



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Romuel Barros Costa Silva

Título: Padronização de um método de isolamento e caracterização de pequenas vesículas extracelulares de fluidos biológicos humanos

Florianópolis
2023

Romuel Barros Costa Silva

Título: Padronização de um método de isolamento e caracterização de pequenas vesículas extracelulares de fluidos biológicos humanos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica Toxicológica.

Orientadora: Profa. Dra. Alexandra Susana Latini
Coorientadora: Dr.(a) Leticia Barbosa Kawano
Dourado

Florianópolis

2023

Silva, Romuel Barros Costa

Padronização de um método de isolamento e caracterização de pequenas vesículas extracelulares de fluidos biológicos

humano / Romuel Barros Costa Silva ; orientadora, Alexandra Susana Latini, coorientador, Leticia Barbosa Kawano Dourado , 2023.

101 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Pequenas VEs. 3. Inflamação. 4. Biomarcadores . I. Latini, Alexandra Susana. II. Dourado , Leticia Barbosa Kawano . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

Romuel Barros Costa Silva

Padronização de um método de isolamento e caracterização de pequenas vesículas extracelulares de fluidos biológicos humanos

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 25 de setembro de 2023 pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof(a). Dr(a). Ana De Paul

Instituição

Universidad Nacional de Córdoba

Prof. Dr. Alexandre Pastoris Muller

Instituição

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva

Instituição

Universidade Paulista (UNIP)

Prof(a). Dr(a). Joana Gaspar

Instituição

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof(a). Dr(a). Alexandra Latini

Florianópolis Programa de Pós-graduação em Bioquímica, 2023

Dedico este trabalho a minha família e amigos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Alexandra, minha orientadora por ter me acolhido e aberto as portas da do Labox e da ciência para mim, por estar sempre me desafiando a ir além e acreditar que sou capaz. Também agradeço pela parceria e por ter me ensinado tanto não só com palavras, mas também com atitudes, levarei para sempre. Por fim, agradeço por ter confiado em meu trabalho frente a linha de pesquisa sobre vesículas extracelulares que foi fundamental para minha

Agradeço a Letícia minha coorientadora pelos conselhos e oportunidades que me concedeu, também por todos os artigos que me enviou para ler. Também por me inspirar e me mostrar que a ciência faz mais sentido quando muda a vida das pessoas.

Agradeço a todos os membros do Labox em especial Jennyffer e Hugo por me mostrarem a importância da cooperação e da parceria. Em especial também agradeço ao Luis por todo o amparo e coletividade e disposição que mostrou em sua passagem pelo Labox. Também agradeço ao Rodrigo, ex membro do Labox pela imensa contribuição e ajuda que ofereceu.

Agradeço a todo o corpo técnico do LAMEB, GEIMM e ao LCME em especial a Eliana, por toda a contribuição para que este trabalho se concretizasse.

Agradeço a todo o corpo terceirizado da UFSC em especial os trabalhadores do restaurante universitário por cuidarem com zelo pelos espaços públicos mantendo a zeladoria e a segurança dos espaços.

A melhor maneira de ter uma boa ideia é ter muitas ideias

(Linus Pauling)

