

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

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.

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.

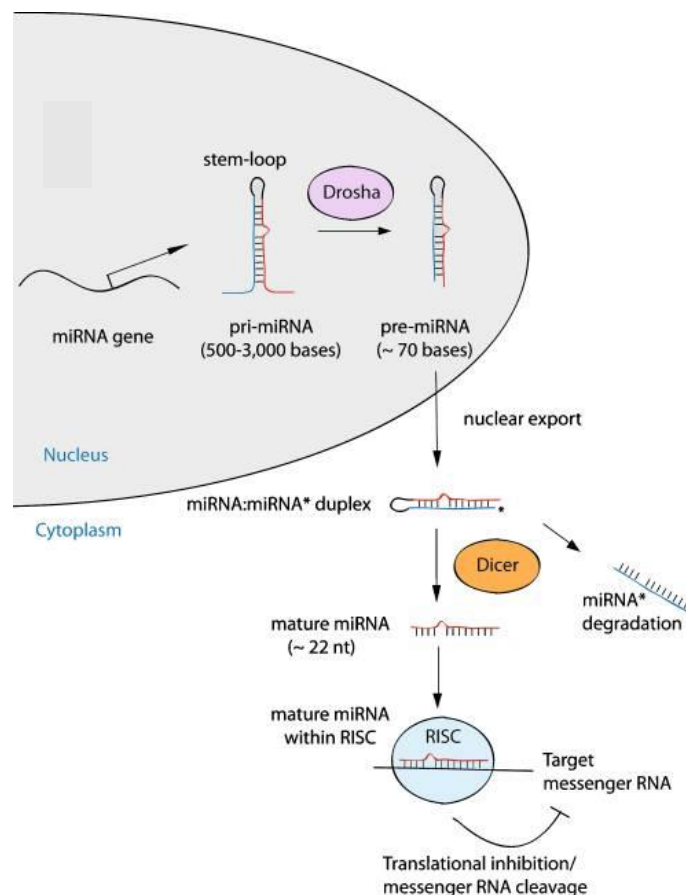
1.1. MICRORNAS

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 Drosha 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

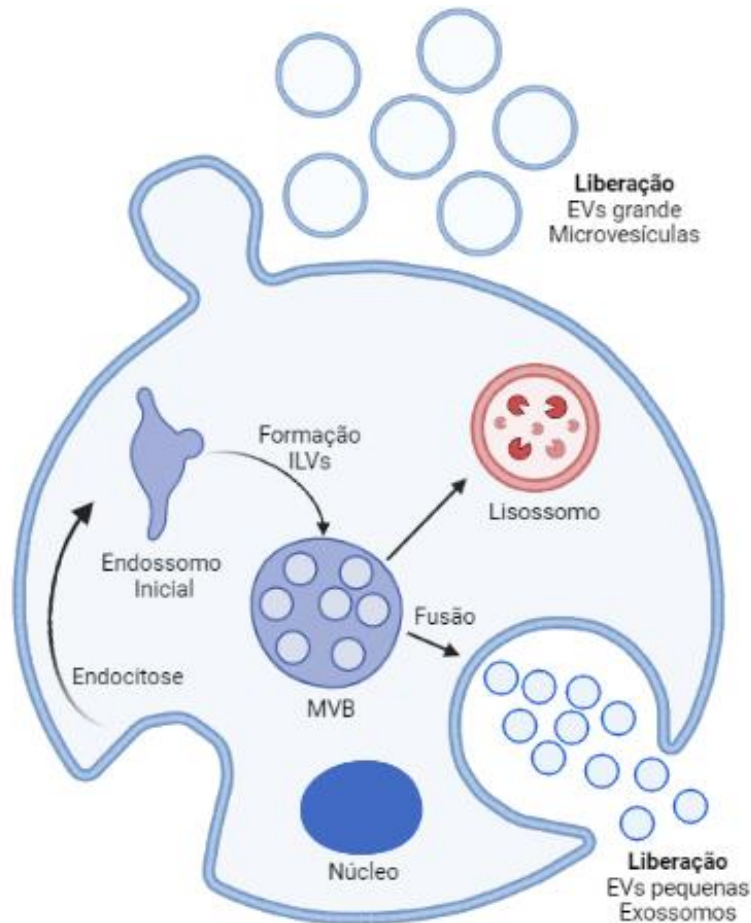
A maioria das células é capaz de secretar EVs e esse processo é conservado ao longo da evolução de bactérias a humanos e plantas (DEATHERAGE; COOKSON, 2012; ROBINSON et al., 2016). A classificação e nomenclatura de EVs tem sido uma questão de debate nos últimos anos (GOULD; RAPOSO, 2013). Por mais que 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 argonauta 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).

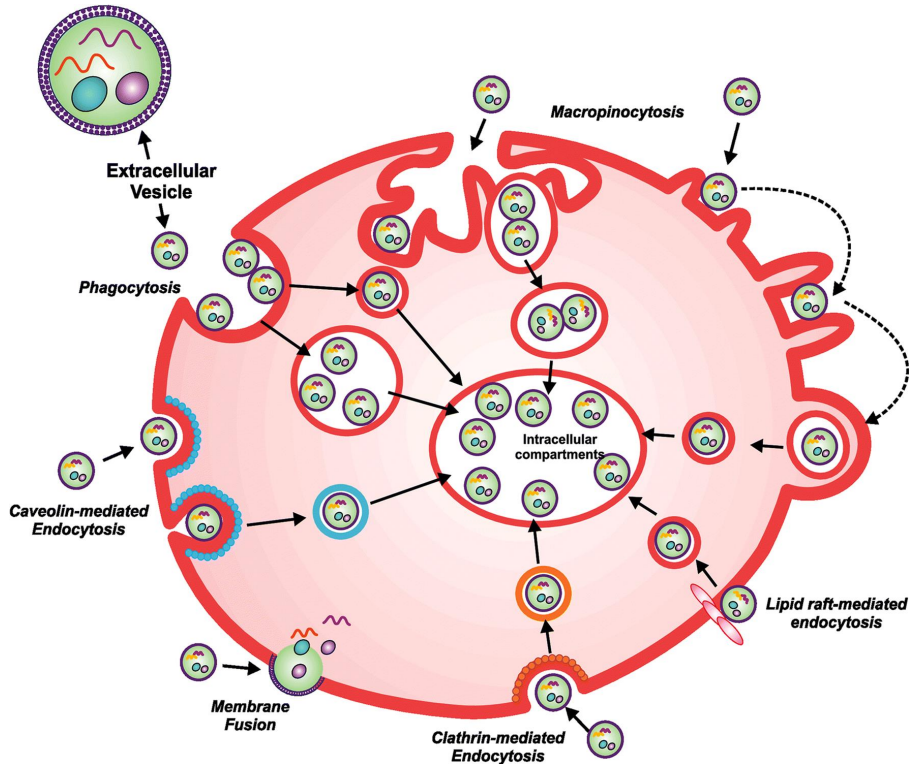
As funções das EVs nos processos fisiopatológicos dependem da capacidade de transferências das EVs, ou seja, capacidade de interagir com as células receptoras para liberar

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.

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- α : 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.

JAEGER, 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 Droscha 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.; STOORVOGEL, 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.

