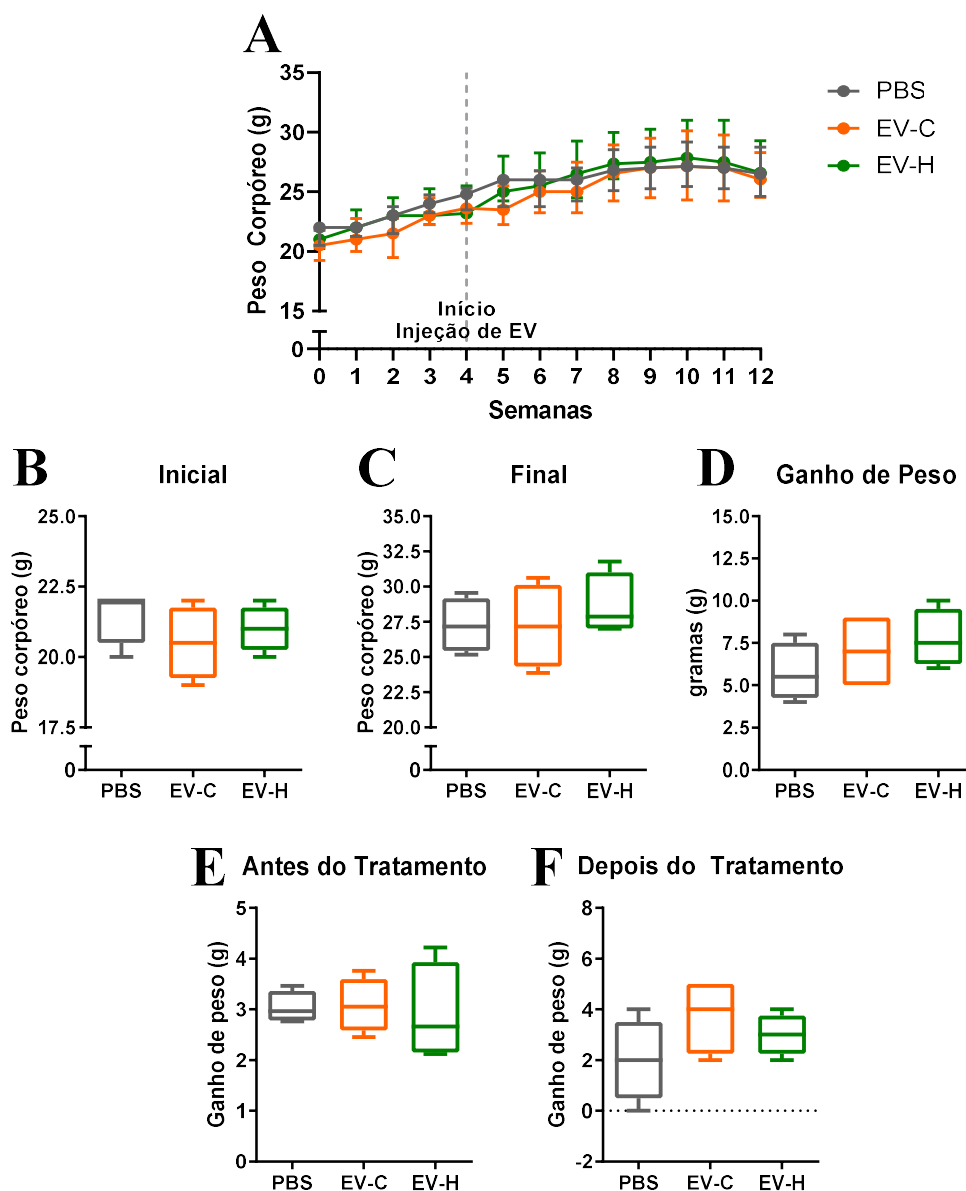
Como se tentou mimetizar o mesmo protocolo experimental realizado anteriormente (Parte IIa), também foram realizados experimentos que envolveram transporte dos animais (calorimetria indireta) e protocolos de jejum (GTT e ITT) nas últimas semanas experimentais (semanas 11 e 12). Sabe-se que tais procedimentos provocam estresse nos animais, prejudicando o ganho de peso. Conforme observado na **Figura 44A**, os animais apresentaram uma perda de peso principalmente na última semana experimental. Assim, conforme também realizado na Parte IIa, a semana considerada como *final* para os resultados de peso final (**Figura 44C**), ganho de peso (**Figura 44D**) e composição corporal (**Figura 44B**) foi a semana 10, que corresponde a 45 dias após o início do tratamento (T45).

Pode-se observar na **Figura 44A**, que o peso médio de todos os animais no início do protocolo experimental (0 semanas) não tem muita variação (PBS: $21,5 \pm 1,0$; EV-C: $20,5 \pm 1,29$ e EV-H: $21 \pm 0,41$ – média \pm DP). Durante as 12 semanas experimentais, o peso dos animais foi aumentando entre 0,20-1,25 gramas por semana, porém sem grandes diferenças entre os grupos experimentais. Para realizar a análise estatística dos resultados, comparou-se o peso inicial, o peso final e o ganho de peso entre os três grupos e, conforme os dados da **Figura 44A** já demonstrava, não foram encontradas diferenças estatísticas em relação ao peso inicial (**Figura 44B**, $p = 0,4355$), peso final (**Figura 44C**, $p = 0,6478$) e ganho de peso (**Figura 44D**, $p = 0,3401$). Também foram avaliados os resultados de ganho de peso antes e depois do tratamento, mas nenhuma diferença estatística foi encontrada (**Figura 44E**, $p = 0,8639$; **Figura 44F**, $p = 0,2842$).

Em relação à composição corporal, pode-se observar um aumento na porcentagem de gordura dos três grupos ao se comparar T0 com T45, contudo o aumento é maior nos grupos EV-C e EV-H (**Figura 45A e 45B**). A **Figura 45C** compara a porcentagem de gordura dos três grupos experimentais ao longo do tempo e nenhuma diferença estatística foi observada entre os

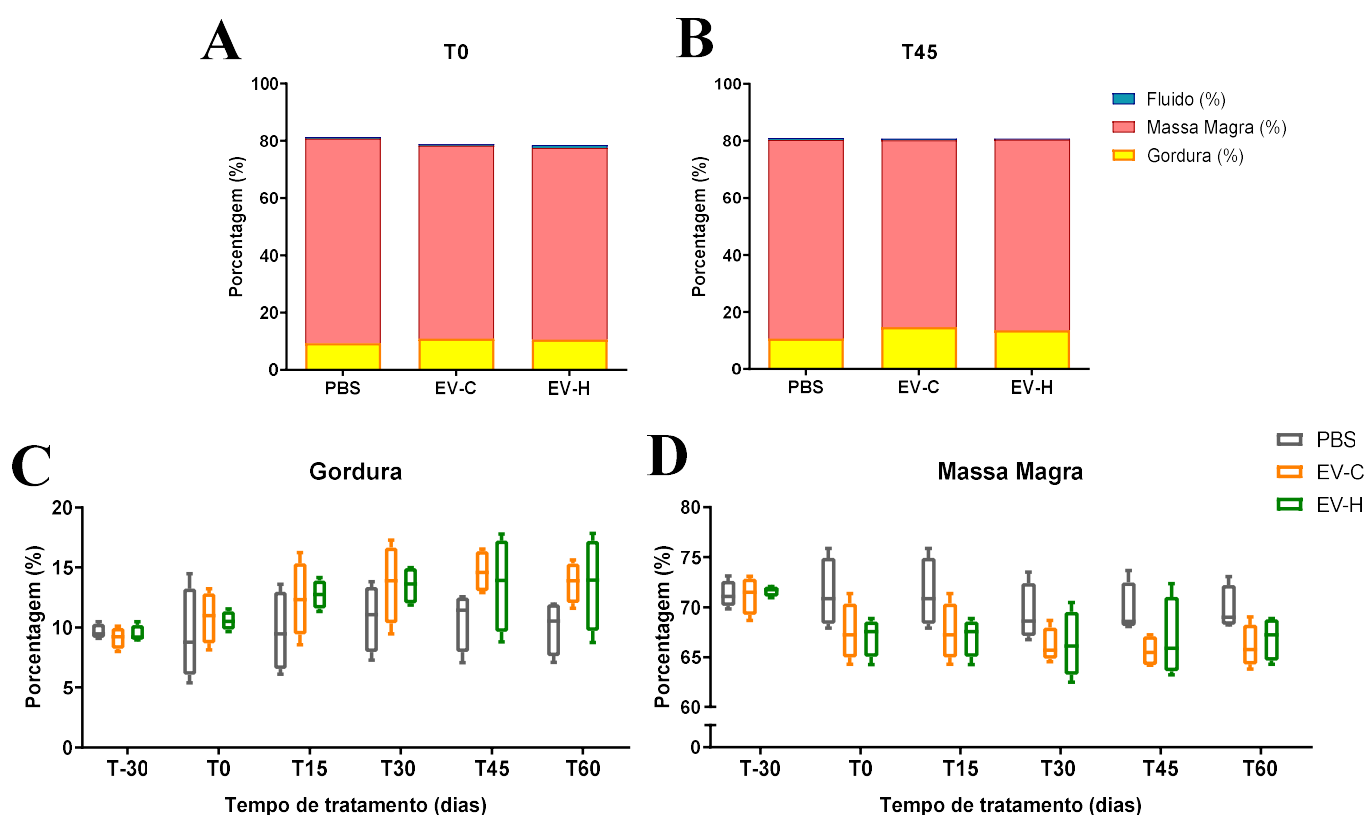
grupos nos tempos T-30 ($p = 0,6667$), T0 ($p = 0,5171$), T15 ($p = 0,3271$), T30 ($p = 0,3475$), T45 ($p = 0,1219$), T60 ($p = 0,1965$). De maneira semelhante, a **Figura 45D** mostra que não foram encontradas diferenças estatísticas na porcentagem de massa magra entre os três grupos experimentais nos tempos T-30 ($p = 0,9676$), T0 ($p = 0,0859$), T15 ($p = 0,0859$), T30 ($p = 0,1965$), T45 ($p = 0,0741$), T60 ($p = 0,2345$).

Figura 44. Avaliação do peso corpóreo de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H), animais magros (EV-C) ou PBS ($n=4$ /grupo).



(A) Curva de peso corpóreo ao longo das 12 semanas experimentais; (B) Peso corpóreo no início do protocolo experimental; (C) Peso corpóreo na semanal final do protocolo experimental; (D) Ganho de peso entre o começo e o final do protocolo experimental; (E) Ganho de peso antes do início do tratamento e (F) Ganho de peso após o início do tratamento. Para todas as análises, peso final foi considerado como o peso da décima semana. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (B-F) foi realizado. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil (A) e *boxplot* (B-F).

Figura 45. Avaliação da porcentagem de gordura, massa magra e fluido de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H), animais magros (EV-C) ou PBS (n=4/grupo).



Composição percentual de gordura, massa magra e fluido (A) antes do início do tratamento e (B) após 45 dias de tratamento; Comparação da composição percentual de (C) gordura e (D) massa magra entre os três grupos experimentais em diferentes tempos de tratamento. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (C e D) foi realizado. Dados apresentados como média (A e B) e *boxplot* (C e D).

8.2. CONSUMO DE RAÇÃO

Para avaliar o efeito do tratamento de EVs realizado no consumo alimentar dos animais, avaliar o consumo de ração durante todo o protocolo experimental. Seguindo a explicação da

seção anterior, foram excluídos os dados das semanas 11 e 12 das análises realizadas nos gráficos **B-H** da **Figura 46**.

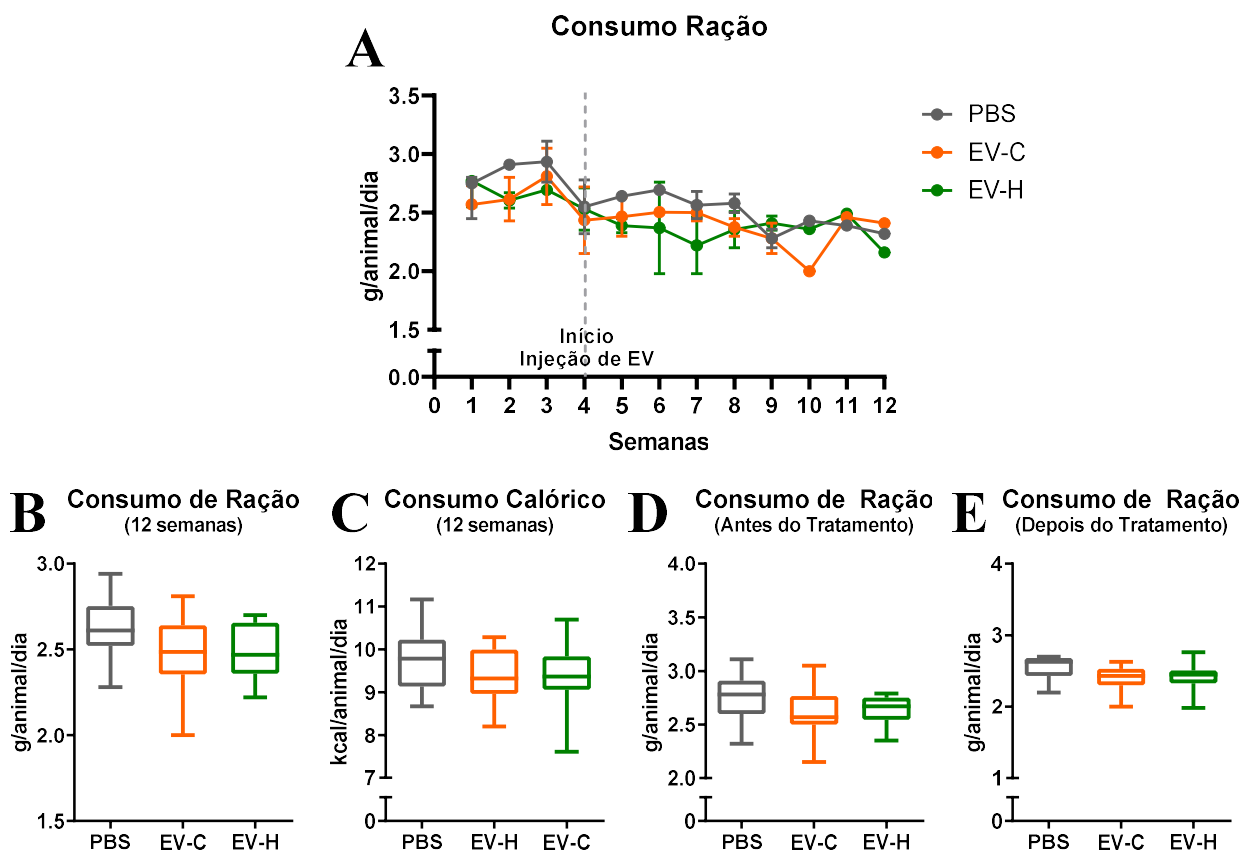
Ao observar a curva de consumo de ração ao longo das 12 semanas experimentais, percebe-se que não há grandes diferenças entre três grupos avaliados (**Figura 46A**). De fato, considerando o média dos dados coletados ao longo das 12 semanas, não foram observadas diferenças estatísticas no consumo de ração (**Figura 46B**, $p = 0,2371$) e no consumo calórico (**Figura 46C**, $p = 0,3916$) entre os três grupos. Para avaliar se o tratamento influenciou o consumo alimentar, comparou-se o consumo de ração antes e depois do tratamento. Novamente, não foram encontradas diferenças estatísticas no consumo de ração antes (**Figura 46D**, $p = 0.2060$) e depois (**Figura 46E**, $p = 0,1076$) do tratamento, mostrando que o tratamento com EVs não tem efeito no consumo alimentar.

8.3. GLICEMIA DE JEJUM E RESPONSABILIDADE À GLICOSE E À INSULINA

Assim como foi realizado na Parte IIa deste trabalho, os animais foram submetidos aos testes de tolerância à glicose (GTT) e à insulina (ITT). Os valores de glicemia obtidos antes da injeção de glicose, durante o experimento de GTT, foram utilizados para a determinação da glicemia de jejum. Os valores glicêmicos obtidos antes (tempo 0) e após a injeção de glicose (para GTT) e insulina (para ITT) foram utilizados para construção de uma curva glicêmica (glicemia x tempos). Para o GTT, calculou-se a área sob a curva (AUC) e para o ITT, a constante de desaparecimento da glicose plasmática (kITT).

Analisando a glicemia após 6 horas de jejum, pode-se observar que os grupos tratados com EVs apresentaram glicemia maior em comparação com o grupo PBS (**Figura 47A**). De fato, a glicemia de jejum foi 12% e 9% maior nos grupos EV-C e EV-H, respectivamente, em comparação com o grupo PBS (**Figura 47A**, $p = 0.0452$). Contudo, nenhuma diferença foi encontrada no pós-teste de Dunn (**Figura 47A**; PBS vs. EV-C: $p = 0,0805$; PBS vs. EV-H: $p = 0,1650$; EV-C vs. EV-H: $p > 0.9999$).

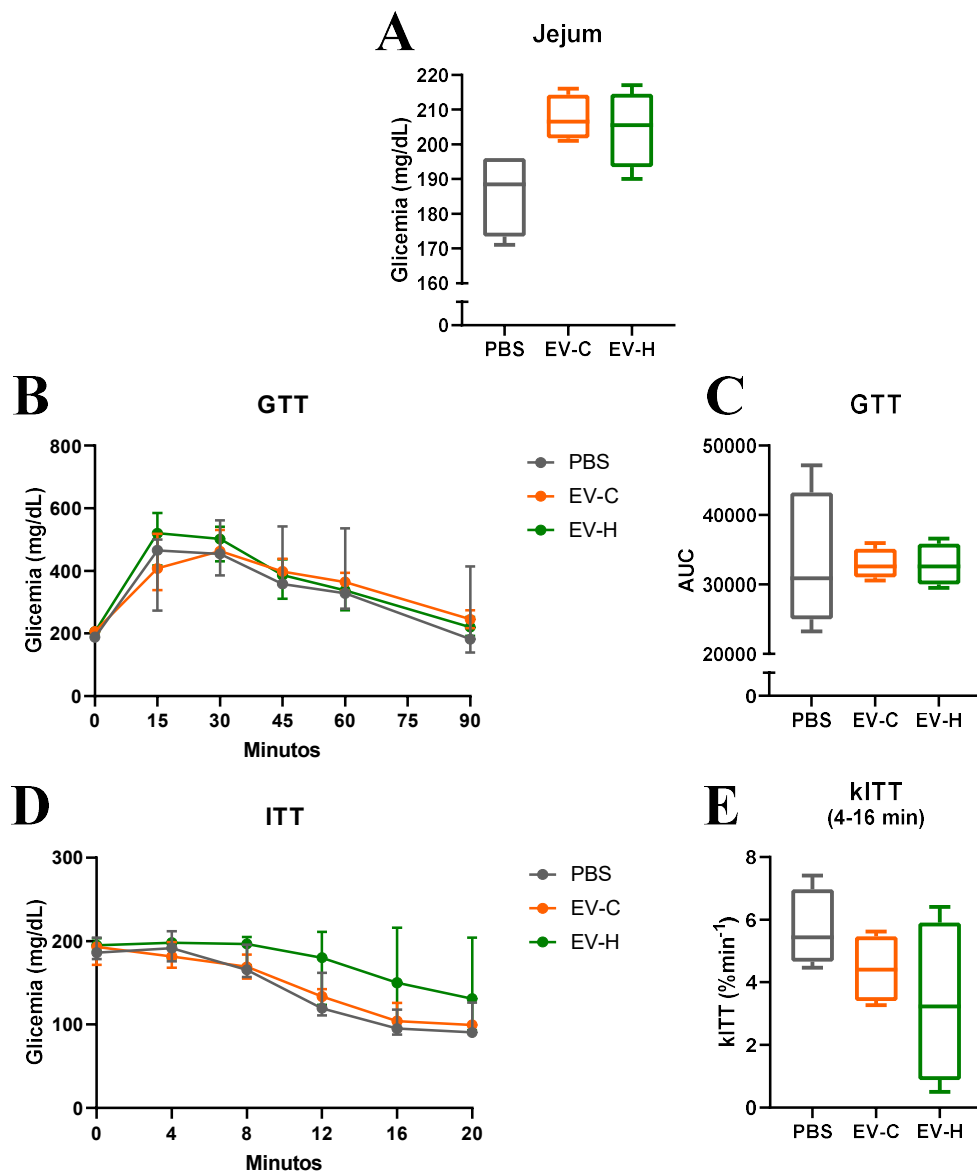
Figura 46. Consumo de ração de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H), animais magros (EV-C) ou PBS (n=4/grupo).



(A) Curva do consumo de ração ao longo das 12 semanas experimentais; Consumo de ração médio das 12 semanas experimentais (B) em gramas e (C) em kcal; Comparação do consumo de ração (D) antes e (E) depois do tratamento com EVs. Para as análises estatísticas, os dados das semanas 11 e 12 foram excluídos. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (B-E) foi realizado. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil (A) e *boxplot* (B-E). * $p < 0,05$.

Não foram observadas grandes diferenças nos valores da curva glicêmica obtida com o GTT (Figura 47B) e, como consequência, não se observou diferença estatística na AUC do GTT (Figura 47C, $p = 0,7463$). Em relação ao ITT, pode-se observar que o grupo EV-H apresenta glicemia maior entre os tempos 8-20 minutos, em comparação com os grupos PBS e EV-C (Figura 47D), entretanto, ao analisar o kITT, não foi encontrada diferença estatística entre os grupos (Figura 47 $p = 0,2345$).

Figura 47. Responsividade à glicose e à insulina de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H), animais magros (EV-C) ou PBS (n=4/grupo).



(A) Glicemia de jejum; (B) Curva do teste de tolerância à glicose (GTT); (C) AUC do GTT; (D) Curva do teste de intolerância à insulina (ITT); (E) Constante de decaimento da glicose (kITT). Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (A, C e E) foi realizado. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil (B e D) e *boxplot* (A, C e E).

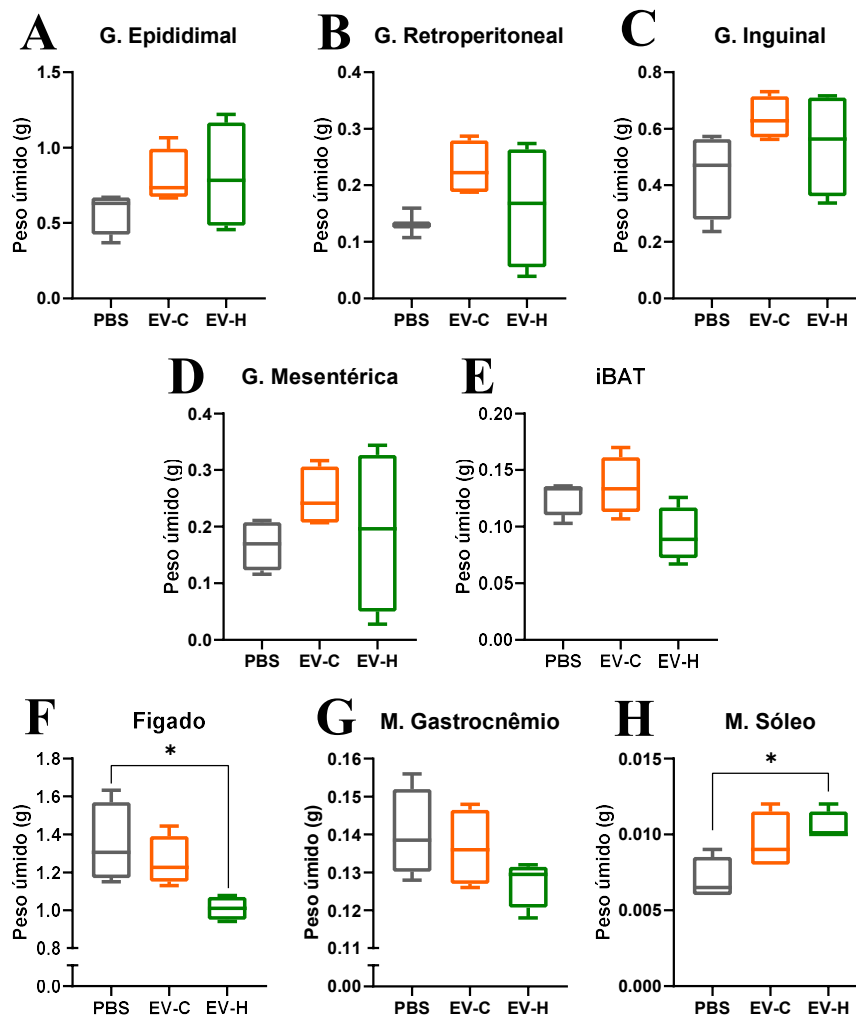
8.4. PESO ÚMIDO DOS TECIDOS

Diferentemente dos dados obtidos da Parte IIa, os animais deste novo lote de tratamento não tiveram diferença no ganho de peso e apenas os animais do grupo EV-H consumiram menos ração em decorrência do tratamento. Em relação a composição corporal, embora a diferença não tenha sido estatística, os animais dos grupos EV-C e EV-H pareceram ter maior percentual de gordura e menor percentual de massa magra em relação ao grupo PBS. Para confirmar os dados obtidos anteriormente, o peso de depósitos de gordura, fígado e músculos esqueléticos foi mensurado.

Não foi observada diferença estatística no peso das gorduras epididimal (**Figura 48A**, $p = 0,3697$), retroperitoneal (**Figura 48B**, $p = 0,2180$), inguinal (**Figura 48C**, $p = 0,1965$) e mesentérica (**Figura 48D**, $p = 0,4360$). O músculo gastrocnêmio (**Figura 48G**, $p = 0,3524$) também não apresentou diferença entre os três grupos. O peso da gordura marrom foi 27% e 31% menor no grupo EV-H em comparação com os grupos PBS e EV-C, respectivamente (**Figura 48E**, $p = 0,0452$). Contudo, nenhuma diferença foi encontrada no pós-teste de Dunn (**Figura 48E**; PBS vs. EV-C: $p > 0,9999$; PBS vs. EV-H: $p = 0,1663$; EV-C vs. EV-H: $p = 0,0813$).

Conforme já observado no lote anterior, comparando apenas o grupo PBS e EV-H, o peso do fígado foi 33% menor no grupo EV-H em comparação com o grupo PBS (**Figura 48F**, $p = 0,0107$; PBS vs. EV-C: $p > 0,9999$; PBS vs. EV-H: $p = 0,0324$; EV-C vs. EV-H: $p = 0,0930$) e, em contrapartida, o peso do músculo sóleo foi 50% maior no grupo EV-H em comparação com o grupo PBS (**Figura 48H**, $p = 0,0281$; PBS vs. EV-C: $p = 0,2636$; PBS vs. EV-H: $p = 0,0363$; EV-C vs. EV-H: $p > 0,9999$). Entretanto, não observamos diferenças no peso desses tecidos entre os grupos EV-C e EV-H.

Figura 48. Peso úmido de tecidos coletados de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H), animais magros (EV-C) ou PBS (n=4/grupo).



(A) Gordura epididimal; (B) Gordura retroperitoneal; (C) Gordura inguinal; (D) Gordura mesentérica; (E) Gordura marrom interescapular (iBAT); (F) Fígado; (G) Músculo gastrocnêmio; (H) Músculo sóleo. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foi realizado. Dados apresentados *boxplot*. * $p < 0,05$.

8.5. CALORIMETRIA INDIRETA

Para se ter uma melhor noção do estado metabólico dos animais, realizou-se calorimetria indireta. Conforme pode ser observado na **Figura 49A**, o consumo de oxigênio (VO_2) dos animais do grupo EV-H foi menor em comparação com os outros dois grupos e, de maneira

contrária, animais do grupo EV-C parecem ter valores maiores de VO_2 ao longo das 24 horas após o tratamento com EVs. Confirmando o que foi observado no gráfico de linhas, animais do grupo EV-C apresentaram um aumento de 12% no VO_2 em comparação com o grupo PBS no ciclo claro e, de maneira contrária, o VO_2 foi de aproximadamente 9% e 24% menor no grupo EV-H em comparação com o grupo PBS e EV-C, respectivamente (**Figura 49B**, $p < 0,0001$; PBS vs. EV-C: $p < 0,0001$; PBS vs. EV-H: $p = 0,0008$; EV-C vs. EV-H: $p < 0,0001$). No ciclo escuro, animais do grupo EV-H seguiram o padrão observado no ciclo claro: 17% e 21% de diminuição no VO_2 em comparação aos grupos PBS e EV-C, respectivamente (**Figura 49B**, $p < 0,0001$; PBS vs. EV-C: $p = 0,1813$; PBS vs. EV-H: $p < 0,0001$; EV-C vs. EV-H: $p < 0,0001$). Já a média do VO_2 , em 24 horas, também mostrou que o grupo EV-C consumiu mais oxigênio do que o grupo PBS (aumento de 6%), enquanto o grupo EV-H apresentou diminuição no VO_2 em 15 % e 22% em relação ao grupo PBS e EV-C, respectivamente (**Figura 49B**, $p < 0,0001$; PBS vs. EV-C: $p = 0,0112$; PBS vs. EV-H: $p < 0,0001$; EV-C vs. EV-H: $p < 0,0001$).

Conforme pode ser observado na **Figura 49C**, a produção de CO_2 (VCO_2) seguiu os padrões de VO_2 , com o grupo EV-H aparentando ter menor VCO_2 e o grupo EV-C, maior. De fato, pode-se observar que, no ciclo claro, o VCO_2 foi 8% maior no grupo EV-C, em comparação com o grupo PBS e, em contrapartida, o grupo EV-H apresentou valores 19% e 30% menor em relação ao grupo PBS e EV-C (**Figura 49C**, $p < 0,0001$; PBS vs. EV-C: $p = 0,0301$; PBS vs. EV-H: $p < 0,0001$; EV-C vs. EV-H: $p < 0,0001$). No ciclo escuro, o grupo EV-H também apresentou diminuição em 22% e 25% no VCO_2 em relação ao grupo PBS e EV-C, respectivamente (**Figura 49C**, $p < 0,0001$; PBS vs. EV-C: $p = 0,9290$; PBS vs. EV-H: $p < 0,0001$; EV-C vs. EV-H: $p < 0,0001$). Tal padrão foi mantido na análise de 24 horas, com o grupo EV-H apresentando diminuição de 20% e 25% de VCO_2 em relação ao grupo PBS e EV-C (**Figura 49C**, $p < 0,0001$; PBS vs. EV-C: $p = 0,2143$; PBS vs. EV-H: $p < 0,0001$; EV-C vs. EV-H: $p < 0,0001$).