RESUMO

As doenças inflamatórias crônicas abrangem uma ampla gama de patologias que envolvem respostas imunológicas persistentes. Biomarcadores são ferramentas valiosas para a compreensão da fisiopatologia e do manejo clínico destas condições, sendo essencial a sua identificação para a eficácia do tratamento e/ou a melhora do prognóstico. Entretanto, ainda existem desafios a serem superados para otimizar a aplicação clínica de biomarcadores, incluindo a pouca estabilidade de diversos compostos ou a indisponibilidade de marcadores em fluidos biológicos que apresentem pouca invasividade. Neste cenário, as vesículas extracelulares (VEs) pequenas (tamanho entre 30-200 nm) presentes em fluidos como plasma e urina emergiram como fonte de biomarcadores promissores para a detecção, prognóstico e terapia de numerosas condições inflamatórias. As pequenas VEs são conhecidas por transportar proteínas, citocinas, RNAs (incluindo miRNAs), da célula emissora que podem modular a resposta inflamatória nas células receptoras. Embora as expectativas positivas pela busca de biomarcadores em VEs, ainda há escassez de protocolos, econômicos e de alta eficiência, que permitam o isolamento de VEs de fluidos biológicos como plasma e urina. Neste estudo, definimos um protocolo que permitiu o isolamento de VEs pequenas de fluidos humanos mediante o uso de ultracentrifugação diferencial. Para a padronização do protocolo, amostras de plasma e urina de voluntários saudáveis foram diluídas (1:10; V/V) em solução salina tampão fosfato, filtradas (filtro hidrofílico de 0,22 μ m) e submetidas a diferentes condições de centrifugação (3.000 – 12.000 x g) e ultracentrifugação (45.000 – 200.000 x g). O diâmetro hidrodinâmico médio (Z-average) das VEs isoladas foi avaliado usando a técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS). A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foi utilizada para avaliar a morfologia e confirmar a integridade e tamanho das VEs. As preparações de vesículas mais purificadas de plasma resultaram de duas centrifugações a 3.000 x g por 20 min e 12.000 x g por 30 min, seguidas por uma etapa de ultracentrifugação de 45.000 x g por 1 h. As preparações geraram suspensões de vesículas com um Z-average de 125 nm, que é comparável com o tamanho de pequenas VEs. O mesmo protocolo foi aplicado a amostras de urina; no entanto, a etapa de ultracentrifugação foi realizada a 45.000 x g por 1 h. A análise DLS mostrou vesículas com um Z-average de 148 nm nas amostras de urina. A análise por TEM mostrou vesículas delimitadas por uma bicamada lipídica com tamanho entre 30 – 130 nm sem sinais claros de agregações ou danos à sua estrutura. Como exemplo da identificação do cargo das VEs isoladas foi determinada a concentração de proteínas totais, RNA e a expressão do gene DHFR, a qual foi realizada por RT-qPCR em amostras de urina de indivíduos afetados por doença pulmonar intersticial associada a artrite reumatoide e em indivíduos saudáveis. Em conclusão, foi estabelecido um protocolo robusto e econômico para isolamento de pequenas VEs de plasma e urina. Este avanço facilita a investigação da relevância dessas vesículas na compreensão das doenças inflamatórias e, potencialmente, no desenvolvimento de estratégias terapêuticas futuras.

Palavras-chave: pequenas VEs, inflamação, biomarcadores

ABSTRACT

Chronic inflammatory diseases encompass a wide range of pathologies involving persistent immune responses. Biomarkers are valuable tools for understanding the pathophysiology and clinical management of these conditions, and their identification is essential for treatment efficacy and/or improved prognosis. However, there are still challenges to be overcome to optimize the clinical application of biomarkers, including the instability of various compounds or the unavailability of markers in biological fluids that are minimally invasive. In this scenario, small extracellular vesicles (EVs) (size between 30-200 nm) have emerged as promising non-invasive biomarkers for the detection, prognosis, and therapy of numerous inflammatory conditions. Small EVs are known to carry specific combinations of signaling molecules, such as proteins, cytokines, RNAs including miRNAs, from the emitting cell that can regulate the inflammatory response by modulating gene expression in recipient cells. Although there are positive expectations in the search for EV-based biomarkers, there is still a shortage of cost-effective, high-efficiency protocols that allow the isolation of EVs from biological fluids such as plasma and urine. In this study, we defined a protocol that allowed the isolation of small EVs from human fluids using differential ultracentrifugation. For protocol standardization, plasma and urine samples from healthy volunteers were diluted (1:10; V/V) in phosphate-buffered saline, filtered (0.22 μ m hydrophilic filter) and subjected to different centrifugation conditions (3,000 – 12,000 x g) and ultracentrifugation (45,000 – 200,000 x g). The average hydrodynamic diameter (Z-average) of the isolated EVs was assessed using the dynamic light scattering (DLS) technique. Transmission electron microscopy (TEM) was used to evaluate the morphology and confirm the integrity and size of the EVs. The purest vesicle preparations from plasma resulted from two centrifugations at 3,000 x g for 20 min and 12,000 x g for 30 min, followed by an ultracentrifugation step at 45,000 x g for 1 h. The preparations yielded vesicle suspensions with a Z-average of 125 nm, which is comparable to the size of small EVs. The same protocol was applied to urine samples; however, the ultracentrifugation step was performed at 45,000 x g for 1 h. DLS analysis showed vesicles with a Z-average of 148 nm in urine samples. TEM analysis showed vesicles bounded by a lipid bilayer with sizes between 30 – 130 nm with no clear signs of aggregations or damage to their structure. As an example of the identification of the cargo of the isolated EVs, the concentration of total proteins, RNA, and the expression of the DHFR gene were determined, which was carried out by RT-qPCR in urine samples from individuals affected by interstitial lung disease associated with rheumatoid arthritis and in healthy individuals. In conclusion, a robust and cost-effective protocol for the isolation of small EVs from plasma and urine was established. This advancement facilitates the investigation of the relevance of these vesicles in understanding inflammatory diseases and, potentially, in the development of future therapeutic strategies.

Keywords: small EVs, inflammation, biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vesículas extracelulares (VEs), biogênese, liberação e captação	21
Figura 2 – Esquema ilustrando a biogênese de microRNA e a transferência de microRNA em vesículas extracelulares	28
Figura 3 - Passos metodológicos empregados no protocolo teste 1 (T1) para o isolamento de vesículas extracelulares (VEs) a partir de fluídos biológicos humanos.	44
Figura 4 - Passos metodológicos empregados no protocolo teste 2 (T2) para o isolamento de vesículas extracelulares (VEs) a partir de fluídos biológicos humanos.	48
Figura 5 - Passos metodológicos empregados no protocolo teste 3 (T3) para o isolamento de vesículas extracelulares (VEs) a partir de fluídos biológicos humanos	51
Figura 6 - Passos metodológicos empregados no protocolo teste 4 (T4) para o isolamento de vesículas extracelulares (VEs) a partir de fluídos biológicos humanos.	55
Figura 7 - Passos metodológicos empregados no protocolo teste 5 (T5) para o isolamento de vesículas extracelulares (VEs) a partir de fluídos biológicos humanos.	58
Figura 8 - Passos metodológicos empregados no protocolo teste 6 (T6) para o isolamento de vesículas extracelulares (VEs) a partir de plasma.	63
Figura 9 - Eletromicrografias de vesículas extracelulares (VEs) obtidas a partir de urina humana	67
Figura 10 - Eletromicrografias de vesículas extracelulares (VEs) obtidas a partir de plasma humano.....	69
Figura 11 - Eletromicrografias de vesículas extracelulares (VEs) obtidas a partir de plasma humano.....	71
Figura 12 - Conteúdo proteico em cada <i>pellet</i> ao longo da extração de vesículas extracelulares (VEs)	73
Figura 13 - Expressão relativa de DHFR em VEs de plasma e urina	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais proteínas marcadoras de origens das VEs	23
Tabela 2 - Princípios e classificação dos métodos mais comuns para isolamento de VEs	33
Tabela 3 - Principais vantagens e limitações dos métodos mais comuns para isolamento de VEs	35
Tabela 4 - Caracterização do tamanho das vesículas extracelulares (VEs) isoladas pelo protocolo teste 1 (T1) analisadas pela dispersão dinâmica de luz (DLS)	46
Tabela 5 - Caracterização do tamanho das vesículas extracelulares (VEs) isoladas pelo protocolo teste (T2) analisadas pela dispersão dinâmica de luz (DLS)	49
Tabela 6 - Caracterização do tamanho das vesículas extracelulares (VEs) isoladas pelo protocolo teste 3 (T3) analisadas por dispersão dinâmica de luz (DLS)	53
Tabela 7 - Caracterização do tamanho das vesículas extracelulares (VEs) isoladas pelo protocolo teste (T4) analisadas por dispersão dinâmica de luz (DLS).	57
Tabela 8 - Caracterização do tamanho das vesículas extracelulares (VEs) isoladas de plasma pelo protocolo teste (T5) analisadas por dispersão dinâmica de luz (DLS).....	60
Tabela 9. Caracterização do tamanho das vesículas extracelulares (VEs) isoladas de urina pelo protocolo teste (T5) analisadas por dispersão dinâmica de luz (DLS).....	61
Tabela 10 - Caracterização do tamanho das vesículas extracelulares (VEs) isoladas de plasma pelo protocolo teste (T6) analisadas por dispersão dinâmica de luz (DLS).....	64
Tabela 11. Quantificação de RNA total em vesículas extracelulares (VEs) isoladas de plasma no <i>pellet</i> A e B pelo protocolo teste 6 (T6) analisadas por Nanodrop	74
Tabela 12. Quantificação de RNA total em vesículas extracelulares (VEs) isoladas de urina no <i>pellet</i> A pelo protocolo teste 5 (T5) analisadas por Nanodrop..	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Artrite reumatoide
DPI	Doença pulmonar intersticial
dsDNA	Fragmento de DNA de fita dupla
ESCRT	Complexo endossomal requerido para transporte.
EXOs	Exossomos
incRNA	Longos RNAs não codificantes
MHC-I	Principal complexo de histocompatibilidade de classe 1
MHC-II	Principal complexo de histocompatibilidade de classe 2
mtDNA	DNA mitocondrial
MVs	Microvesículas
MVB	Corpo multivesicular
rRNA	RNA ribossômico
ssDNA	Fragmento de DNA de fita simples
VEs	Vesículas extracelulares