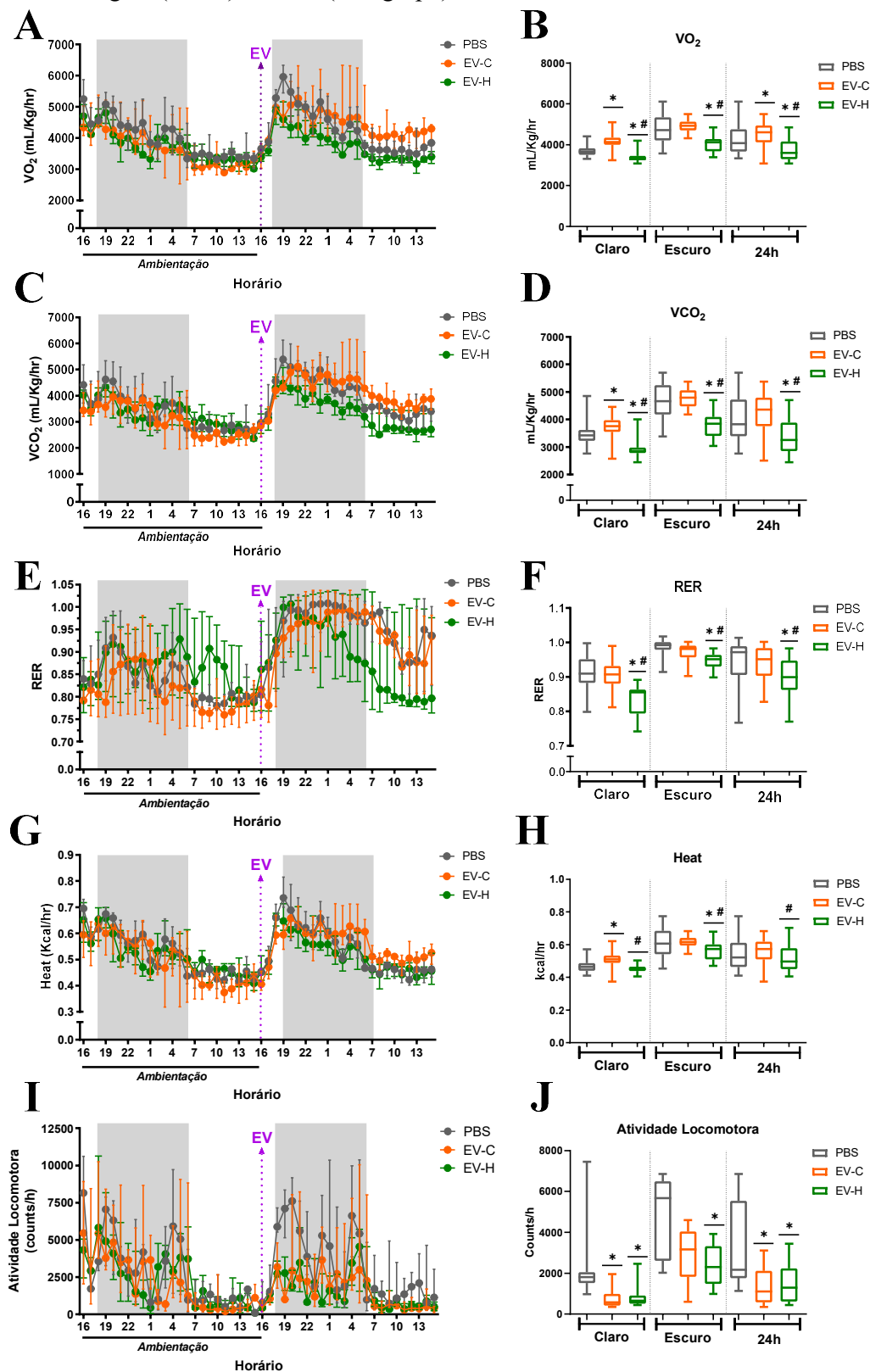
Em relação ao RER, os grupos PBS e EV-C parecem ter valores bem parecidos, enquanto o grupo EV-H apresenta valores menores ao longo das 24 horas de experimento, quando se observa a **Figura 49E**. De fato, tanto no período claro quanto no escuro e em 24 horas, o grupo EV-H apresentou valores menores em comparação com os grupos PBS e EV-C. No período claro, os valores foram 7% e 6% menores (**Figura 49F**, $p < 0,0001$; PBS vs. EV-C: $p > 0,9999$; PBS vs. EV-H: $p < 0,0001$; EV-C vs. EV-H: $p < 0,0001$), no período escuro, 4% e 3% menores (**Figura 49F**, $p < 0,0001$; PBS vs. EV-C: $p = 0,0744$; PBS vs. EV-H: $p < 0,0001$; EV-C vs. EV-H: $p = 0,0001$) e em 24 horas, 5% e 4% menores do que os apresentados pelos grupos PBS

e EV-C, respectivamente (**Figura 49F**, $p < 0,0001$; PBS vs. EV-C: $p = 0,8333$; PBS vs. EV-H: $p < 0,0001$; EV-C vs. EV-H: $p < 0,0001$).

A produção de calor (*heat*) não mostrou grandes variações entre os três grupos experimentais, mas pode-se observar que no período de 24 horas após o tratamento com EVs e PBS o grupo EV-C apresentou maiores valores de *heat*, enquanto o grupo EV-H, menores (**Figura 49G**). Após análise estatística dos dados, os animais do grupo EV-C apresentaram, no ciclo claro, um aumento de 9% dos valores de *heat* em comparação com o grupo PBS e o grupo EV-H, uma diminuição de 12% em comparação com o grupo EV-C. (**Figura 49H**, $p < 0,0001$; PBS vs. EV-C: $p = 0,0001$; PBS vs. EV-H: $p = 0,2032$; EV-C vs. EV-H: $p < 0,0001$). No ciclo escuro o grupo EV-H apresentou diminuição de 7% e 8% na produção de calor em comparação com o grupo PBS e EV-C, respectivamente (**Figura 49H**, $p = 0,0010$; PBS vs. EV-C: $p > 0,9999$; PBS vs. EV-H: $p = 0,0259$; EV-C vs. EV-H: $p = 0,0010$). Ao longo das 24 horas, o *heat* do grupo EV-H só foi menor (redução de 8%) em comparação com o grupo EV-C (**Figura 49H**, $p = 0,0006$; PBS vs. EV-C: $p = 0,0848$; PBS vs. EV-H: $p = 0,2923$; EV-C vs. EV-H: $p = 0,0004$).

A atividade locomotora parece ter sido afetada pelo tratamento com EVs, uma vez que após o tratamento, os grupos EV-C e EV-H apresentaram atividade locomotora visivelmente menor do que os animais do grupo PBS (**Figura 49I**). No período claro, os grupos EV-C e EV-H apresentaram diminuição na atividade locomotora em 62% e 60%, respectivamente, em comparação com o grupo PBS (**Figura 49J**, $p = 0,0002$; PBS vs. EV-C: $p = 0,0006$; PBS vs. EV-H: $p = 0,0026$; EV-C vs. EV-H: $p > 0,9999$). No período escuro, apenas foi observada diminuição de 53% do grupo EV-H em comparação como grupo PBS (**Figura 49J**, $p = 0,0048$; PBS vs. EV-C: $p = 0,1047$; PBS vs. EV-H: $p = 0,0038$; EV-C vs. EV-H: $p = 0,7152$). No período de 24 horas, a atividade locomotora foi 60% e 57% menor, em comparação com o grupo PBS, nos grupos EV-C e EV-H, respectivamente (**Figura 49J**, $p = 0,0001$; PBS vs. EV-C: $p = 0,0004$; PBS vs. EV-H: $p = 0,0013$; EV-C vs. EV-H: $p > 0,9999$). Interessantemente, os resultados sugerem um efeito *per se* das EVs na atividade locomotora de animais controle.

Figura 49. Parâmetros avaliados por calorimetria indireta em camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H), animais magros (EV-C) ou PBS (n=4/grupo).



(A) Volume de oxigênio (VO_2) e de (C) CO_2 (VCO_2) ao longo do experimento; (B) Média de VO_2 ; e de (D) VCO_2 no ciclo claro, escuro e em 24 horas; (E) *Respiratory exchange ratio* (RER), (G) *heat* e (I) atividade locomotora ao longo do experimento; (F) média do RER, do (H) *heat* e da (J) atividade locomotora no ciclo claro, escuro e em 24 horas. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (B, D, F, H e J) foi realizado. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil (A, C, E, G e I) e *boxplot* (B, D, F, H e J). *[#]p < 0,05. (*) vs. PBS; ([#]) vs. EV-C.

PARTE III – SEQUENCIAMENTO DE MicroRNAs DERIVADOS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES E ANÁLISE BIOINFORMÁTICA

9. METODOLOGIA

9.1. EXTRAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DO SORO

Para realizar o sequenciamento, partiu-se de um *pool* de 400 µL de soro de animais do grupo C e do grupo H. Para compor o volume total de 400 µL, quatro amostras diferentes de soro dos animais do grupo C e do grupo H foram escolhidas, onde 100 µL de soro de cada amostra foram adicionados ao *pool* de seu respectivo grupo. O soro foi extraído conforme descrito na seção 3.8 e o isolamento das EVs, conforme seção 5.1. O *pellet* de EVs foi ressuspensionado em 230 µL de PBS.

9.2. EXTRAÇÃO DE RNA DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

Partindo de 200 µL de exossomos ressuspensionados em PBS, extraiu-se o RNA dos exossomos utilizando o reagente Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit (Cat. #4478545; Thermo Fisher Scientific). Realizou-se o protocolo para enriquecimento de smallRNAs nas duas amostras (C e H), conforme instrução do fabricante.

9.3. SEQUENCIAMENTO DE MicroRNAs

As amostras de RNA enriquecidas foram encaminhadas para sequenciamento. O *kit* usado para preparação das bibliotecas foi o Clontech SMARTer smRNA (Clontech Laboratories, Takara Bio Inc., Mountain View, CA, EUA), seguindo as informações do fabricante. Para o sequenciamento utilizou-se o Illumina HiSeq X Ten (Illumina, San Diego, CA, EUA). O protocolo de sequenciamento e a análise bioinformática dos dados foram realizados por intermédio da empresa Proteimax (São Paulo, Brasil; <https://www.proteimax.com>). Expressão diferenciada foi realizada utilizando o software edgeR.

9.4. ANÁLISE BIOINFORMÁTICA

Análises das vias relacionadas com os miRNAs diferentemente expressos entre os grupos obeso e controle (H vs. C) foi realizada usando o servidor web de acesso livre *DIANA-miRPath*

v3.0 (<http://snf-515788.vm.oceanos.grnet.gr/>) (VLACHOS et al., 2015). A predição de genes-alvo dos miRNAs diferentemente expressos foi feita utilizando o algoritmo de predição online e de acesso livre, *DIANA microT-CD web server v5.0* (http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=microT_CDS/index) (RECZKO et al., 2012; PARASKEVOPOULOU et al., 2013). Utilizou-se *DIANA-miRPath v3.0* para identificar as vias KEGG - Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas (do inglês, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (KANEHISA;GOTO, 2000; KANEHISA, 2019; KANEHISA et al., 2021). Como a base de dados KEGG utiliza o nome das vias em inglês, os nomes das vias nas tabelas não foram traduzidos, a tradução (seguida pelo nome da via em inglês) foi utilizada no corpo do texto.

Uma análise de enriquecimento dos genes-alvo de miRNA nas vias KEGG foi realizada das duas maneiras possíveis, uma *a priori* e outra *a posteriori* da análise estatística (VLACHOS et al., 2012).

Na análise *a priori*, os genes-alvo dos miRNAs diferentemente expressos foram combinados em um conjunto, ou seja, o servidor calcula todos os genes que são alvo de pelo menos um miRNA e os classifica como “UNION_SET”. O conjunto de genes “UNION_SET” é utilizado para a análise estatística de *over representation* (*over representation statistical analysis*), uma análise de enriquecimento que identifica vias que foram significativamente enriquecidas com genes pertencentes ao “UNION_SET”.

Na análise *a posteriori*, o servidor identifica todas as vias que, de maneira significativa estatisticamente, foram consideradas alvo dos miRNAs selecionados. Para isso, o servidor, inicialmente, realiza análise de enriquecimento e calcula os valores de p entre cada miRNA e todas as vias KEGG. Após esse processo, para cada via, um valor de p combinado é calculado através da fusão entre os valores de p previamente obtido, utilizando o método de meta-análise de Fisher. Quanto menor o valor de p combinado, maior a probabilidade de que a via examinada seja significativamente enriquecida com genes-alvo de pelo menos um nos miRNAs diferentemente expressos.

No servidor *DIANA-miRPath v3.0*, os parâmetros utilizados para as análises *a priori* foram: “genes union”; “micro- threshold: 0.8”. Para as análises *a posteriori*: “pathways union”, “micro- threshold: 0.8”, “Fisher’s exact test (Hypergeometric distribution)”. Para ambas as análises, o *threshold* do valor de p foi de 0,05 e utilizou-se correção de *False Discovery Rate* (FDR) descrito por BENJAMINI e HOCHBERG (1995), uma vez que múltiplos testes de

hipótese foram realizados. Também utilizando o *DIANA-miRPath v3.0*, criou-se um cluster hierárquico dos miRNAs e de suas vias-alvo calculado através do método de ligação completa (*complete-linkage clustering method*) (VLACHOS et al., 2012).

Após a análise *a posteriori*, obteve-se os resultados das vias KEGG reguladas por um ou mais miRNAs. Esquemas das vias, destacando os genes-alvos regulados foram realizados utilizando o servidor web *KEGG Mapper* (<https://www.genome.jp/kegg/mapper.html>). Além disso, para cada via significativamente regulada, analisou os miRNAs envolvidos, seus genes-alvo e o *score* de predição (threshold: 0,8) disponível no servidor web *DIANA microT-CD v5.0*. Quanto maior o score de predição (valor máximo: 1,0), maior a probabilidade de o gene ser alvo no miRNA. A partir desses dados, montou-se uma rede gênica utilizando o software Cytoscape v.3.8.2 (SHANNON et al., 2003).

10. RESULTADOS

10.1. SEQUÊNCIAMENTO DE MicroRNAs

De maneira geral, um total de 406 e 318 miRNAs foram encontrados nas vesículas extracelulares derivadas do soro das amostras C e H, respectivamente (**Tabela 8**). No grupo C, 107 foram miRNAs já conhecidos, enquanto 299 foram miRNAs ainda não descritos na literatura, ou seja, miRNAs novos (**Tabela 8**). No grupo H, 119 miRNAs conhecidos e 199 novos, foram encontrados (**Tabela 8**). Os novos miRNAs foram preditos pelo software miRDeep2.

Tabela 8. Resumo dos microRNAs encontrados nas vesículas extracelulares do soro dos animais do grupo C e H.

	C	H
miRNAs conhecidos	107	119
miRNAs Novos	299	199
miRNAs totais	406	318

Comparou-se a expressão dos miRNAs encontrados nas amostras C e H para verificar quantos e quais miRNAs se encontravam diferentemente expressos. Dos miRNAs encontrados em cada amostra pelo sequenciamento, 67 foram diferentemente expressos (**Tabela 9**).

Para análise dos miRNAs diferentemente expressos, o software DESeq2 foi utilizado. Durante o processo, os valores de \log_2 *Fold Change* (FC) e o *False Discovery Rate* (FDR) foram usados como critérios de seleção. O valor de FC indica a relação do nível de expressão entre duas amostras, no caso deste trabalho, entre C e H. O FDR é utilizado para diminuir a probabilidade do erro do tipo I (falso-positivo) e foi obtido pela correção do valor de p da diferença significativa.

De todos esses 67 miRNAs, nosso foco será nos que já são conhecidos (n=16), uma vez que os miRNAs precisam ser validados. A **Tabela 10** mostra quais miRNAs conhecidos foram diferentemente expressos entre os grupos C e H, o valor de p, o FDR, o \log_2 (FC) e se ele foi *up-regulated* ou *down-regulated* no grupo H, em comparação com o grupo C. Para melhor

visualização, criou-se o *heat map* com base nos valores de $\text{Log}_2(\text{FC})$ obtidos ao se comparar a expressão dos 16 miRNAs do grupo H com o grupo C (**Figura 50**).

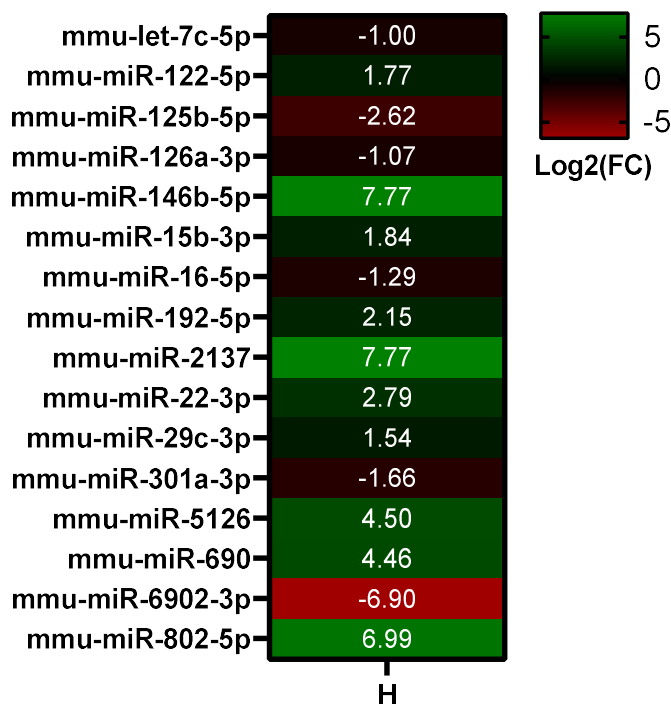
Tabela 9. MicroRNAs de vesículas extracelulares do soro que foram diferentemente expressos entre os grupos C e H.

H versus C	
<i>Up-regulated</i>	32
<i>Down-regulated</i>	35
Total	67

Tabela 10. MicroRNAs conhecidos diferentemente expressos (H versus C).

miRNAs	p-valor	FDR	$\text{log}_2(\text{FC})$	<i>regulated</i>
mmu-let-7c-5p	0.001471	0.009451	-1.0012	<i>down</i>
mmu-miR-122-5p	6.16E-13	2.16E-11	1.768179	<i>up</i>
mmu-miR-125b-5p	0.000273	0.002653	-2.6154	<i>down</i>
mmu-miR-126a-3p	0.000616	0.004927	-1.06635	<i>down</i>
mmu-miR-146b-5p	1.54E-05	0.000212	7.772101	<i>up</i>
mmu-miR-15b-3p	0.001289	0.008775	1.838781	<i>up</i>
mmu-miR-16-5p	5.70E-05	0.000667	-1.29362	<i>down</i>
mmu-miR-192-5p	3.51E-15	1.45E-13	2.153584	<i>up</i>
mmu-miR-2137	1.54E-05	0.000212	7.772101	<i>up</i>
mmu-miR-22-3p	0.00141	0.009318	2.794589	<i>up</i>
mmu-miR-29c-3p	3.47E-07	6.09E-06	1.54226	<i>up</i>
mmu-miR-301a-3p	0.000413	0.003697	-1.66415	<i>down</i>
mmu-miR-5126	7.43E-10	1.88E-08	4.504835	<i>up</i>
mmu-miR-690	0.000352	0.003349	4.463375	<i>up</i>
mmu-miR-6902-3p	0.00141	0.009318	-6.90082	<i>down</i>
mmu-miR-802-5p	5.81E-18	3.31E-16	6.985397	<i>up</i>

Figura 50. Heat map dos microRNAs diferentemente expressos em vesículas extracelulares isoladas do soro de animais do grupo H, em comparação com o grupo C



As cores verdes e vermelhas representam os genes com maior e menor expressão, respectivamente. As colunas representam a amostra de animais do grupo H (animais obesos) e as linhas, todos os 16 miRNAs já descritos diferentemente expressos em comparação com o grupo C (animais controle).

10.2. ANÁLISE BIOINFORMÁTICA – VIAS E GENES-ALVO DOS MicroRNAs

Os resultados do sequenciamento mostraram que 16 microRNAs isolados de EVs do soro foram diferentemente expressos entre os animais obesos e controle. Com o intuito de entender o envolvimento desses miRNAs na obesidade e identificar potenciais funções biológicas por eles reguladas, realizou-se análise *in silico* de vias tendo como base os genes-alvo dos 16 miRNAs encontrados.

Para as análises *in silico*, os genes-alvo foram preditos utilizando o servidor web *DIANA microT-CD web server v5.0* e, para as análises de vias, utilizou-se o servidor web *DIANA-miRPath v3.0*, que permite análise de enriquecimento de genes-alvo de miRNA nas vias KEGG. A análise de enriquecimento de genes-alvo de miRNA nas vias KEGG foi realizada de duas maneiras, uma *a priori* e outra *a posteriori* da análise estatística.

Inicialmente, realizamos a análise *a priori*, ou seja, os genes-alvo dos miRNAs selecionados foram agrupados antes da análise estatística. A **Tabela 11** mostra os resultados dessa análise, listando, dentre os 16 miRNAs investigados, o número de miRNAs envolvidos em cada via KEGG e o número de genes-alvo desses miRNAs.

Ao todo foram 34 vias identificadas, sendo a via relacionada com a interação do receptor de matriz extracelular (*ECM-receptor interaction*) a que apresentou a maior diferença estatística ($p = 4.44E-34$, **Tabela 11**). A via de sinalização da PI3K-Akt (*PI3K-Akt signaling pathway*) foi alvo do maior número de miRNAs ($n = 14$) e a via que teve maior número de genes-alvo foi a via envolvida com câncer (*Pathways in cancer*) (**Tabela 11**).

Após a primeira análise, seguiu-se para a análise *a posteriori*. A **Tabela 12** mostra as vias KEGG que foram significativamente reguladas pelos miRNAs selecionados após a análise estatística.

Conforme pode ser observado na **Tabela 12**, dez vias foram significativamente reguladas, sendo que, com exceção da via envolvendo a biossíntese de glicosfingolipídios - séries lacto e neolacto (*Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series*), nove delas foram em comum com a análise realizada *a priori* (**Tabela 11**).

A via de sinalização da PI3K-Akt (*PI3K-Akt signaling pathway*), a via de biossíntese de mucina tipo O-glicano (*Mucin type O-Glycan biosynthesis*) e as vias relacionadas com a interação do receptor de matriz extracelular (*ECM-receptor interaction*) foram reguladas pelo maior número de miRNAs ($n=4$), sendo a via da PI3K-Atk a com maior número de genes-alvo identificados ($n=57$) (**Tabela 12**).

Em relação aos resultados obtidos na **Tabela 12**, um agrupamento hierárquico onde os miRNAs selecionados são agrupados em relação a sua influência nas vias KEGG foi realizado (**Figura 51**). Além disso, todas as dez vias reguladas pelos miRNAs selecionados foram avaliadas e montou-se um esquema da via onde os genes-alvo dos miRNAs foram destacados. Tais esquemas podem ser visualizados nos **Apêndices A-K** deste trabalho.

A **Figura 51** mostra três informações diferentes: 1) agrupamento de miRNAs que tem como alvo uma lista semelhante de vias; 2) agrupamento de vias que são alvo de uma lista similar de miRNAs e 3) o nível de significância (valor de p) das interações entre miRNA e vias-alvo (*heat map*).

Tabela 11. Vias KEGG alvo dos microRNAs de EVs do soro diferentemente expressos – Análise *a priori*

Via KEGG	Valor de p	n.º genes	n.º miRNAs
<i>ECM-receptor interaction</i>	4.44E-34	22	9
<i>Prion diseases</i>	1.43E-15	5	8
<i>Mucin type O-Glycan biosynthesis</i>	1.12E-10	10	6
<i>Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells</i>	2.76E-08	45	12
<i>Proteoglycans in cancer</i>	9.34E-06	55	12
<i>FoxO signaling pathway</i>	1.14E-04	40	12
<i>Lysine degradation</i>	1.90E-04	13	7
<i>Glioma</i>	2.58E-04	19	8
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	2.58E-04	79	14
<i>Amoebiasis</i>	9.02E-04	25	9
<i>Pathways in cancer</i>	2.42E-03	81	13
<i>Endocytosis</i>	2.43E-03	47	12
<i>Axon guidance</i>	2.89E-03	35	10
<i>MAPK signaling pathway</i>	5.77E-03	56	11
<i>TGF-beta signaling pathway</i>	5.91E-03	24	9
<i>Adrenergic signaling in cardiomyocytes</i>	5.91E-03	34	11
<i>Focal adhesion</i>	5.91E-03	49	11
<i>Prostate cancer</i>	7.44E-03	24	9
<i>AMPK signaling pathway</i>	9.32E-03	33	12
<i>Gap junction</i>	1.15E-02	19	8
<i>Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate / heparin</i>	1.57E-02	5	4
<i>Hippo signaling pathway</i>	1.88E-02	34	12
<i>Dorso-ventral axis formation</i>	1.96E-02	10	8
<i>Thyroid hormone synthesis</i>	2.16E-02	10	7
<i>HTLV-I infection</i>	2.35E-02	56	10
<i>Thyroid cancer</i>	2.62E-02	7	6
<i>Regulation of actin cytoskeleton</i>	2.66E-02	47	11
<i>cGMP-PKG signaling pathway</i>	2.66E-02	39	12
<i>Choline metabolism in cancer</i>	2.68E-02	25	10
<i>mTOR signaling pathway</i>	2.70E-02	18	11
<i>Neurotrophin signaling pathway</i>	3.22E-02	29	10
<i>Protein digestion and absorption</i>	3.56E-02	23	7
<i>Sphingolipid signaling pathway</i>	4.63E-02	30	9
<i>Melanoma</i>	4.78E-02	18	7

Tabela 12. Vias KEGG alvo dos microRNAs de EVs do soro diferentemente expressos – Análise *a posteriori*

Via KEGG	Valor de p	n.º genes	n.º miRNAs
Prion diseases (mmu05020)	< 1E-325	1	2
mmu-miR-146b-5p microT-CDS	4.84E-49	1	
mmu-miR-301a-3p microT-CDS	3.08E-42	1	
ECM-receptor interaction (mmu04512)	< 1E-325	18	4
mmu-let-7c-5p microT-CDS	7.22E-28	8	
mmu-miR-122-5p microT-CDS	5.61E-04	1	
mmu-miR-15b-3p microT-CDS	1.95E-06	1	
mmu-miR-29c-3p microT-CDS	6.79E-109	15	
Amoebiasis (mmu05146)	4.66E-07	20	2
mmu-let-7c-5p microT-CDS	6.40E-05	11	
mmu-miR-29c-3p microT-CDS	1.13E-13	14	
Mucin type O-Glycan biosynthesis (mmu00512)	7.28E-07	7	4
mmu-let-7c-5p microT-CDS	7.80E-05	3	
mmu-miR-122-5p microT-CDS	4.70E-06	1	
mmu-miR-125b-5p microT-CDS	4.17E-08	2	
mmu-miR-22-3p microT-CDS	1.59E-02	1	
Thyroid hormone synthesis (mmu04918)	1.41E-05	3	2
mmu-miR-146b-5p microT-CDS	1.17E-09	2	
mmu-miR-22-3p microT-CDS	2.93E-07	2	
Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series (mmu00601)	1.11E-03	2	3
mmu-miR-125b-5p microT-CDS	5.93E-06	1	
mmu-miR-22-3p microT-CDS	7.59E-06	1	
mmu-miR-301a-3p microT-CDS	7.29E-04	1	
PI3K-Akt signaling pathway (mmu04151)	4.32E-03	57	4
mmu-let-7c-5p microT-CDS	3.83E-02	22	
mmu-miR-16-5p microT-CDS	3.06E-02	21	
mmu-miR-2137 microT-CDS	5.00E-02	1	
mmu-miR-29c-3p microT-CDS	2.27E-06	27	
Protein digestion and absorption (mmu04974)	2.32E-02	20	2
mmu-let-7c-5p microT-CDS	4.14E-02	9	
mmu-miR-29c-3p microT-CDS	4.76E-09	17	
Glioma (mmu05214)	2.80E-02	13	2
mmu-miR-29c-3p microT-CDS	3.95E-06	8	
mmu-miR-301a-3p microT-CDS	1.01E-02	5	
FoxO signaling pathway (mmu04068)	4.55E-02	7	2
mmu-miR-2137 microT-CDS	2.58E-02	1	
mmu-miR-690 microT-CDS	5.95E-03	6	

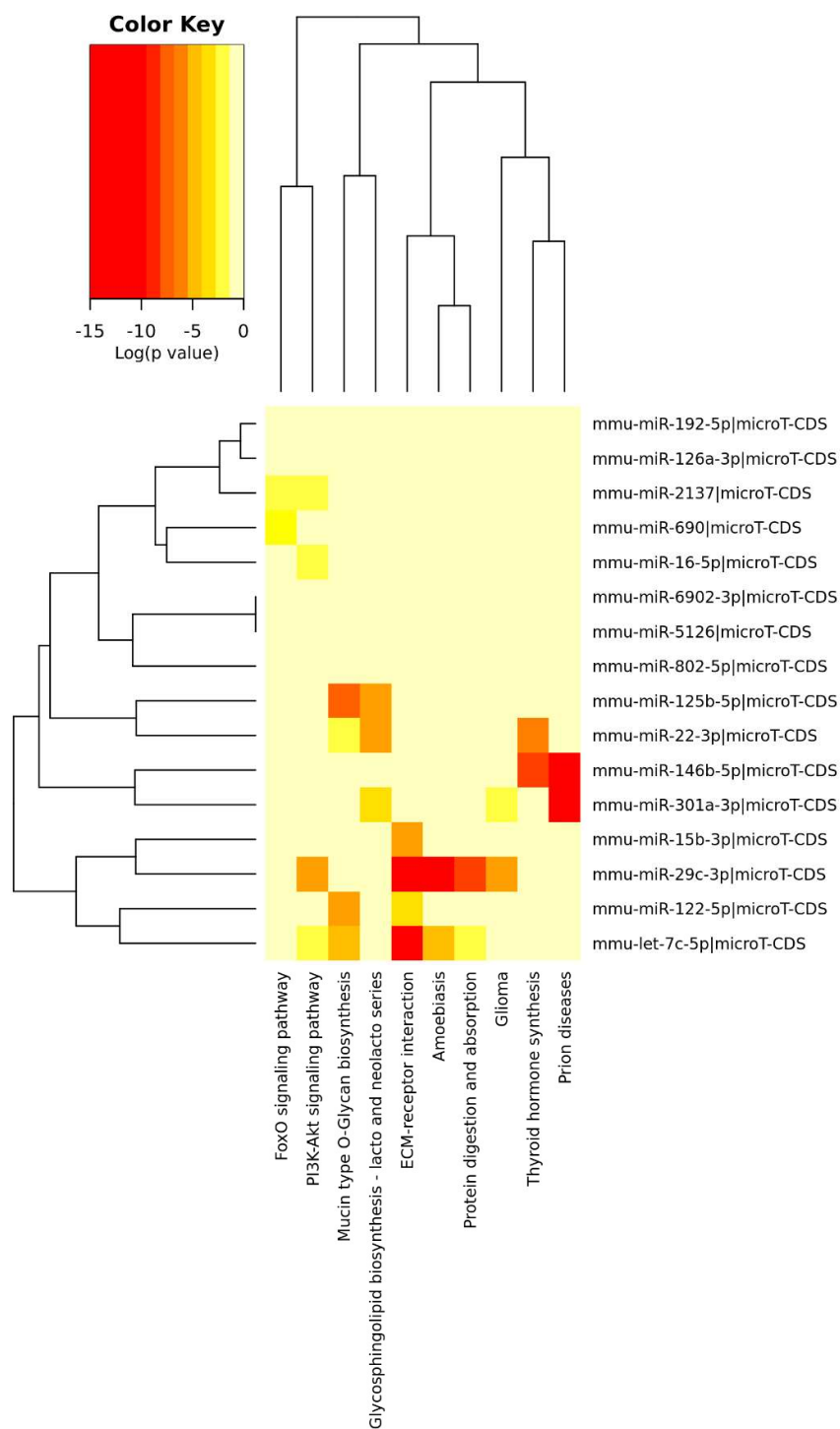
Informações entre parênteses representa o código da via. MicroT-CDS: algoritmo de predição utilizado.

Podemos observar que dos 16 miRNAs selecionados, apenas 11 tiveram valor de p das interações entre miRNAs e vias menor do que 0,05 (**Figura 51**). Dentre os 11 miRNAs, o let-7c-5p, e o miR-29c-3p foram os que regularam o maior número de vias (n = 5), sendo 4 delas em comum, incluindo a via de sinalização PI3K-Akt (*PI3K-Akt signaling pathway*) e as vias relacionadas com a interação do receptor de matriz extracelular (*ECM-receptor interaction*) (**Figura 51**).

Os miRNAs let-7c-5p, miR-29c-3p, miR-122-5p e miR-15b-3p foram agrupados juntos, indicando que eles têm vias similares como alvo (**Figura 51**). De fato, a **Figura 51** mostra que esses quatro miRNAs regulam, pelo menos, duas vias em comum. Seguindo o mesmo raciocínio, as vias de sinalização da FoxO (*FoxO signaling pathway*) e da PI3K-Akt (*PI3K-Akt signaling pathway*) foram preditas de serem alvo de um agrupamento similar de miRNAs, assim como as vias de biossíntese de mucina tipo O-glicano (*Mucin type O-Glycan biosynthesis*) e de Biossíntese de glicosfingolipídios - séries lacto e neolacto (*Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series*) (**Figura 51**).