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
	ESTADO DA ARTE	17
	VES, CLASSIFICAÇÃO E BIOGÊNESE	18
1	COMPOSIÇÃO DE VEs.....	22
2	2.2.1 Proteínas presentes nas VEs	22
2.1	2.2.2 Proteínas marcadoras de origem de VEs	23
2.2	2.2.3 Lipídeos presentes nas VEs	24
	2.2.4 Ácidos nucleicos presentes nas VEs	25
	FUNÇÃO BIOLÓGICA DAS VEs	28
2.3	2.3.1 Pequenas VEs, artrite reumatoide e doença pulmonar intersticial	30
	ISOLAMENTO DE VEs	33
2.4	HIPÓTESE	37
2.5	OBJETIVO GERAL	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS:	37
4	NORMAS ÉTICAS	37
4.1	COLETA E PREPARO DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	38
4.2	PROCEDIMENTO E MATERIAIS UTILIZADOS NO ISOLAMENTO DE VEs	
4.3	DE PLASMA E URINA	38
4.4	ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (DLS).....	39
4.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	39
4.6	QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA	40
4.7	EXTRAÇÃO DE ÁCIDO RIBONUCLEICO (RNA) TOTAL	40
4.8	SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (CDNA).....	41
4.9	QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR REAÇÃO EM CADEIA	
4.10	DA POLIMERASE QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (RT-QPCR).....	41
5	ANÁLISES DOS DADOS	42
5.1	RESULTADOS	43
5.2	PADRONIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO PARA O ISOLAMENTO DE VEs A	
5.3	PARTIR DOS FLUÍDOS BIOLÓGICOS, PLASMA E URINA.....	43
	TAMANHO E MORFOLOGIA DAS VES POR MET	65
	CONTEÚDO BIOLÓGICO NAS VEs.....	71

5.3.1	Concentração de proteínas no <i>pellet</i>	71
5.3.2	Concentração de RNA total no pellet	74
5.3.3	Quantificação da expressão gênica por RT-qPCR.....	76
	DISCUSSÃO	78
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	86
	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	87
6	REFERÊNCIAS	88
7		
7.1		
7.2		

INTRODUÇÃO

1 A identificação de biomarcadores para o diagnóstico e o seguimento de doenças inflamatórias crônicas é uma área ainda não plenamente atendida na pesquisa médica contemporânea (MAYEUX, 2004). Um diagnóstico precoce e preciso, viabilizado por biomarcadores detectados em fluidos biológicos coletado de forma minimamente invasiva, pode ser instrumental para otimizar as estratégias terapêuticas e melhorar os prognósticos (NAYLOR, 2003). Além disso, o monitoramento da progressão da doença através de marcadores biológicos pode prover de informação valiosa para a adaptação e personalização de tratamentos, respondendo de forma mais específica às necessidades individuais (VINCENT; BOGOSSIAN; MENOZZI, 2020).

A coleta dos fluidos biológicos urinas e a saliva para a busca de biomarcadores foi propulsionada há várias décadas visto que o procedimento da coleta é pouco invasivo e por ser realizado com frequência sem maiores riscos associados. No entanto, vários biomarcadores têm apresentado baixa durabilidade após a coleta dos fluidos biológicos, o que tem comprometido a detecção e, conseqüentemente, a precisão do diagnóstico (SOURVINOU; MARKOU; LIANIDOU, 2013). Em um cenário em que minutos podem ser críticos, a rápida degradação de um biomarcador pode resultar em diagnósticos tardios ou imprecisos, afetando potencialmente o curso do tratamento e o prognóstico do indivíduo (MALL et al., 2013).

Nesse contexto, vesículas extracelulares (VEs) tem sido proposta como um substrato biológico para a busca de biomarcadores devido à capacidade de proteger os potenciais biomarcadores de degradação (IBRAHIM; IBRAHIM; PARIMON, 2021). As VEs pela capacidade de encapsular uma variedade de moléculas bioativas outorgam uma durabilidade e estabilidade superior quando comparado com os biomarcadores convencionais analisados em urina ou plasma (ENDERLE et al., 2015). Esta característica as torna particularmente valiosas em amostras que podem necessitar de armazenamento prolongado ou que podem ser expostas a condições subótimas antes da análise (GE et al., 2014). Ainda, as VEs apresentam outra característica ímpar que é a capacidade de carregar e proteger uma gama diversificada de biomoléculas, incluindo proteínas, lipídios, DNA e RNA. Esta característica multifacetada possibilita a detecção de variações mais sutis e complexas na patologia e na resposta do indivíduo ao tratamento (GUDEHITHLU et al., 2015).

Embora as VEs representem uma revolução potencial na identificação de novos biomarcadores, existe, no entanto, um outro desafio que deve ser enfrentado pela comunidade científica. O isolamento de VEs a partir de fluídos biológicos necessita de processos específicos de extração, o que pode ser considerado uma desvantagem quando comparado com a simples coleta de uma amostra de urina ou de plasma. Em função da tecnologia empregada, os métodos de isolamentos atuais resultam em níveis diferentes de rendimento, pureza e reprodutibilidade (WILLIAMS et al., 2023). Adicionalmente, o custo, o volume de amostra necessários e a aplicação de metodologias subsequentes têm sido reportados com fatores determinantes na escolha do método de isolamento (THÉRY et al., 2018). Assim, o presente trabalho visou estabelecer um método de isolamento de VEs presentes em fluídos biológicos humanos com alta pureza, rendimento, funcionalidade, e de relativo baixo custo.

ESTADO DA ARTE

2

As Ves têm despertado o interesse da comunidade científica nas últimas décadas devido ao seu papel multifuncional em diversos processos biológicos. Contudo, sua descoberta remonta à década de 1960, período no qual eram frequentemente interpretadas como meros artefatos ou detritos celulares sem função biológica aparente. Peter Wolf, em 1967, foi pioneiro ao identificar vesículas plasmáticas circulantes, descrevendo-as em conexão com a coagulação (WOLF, 1967). Essas vesículas foram reconhecidas posteriormente como derivadas de plaquetas e foram nomeadas “pó de plaquetas”, estabelecendo a base para a compreensão das VEs e sua função na hemostasia (ZHAO et al., 2021).

Ao longo das décadas de 1970 e 1980, os estudos progrediram lentamente, em parte devido à falta de tecnologia avançada para analisar e caracterizar essas minúsculas vesículas. Entretanto, com a evolução dos métodos de microscopia eletrônica e técnicas de centrifugação, tornou-se evidente que as células liberavam vesículas de maneira intencional e que estas carregavam consigo uma variedade de biomoléculas, incluindo proteínas, lipídios e ácidos nucleicos.

Na virada do século XXI, a importância das VEs foi solidamente estabelecida, uma vez que estudos demonstraram seu papel em diversas funções biológicas, como comunicação intercelular, resposta imune e patogênese de diversas doenças (GENG et al., 2021). A crescente compreensão de sua relevância em saúde e doença tem

conduzido a investigações intensivas sobre seu potencial uso terapêutico e como biomarcadores (ZHAO et al., 2021).