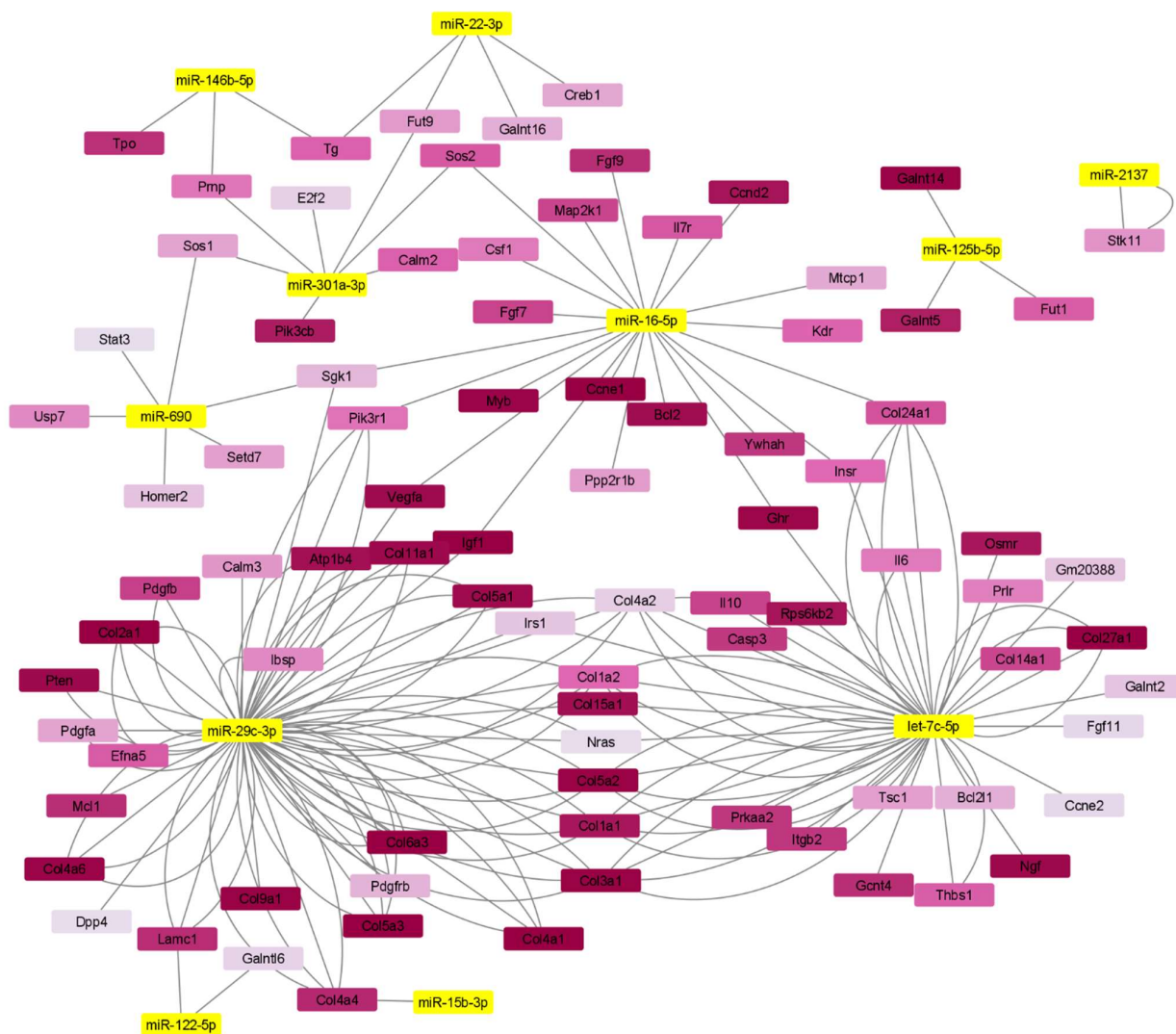
Para complementar a análise *a posteriori* realizada, resolveu-se analisar os genes-alvo dos miRNAs que regularam as vias KEGG. Para cada via, analisou os miRNAs envolvidos e os seus genes-alvo e adicionou-se a informação do *score* de predição disponível no servidor web *DIANA microT-CD v5.0*. O resultado dessa análise pode ser visto na **Figura 52**, em que uma rede gênica foi construída, mostrando as diferentes interações entre os miRNAs (em amarelo) e os seus genes alvo (em roxo). A cor roxa está relacionada com o *score* de predição, quanto mais escuro, maior o *score*. O programa utilizado para análise das interações foi o Cytoscape v.3.8.2 e a planilha utilizada para a entrada dos dados no programa pode ser encontrada no **Apêndice K**.

Figura 51. Análise de vias reguladas pelos miRNAs diferentemente expressos – Agrupamento hierárquico e *heat map*.



Agrupamento realizado com base no nível de significância da interação entre miRNAs e a sua via alvo. Cores escuras representam maior significância (menor valor de p).

Figura 52. Rede gênica - microRNAs diferentemente expressos e seus genes alvo



Análise feita a partir dos resultados das análises de *via a posteriori*. miRNAs diferentemente expressos (em amarelo) e seus genes-alvo (em roxo). Cores mais escuras estão relacionadas com maior *score* de predição.

PARTE IV – VALIDAÇÃO E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS MICRORNAS NOS TECIDOS DE INTERESSE

11. METODOLOGIA

11.1. EXTRAÇÃO DE RNA

11.1.1. Vesículas Extracelulares

Um novo lote de animais alimentados com dieta controle e dieta hiperlipídica suplementada com leite condensado foi realizado para isolar o soro e posteriormente as vesículas extracelulares conforme descrito nas seções 3.8 e 5.1, respectivamente. O RNA total proveniente das EVs foi isolado então utilizando o kit de extração mirVana™ PARIS™ (Invitrogen Life Technologies), conforme a instrução do fabricante.

11.1.1. Tecidos

Animais do grupo C e H tiveram o fígado, o músculo gastrocnêmio e a gordura epididimal coletados para extração de RNA. Os mesmos tecidos foram coletados dos animais tratados com EVs do soro de animais do grupo H e C (animais utilizados na Parte IIb desse trabalho). O RNA foi extraído utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante.

11.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MicroRNAs

A concentração do RNA total proveniente das EVs e dos tecidos foi mensurada usando o espectrofotômetro BioDrop uLite (BioDrop). A pureza foi determinada pela razão A260/A280nm e A260/A230nm. A síntese de cDNA foi realizada utilizando TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Cat. #A28007; ThermoFisher Scientific), seguindo o protocolo do fabricante. Com o cDNA de miRNA universal, TaqMan™ Advanced assays foram utilizadas para a quantificação dos seguintes miRNAs: miR-15b-3p (Assay ID: mmu480955_miR), miR-122-5p (Assay ID: mmu480899_miR), miR-22-3p (Assay ID: mmu481004_miR), miR-29c-3p (Assay ID: mmu479229_miR), miR-192-5p (Assay ID: mmu480876_miR), miR-802-5p (Assay ID: mmu482544_miR). As reações de RT-qPCR foram realizadas no aparelho QuantStudio3 (Applied Biosystems) e os resultados analisados pelo software QuantStudio™ Design & Analysis (Applied Biosystems). A expressão gênica

relativa foi determinada pelo método matemático $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK;SCHMITTGEN, 2001). O miRNA de referência utilizado foi o miR-451a (Assay ID: mmu482766_miR).

11.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos dados foram testados em relação à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (teste F). Para comparação entre os dois grupos de animais (H *versus* C), os testes t de Student bilateral para amostras independentes e U de Mann-Whitney bilateral para amostras independentes foram realizados, dependendo da normalidade e homogeneidade dos dados. Para comparar os três grupos experimentais (PBS, EV-C e EV-H), se optou pelo teste de Kruskal Wallis (não paramétrico), uma vez que a amostra utilizada tenha sido pequena.

Para todas as análises estatísticas o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software) foi utilizado. O nível de significância foi estabelecido como $p < 0,05$. Os títulos ou as legendas das figuras indicam o n amostral. Nas legendas, a forma de expressão dos dados está indicada.

11.4. ANÁLISE BIOINFORMÁTICA

Utilizou-se *DIANA-miRPath v3.0* (<http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/>) (VLACHOS et al., 2015). para identificar as vias KEGG - Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas (do inglês, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (KANEHISA;GOTO, 2000; KANEHISA, 2019; KANEHISA et al., 2021). Como a base de dados KEGG utiliza o nome das vias em inglês, os nomes das vias nas tabelas não foram traduzidos, a tradução (seguida pelo nome da via em inglês) foi utilizada no corpo do texto.

Uma análise *a priori* (conforme descrito na seção 9.4) de enriquecimento dos genes-alvo de miRNA nas vias KEGG foi realizada para cada miRNA validado que foi diferentemente expresso entre os grupos obeso e controle (H *versus* C) (VLACHOS et al., 2012). No servidor *DIANA-miRPath v3.0*, os parâmetros utilizados para as análises *a priori* foram: “genes union”; “micro- threshold: 0.8”. O *threshold* do valor de p foi de 0,05 e utilizou-se correção de *False Discovery Rate* (FDR) descrito por BENJAMINI e HOCHBERG (1995), uma vez que múltiplos testes de hipótese foram realizados.

Além disso, os genes-alvos preditos para cada miRNA e seus respectivos *scores* de predição (threshold: 0,8) foram avaliados atravésdo algoritmo de predição online e de acesso livre: *DIANA* *microT-CD* *v5.0* (<http://diana.imis.athena->

innovation.gr/DianaTools/index.php?r=miroT_CDS/index) (RECZKO et al., 2012; PARASKEVOPOULOU et al., 2013). Quanto maior o score de predição (valor máximo: 1,0), maior a probabilidade de o gene ser alvo no miRNA. A partir desses dados, filtrou-se os genes que fossem alvo de pelo menos dois miRNAs diferentes e, assim, montou-se uma rede gênica utilizando o software Cytoscape v.3.8.2 (SHANNON et al., 2003).

Para tentar ter uma noção melhor da origem dos miRNAs validados, realizou-se a pesquisa dos tecidos em que os miRNAs validados são preferencialmente expressos na base de dados denominada *Human miRNA tissue atlas* (disponível online em: <https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/tissueatlas/>) (LUDWIG et al., 2016).

12. RESULTADOS

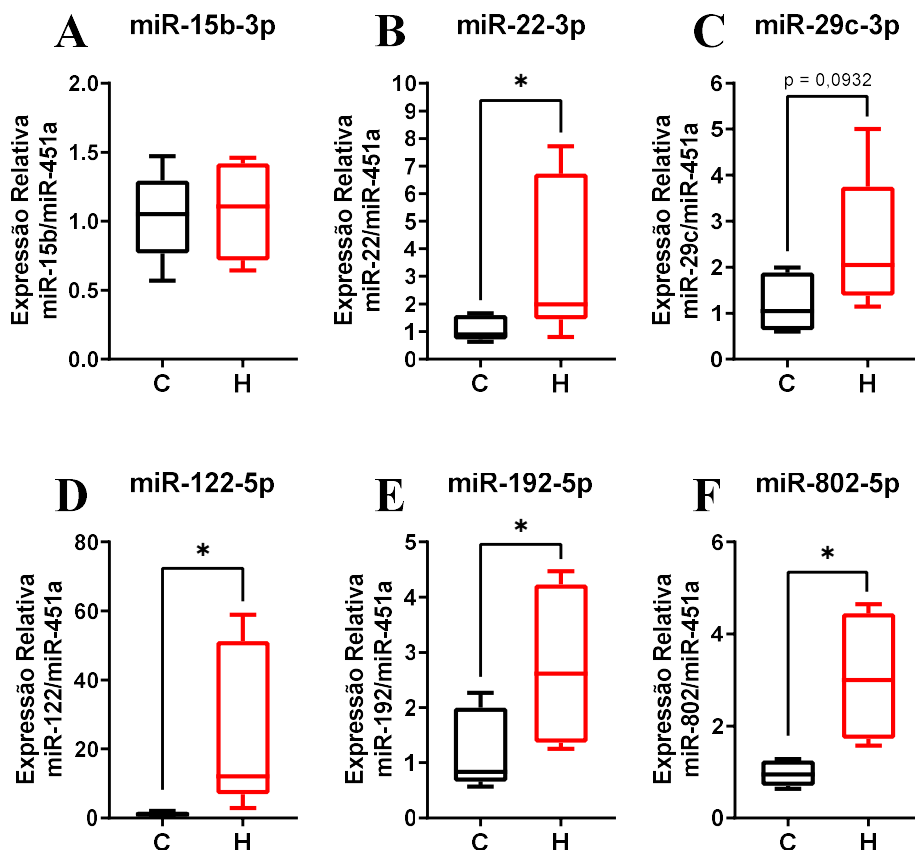
12.1. VALIDAÇÃO DE MicroRNAs EM VESÍCULAS EXTRACELULARES ISOLADAS DO SORO – ANIMAIS OBESOS E CONTROLE

Os resultados do sequenciamento de miRNA de EVs do soro mostraram que 16 miRNAs já conhecidos foram diferentemente expressos no grupo H (animais obesos), em relação ao grupo C (animais controle). A partir desses 16 miRNAs, 11 miRNAs foram inicialmente selecionados para validação. Desses, seis foram validados: miR-15b-3p, miR-22-3p, miR-29c-3p, miR-122-5p, miR-192-5p, miR-802-5p.

O critério de seleção dos miRNAs que foram validados foi explicado no artigo publicado com os dados iniciais desse trabalho (DE MENDONÇA et al., 2020). De maneira resumida, o experimento de sequenciamento de miRNAs foi realizado com quatro grupos experimentais: controle, obeso, controle treinado e obeso treinado. Assim, os resultados poderiam ser usados diretamente em dois trabalhos em desenvolvimento no laboratório, um envolvendo EVs e obesidade e, o outro, EVs, obesidade e exercício físico aeróbico. Resolveu-se iniciar a validação com miRNAs que poderiam ser utilizados nos dois trabalhos (obesidade e exercício físico) e, por tal motivo, escolheu-se iniciar a validação com miRNAs que foram aumentados pela obesidade e tiveram sua expressão restaurada pelo exercício físico. Após esse critério de seleção, filtrou-se os miRNAs que são conservados entre camundongos e humanos. Ao final, seis miRNAs de EVs do soro foram validados.

Nas EVs do soro, não foi encontrada diferença na expressão do miR-15b-3p entre os grupos C e H (**Figura 53A**, $p = 0,8732$) e, embora tenha sido observado um aumento de 105% na expressão do miR-29c-3p no grupo H, a diferença não foi considerada estatística (**Figura 53C**, $p = 0,0932$). A expressão do miR-22-3p e do miR-122-5p foi 206% e 2184% maior no grupo H, em comparação com o grupo C, respectivamente (**Figura 53B**, $p = 0,0350$; **Figura 53D**, $p = 0,0334$). Já a expressão do miR-192-5p e do miR-802-5p foi 140% e 218% maior no grupo H, respectivamente (**Figura 53E**, $p = 0,0369$; **Figura 53F**, $p = 0,0070$).

Figura 53. Validação - Expressão relativa de miRNAs de vesículas extracelulares do soro de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.



Teste t de Student foi realizado. Amostra: C: n=6-7; H: n=4-7. Dados apresentados como *boxplot*. * $p < 0,05$.

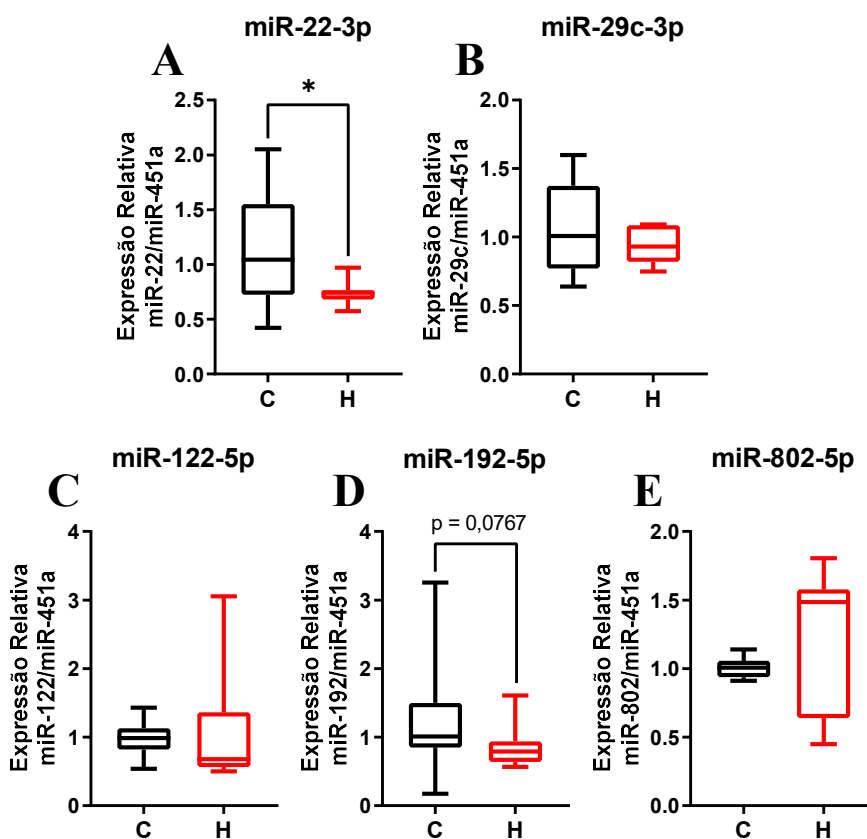
12.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MicroRNAs NOS TECIDOS – ANIMAIS OBESOS E CONTROLE

Dos seis miRNAs que foram escolhidos para o início da validação, a expressão de cinco deles mostrou seguir o padrão dos dados do sequenciamento: miR-29c-3p, miR-22-3p, miR-122-5p, miR-192-5p e miR-802-5p. Assim, foi-se investigar, nos animais do grupo H e C, a expressão desses miRNAs em três importantes tecidos para o metabolismo energético, o fígado, a gordura branca epididimal e o músculo esquelético (músculo gastrocnêmio).

No fígado, a expressão desses cinco miRNAs foram avaliados (**Figura 54**). Conforme pode ser observado no **Figura 54**, a expressão do miR-22-3p foi 29% menor no grupo H, em

comparação com o grupo C ($p = 0,0306$). Não foram observadas diferenças estatísticas na expressão de miR-29c-3p (e miR-122-5p entre os dois grupos experimentais (**Figura 54B**, $p = 0,8048$; **Figura 54C**, $p = 0,4865$). Embora sem diferença estatística, a expressão do miR-192-5p foi, em comparação com o grupo C, 22% menor no grupo H (**Figura 54D**, $p = 0,0767$); e a expressão do miR-802-5p foi 48% maior no grupo H (**Figura 54E**, $p = 0,2086$).

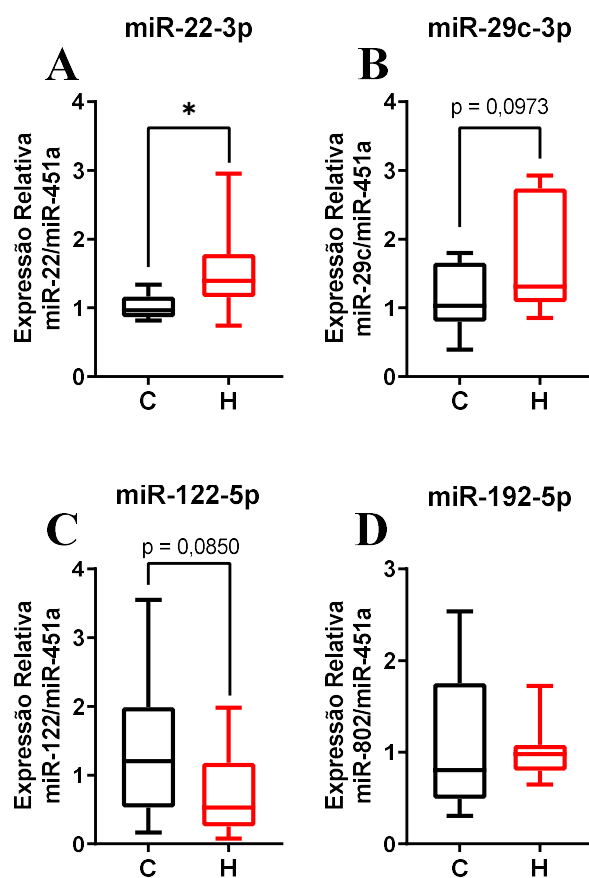
Figura 54. Expressão relativa de miRNAs no fígado de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.



Teste U de Mann-Whitney foi realizado. Dados apresentados como *boxplot*. $n=7-14$ /grupo. * $p < 0,05$.

Na gordura epididimal, quatro miRNAs foram investigados: miR-22-3p, miR-29c-3p, miR-122-5p e miR-192-5p (**Figura 55**). Não se obteve amplificação quando a expressão do miR-802-5p foi investigada. A **Figura 55A** mostra que a expressão do miR-22-3p foi 44% maior no grupo H, em relação ao grupo C ($p = 0,0031$). Embora a diferença não tenha sido estatística, a expressão do miR-29c-3p e do miR-122-5p foi 27% maior e 56% menor grupo H, respectivamente (**Figura 55B**, $p = 0,0973$; **Figura 55C**, $p = 0,0850$). Não foi observada diferença na expressão do miR-192-5p entre os grupos C e H (**Figura 55D**, $p = 0,5382$).

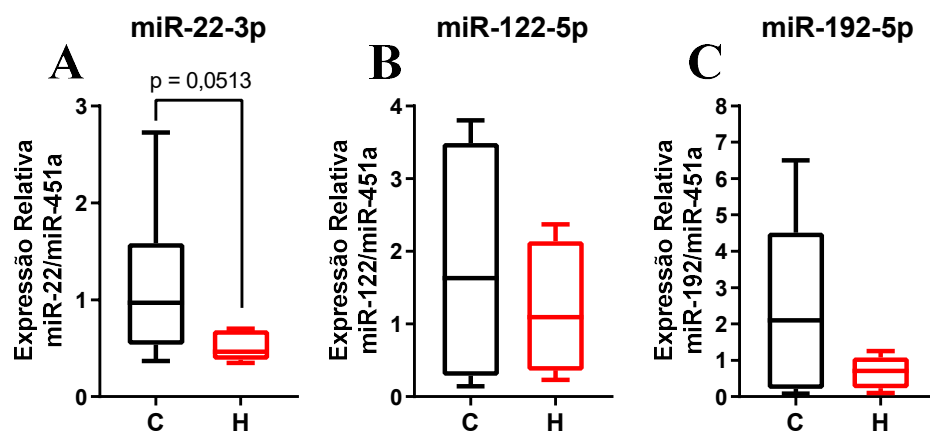
Figura 55. Expressão relativa de miRNAs na gordura epididimal de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.



Teste U de Mann-Whitney foi realizado. Dados apresentados como *boxplot*. $n=7-14$ /grupo. * $p < 0,05$.

No músculo gastrocnêmio, a expressão dos miR-22-3p, miR-122-5p e miR-192-5p foi realizada. A expressão do miR-22-3p foi 52% menor no grupo H, em comparação com o grupo C (**Figura 56A**, $p = 0,0513$). Não foi observada diferença estatística na expressão do miR-122-5p e miR-192-5p entre os dois grupos experimentais (**Figura 56B**, $p = 0,8857$; **Figura 56C**, $p = 0,5476$).

Figura 56. Expressão relativa de miRNAs no músculo gastrocnêmio de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica e leite condensado (H) durante 12 semanas.



Teste U de Mann-Whitney foi realizado. Dados apresentados como *boxplot*. $n=7-14$ /grupo. * $p < 0,05$.

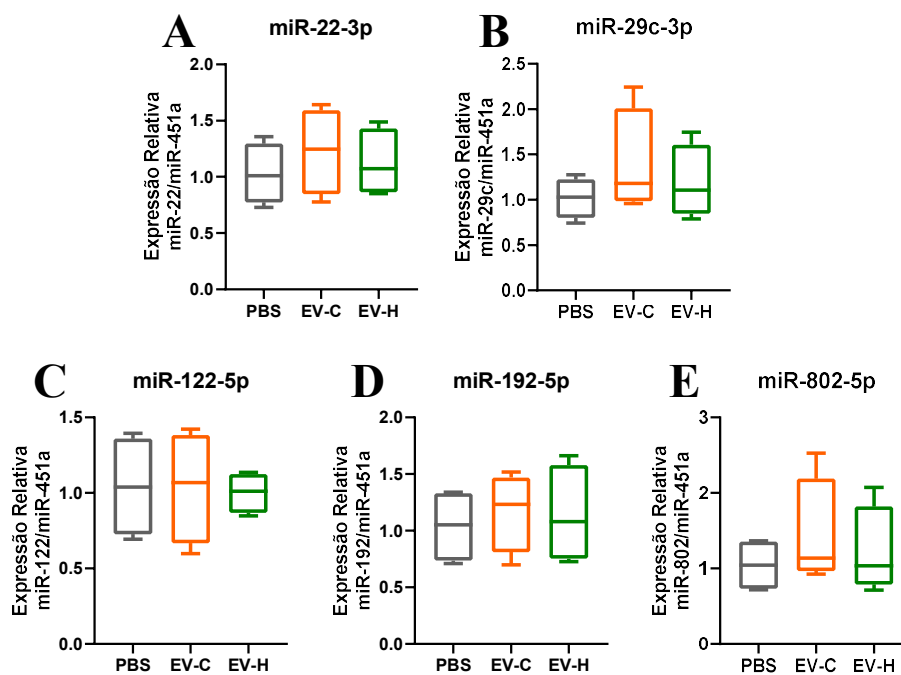
12.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MicroRNAs NOS TECIDOS – ANIMAIS TRATADOS COM EVs DO SORO

Uma vez que tenha sido feita a validação dos miRNAs no soro e tenha se avaliado a expressão dos miRNAs validados no fígado, na gordura epididimal e no músculo gastrocnêmio dos animais obesos (grupo H) e controle (grupo C), seguiu-se então para análise da expressão desses miRNAs nos tecidos de animais tratados com EVs isoladas do soro de animais obesos (EV-H) e controle (EV-C).

A expressão de miRNAs foi avaliada no fígado e na gordura epididimal e o n amostral foi de apenas quatro animais por grupo. Portanto, considera-se esses resultados ainda como preliminares.

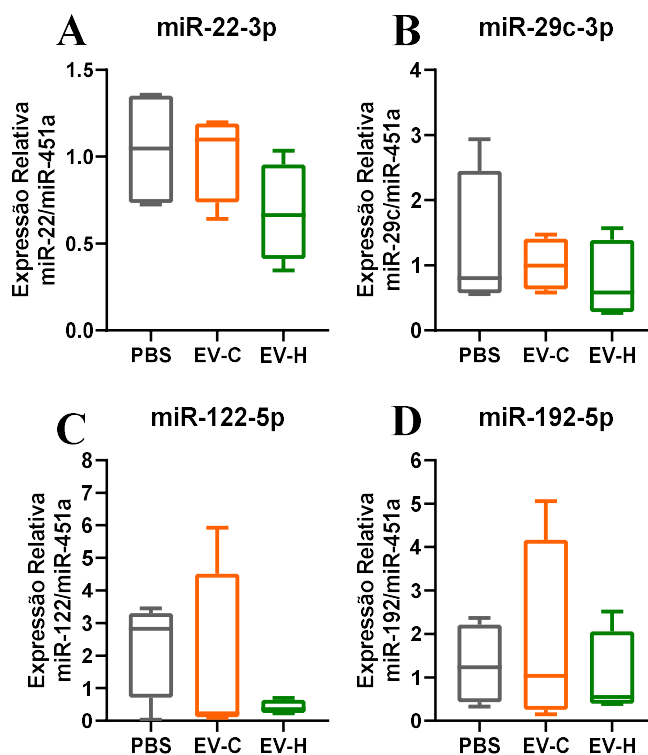
No fígado, os miRNAs miR-22-3p ($p = 0,7697$), miR-29c-3p ($p = 0,6667$), miR-122-5p ($p = 0,9676$), miR-192-5p ($p = 0,8639$) e miR-802-5p ($p = 0,7463$) foram analisados, mas não foi observada diferença de expressão entre os três grupos experimentais (**Figura 57A-E**). Na gordura epididimal, os miRNAs miR-22-3p ($p = 0,1619$), miR-29c-3p ($p = 0,7463$), miR-122-5p ($p = 0,7463$), miR-192-5p ($p = 0,9410$) foram avaliados, mas também não foi encontrada diferença estatística entre os grupos (**Figura 57A-D**)

Figura 57. Expressão relativa de miRNAs no fígado de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H), animais magros (EV-C) ou PBS ($n=4$ /grupo).



Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foi realizado. Dados apresentados como *boxplot*.

Figura 58. Expressão relativa de miRNAs na gordura epididimal de camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta controle e tratados com EVs derivadas do soro de animais obesos (EV-H), animais magros (EV-C) ou PBS (n=4/grupo).



Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foi realizado. Dados apresentados como *boxplot*.

12.4. ANÁLISE BIOINFORMÁTICA – VIAS, GENES-ALVO E TECIDOS EM QUE OS MicroRNAs SÃO EXPRESSOS

12.4.1. Análise de predição – Vias e genes-alvo dos microRNAs

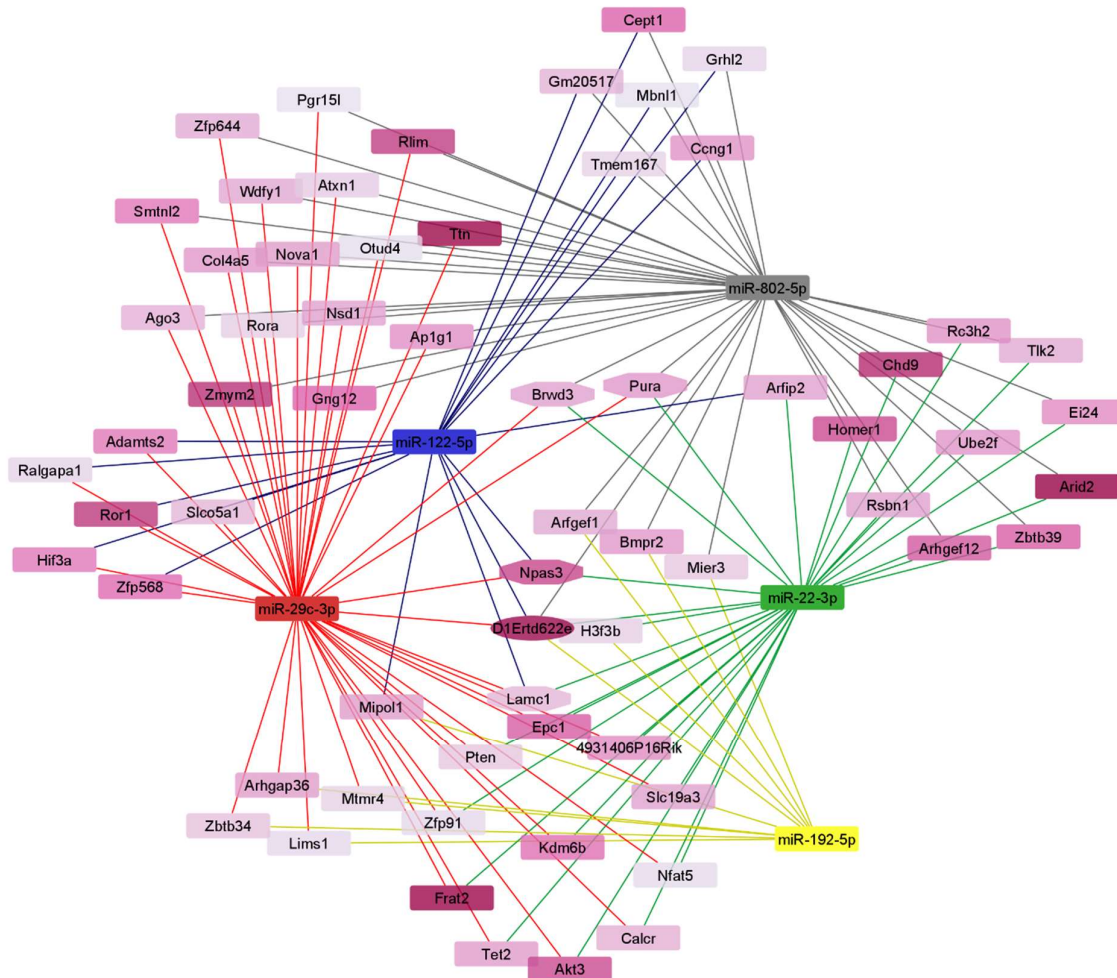
Considerando os genes-alvo de cada um dos 5 miRNAs que foram validados nas EVs soro, investigou-se, por meio da análise *a priori* (*DIANA-miRPath v3.0*), as vias KEGG que esses miRNAs, individualmente, têm como alvo. Como pode ser observado na **Tabela 11**, cada miRNA apresentou pelo menos duas vias-alvo, sendo que nenhuma delas foi em comum para todos os miRNAs. Das vias, apenas uma foi comum para dois miRNAs diferentes: a via relacionada com a interação do receptor de matriz extracelular (*ECM-receptor interaction*), mostrando-se regulada pelo miR-29c-3p e miR-122-5p.