VES, CLASSIFICAÇÃO E BIOGÊNESE

2.1 Atualmente VE é um termo que tem sido utilizado para descrever uma ampla população de vesículas heterogêneas variando de 30 nm a 4 µm de diâmetro, encapsuladas por bicamadas lipídicas e que não possuem núcleo funcional, portanto não podem se replicar (THÉRY et al., 2018). Existem vários subtipos de VEs, que podem ser classificadas com base em sua biogênese, tamanho e expressão ou ausência de proteínas específicas (GENG et al., 2021). Com base em sua biogênese, as VEs são normalmente caracterizadas nos seguintes grupos: exossomos (EXOs), microvesículas (MVs) / oncosomas / corpos apoptóticos e migrassomo (Figura 1) (SZATANEK et al., 2017).

biogênese dos exossomos é um processo orquestrado e multifacetado que envolve uma série de eventos intracelulares. Fundamentalmente, os exossomos se originam de endossomos, grandes vesículas geradas por endocitose que são responsáveis pelo tráfego intracelular de biomoléculas. Ao longo do tráfego intracelulares mecanismos ativos incorporam biomoléculas e fornecem a estrutura proteica necessário para formação de vesículas intraluminais que, quando secretas para o espaço extracelular, são reconhecidas como exossomos. Inicialmente, a membrana plasmática sofre endocitose, formando endossomos precoces (THÉRY; ZITVOGEL; AMIGORENA, 2002). As proteínas RAB5 desempenham um papel fundamental nesta fase, regulando a formação e o tráfego desses endossomos (BLANC; VIDAL, 2018). Os endossomos precoces então amadurecem para formar endossomos tardios ou MVBs. Neste estágio, o complexo ESCRT (do inglês "Endosomal Sorting Complex Required for Transport") torna-se fundamental. O complexo ESCRT é uma série de quatro complexos proteicos (ESCRT-0, -I, -II e -III) que trabalham sequencialmente para selecionar proteínas ubiquitinadas, deformar a membrana e, eventualmente, pinçar vesículas intraluminais dentro dos MVBs (WEI et al., 2020). O papel do RAB7 é especialmente crucial nesta fase, pois regula a maturação e fusão de endossomos tardios (BLANC; VIDAL, 2018). Para que os exossomos sejam secretados, os MVBs devem se fundir com a membrana plasmática, liberando assim suas vesículas intraluminais no espaço extracelular. Neste ponto, as

proteínas RAB como RAB11, RAB27A e RAB35 tornam-se particularmente relevantes, pois regulam o transporte e a fusão dos MVBs com a membrana plasmática (BLANC; VIDAL, 2018). A liberação por este mecanismo foi descrita inicialmente em células imunes, incluindo as células dendríticas (ZITVOGEL et al., 1998), os linfócitos B (RAPOSO et al., 1996), linfócitos T (ZAKHAROVA; SVETLOVA; FOMINA, 2007), e mastócitos (SKOKOS et al., 2001), em plaquetas (HEIJNEN et al., 1999), células tumorais (WOLFERS et al., 2001), células neuronais, e células tronco, entre muitas outras (SIMPSON; JENSEN; LIM, 2008).

Vale ressaltar que, embora o complexo ESCRT seja considerado uma via canônica de biogênese de exossomos, existem evidências de que os exossomos também podem se formar em uma via independente de ESCRT (NICOLAS; GOODWIN, 2019). Além disso, os mecanismos exatos e os detalhes moleculares do papel das proteínas RAB e ESCRT na biogênese de exossomos ainda são tópicos ativos de pesquisa (TSCHUSCHKE et al., 2020; VAN NIEL et al., 2011).

As MVs outra classe de VEs, apresentam um diâmetro entre 100–2000 nm e são formadas pelo brotamento externo da membrana plasmática das células vivas. MVs são enriquecidas em fosfatidilserina e contém componentes de membrana muito semelhante aos da membrana da célula que originou a VE (WEI et al., 2016). Diferentemente dos exossomos, as microvesículas brotam diretamente da membrana plasmática. Esse processo é regulado por uma reorganização dos lipídios da membrana (especialmente fosfatidilserina) e pela reorganização do citoesqueleto, principalmente através da dinâmica da actina e da enzima ADF/cofilina. O mecanismo de formação e liberação de VE apresentado por MVs é compartilhado por outras classes de VEs como oncossomas e corpos apoptóticos (VAN NIEL et al., 2022).