Não só a via foi analisada, mas também todos os genes alvos dos miRNAs. Para cada miRNA, consultou-se os possíveis genes-alvo utilizando o servidor *DIANA microT-CD web server v5.0*. Dessa lista, filtrou-se genes que fossem alvo de pelo menos dois miRNAs diferentes e, com esse resultado, criou-se uma rede gênica de genes preditos de serem regulados por dois ou mais miRNAs, mostrando as diferentes interações entre os miRNAs e seus genes-alvo (**Figura 59**). A cor roxa está relacionada com o *score* de predição, quanto mais escuro, maior o *score*. Os dados utilizados para criação da rede gênica podem ser encontrados no **Apêndice L**.

Tabela 13. Vias KEGG alvo dos cinco microRNAs validados de EVs do soro diferentemente expressos – Análise a priori

Via KEGG	Valor de p	n.º genes
mmu-miR-22-3p		
<i>Cyanoamino acid metabolism</i>	0.0267666	1
<i>Other glycan degradation</i>	0.03211991	1
<i>Antigen processing and presentation</i>	0.03426124	3
<i>Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchor biosynthesis</i>	0.03533191	2
<i>Aminoacyl-tRNA biosynthesis</i>	0.04122056	2
mmu-miR-29c-3p		
<i>Protein digestion and absorption</i>	0.005888651	17
<i>ECM-receptor interaction</i>	0.007494647	15
<i>Amoebiasis</i>	0.009635974	14
<i>Thiamine metabolism</i>	0.01980728	1
<i>Focal adhesion</i>	0.02194861	23
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	0.02462527	27
<i>Small cell lung cancer</i>	0.03319058	8
<i>Glioma</i>	0.04496788	8
<i>Aldosterone-regulated sodium reabsorption</i>	0.04925054	5
mmu-miR-122-5p		
<i>Mucin type O-Glycan biosynthesis</i>	4.70E-06	1
<i>Central carbon metabolism in cancer</i>	0.000408302	2
<i>ECM-receptor interaction</i>	0.000560934	1
<i>Terpenoid backbone biosynthesis</i>	0.004445411	1
<i>Pancreatic secretion</i>	0.034196872	2
mmu-miR-192-5p		
<i>Glycosaminoglycan degradation</i>	0.000280035	1
<i>mRNA surveillance pathway</i>	0.017150162	2
mmu-miR-802-5p		
<i>Lysine degradation</i>	2.56E-05	4
<i>Folate biosynthesis</i>	0.031446995	1

Figura 59. Rede gênica - microRNAs validados que foram diferentemente expressos e seus genes alvo



Análise feita com base nos genes-alvo regulados por dois ou mais miRNAs. miRNAs validados que foram diferentemente expressos (em amarelo) e seus genes-alvo (em roxo). Em relação aos genes alvo, cores mais escuras estão relacionadas com maior *score* de predição e o formato quadrado, octogonal e ovalado indica que o gene é alvo de dois, três ou cinco miRNAs, respectivamente.

12.4.2. Expressão de microRNAs em diferentes tecidos

Uma vez que os genes-alvos foram avaliados, tentou-se encontrar em bases de dados disponíveis online, os tecidos em que os miRNAs são preferencialmente expressos. A base de dados utilizada foi a *Human miRNA tissue atlas*. Esse atlas é para miRNAs humanos e não se encontrou um atlas equivalente com informação sobre miRNAs de camundongos. Porém, vale lembrar que os miRNAs analisados são conservados entre as espécies e, portanto, se assume que os tecidos em que os miRNAs são preferencialmente expressos não sejam muito diferentes entre as espécies.

Dos cinco miRNAs investigados, as informações de quatro deles foram encontradas no atlas (**Figura 60-63**). Como pode ser observado na **Figura 60**, o miR-22-3p é majoritariamente expresso no músculo e adipócitos. O miR-29c-3p é expresso principalmente no músculo, no cérebro e na tireoide (**Figura 61**). O miR-122-5p é quase que totalmente expresso no fígado (**Figura 62**). E, por fim, o miR-192-5p, que é mais expresso no intestino grosso e, em menor extensão, no fígado (**Figura 63**).

Como já mencionado, não foi encontrado uma plataforma que continha um atlas para expressão de miRNAs em diferentes tecidos em camundongos, porém, ISAKOVA et al. (2020) publicaram um atlas de camundongos para *small noncoding RNA*. Na Figura 2C desse artigo (Disponível no **Anexo A** deste trabalho), é mostrado miRNAs de camundongos que são tecido-específicos.

Dos cinco miRNAs investigados, três se encontraram nessa figura, incluindo o miR-802-5p cujos dados não estavam disponíveis no *TissueAtlas*. O miR-122-5p foi exclusivamente encontrado no fígado, o miR-192-5p, expresso principalmente no fígado e intestino e o miR-802-5p, expresso principalmente no pâncreas (**Anexo A**). Vale ressaltar que os resultados para o miR-122-5p e o miR-192-5p (únicos miRNAs presentes nas duas bases de dados) foram similares entre os atlas de humanos e camundongos.

Figura 60. Expressão do hsa-miR-22-3p em diferentes tecidos

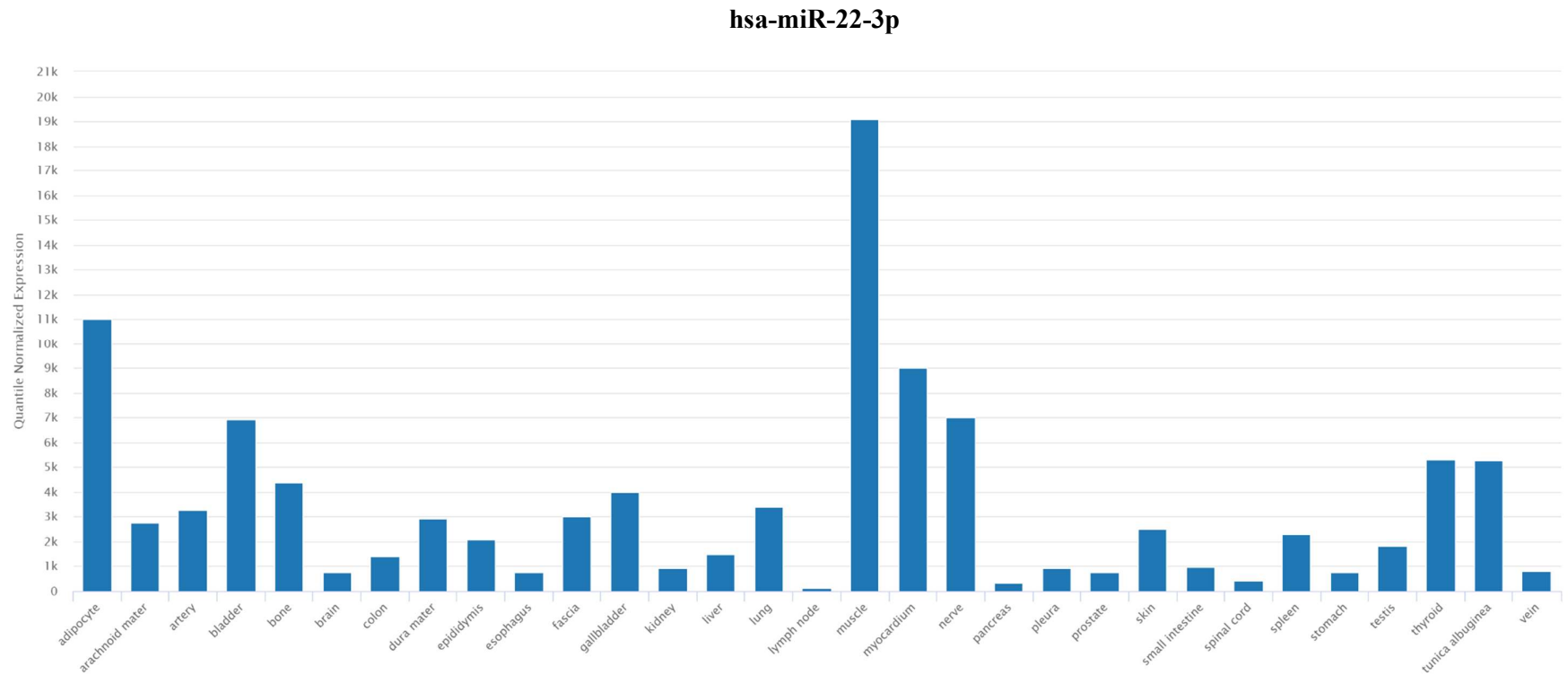


Gráfico obtido na base de dados *Human miRNA tissue atlas*.

Figura 61. Expressão do hsa-miR-29c-3p em diferentes tecidos

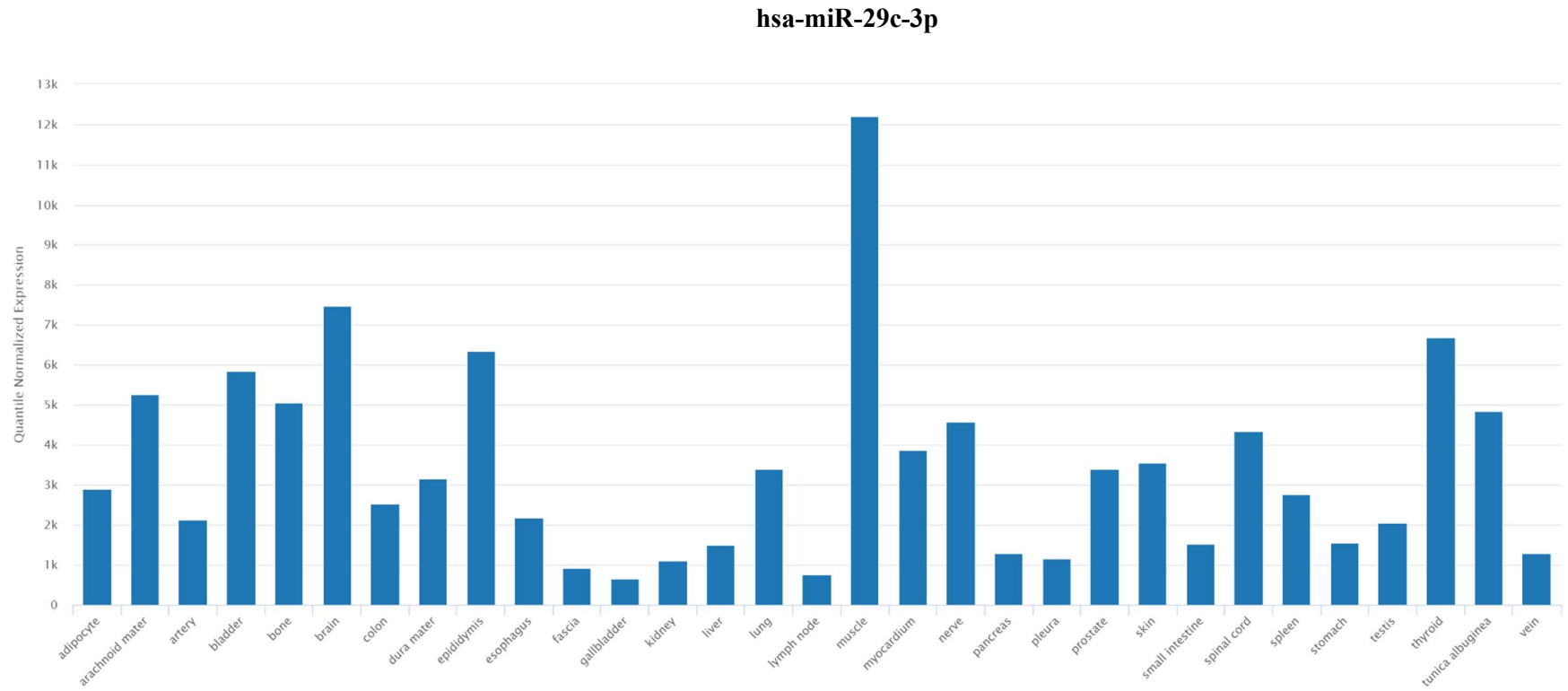


Gráfico obtido na base de dados *Human miRNA tissue atlas*.

Figura 62. Expressão do hsa-miR-122-5p em diferentes tecidos

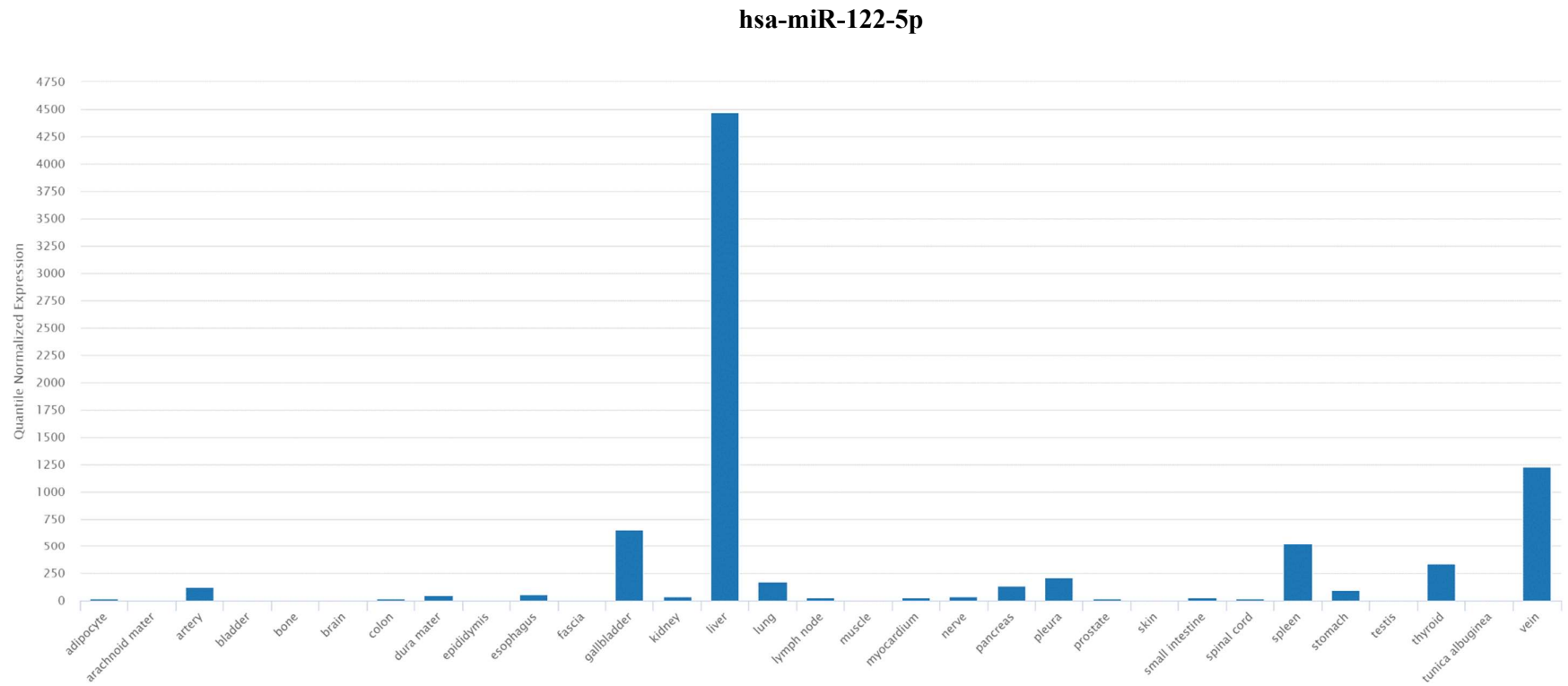


Gráfico obtido na base de dados *Human miRNA tissue atlas*.

Figura 63. Expressão do hsa-miR-192-5p em diferentes tecidos

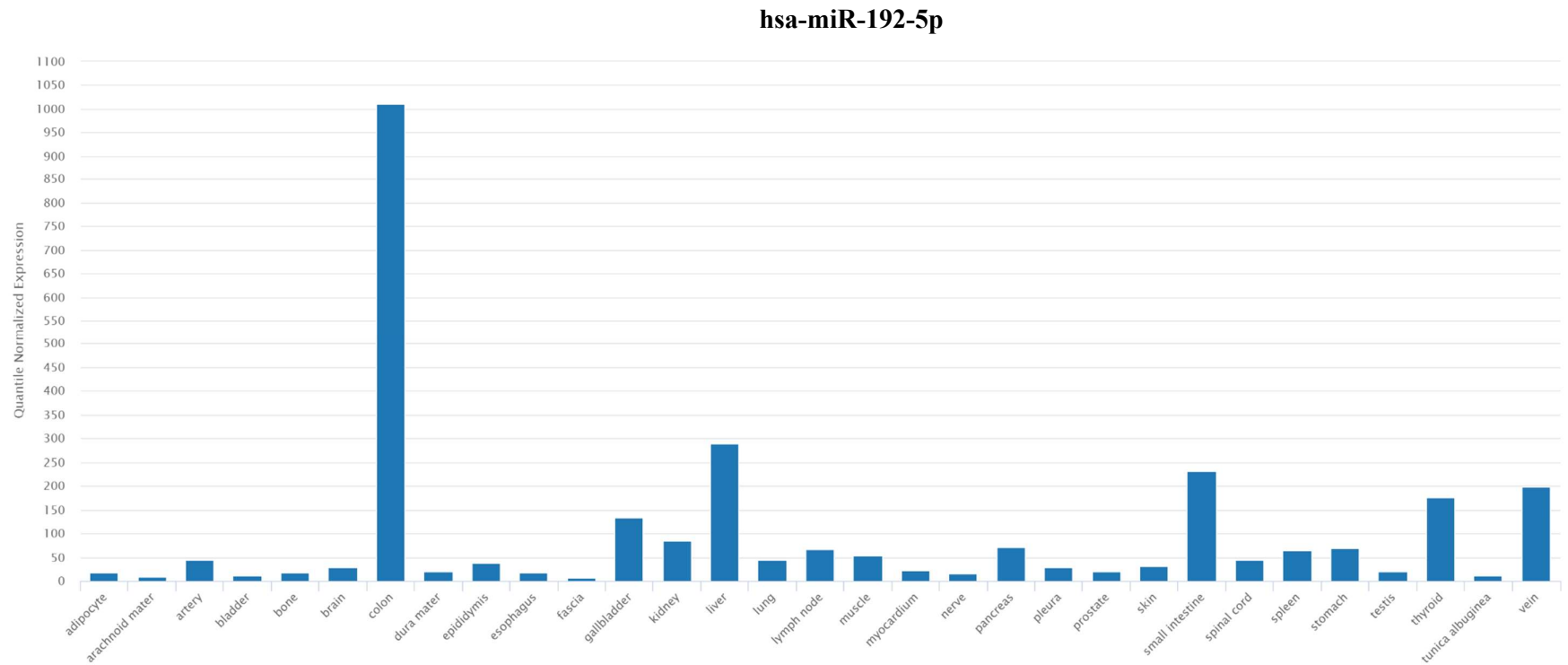


Gráfico obtido na base de dados *Human miRNA tissue atlas*.

13. DISCUSSÃO

De maneira geral, este trabalho tentou entender melhor o papel de vesículas extracelulares (EVs) na obesidade. Para isso, nós induzimos um quadro de obesidade por dieta hiperlipídica suplementada com leite condensado em camundongos machos da linhagem C57BL/6 para, posteriormente, isolar EVs do soro dos animais (obesos e controle) e utilizar as EVs isoladas para 1) tratar animais alimentados com dieta controle e 2) realizar o sequenciamento de microRNAs (miRNAs). O tratamento com EVs mostrou diferenças no metabolismo energético promovidas pelas EVs do soro de animais obesos e, com o sequenciamento, obteve-se os miRNAs que foram diferentemente expressos nas EVs do soro de animais obesos, em comparação com o grupo controle. Realizou-se validação da expressão de miRNAs nas EVs do soro e, além disso, avaliou-se a expressão desses miRNAs em tecidos de animais obesos, controle e tratados com EVs. Com os dados do sequenciamento foi possível analisar os genes- alvo e vias reguladas pelos miRNAs diferentemente expressos possibilitando análises futuras do efeito desses miRNAs no metabolismo energético.

Modelos animais de indução de obesidade por dieta podem reproduzir a obesidade humana e suas comorbidades, e já estão bem estabelecidos na literatura (DE MOURA et al., 2021). Dietas hipercalóricas promovem ganho de peso excessivo, hiperinsulinemia, hiperglicemia e outras complicações metabólicas (MASSIERA et al., 2010; LANG et al., 2019). Administração de dietas com altas concentrações de frutose, de sacarose ou dietas hiperlipídicas em camundongos são modelos bem aceitos de indução de obesidade e síndrome metabólica em roedores (PANCHAL;BROWN, 2011; BARRETT et al., 2016; LANG et al., 2019). Dietas que, além de altas concentrações de gorduras, apresentem altas quantidades de carboidratos (normalmente, sacarose ou frutose) apresentam maior palatabilidade e mimetizam melhor o quadro de síndrome metabólica humana por simular o consumo alimentar usual da maioria da população (PANCHAL;BROWN, 2011).

Estudos realizados com roedores mostram que, em comparação com a dieta hiperlipídica, dietas ricas tanto em gordura quanto em carboidratos se mostram mais eficientes na indução de hiperfagia, ganho de peso, hipertrofia de adipócitos, inflamação sistêmica, resistência à insulina, hiperglicemia, intolerância à glicose, esteatose e fibrose hepática (SAMPEY et al., 2011; ISHIMOTO et al., 2013; HIGA et al., 2014). Tais estudos apontam para o fato de que essas dietas podem ser consideradas como um modelo mais robusto para estudo da obesidade em contexto de síndrome metabólica, criando um fenótipo mais extremo de obesidade com intolerância à glicose e inflamação (SAMPEY et al., 2011).

No presente estudo os camundongos tiveram acesso *ad libitum* à dieta hiperlipídica (59% Kcal gordura) e ao leite condensado (55% Kcal carboidratos). Dentre os carboidratos encontrados no leite condensado, o conteúdo de sacarose varia entre 40-50% aproximadamente (BIRCH;MWANGELWA, 1974; RENHE et al., 2018). Na literatura, diferentes protocolos de dieta suplementada com sacarose são encontrados, entretanto, o conteúdo de sacarose normalmente se encontra entre 17-50% da composição da dieta (SUMIYOSHI et al., 2006; SATO et al., 2010; ISHIMOTO et al., 2013; FISHER-WELLMAN et al., 2016; BURCHFIELD et al., 2018; BODUR et al., 2019; PENNINGTON et al., 2020) . Assim, o conteúdo de sacarose ofertado aos animais deste trabalho se mostra próximo do que normalmente é encontrado na literatura.

O modelo de indução de obesidade por nós utilizado (dieta hiperlipídica suplementada com leite condensado) já foi adotado anteriormente por outros estudos (SAMUELSSON et al., 2008; AIKEN et al., 2016). Adicionalmente, o nosso desenho experimental foi baseado em um trabalho previamente publicado na literatura (MASI et al., 2017) que comparou o efeito de diferentes dietas (dieta controle, hiperlipídica, hiperlipídica suplementada com leite condensado e dieta controle suplementada com leite condensado) no metabolismo de camundongos. MASI et al. (2017) demonstrou que camundongos alimentados com dieta hiperlipídica suplementada com leite condensado, em comparação com as outras três dietas, apresentaram maior ganho de peso, maior consumo calórico, maior insulinemia de jejum, menor sensibilidade à insulina, maior lipólise, maior perfil inflamatório e fibrose hepática.

O protocolo de dieta utilizado por MASI et al. (2017) foi de oito semanas, contudo o protocolo de dieta utilizado neste trabalho foi de 12 semanas de dieta. Uma vez que o protocolo experimental utilizado tivera duração diferente do protocolo já descrito, jugou-se necessária a caracterização completa desses animais. Além disso, seria importante ter uma noção geral do perfil metabólico dos animais que seriam considerados obesos neste trabalho, já que o objetivo da indução de obesidade fora a extração de EVs do soro que, então, seriam utilizadas nos próximos passos do projeto.

Camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e leite condensado por 12 semanas apresentaram, em comparação com camundongos alimentados com dieta controle, maior ganho de peso, refletindo em maior percentual de gordura corporal e maior peso úmido do fígado e de todos os depósitos de gordura analisados (inguinal, epididimal, retroperitoneal, mesentérica e marrom interescapular). Além disso, os camundongos obesos apresentaram intolerância à glicose e ao piruvato (tendência; $p = 0,0571$), resistência à insulina, concentração sérica maior

de LDL-c, HDL-c e CT, escore de esteatose e inflamação hepática maiores e hipertrofia de adipócitos brancos e marrons. A expressão de genes relacionados com oxidação de ácidos graxos, adipogênese, metabolismo de lipídeos, captação de glicose, sinalização da insulina, captação de ácidos graxos e lipogênese estavam diminuídos nos depósitos de gordura dos animais obesos. No músculo gastrocnêmio dos animais obesos, a expressão de *Glut4*, *Pgc1a* e *Fasn* se mostrou diminuída, enquanto a expressão de *Fabp3* se mostrou aumentada. No fígado, *Ppara*, *Pparg* e *Tnfa* tiveram expressão aumentada enquanto a expressão de *Fasn* se encontrou diminuída nos animais obesos.

Os resultados da caracterização descritos acima são consistentes com os obtidos por MASI et al. (2017), que utilizou o mesmo modelo de indução de obesidade por dieta hiperlipídica suplementada com leite condensado, e com resultados já publicados do nosso grupo de pesquisa, utilizando o modelo de indução de obesidade apenas por dieta hiperlipídica (FRIAS FDE et al., 2016; FRIAS et al., 2018; DE MENDONÇA et al., 2019).

De maneira geral, os dados obtidos mostram que com o aumento da palatabilidade e densidade calórica promovida pela dieta hiperlipídica e pelo leite condensado, foi possível induzir um quadro de obesidade. Como consequência, pode-se observar que além de obesos, os animais apresentaram um quadro de resistência à insulina que, provavelmente, foi estimulada por inflamação tecidual e sistêmica. Esses resultados foram publicados em 2020 (DE MENDONÇA et al., 2020).

Com a caracterização do modelo de indução de obesidade por dieta, nós utilizamos o soro dos animais obesos e controle para as próximas etapas do trabalho, envolvendo tratamento *in vivo* e sequenciamento de miRNA. A partir de 150 µL de soro, EVs foram isoladas utilizando o reagente ExoQuick™ (System Biosciences), *kit* comercial que isola EVs por precipitação utilizando polímeros bastante hidrofílicos, como o polietilenoglicol, que diminuem a solubilidade das EVs, facilitando sua precipitação (formação do *pellet*) (BRENNAN et al., 2020).

Isolar EVs utilizando *kits* comerciais como o ExoQuick™ é um dos métodos disponíveis, dentre tantos outros como, ultracentrifugação, ultracentrifugação diferencial, ultracentrifugação por densidade de gradiente, cromatografia por exclusão de tamanho e ultrafiltração (CARNINO et al., 2019). Um estudo conduzido por KONOSHENKO et al. (2018) analisou artigos envolvendo extração de EVs publicados entre 2014 e 2017 e mostrou que dentre os métodos

utilizados para isolar EVs, o método de precipitação por polímero foi o terceiro mais utilizado, sendo superado apenas por ultracentrifugação e ultracentrifugação diferencial.

A diretriz da Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (MISEV 2018) aponta que não há um método considerado como correto para a extração de EVs e que os pesquisadores devem escolher seu método com base nos usos subsequentes das preparações de EVs obtidas (THERY et al., 2018). Contudo, a diretriz descreve os diferentes métodos de extração com base no seu grau de obtenção de EVs (*EV recovery*) e especificidade, além de destacar a importância da caracterização das EVs (THERY et al., 2018). O método de extração utilizado neste trabalho foi considerado como um método de extração de EVs que proporciona alta obtenção de EVs e baixa especificidade.

De fato, diversos estudos apontam a contaminação com proteínas como a principal limitação do uso de reagentes como o ExoQuick™, porém ele é reconhecido como um método rápido, fácil, que não necessita de ultracentrífuga, que mantém a integridade das EVs, que possibilita o processamento de um número grande de amostras, que permite a extração de EVs com um volume pequeno de amostra e como uma alternativa adequada à ultracentrifugação (HELWA et al., 2017; KONOSHENKO et al., 2018; SERRANO-PERTIERRA et al., 2019). Além disso, conforme demonstrado recentemente por VEERMAN et al. (2021), o uso de ExoQuick™, em comparação com outros quatro métodos (afinidade de membrana, cromatografia por exclusão de tamanho, gradiente de iodixanol e afinidade pela fosfatidilserina) isola uma quantidade maior de partículas e de RNA, uma menor quantidade de proteínas e, mesmo com volume baixo de plasma (250 µl), foi o método que melhor identificou marcadores proteicos de EVs.

O uso do ExoQuick™ possibilitou a obtenção de EVs que foram caracterizadas seguindo as recomendações da MISEV 2018 (THERY et al., 2018). As preparações de EVs se mostraram íntegras, com concentração de aproximadamente 6,4E10 partículas/mL e tamanho menor que 200 nm, avaliado por três métodos diferentes (NTA, DLS e microscopia eletrônica). Constatou-se presença de marcadores proteicos específicos de EVs (TSG101, ALIX, CD9 e CD63), ausência de marcador de EVs grande (Grp94) e, conforme esperado, contaminação com albumina. Os resultados de caracterização das EVs do soro se mostraram similares ao encontrado na literatura utilizando soro de camundongos e de humanos, e volumes pequenos de amostra (100 e 200 µL) (HELWA et al., 2017; SERRANO-PERTIERRA et al., 2019; GEMOLL et al., 2020; WU et al., 2021).

Após validação do método de extração e caracterização das EVs, seguiu-se então para o protocolo de tratamento *in vivo*, realizado a cada três dias, durante oito semanas, com as EVs provenientes do soro dos animais. A dose utilizada para o tratamento foi a de 400 µg de proteína, já descrita na literatura como segura e bem tolerada para o tratamento de células, camundongos, ratos e coelhos (YANG et al., 2013; SUN, L. et al., 2016; MAO et al., 2017; TRIPISCIANO et al., 2017; SUN, Y. et al., 2018). A via de administração foi a intraperitoneal que, conforme demonstrado por WIKLANDER et al. (2015), promove acúmulo de EVs principalmente no fígado, pâncreas e trato gastrointestinal após sua injeção.

Com o objetivo de investigar as alterações metabólicas causadas por EVs durante a obesidade, utilizou-se as EVs para o tratamento de camundongos alimentados com dieta controle. O primeiro lote de tratamento (Parte IIa) demonstrou que EVs derivadas do soro de camundongos obesos (EV-H) podem modular o metabolismo de camundongos controle. Entre os principais achados, nós encontramos que camundongos controle tratados com EVs do soro de camundongos obesos apresentam menor peso final, ganho de peso e consumo de ração; menor peso úmido da gordura subcutânea inguinal, do fígado e do músculo esquelético gastrocnêmio; aumento do gasto energético; maior preferência por ácidos graxos como fonte de energia; menor termogênese (apenas no período claro); tendência ($p = 0.0571$) a melhora da sensibilidade à insulina, aumento do conteúdo de triglicerídeo hepático e aumento do escore de inflamação hepática, em relação a camundongos magros tratados com PBS (veículo).

Mesmo com n amostral baixo ($n=5$ /grupo controle e $n=4$ /grupo tratado com EV-H), os resultados sugerem que EVs do soro de animais obesos promoveram mudanças no metabolismo de animais controle. A perda de peso observada no grupo tratado poderia ser explicada pelo maior gasto energético e pela preferência em oxidar ácidos graxos como fonte de energia, o que estaria associada com o aumento de lipólise e, conseqüentemente, menor peso úmido da gordura subcutânea inguinal. O aumento de lipólise levaria a um maior aporte de ácidos graxos livres e glicerol para a circulação, predispondo maior captação de ácidos graxos pelo fígado, fato que explicaria o aumento de TG hepático observado. Além disso, sabe-se que a gordura inguinal está relacionada com o processo de *browning* e, sua ativação, com aumento de termogênese (WANG, W.;SEALE, 2016). Com isso, a diminuição do peso da gordura subcutânea inguinal pode estar associada com a menor termogênese e, conseqüentemente, com menor *heat* encontrado, no período claro dos animais tratados.

Adicionalmente, a perda de peso, juntamente com as outras alterações observadas, também pode ter ocorrido por um efeito das EVs no consumo alimentar, que foi menor nos

animais tratados. Um estudo publicado por GAO et al. (2019) mostrou, pela primeira vez, que vesículas extracelulares secretadas pelo tecido adiposo podem ser diretamente transferidos para neurônios POMC (anorexígenos) hipotalâmicos, regulando consumo alimentar por sinalização via mTOR.

Embora tenha-se obtidos resultados animadores, duas importantes limitações precisam ser apontadas para o primeiro lote de tratamento. A primeira é a o peso dos animais do grupo tratado, que, embora não tenha sido observada diferença estatística, é um pouco menor logo nas primeiras semanas no protocolo experimental (antes do tratamento), em comparação com o grupo controle. Neste caso, os efeitos observados não seriam exclusivos do tratamento com EVs, mas também poderiam ser atribuídos ao fato de os animais terem peso menor. A segunda limitação é a do uso de PBS como controle, ainda que seja uma prática amplamente utilizada (JUNG et al., 2020; LI et al., 2020). Por mais que o uso de PBS reproduza a manipulação e o estresse dos animais em relação à injeção, o seu uso não reproduz a extração de EVs e a co-extração inevitável de contaminantes proteicos presentes no material biológico utilizado. Assim, conforme apontado por KENNEDY et al. (2020) o controle ideal seria EVs isoladas do mesmo material biológico em condições consideradas controle, permitindo um protocolo equivalente de extração.

Tentando contornar as limitações do primeiro lote, um segundo lote de tratamento foi realizado, tomando bastante cuidado na hora de separar os animais entre os diferentes grupos antes do início do protocolo experimental para que a média dos pesos dos animais fosse semelhante entre os grupos. Além disso, adicionou-se um novo grupo experimental: animais tratados com EVs do soro de animais controle (EV-C). Para o novo lote, o mesmo desenho experimental foi utilizado, mantendo a dose, a frequência e o tempo de tratamento.

Com o segundo lote de tratamento, não foi observado diferença no peso corpóreo e na composição corporal entre os animais dos diferentes grupos. Contudo vale ressaltar que os grupos tratados com EVs seguiram um mesmo padrão de resultado, apresentaram valores aparentemente maiores em relação à porcentagem de gordura e menores em relação à porcentagem de massa magra, em comparação com o grupo tratado com PBS. A média do consumo alimentar dos animais também não foi diferente. Não foram encontradas diferenças estatísticas nos resultados de glicemia de jejum, GTT e ITT, porém destaca-se novamente o mesmo padrão de resultados para os grupos tratados com EVs, que apresentaram valores maiores de glicemia de jejum, em comparação com o grupo tratado com PBS.

Interessantemente, no ITT, o grupo EV-H apresentou valores maiores na sua curva glicêmica a partir do tempo de oito minutos, em comparação com os outros dois grupos.

Os pesos das gorduras analisadas e do músculo gastrocnêmio não foram diferentes entre os grupos, porém destaca-se que, com exceção do peso da iBAT e do músculo gastrocnêmio que se mostraram menor no grupo EV-H, o peso das demais gorduras seguiram o mesmo padrão entre os grupos tratados com EVs, se mostrando aumentado, em comparação com o grupo tratado com PBS. Os resultados da calorimetria indireta mostram que o tratamento com EV-C e EV-H provocaram efeitos contrários em relação ao metabolismo energético e *heat*. Animais do grupo EV-H apresentaram diminuição do metabolismo energético e do *heat* e, em contrapartida, os do grupo EV-C, aumento. Os animais do grupo EV-H também apresentaram RER próximo de 0,7, indicando preferência por oxidação de lipídeos e, surpreendentemente, a atividade locomotora dos grupos tratados com EVs foi menor em comparação com o grupo tratado com PBS.

Ao se observar os resultados do segundo lote e comparar os grupos PBS e EV-C fica evidente que, de fato, o PBS não é um bom controle e pode ter contribuído para resultados falso-positivos no primeiro lote. Ademais, alguns dos efeitos metabólicos promovidos pelo tratamento com EV-H observados no primeiro lote não foram mantidos no segundo lote e, algum deles, chegaram a ser opostos. Como o protocolo experimental realizado nos dois lotes foi igual e, a única diferença tenha sido o peso antes do tratamento que foi igual entre os três grupos experimentais no segundo lote, sugere-se que, no primeiro lote, o menor peso observado no grupo EV-H, embora sem diferença estatística, pode ter interferido e mascarado os verdadeiros efeitos metabólicos promovidos pelas EVs. Assim, neste trabalho, os efeitos promovidos por EVs do soro de camundongos obesos foram considerados os efeitos obtidos pelo segundo lote de tratamento. Vale destacar que, após o tratamento com EV-H, o menor *heat* e preferência para a oxidação de lipídeos foram resultados mantidos entre os dois lotes.

Nosso trabalho não foi o primeiro a tentar entender o efeito e a comunicação de EVs na obesidade e resistência à insulina. O primeiro estudo a sugerir que EVs derivadas do tecido adiposo poderiam afetar a resistência à insulina foi realizado por DENG et al. (2009). Nesse trabalho, camundongos C57BL/6 *wild-type* (WT) foram tratados (30 µg por dose/animal, via intravenosa, a cada três dias por três semanas) com EVs derivadas do tecido adiposo visceral de camundongos WT magros ou camundongos obesos (*ob/ob*). Camundongos WT tratados com EVs derivadas dos animais obesos desenvolveram intolerância à glicose e resistência à insulina, e apresentaram aumento sérico de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNFα) por provável

ativação de macrófagos através da via do TLR4/TRIF (*Toll-like receptor 4/TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*) tanto no tecido adiposo como no fígado (DENG et al., 2009).

De maneira semelhante, um estudo realizado por YING et al. (2017) reportou que o tratamento de camundongos C57BL/6 magros com EVs derivadas dos macrófagos do tecido adiposo de camundongos obesos (30 μ g por dose/animal administrada por via intravenosa, a cada sete dias por duas semanas) apresentaram resistência à insulina (YING et al., 2017). Interessantemente, o oposto também foi observado, ou seja, o tratamento de EVs derivadas de macrófagos do tecido adiposo de camundongos magros melhorou a resistência à insulina de camundongos obesos (YING et al., 2017). Propôs-se que tais efeitos ocorrem via o miR-155 e um dos seus genes-alvo, *Pparg*. EVs derivadas dos macrófagos do tecido adiposo de camundongos obesos aumentam a expressão do miR-155, levando a menor expressão de *Pparg* e genes por ele regulados, e menor captação de glicose e fosforilação de AKT nos adipócitos, miócitos e hepatócitos.

Tentando demonstrar a comunicação entre fígado e tecido adiposo, ZHAO et al. (2020) extraiu EVs de hepatócitos primários isolados de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica (60% kcal gordura) ou controle por 12 semanas para tratar camundongos alimentados com dieta controle (dose de 30 μ g/animais administrada por via intravenosa a cada três dias por seis semanas). Os animais tratados com EVs provenientes dos hepatócitos dos animais obesos apresentaram maior peso das gorduras brancas epididimal e inguinal, maior expressão de genes relacionados com lipogênese e aumento da expressão do miR-122 (considerado como um miRNA específico no fígado) nas duas gorduras (ZHAO et al., 2020).

Em comparação com os estudos *in vitro*, são poucos os estudos disponíveis na literatura em relação à obesidade e resistência à insulina que tenham, de fato, realizado estudos *in vivo* para mostrar os efeitos das EVs e sua comunicação entre diferentes tecidos (LEI et al., 2021). Dos estudos citados acima, de maneira geral, pode-se observar que os efeitos das EVs se dão principalmente no peso de tecidos, na responsividade à glicose e insulina e na expressão de genes e proteínas. Adicionalmente, os resultados indicam que, independentemente do seu tecido de origem, o tratamento com EVs derivadas de animais obesos tende a desencadear efeitos deletérios relacionados com a patogênese da obesidade e resistência à insulina e impactar o metabolismo energético negativamente. De fato, os resultados do segundo lote de tratamento deste trabalho mostram esses efeitos no grupo EV-H, principalmente se considerarmos a maior

curva glicêmica no ITT, menor gasto energético e *heat* observados pelo experimento de calorimetria indireta.

Contudo, comparar os resultados obtidos neste trabalho com os descritos na literatura é bastante difícil, uma vez que, com exceção do ITT e GTT, são poucos os experimentos que os estudos têm em comum. Nenhum dos artigos citados realizou calorimetria indireta ou informou sobre o consumo alimentar dos animais. O peso dos animais não foi reportado nos estudos de DENG et al. (2009) e ZHAO et al. (2020). Contudo, corroborando com o que foi encontrado no nosso trabalho, o estudo publicado por YING et al. (2017) mostrou que o tratamento com EVs não modificou o peso dos animais.

Além disso, o tecido ou tipo celular de origem das EVs e a frequência do tratamento foram diferentes entre os estudos citados e em relação ao nosso trabalho. Em contrapartida, a via de administração e a dose do tratamento foi a mesma, uma vez que os estudos *in vivo* cuja via de administração seja intravenosa se baseiam, normalmente, na dose de 30 µg utilizada por DENG et al. (2009), o primeiro trabalho da área a apontar comunicação via EVs do tecido adiposo. Interessantemente, não há uma citação ou um estudo de dose-resposta realizado por DENG et al. (2009) que justifique sua escolha de dose.

Diferentemente do que já estava sendo publicado na época em que idealizamos o projeto, nosso enfoque não era apenas no efeito das EVs derivados de um tecido específico em um órgão específico durante a obesidade, mas sim tentar entender melhor a comunicação via EVs entre os principais tecidos alvos da insulina (tecido adiposo, músculo esquelético e fígado) durante a obesidade e tentar correlacionar os efeitos observados com o conteúdo de miRNAs dessas EVs.

Antes do início do protocolo de tratamento com EVs do soro, nenhum trabalho até então tinha mostrado o efeito do tratamento de camundongos magros com EVs presentes na circulação de camundongos obesos. No final de 2018, Castanho e colaboradores trataram camundongos magros com EVs derivados do plasma de camundongos obesos (alimentados com dieta hiperlipídica 60% kcal gordura por 15 semanas) (CASTANO et al., 2018). O tratamento foi realizado duas vezes por semana, por quatro e oito semanas, com uma dose de 5µg administrada por veia caudal (CASTANO et al., 2018). Os animais tratados por quatro semanas apresentaram intolerância à glicose, resistência à insulina, ganharam mais peso e uma tendência ao aumento do acúmulo de triglicerídeos hepático e, com oito semanas de tratamento, esses efeitos foram intensificados (CASTANO et al., 2018).

Admite-se que os resultados obtidos por CASTANO et al. (2018) foram surpreendentes, uma vez que, com uma dose seis vezes menor do que a utilizada pelos outros estudos, foi possível observar efeito do tratamento, mostrando que EVs derivadas do plasma de animais obesos levam a efeitos deletérios no metabolismo dos animais tratado. Admite-se que esses resultados vão de encontro com a hipótese por nós criada tendo como base os resultados obtidos pelo nosso trabalho. Pensamos que as EVs presentes na circulação (plasma e soro) pudessem ter origem diferentes tipos celulares e que pudessem secretar EVs com conteúdo bastante diferentes e, portanto, sinalizar informações diferentes. Tal fato poderia então, favorecer uma resposta mais difusa, dificultando a visualização dos resultados.

Corroborando com a nossa hipótese, tem-se o artigo publicado por ZHOU et al. (2020) que, além de utilizar o mesmo método de extração de EVs do nosso trabalho, foi, até onde sabemos, o único trabalho a comparar o efeito do tratamento de EVs de um tecido específico com EVs do soro. Animais obesos (alimentados com dieta hiperlipídica 60% kcal gordura por 8 semanas) foram tratados com EVs provenientes do soro e da iBAT de animais controle (dose de 100 µg administrada por via intravenosa uma vez por semana por seis semanas). Os animais tratados com EVs da iBAT apresentaram menor peso corpóreo, menor intolerância à glicose, melhora no perfil lipídico, menor peso úmido e diâmetro dos adipócitos das gorduras epididimal e inguinal e menor acúmulo de lipídios no fígado. Contudo, não foram observados resultados significativos com o tratamento utilizando as EVs do soro (ZHOU et al., 2020).

Conforme demonstrado, estudos utilizando EVs proveniente de diferentes tecidos e diferentes doses de tratamento já foram realizados e, com eles, fica evidente o potencial de EVs na regulação do metabolismo energético. Nosso trabalho não fez diferente e, corroborando com o que já foi publicado, mostrou efeitos no metabolismo via EVs do soro de animais obesos, utilizando dieta, dose, tempo de tratamento e via de administração diferentes. Nosso próximo passo foi tentar entender as possíveis vias moleculares que poderiam estar causando essas alterações metabólicas.

Sabe-se que as EVs são apontadas como importantes mediadores da comunicação entre tecidos, uma vez que elas podem ser secretadas na circulação e captadas por diferentes tipos celulares (HUANG-DORAN et al., 2017). A carga das EVs pode ser composta por diferentes moléculas como proteínas, lipídeos, RNAs, miRNAs e DNA e é influenciada pelo estado fisiológico da célula doadora (VAN NIEL et al., 2018; MARGOLIS;SADOVSKY, 2019). Então, condições que perturbem a homeostasia celular podem modificar a carga das EVs, resultando em alterações funcionais nas suas células-alvo (VAN NIEL et al., 2018;

MARGOLIS;SADOVSKY, 2019). Dentre os diferentes tipos de moléculas presentes nas EVs, nosso foco foi estudar as diferenças no conteúdo de miRNAs de EVs do soro isoladas de camundongos obesos e controle.

Então, realizou-se o sequenciamento de miRNAs provenientes das EVs do soro de animais controle e obesos e, como resultado, obteve-se 16 miRNAs que foram diferentemente expressos entre os grupos. Desses miRNAs, pesquisou-se na literatura os que aparecem associados com obesidade, resistência à insulina e diabetes e que já tenham sido descritos na circulação ou em EVs provenientes de diferentes tecidos (**Quadro 1**).

Como pode-se observar, dos 16 miRNAs diferentemente expressos, apenas nove já foram descritos na circulação (soro, plasma ou EVs circulantes) e, desses, apenas três foram descritos em EVs (miR-122-5p, miR-192-5p, let-7-5p) (**Quadro 1**). De maneira geral, o nosso trabalho identificou, em um contexto de obesidade e resistência à insulina, 13 miRNAs que até então não tinham sido descritos em EVs circulantes.

Vale ressaltar que dos sete miRNAs que ainda não foram descritos na circulação, apenas os miRNAs miR-6902 e miR-5126 não se encontraram presente em publicações relacionadas à obesidade. O miR-2137 se mostrou aumentando na gordura visceral de camundongos *ob/ob*, em comparação com animais WT e sua inibição leva ao aumento da secreção de IL-10, citocina anti-inflamatória (CIOFFI et al., 2015; HUCK et al., 2017). O miR-22-3p se encontra aumentado no fígado de camundongos com resistência à insulina e injeção subcutânea do miR-22-3p antagomir (fármaco candidato nomeado como APT-110) por 12 semanas em camundongos obesos, aumenta sensibilidade à insulina e reduz a esteatose hepática, níveis séricos de colesterol e peso das gorduras (KAUR et al., 2015; THIBONNIER et al., 2020). A expressão do miR-29c-3p foi aumentada no músculo de pacientes com diabetes mellitus do tipo 2 e negativamente correlacionada com a sensibilidade à insulina periférica (DAHLMANS et al., 2017). EVs derivadas de macrófagos do tecido adiposo de animais obesos apresentaram menor expressão do miR-690 e, este, já foi descrito como um miRNA relacionado com maior sensibilidade à insulina, encontrado em EVs de macrófagos M2 (YING et al., 2017; YING et al., 2021). E, para finalizar, já foi descrito que a obesidade aumenta a expressão do miR-802-5p, prejudicando as vias de sinalização e secreção de insulina e, além disso, sua inibição se mostrou protetora contra obesidade através de um mecanismo envolvendo AMPK e metabolismo de lipídeos hepático (ZHANG, F. et al., 2020; NI et al., 2021).

Quadro 1. miRNAs descritos na circulação e envolvidos com obesidade e resistência à insulina

let-7c-5p	Obesidade	EVs-Soro	Humano	Diminuída	(KIM, H. et al., 2020)
		Soro	Camundongo	Diminuída	(HSIEH et al., 2015)
miR-122-5p	Obesidade	Soro	Humano	Aumentada	(WANG, R. et al., 2015)
	Obesidade	Plasma	Humano	Aumentada	(PRATS-PUIG et al., 2013)
	RI ^a e Obesidade	Plasma	Camundongo	Aumentada	(JONES et al., 2017)
	Obesidade	EVs-Plasma	Camundongo	Aumentada	(CASTANO et al., 2018)
	Diabetes ^b	Soro	Humano	Aumentada	(JAEGER et al., 2018)
miR-125b-5p	Obesidade	Soro	Humano	Diminuída	(LIN et al., 2020)
		Plasma	Humano	Diminuída	(PRATS-PUIG et al., 2013)
	Obesidade	Plasma	Humano	Diminuída	(ORTEGA et al., 2013)
miR-126a-3p	Diabetes ^b	Plasma	Humano	Diminuída	(OLIVIERI et al., 2015)
miR-146b-5p	Obesidade e Diabetes ^b	Soro	Humano	Aumentada	(CUI et al., 2018)
miR-15b-3p	Obesidade e Diabetes ^b	Soro	Humano	Aumentada	(PESCADOR et al., 2013)
		Soro	Humano	Aumentada	(CUI et al., 2018)
miR-16-5p	Diabetes ^c	Soro	Humano	Diminuída	(AKERMAN et al., 2018)
miR-192-5p	Diabetes ^b	Soro	Humano	Aumentada	(JAEGER et al., 2018)
	Obesidade	EV-Plasma	Camundongo	Aumentada	(CASTANO et al., 2018)
	RI ^a e Obesidade	Plasma	Camundongo	Aumentada	(JONES et al., 2017)
miR-301a-3p	RI ^a	Soro	Humano	Diminuída	(MASOTTI et al., 2017)

Revisão da literatura realizada com base em trabalhos envolvendo obesidade, resistência à insulina e Diabetes. * Em relação ao grupo controle; ^a Resistência à insulina; ^b Diabetes Mellitus do tipo 2; ^c Diabetes Mellitus do tipo 1.

A partir dos dados obtidos no sequenciamento, os 16 miRNAs diferentemente expressos em EVs do soro de animais obesos foram analisados em função do enriquecimento de vias metabólicas KEGG. Das 10 vias identificadas pela análise *a posteriori*, duas chamam-se e destacam-se por serem reguladas por um maior número de miRNAs (n=4) e possuem um número alto de genes-alvo: interação do receptor de matriz extracelular (*ECM-receptor interaction*) e sinalização da PI3K-Akt (*PI3K-Akt signaling pathway*). As duas vias citadas se mostram reguladas pelo let-7c-5p e miR-29c-3p, miRNAs que, dentre todos os outros analisados, parecem regular o maior número de genes das vias enriquecidas que foram identificadas.

A maioria dos 18 genes que são alvos dos quatro miRNAs (let-7c-5p, miR-122-5p, 15b-3p e 29c-3p) que regulam a via de interação do receptor de matriz extracelular (*ECM-receptor interaction*) são membros da família do colágeno. A matriz extracelular (ECM, do inglês *extracellular matrix*) é uma estrutura complexa composta por diferentes proteínas, proteoglicanos e polissacarídeos que controla processos biológicos como diferenciação, migração, reparo, sobrevivência e desenvolvimento (WILLIAMS et al., 2015; RUIZ-OJEDA et al., 2019). O remodelamento da ECM, principalmente no tecido adiposo, é uma característica observada na obesidade e está relacionada com a resistência à insulina (WILLIAMS et al., 2015; RUIZ-OJEDA et al., 2019). Estudos com camundongos e pacientes obesos mostram o aumento da expressão de genes da família do colágeno no tecido adiposo subcutâneo e visceral (HENEGAR et al., 2008; STRIEDER-BARBOZA et al., 2020).

A via de sinalização da PI3K-Akt (*PI3K-Akt signaling pathway*) foi regulada pelos miRNAs let-7c-5p, miR-16-5p, miR-2137 e miR-29c-3p, e foi a via com maior número de genes-alvo, totalizando 57 genes, incluindo os que codificam o receptor de insulina e o substrato-1 do receptor de insulina. Essa via de sinalização exerce papel central na fisiologia celular por estar envolvido com a homeostase de glicose, metabolismo de lipídeos, síntese proteica e proliferação celular (HUANG et al., 2018). A via da PI3K-Akt é considerada como a maior efetora das ações metabólicas da insulina no tecido adiposo, no músculo esquelético e no fígado e, conseqüentemente, alterações na sua sinalização podem resultar em resistência à insulina (SCHULTZE et al., 2012; HUANG et al., 2018; ZHANG, Z. et al., 2019). Destaca-se que a via de sinalização da FoxO (*FoxO signaling pathway*), que também se mostrou enriquecida nas análises, está envolvida com a sinalização da insulina e é considerada a integração entre o metabolismo de lipídeos e de glicose (LEE, S.; DONG, 2017).

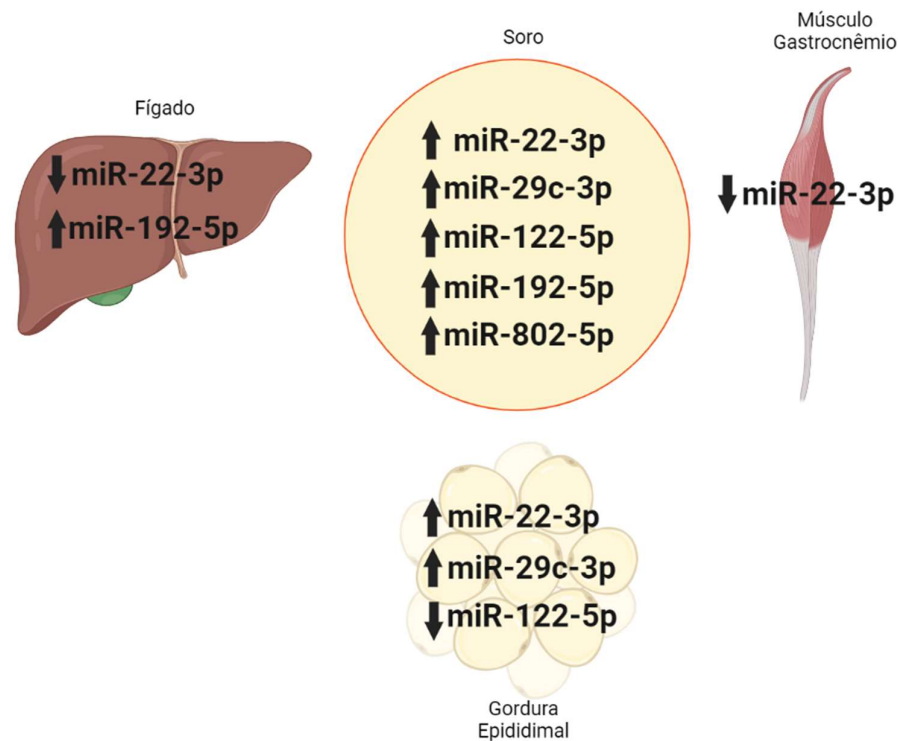
As análises de enriquecimento de vias KEGG mostrou as vias que poderiam ser reguladas pelos miRNAs diferentemente expressos na obesidade. Neste trabalho, focou-se em três vias

(sinalização da PI3K-Akt, sinalização da FoxO e interação do receptor de matriz extracelular) por conta do seu envolvimento já conhecido com obesidade e sinalização de insulina. Contudo, os dados de todas as análises de bioinformática e os genes-alvo dos miRNAs foram descritos e podem ser usados para trabalhos futuros. No geral, os dados apontam para o envolvimento de miRNAs circulantes (presentes em EVs do soro) na patogênese da obesidade e resistência à insulina e, para confirmar esses dados, realizou-se a validação dos miRNAs.

Realizou-se validação de seis miRNAs do soro de EVs (miR-15b-3p, miR-22-3p, miR-29c-3p, miR-122-5p, miR-192-5p, miR-802-5p) e, com exceção do miR-15b-3p, todos foram validados e se encontraram com expressão aumentada em EVs do soro de animais obesos. Além da expressão desses miRNAs no soro, avaliou-se suas expressões no fígado, na gordura epididimal e no músculo gastrocnêmio e o resumo dos resultados pode ser verificado **Figura 64**. A validação do sequenciamento ainda não está completa e nem todos os cinco miRNAs validados foram investigados na gordura epididimal e no músculo gastrocnêmio, entretanto, os resultados iniciais mostram-se promissores, inclusive em termos de comunicação entre tecidos via EVs.

Os miRNAs miR-192-5p e miR-122-5p, conforme explanado anteriormente no **Quadro 1**, já foram descritos na circulação e em EVs do plasma. Nossos resultados apontam para uma expressão aumentada desses miRNAs em EVs do soro de animais obesos, assim como os resultados com EVs do plasma de CASTANO et al. (2018). Além da expressão aumentada em EVs do soro, o miR-192-5p também mostrou maior expressão no fígado. Esse miRNA já foi apontado como um potencial biomarcador para NAFLD e já foi demonstrado que EVs de hepatócitos lipotóxicos contém o miR-192-5p e ele desempenha um papel crítico na ativação de macrófagos M1 (pró-inflamatórios) e na inflamação hepática por mecanismo envolvendo inibição da expressão de Rictor e, conseqüentemente, a fosforilação de Akt e FoxO1 (TAN et al., 2014; LIU et al., 2020). Em relação ao miR-122-5p, que se mostrou aumentado em EVs do soro, seus efeitos no tecido adiposo estão relacionados com menor diferenciação de adipócitos e inibição da adipogênese via inibição de *Pparg*, seu alvo, levando a menor acúmulo de gordura (LIAO et al., 2018). Os níveis séricos de miR-122-5p também se mostraram negativamente associados com a ativação de BAT (OKAMATSU-OGURA et al., 2019). Cabe ressaltar que os nossos dados corroboram com os de CASTANO et al. (2018) que também mostrou aumento do miR-192-5p no fígado e diminuição do miR-122-5p na gordura epididimal de animais obesos.

Figura 64. Esquema representativo dos resultados da validação da expressão de microRNAs das EVs do soro e expressão dos microRNAs validados no fígado, músculo gastrocnêmio e gordura epididimal de camundongos obesos



Validação e expressão de miRNAs nos tecidos realizada por RT-qPCR utilizando o método TaqMan™ Advanced. Experimento realizado em animais alimentados com dieta hiperlipídica suplementada com leite condensado por 12 semanas. Orientação da flecha reflete aumento ou diminuição da expressão de camundongos obesos em comparação com o grupo controle, refletindo os resultados obtidos no teste estatístico. Pela amostra ser pequena, considerou-se resultados dos testes com valor de $p < 0,1$ como significativos. miRNAs avaliados no fígado: miR-29c-3p, miR-22-3p, miR-122-5p, miR-192-5p e miR-802-5p; miRNAs avaliados na gordura epididimal: miR-29c-3p, miR-22-3p, miR-122-5p e miR-192-5p; miRNAs avaliados no músculo gastrocnêmio: miR-22-3p, miR-122-5p e miR-192-5p. Figura criada com BioRender.com.

A expressão de miR-192-5p se dá majoritariamente no intestino grosso e no fígado. Como há aumento de sua expressão em EVs do soro, podemos hipotetizar que, na obesidade, ocorre o aumento da expressão do miR-192-5p no fígado, levando aos seus possíveis efeitos deletérios relacionados com NAFLD e inflamação. Além disso, o fígado pode secretar EVs contendo esse miRNA para a circulação. Com pensamento similar, o miR-122-5p é considerado um miRNA específico de fígado, e o fato de ele se mostrar aumentando em EVs no soro e diminuído na gordura epididimal sem apresentar diferença na sua expressão hepática, pode nos

levar a pensar que, na obesidade, o miR-122-5p é menos captado pelo tecido adiposo e, então, sua diminuição promove maior acúmulo de gordura.

Conforme já mencionado, o miR-29c-3p apresenta expressão aumentada no músculo de pacientes com diabetes mellitus do tipo 2 e sua expressão está correlacionada com menor expressão de GLUT4 e Hexoquinase II (HK2) (RNAm e proteína) (ESTEVEZ et al., 2018). Adicionalmente, a superexpressão desse miRNA em células 3T3-L1 acarreta menor expressão de GLUT4. Tais dados sugerem um papel importante do miR-29c-3p no comprometimento da homeostase de glicose induzido pelo diabetes (SONG et al., 2018). No nosso trabalho, a expressão do miR-29c-3p foi maior em EVs do soro e na gordura epididimal de animais obesos. Conforme encontrado no *Human miRNA tissue atlas*, o músculo é o tecido que mais expressa esse miRNA, mas não encontramos aumento de sua expressão no músculo. Talvez, na obesidade, o miR-29c-3p seja de fato mais expresso no músculo, mas, em contrapartida, também seja mais secretado na circulação em EVs. Uma vez na circulação, as EVs podem ser captadas pela gordura epididimal, tecido que também expressa *Glut4* e *Hk2*, tornando possível os efeitos deletérios na homeostase de glicose mediada pelo aumento de miR-29c-3p neste tecido.

Embora o miR-22-3p seja demonstrado no *Human miRNA tissue atlas* como abundante no músculo e, em menor grau, nos adipócitos, esse miRNA está descrito como um importante regulador do metabolismo de lipídeos hepático, sendo sua superexpressão relacionada com esteatose hepática e sua inibição, com aumento de expressão do FGF21, levando à ativação de AMPK e ERK1/2, levando a menor lipogênese e, conseqüentemente, menor esteatose (HU et al., 2020; WANG, L. et al., 2020). Além disso, estudos que desafiaram com dieta hiperlipídica camundongos *knockout* (global) para miR-22-3p e camundongos tratados com um inibidor de miR-22-3p (antagormir - APT-110) mostraram que a perda desse miRNA resulta em diminuição de massa de gordura, menor expressão de genes lipogênicos na gordura epididimal e no fígado, melhora da esteatose hepática e maior gasto energético (DINIZ et al., 2017; THIBONNIER et al., 2020). Pelo fato de a expressão do miR-22-3p estar aumentada na gordura epididimal, pode-se pensar que, na obesidade, ocorre ou maior expressão do miR-22-3p ou maior captação desse miRNA presente em EVs circulantes, acarretando nos efeitos já descritos na literatura relacionados com maior lipogênese, acúmulo de gordura e menor gasto energético nesse tecido.

Os resultados iniciais de validação e as análises de expressão dos miRNAs validados no fígado, no músculo gastrocnêmio e na gordura epididimal, sugerem que um mecanismo de

comunicação entre EVs possa estar envolvido com a patogênese da obesidade, destacando-se o papel regulatório dos miRNAs. Na tentativa de investigar a transferência entre miRNAs de EVs do soro, para tecidos de interesse, avaliou-se a expressão dos miRNAs validados em EVs do soro no fígado e na gordura epididimal de animais controle tratados com EVs derivadas de animais obesos, porém com um n amostral baixo ($n=4$), nenhuma diferença estatística foi encontrada. Admite-se que outros experimentos devem ser feitos com o intuito de tentar entender os efeitos das EVs do soro no metabolismo energético e, por fim, elucidar possíveis mecanismos de comunicação entre diferentes tecidos.

Resumidamente, este trabalho foi o primeiro a utilizar EVs do soro para experimentos *in vivo* e sequenciamento de miRNAs provenientes de animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica suplementada com leite condensado por 12 semanas. O tratamento com EVs do soro de animais obesos mostrou efeitos deletérios no metabolismo energético de camundongos controle e 16 miRNA foram diferentemente expressos em EVs soro de camundongos obesos. As vias e os genes-alvo que possivelmente são reguladas pelos miRNAs diferentemente expressos foram avaliados. Identificamos 13 miRNAs EVs que ainda não haviam sido descritos em EVs circulantes na obesidade e resistência à insulina. Iniciou-se a validação dos miRNAs e, com base nos resultados de expressão dos miRNAs validados no fígado, músculo gastrocnêmio e gordura epididimal, algumas hipóteses de comunicação entre tecidos via EVs foram criadas.

14. CONCLUSÃO

De maneira geral, nosso trabalho caracteriza um modelo de obesidade por dieta que até então não foi utilizado para estudo de EVs, mostra o efeito de EVs do soro de animais obesos no metabolismo energético de animais controle, identifica 13 miRNAs que ainda não haviam sido descritos em EVs circulantes na obesidade e resistência à insulina, discute o possível envolvimento de miRNAs de EVs na patogênese da obesidade, fornece uma extensa análise de bioinformática para uso futuro e promove análises iniciais realizadas com o intuito de desvendar a comunicação entre tecidos via miRNAs de EVs na obesidade.

Parte I – Camundongos alimentados com dieta hiperlipídica suplementada com leite condensado apresentaram quadro de obesidade, intolerância à glicose, resistência à insulina, maior concentração sérica de LDL-c, HDL-c e CT, alteração da expressão de genes relacionados com oxidação de ácidos graxos, adipogênese, metabolismo de lipídeos, captação de glicose, sinalização da insulina, captação de ácidos graxos, lipogênese e inflamação nos depósitos de gordura, fígado e músculo gastrocnêmio, maior escore de esteatose e inflamação hepática e hipertrofia de adipócitos brancos e marrons.

Parte II – O método de extração de EVs do soro adotado se mostrou eficaz, extraíndo EVs íntegras, com concentração de aproximadamente $6,4E10$ partículas/mL e tamanho menor que 200 nm, presença de marcadores proteicos específicos de EVs, ausência de marcador de EVs grande e, conforme esperado, contaminação com albumina. Com os resultados do primeiro lote de tratamento ficou claro que o tratamento com PBS não era um bom controle experimental e, os resultados do segundo lote mostraram que o tratamento com EVs do soro de animais obesos levou à preferência por oxidação de lipídeos e diminuição do gasto energético e do *heat*.

Parte III – O sequenciamento de miRNAs provenientes das EVs do soro de animais controle e obesos revelou que 67 miRNAs foram diferentemente expressos entre os dois grupos, sendo 16 deles já descritos na literatura. Estes foram analisados em função do enriquecimento de vias metabólicas KEGG e 10 vias foram identificadas, dentre elas as vias de interação do receptor de matriz extracelular, de sinalização da PI3K-Akt e de sinalização da FoxO. Os miRNAs let-7c-5p e miR-29c-3p, dentre todos os outros analisados, parecem regular o maior número de genes das vias enriquecidas que foram identificadas.

Parte IV – Realizou-se validação de seis miRNAs do soro de EVs. Os miRNAs miR-22-3p, miR-29c-3p, miR-122-5p, miR-192-5p e miR-802-5p foram validados e apresentaram expressão aumentada em EVs do soro de animais obesos. Análises da expressão dos miRNAs validados no fígado, músculo gastrocnêmio e gordura epididimal apontam para uma provável comunicação entre tecidos via miRNAs de EVs.

REFERÊNCIAS

AIKEN, C. E. et al. Decreased ovarian reserve, dysregulation of mitochondrial biogenesis, and increased lipid peroxidation in female mouse offspring exposed to an obesogenic maternal diet. **FASEB J**, v. 30, n. 4, p. 1548-1556, 2016.

AKERMAN, L. et al. Serum miRNA levels are related to glucose homeostasis and islet autoantibodies in children with high risk for type 1 diabetes. **PLoS One**, v. 13, n. 1, p. e0191067, 2018.

ANAND, S. et al. Ticket to a bubble ride: Cargo sorting into exosomes and extracellular vesicles. **Biochim Biophys Acta Proteins Proteom**, v. 1867, n. 12, p. 140203, 2019.

BARRETT, P.; MERCER, J. G.; MORGAN, P. J. Preclinical models for obesity research. **Dis Model Mech**, v. 9, n. 11, p. 1245-1255, 2016.

BARTEL, D. P. Metazoan MicroRNAs. **Cell**, v. 173, n. 1, p. 20-51, 2018.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)**, v. 57, n. 1, p. 289-300, 1995.

BIRCH, G. G.; MWANGELWA, O. M. Colorimetric determination of sugars in sweetened condensed milk products. **J Sci Food Agric**, v. 25, n. 11, p. 1355-1362, 1974.

BLUHER, M. Adipose tissue dysfunction in obesity. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 117, n. 6, p. 241-250, 2009.

BLUHER, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nat Rev Endocrinol**, v. 15, n. 5, p. 288-298, 2019.

BODUR, A. et al. Effect of a high sucrose and high fat diet in BDNF (+/-) mice on oxidative stress markers in adipose tissues. **Arch Biochem Biophys**, v. 665, p. 46-56, 2019.

BONORA, E. et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 68, n. 2, p. 374-378, 1989.

BORGES, F. T.; REIS, L. A.; SCHOR, N. Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. **Braz J Med Biol Res**, v. 46, n. 10, p. 824-830, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRENNAN, K. et al. A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. **Sci Rep**, v. 10, n. 1, p. 1039, 2020.

BRENNECKE, J. et al. Principles of microRNA-target recognition. **PLoS Biol**, v. 3, n. 3, p. e85, 2005.

BURCHFIELD, J. G. et al. High dietary fat and sucrose results in an extensive and time-dependent deterioration in health of multiple physiological systems in mice. **J Biol Chem**, v. 293, n. 15, p. 5731-5745, 2018.

CARNINO, J. M.; LEE, H.; JIN, Y. Isolation and characterization of extracellular vesicles from Broncho-alveolar lavage fluid: a review and comparison of different methods. **Respir Res**, v. 20, n. 1, p. 240, 2019.

CASTANO, C. et al. Obesity-associated exosomal miRNAs modulate glucose and lipid metabolism in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 115, n. 48, p. 12158-12163, 2018.

CHA, D. J. et al. KRAS-dependent sorting of miRNA to exosomes. **Elife**, v. 4, p. e07197, 2015.

CHEN, X. et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. **Cell Res**, v. 18, n. 10, p. 997-1006, 2008.

CHEN, X. et al. Horizontal transfer of microRNAs: molecular mechanisms and clinical applications. **Protein Cell**, v. 3, n. 1, p. 28-37, 2012.

CIOFFI, M. et al. MiR-93 Controls Adiposity via Inhibition of Sirt7 and Tbx3. **Cell Rep**, v. 12, n. 10, p. 1594-1605, 2015.

CORRIGAN, A. P.; RIDER, C. C. Multiple chromatographic forms of ATP citrate lyase from rat liver. **Biochem J**, v. 214, n. 2, p. 299-307, 1983.

CUI, X. et al. Change in circulating microRNA profile of obese children indicates future risk of adult diabetes. **Metabolism**, v. 78, p. 95-105, 2018.

CULLEN, B. R. Transcription and processing of human microRNA precursors. **Mol Cell**, v. 16, n. 6, p. 861-865, 2004.

DAHLMANS, D. et al. Evaluation of Muscle microRNA Expression in Relation to Human Peripheral Insulin Sensitivity: A Cross-Sectional Study in Metabolically Distinct Subject Groups. **Front Physiol**, v. 8, p. 711, 2017.

DE MENDONÇA, M. et al. Adiponectin is required for pioglitazone-induced improvements in hepatic steatosis in mice fed a high-fat diet. **Mol Cell Endocrinol**, v. 493, p. 110480, 2019.

DE MENDONÇA, M. et al. Aerobic exercise training regulates serum extracellular vesicle miRNAs linked to obesity to promote their beneficial effects in mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 319, n. 3, p. E579-E591, 2020.

DE MOURA, E. D. M. et al. Diet-induced obesity in animal models: points to consider and influence on metabolic markers. **Diabetol Metab Syndr**, v. 13, n. 1, p. 32, 2021.

DEATHERAGE, B. L.; COOKSON, B. T. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. **Infect Immun**, v. 80, n. 6, p. 1948-1957, 2012.

DENG, Z. B. et al. Adipose tissue exosome-like vesicles mediate activation of macrophage-induced insulin resistance. **Diabetes**, v. 58, n. 11, p. 2498-2505, 2009.

DINIZ, G. P. et al. Loss of microRNA-22 prevents high-fat diet induced dyslipidemia and increases energy expenditure without affecting cardiac hypertrophy. **Clin Sci (Lond)**, v. 131, n. 24, p. 2885-2900, 2017.

DOBBS, R. et al. **Overcoming obesity: An initial economic analysis**. 2014

DOS SANTOS, B. et al. Effects of a diet enriched with polyunsaturated, saturated, or trans fatty acids on cytokine content in the liver, white adipose tissue, and skeletal muscle of adult mice. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 594958, 2013.

DUMORTIER, O.; HINAULT, C.; VAN OBBERGHEN, E. MicroRNAs and metabolism crosstalk in energy homeostasis. **Cell Metab**, v. 18, n. 3, p. 312-324, 2013.

EL-HEFNAWY, T. et al. Characterization of amplifiable, circulating RNA in plasma and its potential as a tool for cancer diagnostics. **Clin Chem**, v. 50, n. 3, p. 564-573, 2004.

ESTEVEES, J. V. et al. Diabetes Modulates MicroRNAs 29b-3p, 29c-3p, 199a-5p and 532-3p Expression in Muscle: Possible Role in GLUT4 and HK2 Repression. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 9, p. 536, 2018.

FERRANTE, S. C. et al. Adipocyte-derived exosomal miRNAs: a novel mechanism for obesity-related disease. **Pediatr Res**, v. 77, n. 3, p. 447-454, 2015.

FILIPOWICZ, W.; BHATTACHARYYA, S. N.; SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? **Nat Rev Genet**, v. 9, n. 2, p. 102-114, 2008.

FISHER-WELLMAN, K. H. et al. A Direct Comparison of Metabolic Responses to High-Fat Diet in C57BL/6J and C57BL/6NJ Mice. **Diabetes**, v. 65, n. 11, p. 3249-3261, 2016.

FONTAINE, K. R. et al. Years of life lost due to obesity. **JAMA**, v. 289, n. 2, p. 187-193, 2003.

FRIAS FDE, T. et al. MyomiRs as Markers of Insulin Resistance and Decreased Myogenesis in Skeletal Muscle of Diet-Induced Obese Mice. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 7, p. 76, 2016.

FRIAS, F. T. et al. Fenofibrate reverses changes induced by high-fat diet on metabolism in mice muscle and visceral adipocytes. **J Cell Physiol**, v. 233, n. 4, p. 3515-3528, 2018.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972.

GAO, J. et al. Adipocyte-derived extracellular vesicles modulate appetite and weight through mTOR signalling in the hypothalamus. **Acta Physiol (Oxf)**, p. e13339, 2019.

GEMOLL, T. et al. Protein Profiling of Serum Extracellular Vesicles Reveals Qualitative and Quantitative Differences After Differential Ultracentrifugation and ExoQuick(TM) Isolation. **J Clin Med**, v. 9, n. 5, 2020.

GOULD, S. J.; RAPOSO, G. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. **J Extracell Vesicles**, v. 2, 2013.

GUAY, C.; REGAZZI, R. Exosomes as new players in metabolic organ cross-talk. **Diabetes Obes Metab**, v. 19 Suppl 1, p. 137-146, 2017.

GUDURIC-FUCHS, J. et al. Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types. **BMC Genomics**, v. 13, p. 357, 2012.

HELWA, I. et al. A Comparative Study of Serum Exosome Isolation Using Differential Ultracentrifugation and Three Commercial Reagents. **PLoS One**, v. 12, n. 1, p. e0170628, 2017.

HENEGAR, C. et al. Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. **Genome Biol**, v. 9, n. 1, p. R14, 2008.

HIGA, T. S. et al. Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. **Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol**, v. 6, n. 1, p. 47-54, 2014.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87-91, 1993.

HSIEH, C. H. et al. Weight-reduction through a low-fat diet causes differential expression of circulating microRNAs in obese C57BL/6 mice. **BMC Genomics**, v. 16, p. 699, 2015.

HU, Y. et al. miR-22 inhibition reduces hepatic steatosis via FGF21 and FGFR1 induction. **JHEP Rep**, v. 2, n. 2, p. 100093, 2020.

HUANG-DORAN, I.; ZHANG, C. Y.; VIDAL-PUIG, A. Extracellular Vesicles: Novel Mediators of Cell Communication In Metabolic Disease. **Trends Endocrinol Metab**, v. 28, n. 1, p. 3-18, 2017.

HUANG, X. et al. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. **Int J Biol Sci**, v. 14, n. 11, p. 1483-1496, 2018.

HUCK, O. et al. Identification and Characterization of MicroRNA Differentially Expressed in Macrophages Exposed to Porphyromonas gingivalis Infection. **Infect Immun**, v. 85, n. 3, 2017.

HUNTER, M. P. et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. **PLoS One**, v. 3, n. 11, p. e3694, 2008.

IACOMINO, G.; SIANI, A. Role of microRNAs in obesity and obesity-related diseases. **Genes Nutr**, v. 12, p. 23, 2017.

ISAKOVA, A. et al. A mouse tissue atlas of small noncoding RNA. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 117, n. 41, p. 25634-25645, 2020.

ISHIMOTO, T. et al. High-fat and high-sucrose (western) diet induces steatohepatitis that is dependent on fructokinase. **Hepatology**, v. 58, n. 5, p. 1632-1643, 2013.

JADLI, A. S. et al. Inside(sight) of tiny communicator: exosome biogenesis, secretion, and uptake. **Mol Cell Biochem**, v. 467, n. 1-2, p. 77-94, 2020.

JAEGGER, A. et al. Circulating microRNAs -192 and -194 are associated with the presence and incidence of diabetes mellitus. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 14274, 2018.

JONES, A. et al. miRNA Signatures of Insulin Resistance in Obesity. **Obesity (Silver Spring)**, v. 25, n. 10, p. 1734-1744, 2017.

JUNG, Y. J. et al. Cell reprogramming using extracellular vesicles from differentiating stem cells into white/beige adipocytes. **Sci Adv**, v. 6, n. 13, p. eaay6721, 2020.

KANEHISA, M. Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. **Protein Sci**, v. 28, n. 11, p. 1947-1951, 2019.

KANEHISA, M. et al. KEGG: integrating viruses and cellular organisms. **Nucleic Acids Res**, v. 49, n. D1, p. D545-D551, 2021.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Res**, v. 28, n. 1, p. 27-30, 2000.

KAUR, K. et al. Elevated Hepatic miR-22-3p Expression Impairs Gluconeogenesis by Silencing the Wnt-Responsive Transcription Factor Tcf7. **Diabetes**, v. 64, n. 11, p. 3659-3669, 2015.

KENNEDY, T. L.; RUSSELL, A. J.; RILEY, P. Experimental limitations of extracellular vesicle-based therapies for the treatment of myocardial infarction. **Trends Cardiovasc Med**, 2020.

KIM, E. et al. Meta-review of protein network regulating obesity between validated obesity candidate genes in the white adipose tissue of high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 54, n. 7, p. 910-923, 2014.

KIM, H. et al. Effect of diabetes on exosomal miRNA profile in patients with obesity. **BMJ Open Diabetes Res Care**, v. 8, n. 1, 2020.

KIRSCHNER, M. B. et al. The Impact of Hemolysis on Cell-Free microRNA Biomarkers. **Front Genet**, v. 4, p. 94, 2013.

KONOSHENKO, M. Y. et al. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. **Biomed Res Int**, v. 2018, p. 8545347, 2018.

KOPPERS-LALIC, D. et al. Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. **Cell Rep**, v. 8, n. 6, p. 1649-1658, 2014.

LACKEY, D. E.; OLEFSKY, J. M. Regulation of metabolism by the innate immune system. **Nat Rev Endocrinol**, v. 12, n. 1, p. 15-28, 2016.

LANG, P. et al. Effects of different diets used in diet-induced obesity models on insulin resistance and vascular dysfunction in C57BL/6 mice. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 19556, 2019.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843-854, 1993.

LEE, S.; DONG, H. H. FoxO integration of insulin signaling with glucose and lipid metabolism. **J Endocrinol**, v. 233, n. 2, p. R67-R79, 2017.

LEE, Y. et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature**, v. 425, n. 6956, p. 415-419, 2003.

LEE, Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **EMBO J**, v. 23, n. 20, p. 4051-4060, 2004.

LEI, L. M. et al. Exosomes and Obesity-Related Insulin Resistance. **Front Cell Dev Biol**, v. 9, p. 651996, 2021.

LEWIS, B. P.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. **Cell**, v. 120, n. 1, p. 15-20, 2005.

LI, Y.; ALTEMUS, J.; LIGHTNER, A. L. Mesenchymal stem cells and acellular products attenuate murine induced colitis. **Stem Cell Res Ther**, v. 11, n. 1, p. 515, 2020.

LIANG, W. et al. Establishment of a general NAFLD scoring system for rodent models and comparison to human liver pathology. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e115922, 2014.

LIAO, C. H. et al. MiR-122 marks the differences between subcutaneous and visceral adipose tissues and associates with the outcome of bariatric surgery. **Obes Res Clin Pract**, v. 12, n. 6, p. 570-577, 2018.

LIN, H. et al. Circulating miRNA Signatures Associated with Insulin Resistance in Adolescents with Obesity. **Diabetes Metab Syndr Obes**, v. 13, p. 4929-4939, 2020.

LIU, X. L. et al. Lipotoxic Hepatocyte-Derived Exosomal MicroRNA 192-5p Activates Macrophages Through Rictor/Akt/Forkhead Box Transcription Factor O1 Signaling in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Hepatology**, v. 72, n. 2, p. 454-469, 2020.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LUDWIG, N. et al. Distribution of miRNA expression across human tissues. **Nucleic Acids Res**, v. 44, n. 8, p. 3865-3877, 2016.

LUMENG, C. N.; SALTIEL, A. R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. **J Clin Invest**, v. 121, n. 6, p. 2111-2117, 2011.

LUND, E. et al. Nuclear export of microRNA precursors. **Science**, v. 303, n. 5654, p. 95-98, 2004.

MAO, F. et al. Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Relieve Inflammatory Bowel Disease in Mice. **Biomed Res Int**, v. 2017, p. 5356760, 2017.

MARGOLIS, L.; SADOVSKY, Y. The biology of extracellular vesicles: The known unknowns. **PLoS Biol**, v. 17, n. 7, p. e3000363, 2019.

MASI, L. N. 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**, v. 7, n. 1, p. 3937, 2017.

MASOTTI, A. et al. Oral glucose tolerance test unravels circulating miRNAs associated with insulin resistance in obese preschoolers. **Pediatr Obes**, v. 12, n. 3, p. 229-238, 2017.

MASSIERA, F. et al. A Western-like fat diet is sufficient to induce a gradual enhancement in fat mass over generations. **J Lipid Res**, v. 51, n. 8, p. 2352-2361, 2010.

- MCARDLE, M. A. et al. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 4, p. 52, 2013.
- MELDOLESI, J. Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication. **Curr Biol**, v. 28, n. 8, p. R435-R444, 2018.
- MITCHELL, P. S. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 30, p. 10513-10518, 2008.
- MOBIUS, W. et al. Immunoelectron microscopic localization of cholesterol using biotinylated and non-cytolytic perfringolysin O. **J Histochem Cytochem**, v. 50, n. 1, p. 43-55, 2002.
- MOBIUS, W. et al. Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. **Traffic**, v. 4, n. 4, p. 222-231, 2003.
- MORI, M. A. et al. Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease. **Cell Metab**, v. 30, n. 4, p. 656-673, 2019.
- MOSCHEN, A. R.; WIESER, V.; TILG, H. Adiponectin: key player in the adipose tissue-liver crosstalk. **Curr Med Chem**, v. 19, n. 32, p. 5467-5473, 2012.
- MULCAHY, L. A.; PINK, R. C.; CARTER, D. R. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. **J Extracell Vesicles**, v. 3, 2014.
- NEWSHOLME, E. A.; WILLIAMS, T. The role of phosphoenolpyruvate carboxykinase in amino acid metabolism in muscle. **Biochem J**, v. 176, n. 2, p. 623-626, 1978.
- NI, Y. et al. Therapeutic inhibition of miR-802 protects against obesity through AMPK-mediated regulation of hepatic lipid metabolism. **Theranostics**, v. 11, n. 3, p. 1079-1099, 2021.
- OKAMATSU-OGURA, Y. et al. Association of circulating exosomal miR-122 levels with BAT activity in healthy humans. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 13243, 2019.
- OLIVIERI, F. et al. MiR-21-5p and miR-126a-3p levels in plasma and circulating angiogenic cells: relationship with type 2 diabetes complications. **Oncotarget**, v. 6, n. 34, p. 35372-35382, 2015.

OMS, O. M. D. S.-. Obesity and overweight. 2021. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> >.

ORTEGA, F. J. et al. Targeting the circulating microRNA signature of obesity. **Clin Chem**, v. 59, n. 5, p. 781-792, 2013.

PANCHAL, S. K.; BROWN, L. Rodent models for metabolic syndrome research. **J Biomed Biotechnol**, v. 2011, p. 351982, 2011.

PARASKEVOPOULOU, M. D. et al. DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. **Nucleic Acids Res**, v. 41, n. Web Server issue, p. W169-173, 2013.

PARLEE, S. D. et al. Quantifying size and number of adipocytes in adipose tissue. **Methods Enzymol**, v. 537, p. 93-122, 2014.

PENNINGTON, K. A. et al. Brief high fat high sugar diet results in altered energy and fat metabolism during pregnancy in mice. **Sci Rep**, v. 10, n. 1, p. 20866, 2020.

PESCADOR, N. et al. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential type 2 diabetes and obesity biomarkers. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77251, 2013.

PRATS-PUIG, A. et al. Changes in circulating microRNAs are associated with childhood obesity. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 98, n. 10, p. E1655-1660, 2013.

RAPOSO, G.; STORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **J Cell Biol**, v. 200, n. 4, p. 373-383, 2013.

RECZKO, M. et al. Functional microRNA targets in protein coding sequences. **Bioinformatics**, v. 28, n. 6, p. 771-776, 2012.

REEVES, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. **J Nutr**, v. 127, n. 5 Suppl, p. 838S-841S, 1997.

RENHE, Í. R. T. et al. Characterization of physicochemical composition, microbiology, sensory evaluation and microscopical attributes of sweetened condensed milk. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 2, p. 293-298, 2018.

ROBINSON, D. G.; DING, Y.; JIANG, L. Unconventional protein secretion in plants: a critical assessment. **Protoplasma**, v. 253, n. 1, p. 31-43, 2016.

RODRIGUEZ, A. et al. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. **Genome Res**, v. 14, n. 10A, p. 1902-1910, 2004.

RUIFROK, A. C.; JOHNSTON, D. A. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. **Anal Quant Cytol Histol**, v. 23, n. 4, p. 291-299, 2001.

RUIZ-OJEDA, F. J. et al. Extracellular Matrix Remodeling of Adipose Tissue in Obesity and Metabolic Diseases. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 19, 2019.

SAMPEY, B. P. et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity (Silver Spring)**, v. 19, n. 6, p. 1109-1117, 2011.

SAMUELSSON, A.-M. et al. Diet-Induced Obesity in Female Mice Leads to Offspring Hyperphagia, Adiposity, Hypertension, and Insulin Resistance. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 383-392, 2008.

SASSEN, S.; MISKA, E. A.; CALDAS, C. MicroRNA: implications for cancer. **Virchows Arch**, v. 452, n. 1, p. 1-10, 2008.

SATO, A. et al. Antiobesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity: importance of hepatic lipogenesis. **Diabetes**, v. 59, n. 10, p. 2495-2504, 2010.

SCHULTZE, S. M. et al. PI3K/AKT, MAPK and AMPK signalling: protein kinases in glucose homeostasis. **Expert Rev Mol Med**, v. 14, p. e1, 2012.

SERRANO-PERTIERRA, E. et al. Characterization of Plasma-Derived Extracellular Vesicles Isolated by Different Methods: A Comparison Study. **Bioengineering (Basel)**, v. 6, n. 1, 2019.

SHANNON, P. et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Res**, v. 13, n. 11, p. 2498-2504, 2003.

SHURTLEFF, M. J. et al. Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. **Elife**, v. 5, p. e19276, 2016.

SINGH, S. K. et al. MicroRNAs--micro in size but macro in function. **FEBS J**, v. 275, n. 20, p. 4929-4944, 2008.

SISCO, K. L. Is RNA in serum bound to nucleoprotein complexes? **Clin Chem**, v. 47, n. 9, p. 1744-1745, 2001.

SOHEL, M. H. Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges. **Achievements in the Life Sciences**, v. 10, n. 2, p. 11, 2016.

SONG, H. et al. MiR-29 family members interact with SPARC to regulate glucose metabolism. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 497, n. 2, p. 667-674, 2018.

SPIEGELMAN, B. M.; FLIER, J. S. Obesity and the regulation of energy balance. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 531-543, 2001.

STEPANIAN, A. et al. Microparticle increase in severe obesity: not related to metabolic syndrome and unchanged after massive weight loss. **Obesity (Silver Spring)**, v. 21, n. 11, p. 2236-2243, 2013.

STRIEDER-BARBOZA, C. et al. Depot-specific adipocyte-extracellular matrix metabolic crosstalk in murine obesity. **Adipocyte**, v. 9, n. 1, p. 189-196, 2020.

SUMIYOSHI, M.; SAKANAKA, M.; KIMURA, Y. Chronic intake of high-fat and high-sucrose diets differentially affects glucose intolerance in mice. **J Nutr**, v. 136, n. 3, p. 582-587, 2006.

SUN, B. K.; TSAO, H. Small RNAs in development and disease. **J Am Acad Dermatol**, v. 59, n. 5, p. 725-737; quiz 738-740, 2008.

SUN, L. et al. Safety evaluation of exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stromal cell. **Cytotherapy**, v. 18, n. 3, p. 413-422, 2016.

SUN, Y. et al. Human Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes Alleviate Type 2 Diabetes Mellitus by Reversing Peripheral Insulin Resistance and Relieving beta-Cell Destruction. **ACS Nano**, v. 12, n. 8, p. 7613-7628, 2018.

SZATANEK, R. et al. The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 6, 2017.

TAN, Y. et al. A pilot study of serum microRNAs panel as potential biomarkers for diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e105192, 2014.

THERY, C. 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**, v. 7, n. 1, p. 1535750, 2018.

THIBONNIER, M. et al. Metabolic and energetic benefits of microRNA-22 inhibition. **BMJ Open Diabetes Res Care**, v. 8, n. 1, 2020.

THOMOU, T. et al. Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. **Nature**, v. 542, n. 7642, p. 450-455, 2017.

TRIPISCIANO, C. et al. Different Potential of Extracellular Vesicles to Support Thrombin Generation: Contributions of Phosphatidylserine, Tissue Factor, and Cellular Origin. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 6522, 2017.

VALADI, H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nat Cell Biol**, v. 9, n. 6, p. 654-659, 2007.

VAN NIEL, G.; D'ANGELO, G.; RAPOSO, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 19, n. 4, p. 213-228, 2018.

VEERMAN, R. E. et al. Molecular evaluation of five different isolation methods for extracellular vesicles reveals different clinical applicability and subcellular origin. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 10, n. 9, p. e12128, 2021.

VIENBERG, S. et al. MicroRNAs in metabolism. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 219, n. 2, p. 346-361, 2017.

VILLARROYA-BELTRI, C. et al. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. **Nat Commun**, v. 4, p. 2980, 2013.

VLACHOS, I. S. et al. DIANA miRPath v.2.0: investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. Web Server issue, p. W498-504, 2012.

VLACHOS, I. S. et al. DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. **Nucleic Acids Res**, v. 43, n. W1, p. W460-466, 2015.

WANG, L. et al. MiR-22 as a metabolic silencer and liver tumor suppressor. **Liver Res**, v. 4, n. 2, p. 74-80, 2020.

WANG, R. et al. Elevated circulating microRNA-122 is associated with obesity and insulin resistance in young adults. **Eur J Endocrinol**, v. 172, n. 3, p. 291-300, 2015.

WANG, W.; SEALE, P. Control of brown and beige fat development. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 17, n. 11, p. 691-702, 2016.

WANG, Y. C. et al. Circulating miR-130b mediates metabolic crosstalk between fat and muscle in overweight/obesity. **Diabetologia**, v. 56, n. 10, p. 2275-2285, 2013.

WEBER, J. A. et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. **Clin Chem**, v. 56, n. 11, p. 1733-1741, 2010.

WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 855-862, 1993.

WIKLANDER, O. P. et al. Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. **J Extracell Vesicles**, v. 4, p. 26316, 2015.

WILLIAMS, A. S.; KANG, L.; WASSERMAN, D. H. The extracellular matrix and insulin resistance. **Trends Endocrinol Metab**, v. 26, n. 7, p. 357-366, 2015.

WITWER, K. W.; THERY, C. Extracellular vesicles or exosomes? On primacy, precision, and popularity influencing a choice of nomenclature. **J Extracell Vesicles**, v. 8, n. 1, p. 1648167, 2019.

WU, S. C. et al. Subpopulations of exosomes purified via different exosomal markers carry different microRNA contents. **Int J Med Sci**, v. 18, n. 4, p. 1058-1066, 2021.

XIE, H.; SUN, L.; LODISH, H. F. Targeting microRNAs in obesity. **Expert Opin Ther Targets**, v. 13, n. 10, p. 1227-1238, 2009.

YANG, L. et al. Bladder cancer cell-derived exosomes inhibit tumor cell apoptosis and induce cell proliferation in vitro. **Mol Med Rep**, v. 8, n. 4, p. 1272-1278, 2013.

YING, W. et al. MiR-690, an exosomal-derived miRNA from M2-polarized macrophages, improves insulin sensitivity in obese mice. **Cell Metab**, v. 33, n. 4, p. 781-790 e785, 2021.

YING, W. et al. Adipose Tissue Macrophage-Derived Exosomal miRNAs Can Modulate In Vivo and In Vitro Insulin Sensitivity. **Cell**, v. 171, n. 2, p. 372-384 e312, 2017.

ZEN, K.; ZHANG, C. Y. Circulating microRNAs: a novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers. **Med Res Rev**, v. 32, n. 2, p. 326-348, 2012.

ZHANG, F. et al. Obesity-induced overexpression of miR-802 impairs insulin transcription and secretion. **Nat Commun**, v. 11, n. 1, p. 1822, 2020.

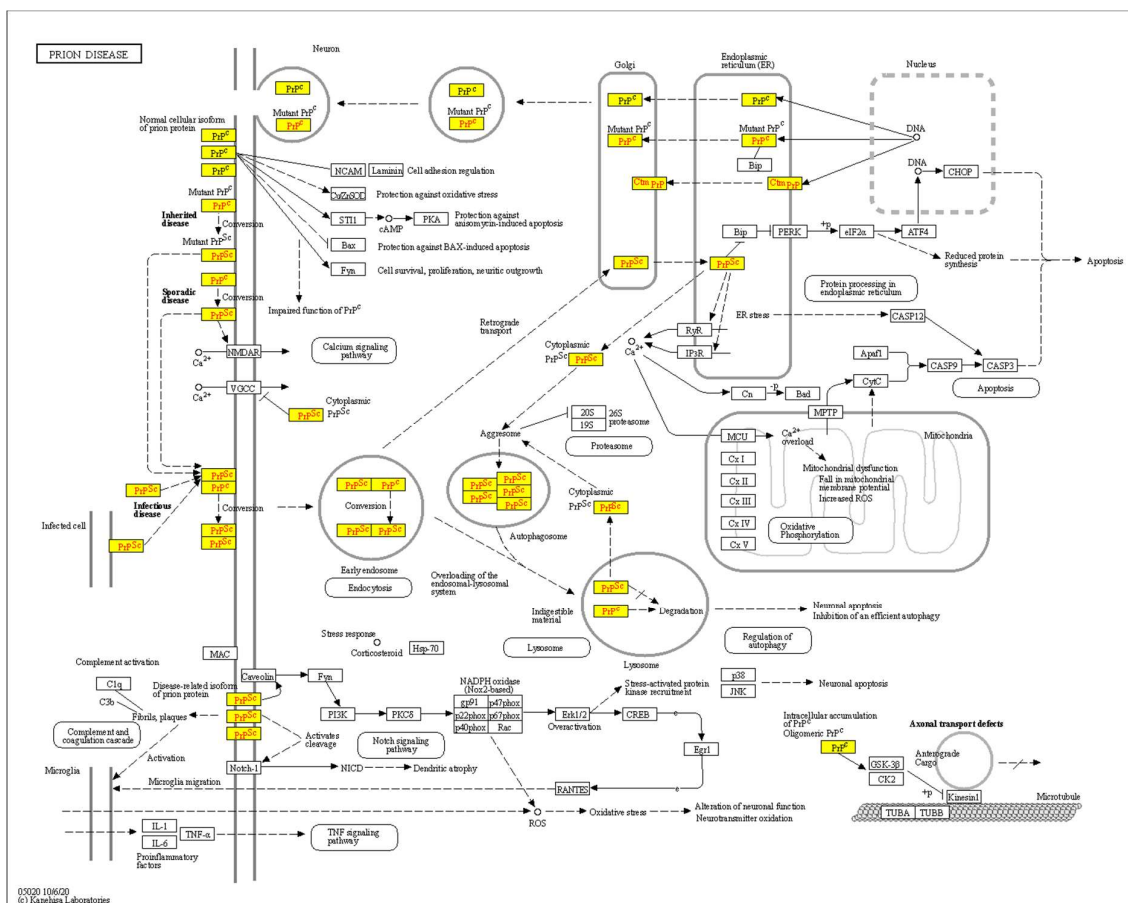
ZHANG, W.; DAHLBERG, J. E.; TAM, W. MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. **Am J Pathol**, v. 171, n. 3, p. 728-738, 2007.

ZHANG, Z.; LIU, H.; LIU, J. Akt activation: A potential strategy to ameliorate insulin resistance. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 156, p. 107092, 2019.

ZHAO, Y. et al. Liver governs adipose remodelling via extracellular vesicles in response to lipid overload. **Nat Commun**, v. 11, n. 1, p. 719, 2020.

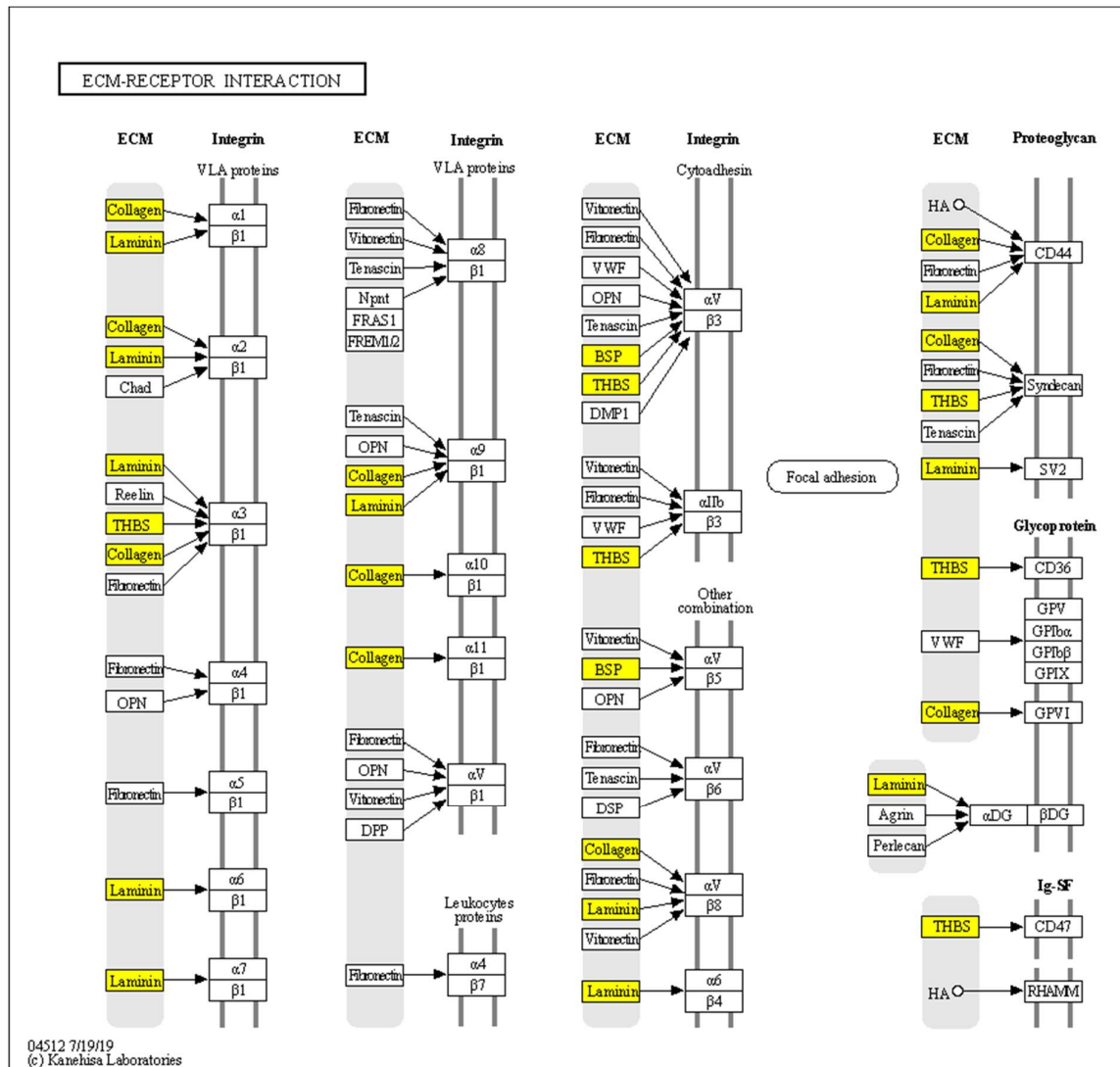
ZHOU, X. et al. Brown adipose tissue-derived exosomes mitigate the metabolic syndrome in high fat diet mice. **Theranostics**, v. 10, n. 18, p. 8197-8210, 2020.

APÊNDICE A – VIA KEGG: PRION DISEASE



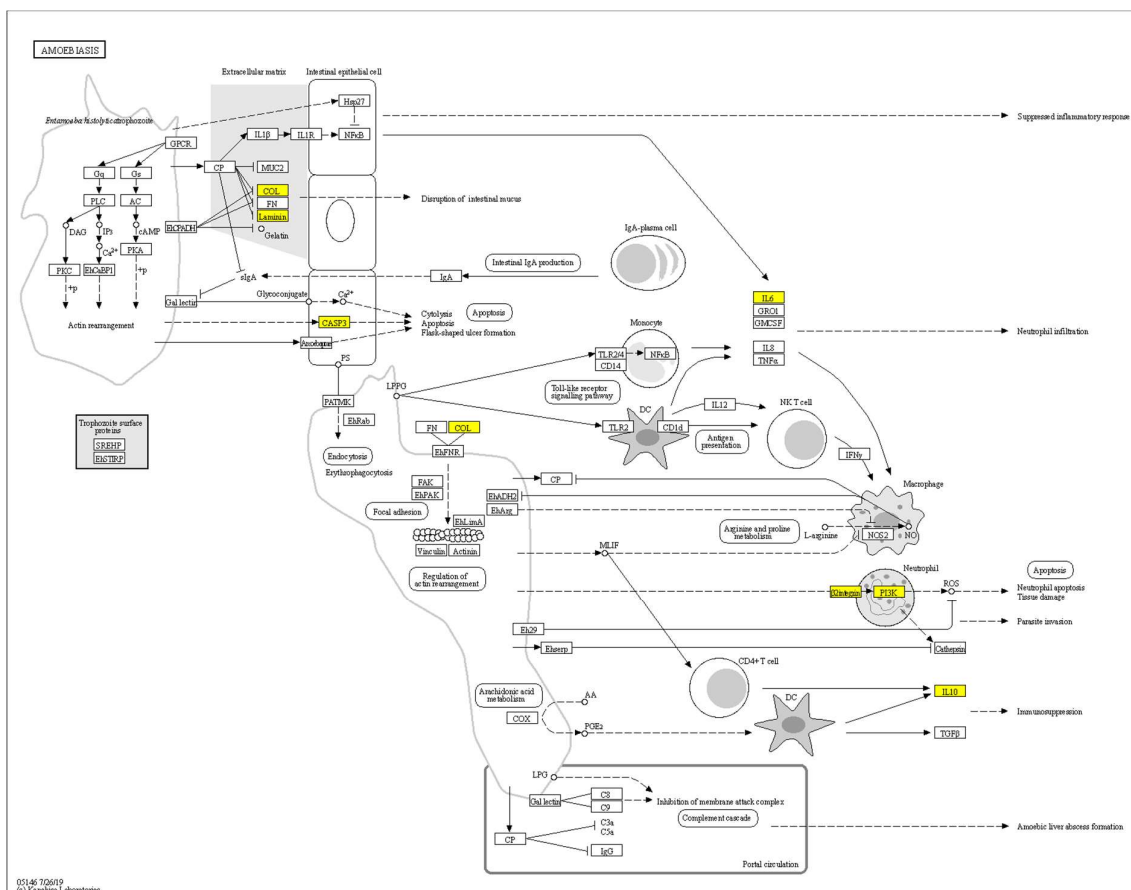
Via KEGG que foi significativamente regulada por um ou mais dos miRNAs diferentemente expressos. Os genes-alvo dos miRNAs estão destacados em amarelo. Gene-alvo: *Prnp*.

APÊNDICE B – VIA KEGG: ECM-RECEPTOR INTERACTION



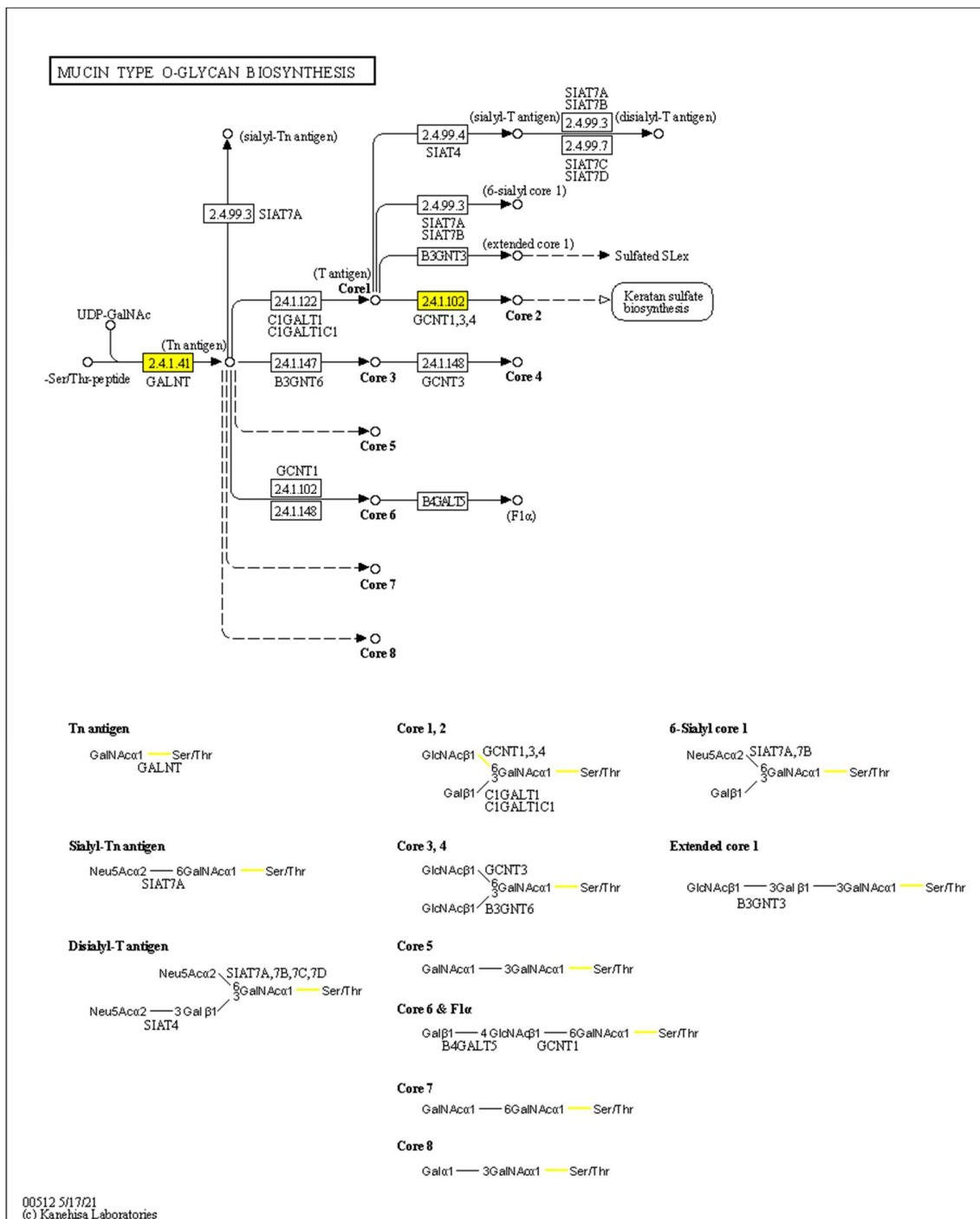
Via KEGG que foi significativamente regulada por um ou mais dos miRNAs diferentemente expressos. Os genes-alvo dos miRNAs estão destacados em amarelo. Genes-alvo: *Coll1a1*, *Coll1a1*, *Coll1a2*, *Col24a1*, *Col27a1*, *Col2a1*, *Col3a1*, *Col4a1*, *Col4a2*, *Col4a4*, *Col4a6*, *Col5a1*, *Col5a2*, *Col5a3*, *Col6a3*, *Ibsp*, *Lamc1* e *Thbs1*.

APÊNDICE C – VIA KEGG: AMOEBIASIS



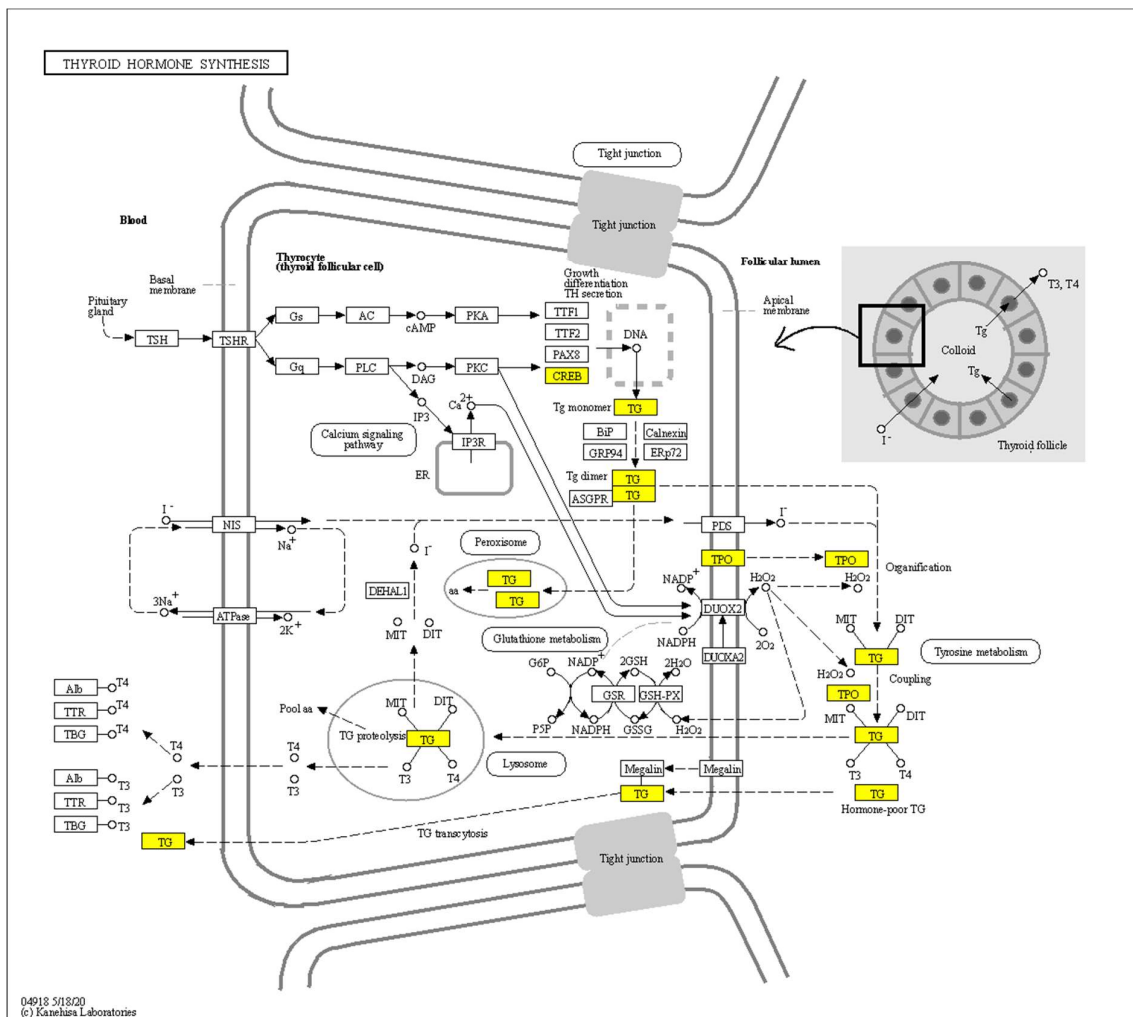
Via KEGG que foi significativamente regulada por um ou mais dos miRNAs diferentemente expressos. Os genes-alvo dos miRNAs estão destacados em amarelo. Genes-alvo: *Col3a1*, *Colla1*, *Col27a1*, *Casp3*, *Il10*, *Col5a2*, *Itgb2*, *Col24a1*, *Colla2*, *Il6*, *Col4a2*, *Pik3r1*, *Col2a1*, *Col4a4*, *Col4a6*, *Col5a3*, *Lamc1*, *Col4a1*, *Coll1a1* e *Col5a1*.

APÊNDICE D – VIA KEGG: MUCIN TYPE O-GLYCAN BIOSYNTHESIS



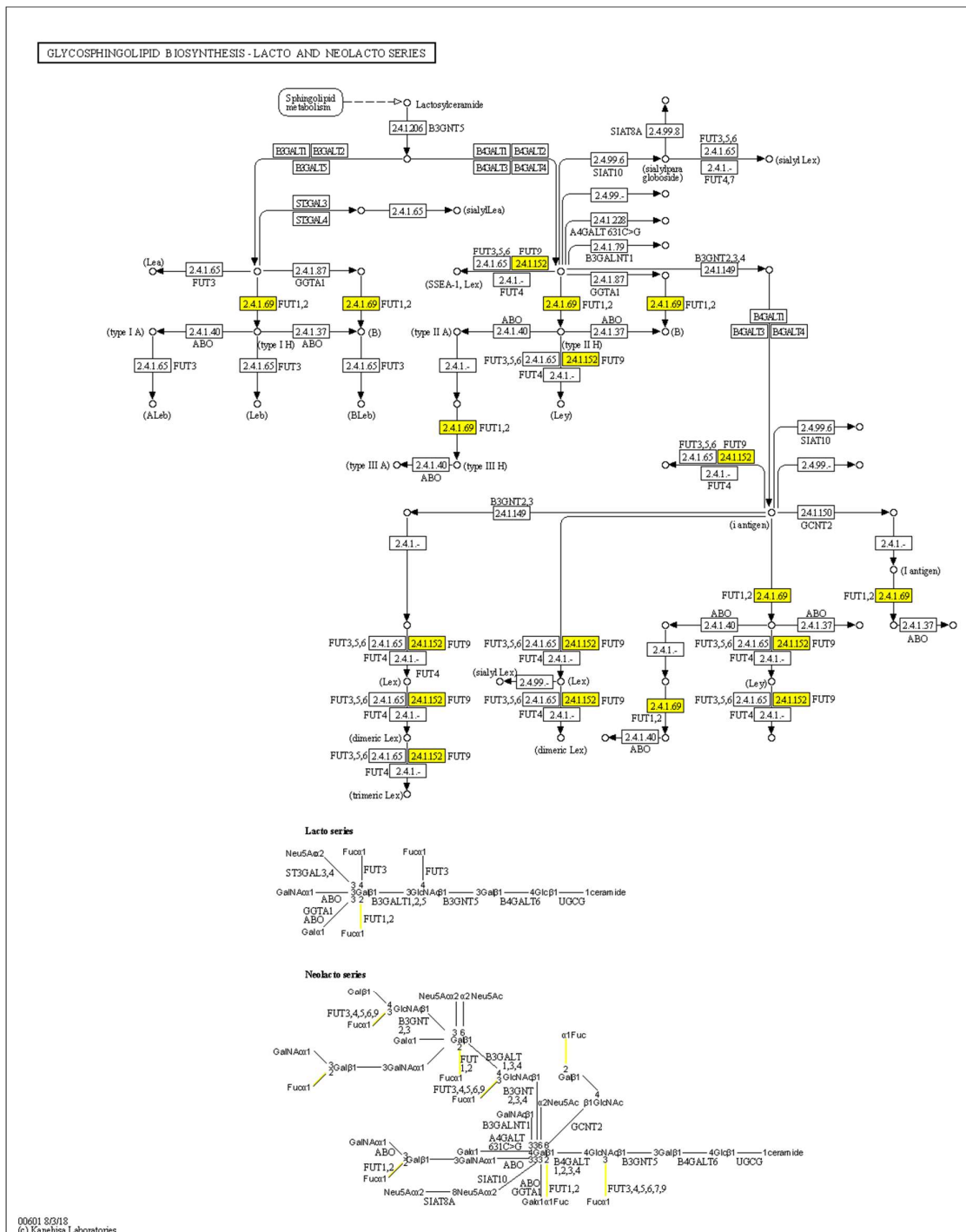
Via KEGG que foi significativamente regulada por um ou mais dos miRNAs diferentemente expressos. Os genes-alvo dos miRNAs estão destacados em amarelo. Genes-alvo: *Gcnt4*, *Galnt2*, *Gm20388*, *Galnt14*, *Galnt5* e *Galnt16*.

APÊNDICE E – VIA KEGG: *THYROID HORMONE SYNTHESIS*



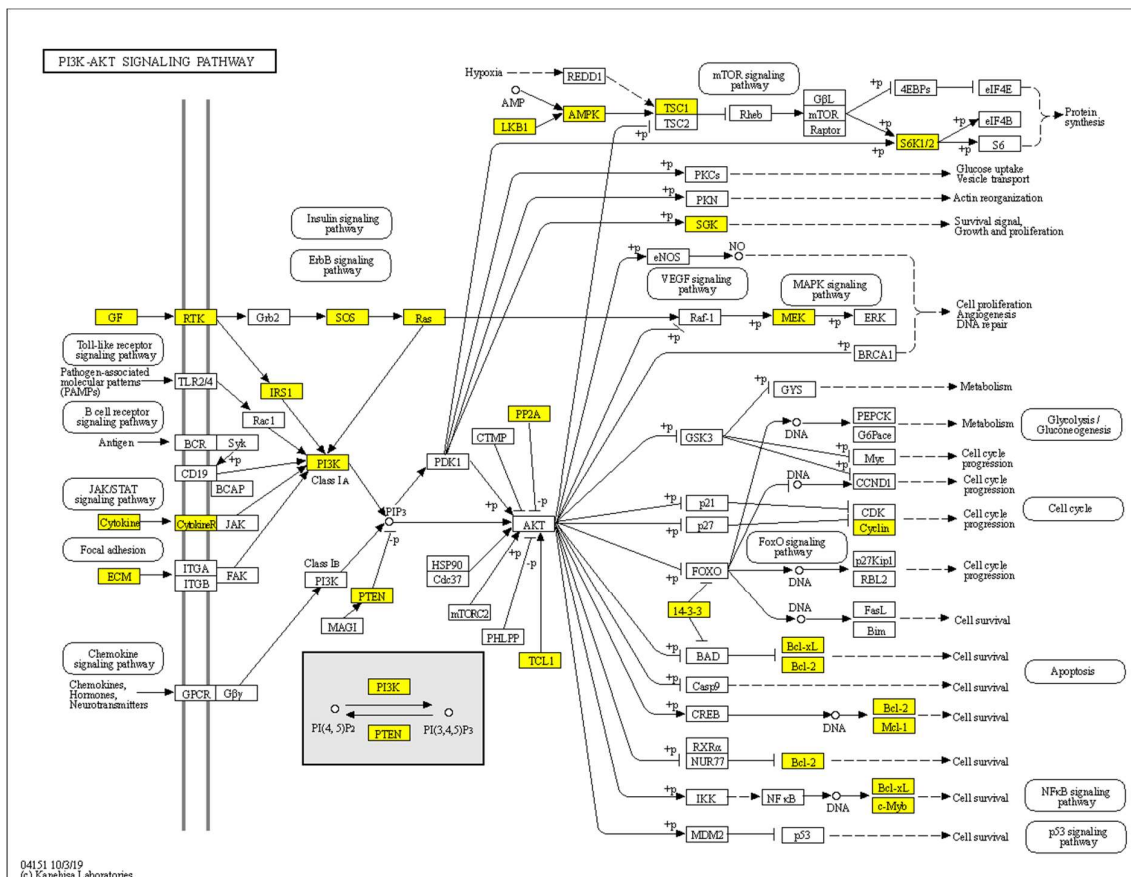
Via KEGG que foi significativamente regulada por um ou mais dos miRNAs diferentemente expressos. Os genes-alvo dos miRNAs estão destacados em amarelo. Genes-alvo: *Tpo*, *Tg*, e *Creb1*.

APÊNDICE F – VIA KEGG: *GLYCOSPHINGOLIPID BIOSYNTHESIS – LACTO AND NEOLACTO SERIES*



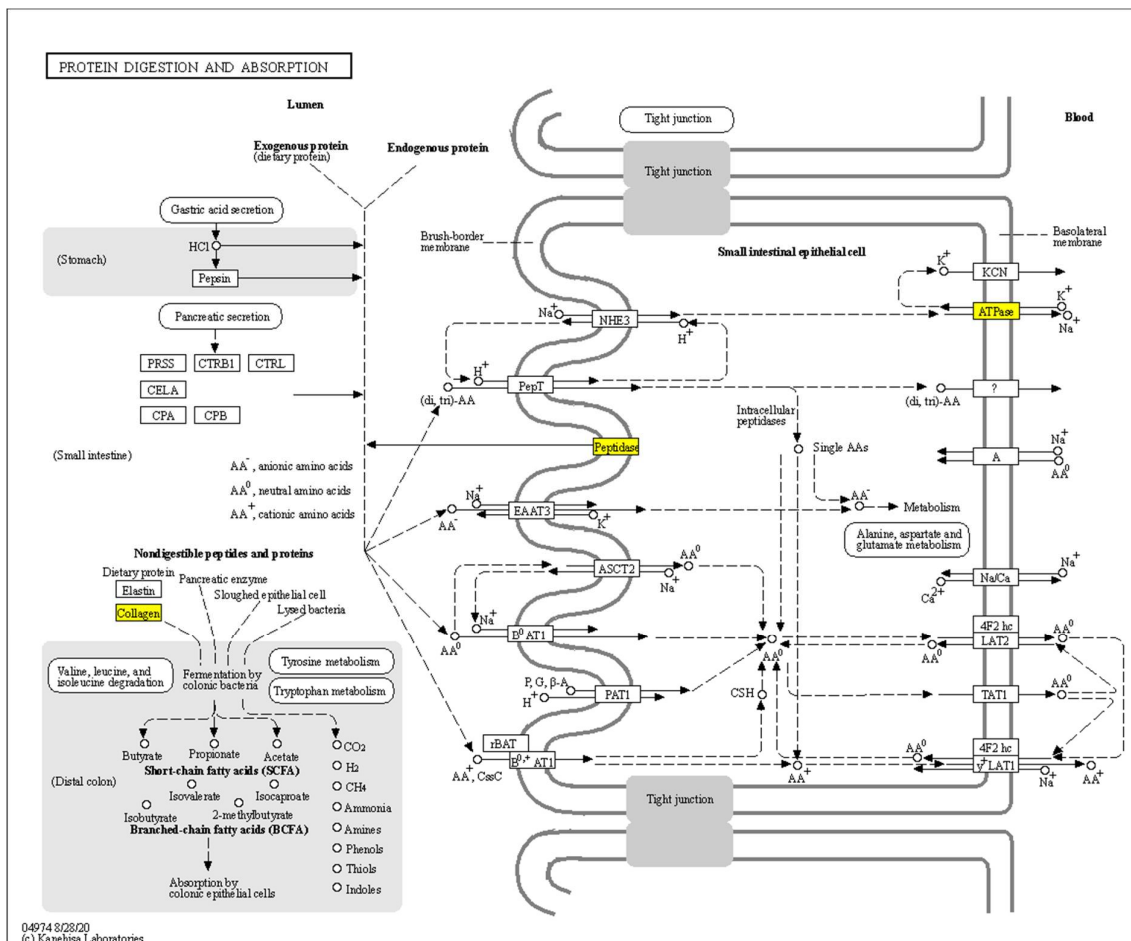
Via KEGG que foi significativamente regulada por um ou mais dos miRNAs diferentemente expressos. Os genes-alvo dos miRNAs estão destacados em amarelo. Genes-alvo: *Fut1* e *Fut9*.

APÊNDICE G – VIA KEGG: PI3K-AKT SIGNALING PATHWAY



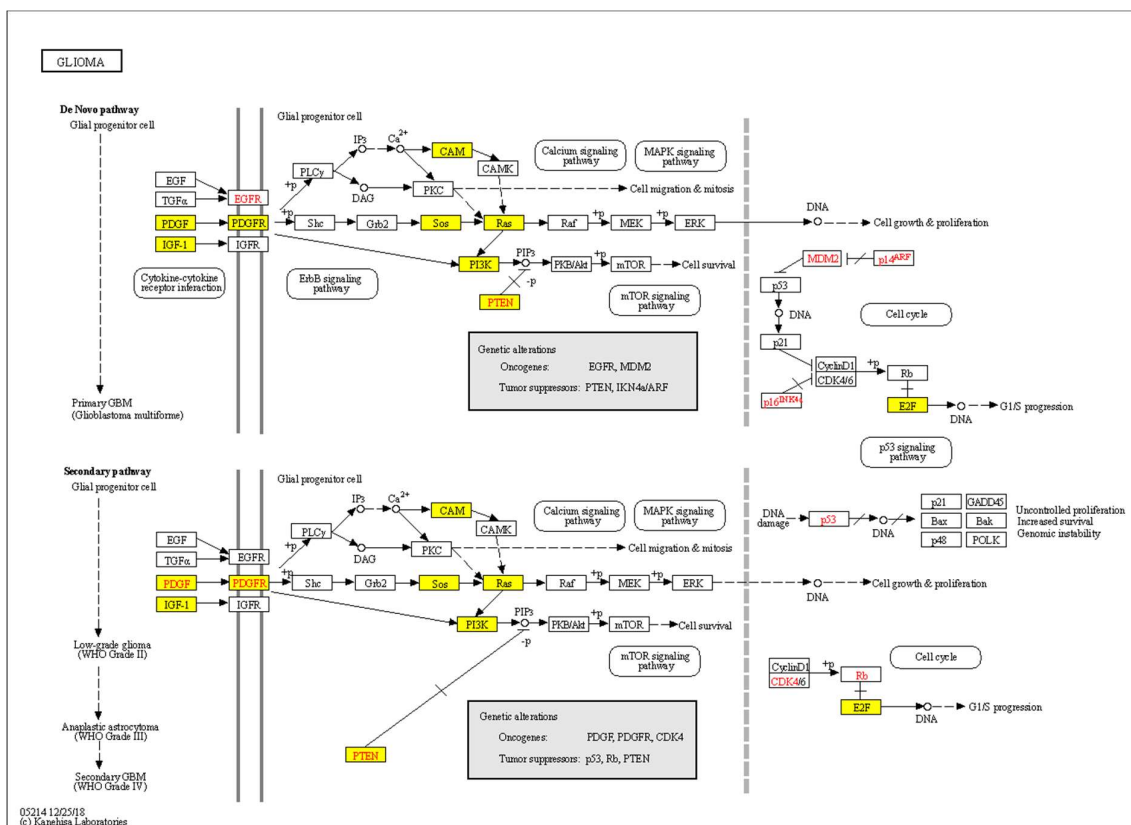
Via KEGG que foi significativamente regulada por um ou mais dos miRNAs diferentemente expressos. Os genes-alvo dos miRNAs estão destacados em amarelo. Genes-alvo: *Prkaa2*, *Tsc1*, *Bcl2l1*, *Col3a1*, *Thbs1*, *Insr*, *Ngf*, *Ccne2*, *Fgf11*, *Col1a1*, *Col27a1*, *Irs1*, *Prlr*, *Ghr*, *Nras*, *Col5a2*, *Osmr*, *Col24a1*, *Col1a2*, *Il6*, *Rps6kb2*, *Col4a2*, *Sos2*, *Pik3r1*, *Ppp2r1b*, *Ywhah*, *Kdr*, *Il7r*, *Map2k1*, *Fgf7*, *Igf1*, *Vegfa*, *Ccne1*, *Bcl2*, *Mtcp1*, *Ccnd2*, *Fgf9*, *Csfl*, *Sgk1*, *Myb*, *Stk11*, *Ibsp*, *Col2a1*, *Efna5*, *Pdgfrb*, *Col6a3*, *Col4a4*, *Col4a6*, *Col5a3*, *Pdgfb*, *Lamc1*, *Col4a1*, *Coll1a1*, *Mcl1*, *Pten*, *Col5a1* e *Pdgfa*.

APÊNDICE H – VIA KEGG: PROTEIN DIGESTION AND ABSORPTION



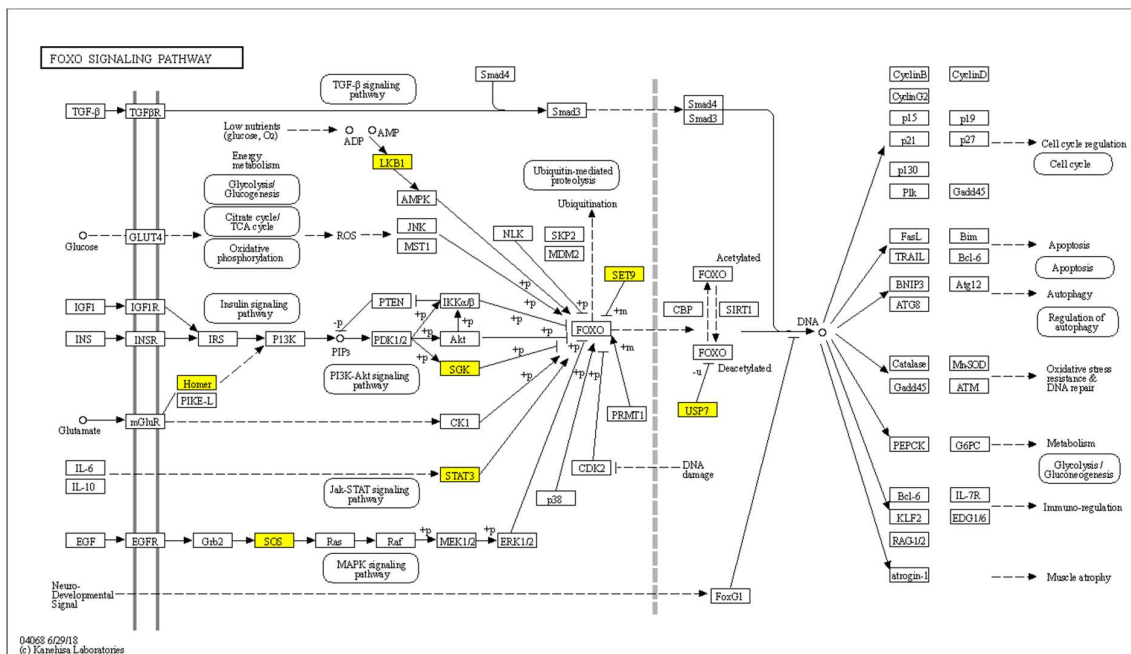
Via KEGG que foi significativamente regulada por um ou mais dos miRNAs diferentemente expressos. Os genes-alvo dos miRNAs estão destacados em amarelo. Genes-alvo: *Col3a1*, *Coll1a1*, *Col27a1*, *Col15a1*, *Col5a2*, *Col24a1*, *Colla2*, *Col4a2*, *Coll4a1*, *Dpp4*, *Col2a1*, *Col6a3*, *Col4a4*, *Col4a6*, *Col5a3*, *Col9a1*, *Col4a1*, *Coll1a1*, *Atp1b4* e *Col5a1*.

APÊNDICE I – VIA KEGG: GLIOMA



Via KEGG que foi significativamente regulada por um ou mais dos miRNAs diferentemente expressos. Os genes-alvo dos miRNAs estão destacados em amarelo. Genes-alvo: *Pik3r1*, *Calm3*, *Pdgrfb*, *Igf1*, *Nras*, *Pdgbf*, *Pten*, *Pdga*, *Sos2*, *E2f2*, *Sos1*, *Pik3cb* e *Calm2*.

APÊNDICE J – VIA KEGG: *FOXO SIGNALING PATHWAY*



Via KEGG que foi significativamente regulada por um ou mais dos miRNAs diferentemente expressos. Os genes-alvo dos miRNAs estão destacados em amarelo. Genes-alvo: *Stk11*, *Stat3*, *Usp7*, *Homer2*, *Sos1*, *Setd7* e *Sgk1*.

APÊNDICE K – DADOS UTILIZADOS PARA CONSTRUÇÃO DA REDE GÊNICA

(Continua)

Pathway	microRNA	Target Gene	Score microT-CDS
<i>Prion Diseases</i>	miR-146b-5p	<i>Prnp</i>	0.826
<i>Prion Diseases</i>	miR-301a-3p	<i>Prnp</i>	0.908
<i>ECM-receptor interaction</i>	let-7c-5p	<i>Col3a1</i>	1
<i>ECM-receptor interaction</i>	let-7c-5p	<i>Thbs1</i>	0.929
<i>ECM-receptor interaction</i>	let-7c-5p	<i>Col1a1</i>	0.859
<i>ECM-receptor interaction</i>	let-7c-5p	<i>Col27a1</i>	0.999
<i>ECM-receptor interaction</i>	let-7c-5p	<i>Col5a2</i>	0.953
<i>ECM-receptor interaction</i>	let-7c-5p	<i>Col24a1</i>	0.938
<i>ECM-receptor interaction</i>	let-7c-5p	<i>Col1a2</i>	1
<i>ECM-receptor interaction</i>	let-7c-5p	<i>Col4a2</i>	0.812
<i>ECM-receptor interaction</i>	miR-122-5p	<i>Lamc1</i>	0.836
<i>ECM-receptor interaction</i>	miR-15b-3p	<i>Col4a4</i>	0.914
<i>ECM-receptor interaction</i>	miR-29c-3p	<i>Ibsp</i>	0.887
<i>ECM-receptor interaction</i>	miR-29c-3p	<i>Col2a1</i>	1
<i>ECM-receptor interaction</i>	miR-29c-3p	<i>Col3a1</i>	0.998
<i>ECM-receptor interaction</i>	miR-29c-3p	<i>Col6a3</i>	1
<i>ECM-receptor interaction</i>	miR-29c-3p	<i>Col1a1</i>	0.983
<i>ECM-receptor interaction</i>	miR-29c-3p	<i>Col4a4</i>	0.969
<i>ECM-receptor interaction</i>	miR-29c-3p	<i>Col5a2</i>	0.998
<i>ECM-receptor interaction</i>	miR-29c-3p	<i>Col4a6</i>	0.996
<i>ECM-receptor interaction</i>	miR-29c-3p	<i>Col5a3</i>	1
<i>ECM-receptor interaction</i>	miR-29c-3p	<i>Col1a2</i>	0.923
<i>ECM-receptor interaction</i>	miR-29c-3p	<i>Lamc1</i>	0.966
<i>ECM-receptor interaction</i>	miR-29c-3p	<i>Col4a1</i>	0.999
<i>ECM-receptor interaction</i>	miR-29c-3p	<i>Col11a1</i>	0.993
<i>ECM-receptor interaction</i>	miR-29c-3p	<i>Col4a2</i>	0.819
<i>ECM-receptor interaction</i>	miR-29c-3p	<i>Col5a1</i>	0.992
<i>Amoebiasis</i>	let-7c-5p	<i>Col3a1</i>	1
<i>Amoebiasis</i>	let-7c-5p	<i>Col1a1</i>	0.859
<i>Amoebiasis</i>	let-7c-5p	<i>Col27a1</i>	0.999
<i>Amoebiasis</i>	let-7c-5p	<i>Casp3</i>	0.957
<i>Amoebiasis</i>	let-7c-5p	<i>Il10</i>	0.95
<i>Amoebiasis</i>	let-7c-5p	<i>Col5a2</i>	0.953
<i>Amoebiasis</i>	let-7c-5p	<i>Itgb2</i>	0.958
<i>Amoebiasis</i>	let-7c-5p	<i>Col24a1</i>	0.938
<i>Amoebiasis</i>	let-7c-5p	<i>Col1a2</i>	1
<i>Amoebiasis</i>	let-7c-5p	<i>Il6</i>	0.903
<i>Amoebiasis</i>	let-7c-5p	<i>Col4a2</i>	0.812
<i>Amoebiasis</i>	miR-29c-3p	<i>Pik3r1</i>	0.91
<i>Amoebiasis</i>	miR-29c-3p	<i>Col2a1</i>	1
<i>Amoebiasis</i>	miR-29c-3p	<i>Col3a1</i>	0.998
<i>Amoebiasis</i>	miR-29c-3p	<i>Col1a1</i>	0.983

(Continuação)

Pathway	microRNA	Target Gene	Score microT-CDS
<i>Amoebiasis</i>	miR-29c-3p	<i>Col4a4</i>	0.969
<i>Amoebiasis</i>	miR-29c-3p	<i>Col5a2</i>	0.998
<i>Amoebiasis</i>	miR-29c-3p	<i>Col4a6</i>	0.996
<i>Amoebiasis</i>	miR-29c-3p	<i>Col5a3</i>	1
<i>Amoebiasis</i>	miR-29c-3p	<i>Colla2</i>	0.923
<i>Amoebiasis</i>	miR-29c-3p	<i>Lamc1</i>	0.966
<i>Amoebiasis</i>	miR-29c-3p	<i>Col4a1</i>	0.999
<i>Amoebiasis</i>	miR-29c-3p	<i>Coll1a1</i>	0.993
<i>Amoebiasis</i>	miR-29c-3p	<i>Col4a2</i>	0.819
<i>Amoebiasis</i>	miR-29c-3p	<i>Col5a1</i>	0.992
<i>Mucin type O-Glycan biosynthesis</i>	let-7c-5p	<i>Gcnt4</i>	0.965
<i>Mucin type O-Glycan biosynthesis</i>	let-7c-5p	<i>Galnt2</i>	0.828
<i>Mucin type O-Glycan biosynthesis</i>	let-7c-5p	<i>Gm20388</i>	0.829
<i>Mucin type O-Glycan biosynthesis</i>	miR-122-5p	<i>Galntl6</i>	0.814
<i>Mucin type O-Glycan biosynthesis</i>	miR-125b-5p	<i>Galnt14</i>	0.997
<i>Mucin type O-Glycan biosynthesis</i>	miR-125b-5p	<i>Galnt5</i>	0.977
<i>Mucin type O-Glycan biosynthesis</i>	miR-22-3p	<i>Galnt16</i>	0.85
<i>Thyroid hormone synthesis</i>	miR-146b-5p	<i>Tpo</i>	0.963
<i>Thyroid hormone synthesis</i>	miR-146b-5p	<i>Tg</i>	0.899
<i>Thyroid hormone synthesis</i>	miR-22-3p	<i>Creb1</i>	0.858
<i>Thyroid hormone synthesis</i>	miR-22-3p	<i>Tg</i>	0.927
<i>Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series</i>	miR-125b-5p	<i>Fut1</i>	0.931
<i>Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series</i>	miR-22-3p	<i>Fut9</i>	0.918
<i>Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series</i>	miR-301a-3p	<i>Fut9</i>	0.871
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	let-7c-5p	<i>Prkaa2</i>	0.958
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	let-7c-5p	<i>Tsc1</i>	0.866
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	let-7c-5p	<i>Bcl2l1</i>	0.85
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	let-7c-5p	<i>Col3a1</i>	1
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	let-7c-5p	<i>Thbs1</i>	0.929
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	let-7c-5p	<i>Insr</i>	0.847
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	let-7c-5p	<i>Ngf</i>	0.994
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	let-7c-5p	<i>Cene2</i>	0.81
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	let-7c-5p	<i>Fgf11</i>	0.811
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	let-7c-5p	<i>Colla1</i>	0.859
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	let-7c-5p	<i>Col27a1</i>	0.999
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	let-7c-5p	<i>Irs1</i>	0.81
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	let-7c-5p	<i>Prlr</i>	0.897
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	let-7c-5p	<i>Ghr</i>	0.978
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	let-7c-5p	<i>Nras</i>	0.991
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	let-7c-5p	<i>Col5a2</i>	0.953
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	let-7c-5p	<i>Osmr</i>	0.982

(Continuação)

Pathway	microRNA	Target Gene	Score microT-CDS
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	let-7c-5p	<i>Col24a1</i>	0.938
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	let-7c-5p	<i>Col1a2</i>	1
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	let-7c-5p	<i>Il6</i>	0.903
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	let-7c-5p	<i>Rps6kb2</i>	0.985
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	let-7c-5p	<i>Col4a2</i>	0.812
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-16-5p	<i>Sos2</i>	0.895
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-16-5p	<i>Pik3r1</i>	0.969
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-16-5p	<i>Ppp2r1b</i>	0.868
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-16-5p	<i>Ywhah</i>	0.958
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-16-5p	<i>Kdr</i>	0.925
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-16-5p	<i>Il7r</i>	0.934
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-16-5p	<i>Map2k1</i>	0.948
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-16-5p	<i>Fgf7</i>	0.949
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-16-5p	<i>Insr</i>	0.919
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-16-5p	<i>Igf1</i>	0.848
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-16-5p	<i>Vegfa</i>	1
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-16-5p	<i>Ghr</i>	0.995
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-16-5p	<i>Ccne1</i>	1
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-16-5p	<i>Bcl2</i>	0.99
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-16-5p	<i>Col24a1</i>	0.885
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-16-5p	<i>Mtcp1</i>	0.855
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-16-5p	<i>Ccnd2</i>	0.985
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-16-5p	<i>Fgf9</i>	0.965
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-16-5p	<i>Csf1</i>	0.902
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-16-5p	<i>Sgk1</i>	0.992
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-16-5p	<i>Myb</i>	0.996
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-2137	<i>Stk11</i>	0.877
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-29c-3p	<i>Pik3r1</i>	0.91
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-29c-3p	<i>Ibsp</i>	0.887
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-29c-3p	<i>Col2a1</i>	1
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-29c-3p	<i>EfnA5</i>	0.932
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-29c-3p	<i>Pdgfrb</i>	0.845
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-29c-3p	<i>Col3a1</i>	0.998
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-29c-3p	<i>Col6a3</i>	1
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-29c-3p	<i>Igf1</i>	1
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-29c-3p	<i>Col1a1</i>	0.983
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-29c-3p	<i>Irs1</i>	0.827
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-29c-3p	<i>Vegfa</i>	0.992
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-29c-3p	<i>Col4a4</i>	0.969
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-29c-3p	<i>Nras</i>	0.806
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-29c-3p	<i>Col5a2</i>	0.998
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-29c-3p	<i>Col4a6</i>	0.996
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-29c-3p	<i>Col5a3</i>	1
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-29c-3p	<i>Pdgfb</i>	0.951

(Continuação)

Pathway	microRNA	Target Gene	Score microT-CDS
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-29c-3p	<i>Col1a2</i>	0.923
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-29c-3p	<i>Lamc1</i>	0.966
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-29c-3p	<i>Col4a1</i>	0.999
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-29c-3p	<i>Col11a1</i>	0.993
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-29c-3p	<i>Mcl1</i>	0.965
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-29c-3p	<i>Sgk1</i>	0.91
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-29c-3p	<i>Pten</i>	0.993
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-29c-3p	<i>Col4a2</i>	0.819
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-29c-3p	<i>Col5a1</i>	0.992
<i>PI3K-Akt signaling pathway</i>	miR-29c-3p	<i>Pdgfa</i>	0.861
<i>Protein digestion and absorption</i>	let-7c-5p	<i>Col3a1</i>	1
<i>Protein digestion and absorption</i>	let-7c-5p	<i>Col1a1</i>	0.859
<i>Protein digestion and absorption</i>	let-7c-5p	<i>Col27a1</i>	0.999
<i>Protein digestion and absorption</i>	let-7c-5p	<i>Col15a1</i>	0.844
<i>Protein digestion and absorption</i>	let-7c-5p	<i>Col5a2</i>	0.953
<i>Protein digestion and absorption</i>	let-7c-5p	<i>Col24a1</i>	0.938
<i>Protein digestion and absorption</i>	let-7c-5p	<i>Col1a2</i>	1
<i>Protein digestion and absorption</i>	let-7c-5p	<i>Col4a2</i>	0.812
<i>Protein digestion and absorption</i>	let-7c-5p	<i>Col14a1</i>	0.947
<i>Protein digestion and absorption</i>	miR-29c-3p	<i>Dpp4</i>	0.804
<i>Protein digestion and absorption</i>	miR-29c-3p	<i>Col2a1</i>	1
<i>Protein digestion and absorption</i>	miR-29c-3p	<i>Col3a1</i>	0.998
<i>Protein digestion and absorption</i>	miR-29c-3p	<i>Col6a3</i>	1
<i>Protein digestion and absorption</i>	miR-29c-3p	<i>Col1a1</i>	0.983
<i>Protein digestion and absorption</i>	miR-29c-3p	<i>Col15a1</i>	0.989
<i>Protein digestion and absorption</i>	miR-29c-3p	<i>Col4a4</i>	0.969
<i>Protein digestion and absorption</i>	miR-29c-3p	<i>Col5a2</i>	0.998
<i>Protein digestion and absorption</i>	miR-29c-3p	<i>Col4a6</i>	0.996
<i>Protein digestion and absorption</i>	miR-29c-3p	<i>Col5a3</i>	1
<i>Protein digestion and absorption</i>	miR-29c-3p	<i>Col9a1</i>	0.998
<i>Protein digestion and absorption</i>	miR-29c-3p	<i>Col1a2</i>	0.923
<i>Protein digestion and absorption</i>	miR-29c-3p	<i>Col4a1</i>	0.999
<i>Protein digestion and absorption</i>	miR-29c-3p	<i>Col11a1</i>	0.993
<i>Protein digestion and absorption</i>	miR-29c-3p	<i>Atp1b4</i>	0.988
<i>Protein digestion and absorption</i>	miR-29c-3p	<i>Col4a2</i>	0.819
<i>Protein digestion and absorption</i>	miR-29c-3p	<i>Col5a1</i>	0.992
<i>Glioma</i>	miR-29c-3p	<i>Pik3r1</i>	0.91
<i>Glioma</i>	miR-29c-3p	<i>Calm3</i>	0.874
<i>Glioma</i>	miR-29c-3p	<i>Pdgfrb</i>	0.845
<i>Glioma</i>	miR-29c-3p	<i>Igfl</i>	1
<i>Glioma</i>	miR-29c-3p	<i>Nras</i>	0.806
<i>Glioma</i>	miR-29c-3p	<i>Pdgfb</i>	0.951
<i>Glioma</i>	miR-29c-3p	<i>Pten</i>	0.993
<i>Glioma</i>	miR-29c-3p	<i>Pdgfa</i>	0.861

(Conclusão)

Pathway	microRNA	Target Gene	Score microT-CDS
<i>Glioma</i>	miR-301a-3p	<i>Sos2</i>	0.933
<i>Glioma</i>	miR-301a-3p	<i>E2f2</i>	0.817
<i>Glioma</i>	miR-301a-3p	<i>Sos1</i>	0.868
<i>Glioma</i>	miR-301a-3p	<i>Pik3cb</i>	0.979
<i>Glioma</i>	miR-301a-3p	<i>Calm2</i>	0.927
<i>FoxO signaling pathway</i>	miR-2137	<i>Stk11</i>	0.877
<i>FoxO signaling pathway</i>	miR-690	<i>Stat3</i>	0.803
<i>FoxO signaling pathway</i>	miR-690	<i>Usp7</i>	0.888
<i>FoxO signaling pathway</i>	miR-690	<i>Homer2</i>	0.83
<i>FoxO signaling pathway</i>	miR-690	<i>Sos1</i>	0.861
<i>FoxO signaling pathway</i>	miR-690	<i>Setd7</i>	0.865
<i>FoxO signaling pathway</i>	miR-690	<i>Sgk1</i>	0.841

APÊNDICE L – DADOS UTILIZADOS PARA CONSTRUÇÃO DA REDE GÊNICA

(Continua)

microRNA	Gene Alvo	Score	Repetições
miR-122-5p	<i>Adams2</i>	0.885722793	2
miR-122-5p	<i>Arfp2</i>	0.853036987	2
miR-122-5p	<i>Ccng1</i>	0.893505825	2
miR-122-5p	<i>Cept1</i>	0.877764524	2
miR-122-5p	<i>D1Ert622e</i>	0.800053729	5
miR-122-5p	<i>Gm20517</i>	0.884646009	2
miR-122-5p	<i>Grhl2</i>	0.899225015	2
miR-122-5p	<i>Hif3a</i>	0.88506978	2
miR-122-5p	<i>Lamc1</i>	0.836288488	3
miR-122-5p	<i>Mbnl1</i>	0.841255287	2
miR-122-5p	<i>Mipol1</i>	0.982876757	2
miR-122-5p	<i>Npas3</i>	0.933893517	3
miR-122-5p	<i>Ralgapa1</i>	0.812510136	2
miR-122-5p	<i>Ror1</i>	0.947206839	2
miR-122-5p	<i>Slco5a1</i>	0.836738095	2
miR-122-5p	<i>Tmem167</i>	0.90738756	2
miR-122-5p	<i>Zfp568</i>	0.898549601	2
miR-192-5p	<i>Arfgef1</i>	0.992471859	2
miR-192-5p	<i>Arhgap36</i>	0.85704972	2
miR-192-5p	<i>Bmpr2</i>	0.821714225	2
miR-192-5p	<i>D1Ert622e</i>	0.960468581	5
miR-192-5p	<i>H3f3b</i>	0.815295686	2
miR-192-5p	<i>Lims1</i>	0.80806888	2
miR-192-5p	<i>Mier3</i>	0.866214805	2
miR-192-5p	<i>Mipol1</i>	0.857260987	2
miR-192-5p	<i>Mtmr4</i>	0.814259098	2
miR-192-5p	<i>Zbtb34</i>	0.827790011	2
miR-22-3p	<i>4931406P16Rik</i>	0.872378518	2
miR-22-3p	<i>Akt3</i>	0.92934143	2
miR-22-3p	<i>Arfp2</i>	0.94691336	2
miR-22-3p	<i>Arhgef12</i>	0.979835049	2
miR-22-3p	<i>Arid2</i>	0.838715297	2
miR-22-3p	<i>Brwd3</i>	0.952518579	3
miR-22-3p	<i>Calcr</i>	0.841579858	2
miR-22-3p	<i>Chd9</i>	0.952678416	2
miR-22-3p	<i>D1Ert622e</i>	0.802235125	5
miR-22-3p	<i>Ei24</i>	0.932805895	2
miR-22-3p	<i>Epcl</i>	0.912301684	2
miR-22-3p	<i>Frat2</i>	0.995477367	2
miR-22-3p	<i>H3f3b</i>	0.973634813	2
miR-22-3p	<i>Homer1</i>	0.85447647	2
miR-22-3p	<i>Kdm6b</i>	0.893833448	2

(Continuação)

microRNA	Gene Alvo	Score	Repetições
miR-22-3p	<i>Lamc1</i>	0.810463417	3
miR-22-3p	<i>Nfat5</i>	0.807145475	2
miR-22-3p	<i>Npas3</i>	0.891991474	3
miR-22-3p	<i>Pten</i>	0.82394163	2
miR-22-3p	<i>Pura</i>	0.874600242	3
miR-22-3p	<i>Rc3h2</i>	0.820614897	2
miR-22-3p	<i>Rsbn1</i>	0.997974961	2
miR-22-3p	<i>Slc19a3</i>	0.853279984	2
miR-22-3p	<i>Tet2</i>	0.856174737	2
miR-22-3p	<i>Tlk2</i>	0.855794132	2
miR-22-3p	<i>Ube2f</i>	0.859637585	2
miR-22-3p	<i>Zbtb39</i>	0.823423995	2
miR-22-3p	<i>Zfp91</i>	0.808486689	2
miR-29c-3p	<i>4931406P16Rik</i>	0.928505027	2
miR-29c-3p	<i>Adamts2</i>	0.999427155	2
miR-29c-3p	<i>Ago3</i>	0.900104558	2
miR-29c-3p	<i>Akt3</i>	0.801620841	2
miR-29c-3p	<i>Ap1g1</i>	0.912431859	2
miR-29c-3p	<i>Arhgap36</i>	0.885353416	2
miR-29c-3p	<i>Atxn1</i>	0.945071897	2
miR-29c-3p	<i>Brwd3</i>	0.989435449	3
miR-29c-3p	<i>Calcr</i>	0.814442281	2
miR-29c-3p	<i>Col4a5</i>	0.999999998	2
miR-29c-3p	<i>D1Ert622e</i>	0.877066696	5
miR-29c-3p	<i>Epc1</i>	0.812564972	2
miR-29c-3p	<i>Frat2</i>	0.983246374	2
miR-29c-3p	<i>Gng12</i>	0.95867961	2
miR-29c-3p	<i>Hif3a</i>	0.999048727	2
miR-29c-3p	<i>Kdm6b</i>	0.965022349	2
miR-29c-3p	<i>Lamc1</i>	0.966005225	3
miR-29c-3p	<i>Lims1</i>	0.947481744	2
miR-29c-3p	<i>Mtmr4</i>	0.957558031	2
miR-29c-3p	<i>Nfat5</i>	0.899957644	2
miR-29c-3p	<i>Noval</i>	0.996639234	2
miR-29c-3p	<i>Npas3</i>	0.998425452	3
miR-29c-3p	<i>Nsd1</i>	0.999172264	2
miR-29c-3p	<i>Otud4</i>	0.958520035	2
miR-29c-3p	<i>Pgr15l</i>	0.957980418	2
miR-29c-3p	<i>Pten</i>	0.99274399	2
miR-29c-3p	<i>Pura</i>	0.814813493	3
miR-29c-3p	<i>Ralgap1</i>	0.847038042	2
miR-29c-3p	<i>Rlim</i>	0.828788432	2
miR-29c-3p	<i>Ror1</i>	0.978225788	2

(Continuação)

microRNA	Gene Alvo	Score	Repetições
miR-29c-3p	<i>Rora</i>	0.952669673	2
miR-29c-3p	<i>Slc19a3</i>	0.89080753	2
miR-29c-3p	<i>Slco5a1</i>	0.92323659	2
miR-29c-3p	<i>Smtnl2</i>	0.993534029	2
miR-29c-3p	<i>Tet2</i>	0.999357304	2
miR-29c-3p	<i>Tn</i>	0.800968363	2
miR-29c-3p	<i>Wdfy1</i>	0.873794597	2
miR-29c-3p	<i>Zbtb34</i>	0.995674432	2
miR-29c-3p	<i>Zfp568</i>	0.908846828	2
miR-29c-3p	<i>Zfp644</i>	0.856494826	2
miR-29c-3p	<i>Zfp91</i>	0.909749146	2
miR-29c-3p	<i>Zmym2</i>	0.841377001	2
miR-802-5p	<i>Ago3</i>	0.840724866	2
miR-802-5p	<i>Ap1g1</i>	0.868058104	2
miR-802-5p	<i>Arfgef1</i>	0.846949694	2
miR-802-5p	<i>Arhgef12</i>	0.915539073	2
miR-802-5p	<i>Arid2</i>	0.999040624	2
miR-802-5p	<i>Atxn1</i>	0.8185006	2
miR-802-5p	<i>Bmpr2</i>	0.860103303	2
miR-802-5p	<i>Brwd3</i>	0.853682905	3
miR-802-5p	<i>Ccng1</i>	0.86579239	2
miR-802-5p	<i>Cept1</i>	0.906278619	2
miR-802-5p	<i>Chd9</i>	0.960219416	2
miR-802-5p	<i>Col4a5</i>	0.86097558	2
miR-802-5p	<i>D1Ert622e</i>	0.991696275	5
miR-802-5p	<i>Ei24</i>	0.87233305	2
miR-802-5p	<i>Gm20517</i>	0.839200321	2
miR-802-5p	<i>Gng12</i>	0.904092423	2
miR-802-5p	<i>Grhl2</i>	0.810924984	2
miR-802-5p	<i>Homer1</i>	0.930909254	2
miR-802-5p	<i>Mbnl1</i>	0.801452668	2
miR-802-5p	<i>Mier3</i>	0.823330348	2
miR-802-5p	<i>Nova1</i>	0.855620344	2
miR-802-5p	<i>Nsd1</i>	0.852003268	2
miR-802-5p	<i>Otud4</i>	0.805021416	2
miR-802-5p	<i>Pgr15l</i>	0.803441181	2
miR-802-5p	<i>Pura</i>	0.861661202	3
miR-802-5p	<i>Rc3h2</i>	0.866065247	2
miR-802-5p	<i>Rlim</i>	0.944544274	2
miR-802-5p	<i>Rora</i>	0.81654512	2
miR-802-5p	<i>Rsbnl</i>	0.853760973	2
miR-802-5p	<i>Smtnl2</i>	0.88765057	2
miR-802-5p	<i>Tlk2</i>	0.847123681	2

(Conclusão)

microRNA	Gene Alvo	Score	Repetições
miR-802-5p	<i>Tmem167</i>	0.814090073	2
miR-802-5p	<i>Ttn</i>	0.994353991	2
miR-802-5p	<i>Ube2f</i>	0.863214732	2
miR-802-5p	<i>Wdfy1</i>	0.847556167	2
miR-802-5p	<i>Zbtb39</i>	0.909059618	2
miR-802-5p	<i>Zfp644</i>	0.845874023	2
miR-802-5p	<i>Zmym2</i>	0.952878192	2

ANEXO A – FIGURA ARTIGO – ATLAS DE MICRORNA

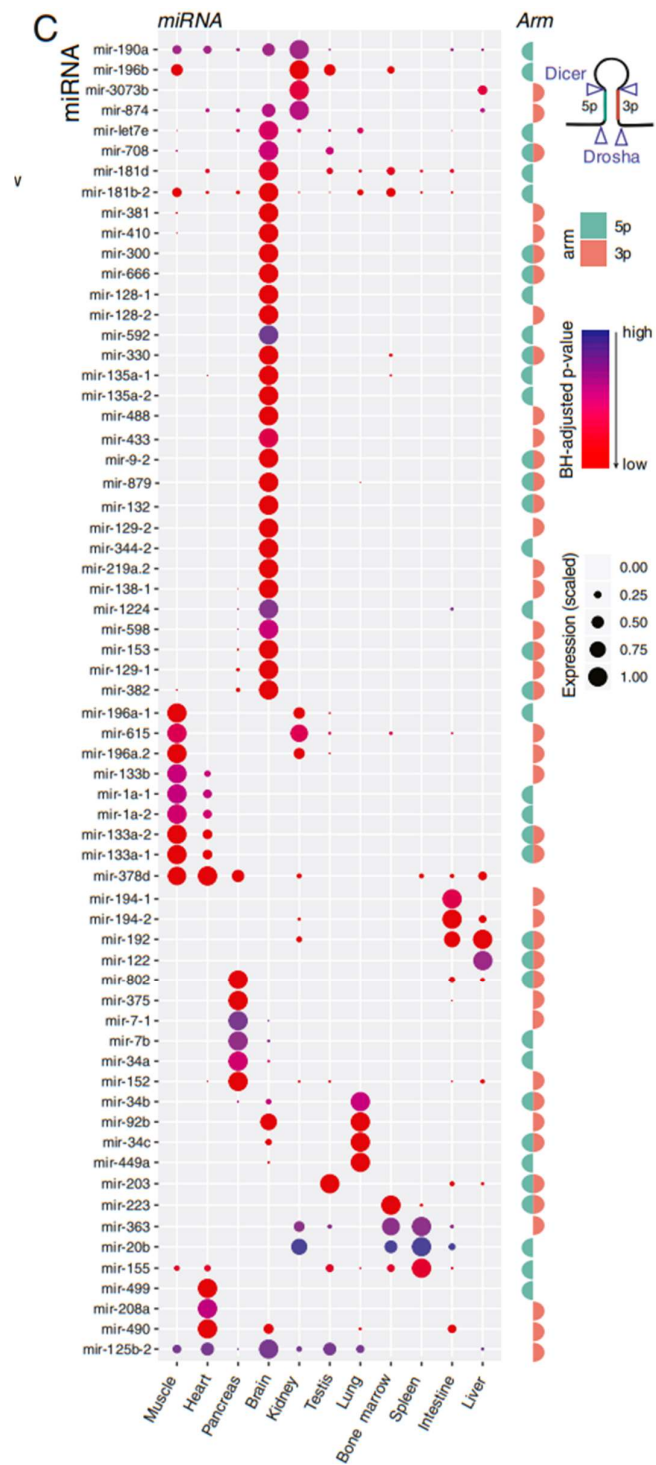


Figura retirada do trabalho de ISAKOVA et al. (2020)