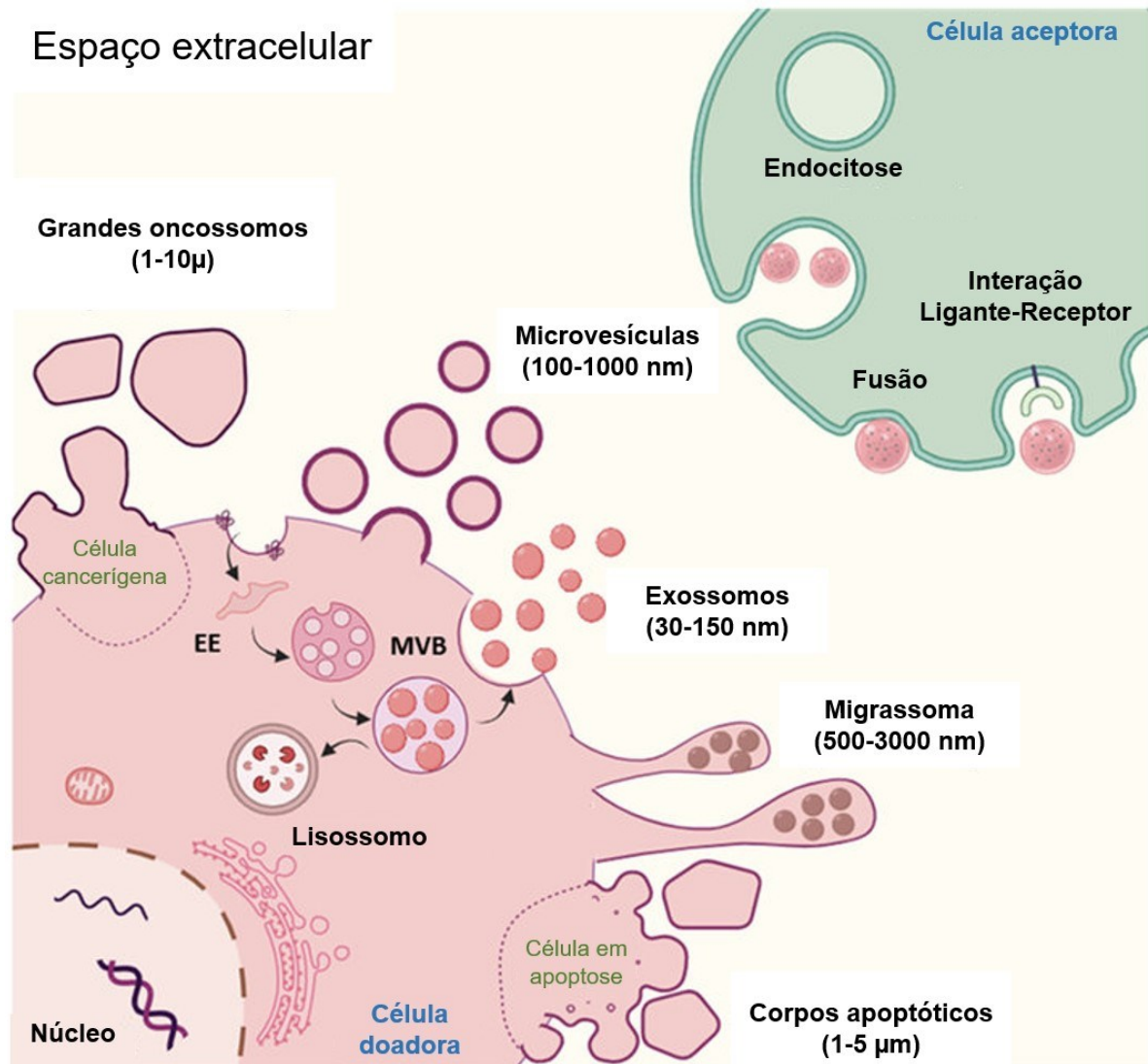
Oncossomas são grandes vesículas extracelulares grande (>1µm de diâmetro) liberadas por células cancerígenas (GENG et al., 2021). Sua biogênese ainda não é completamente compreendida, mas é sabido que elas emergem diretamente da membrana plasmática das células tumorais (THÉRY et al., 2018). Os oncossomos carregam cargas bioativas capazes de influenciarem as células a se tornarem tolerantes a presença de células malignas e têm sido associados à promoção de processos de invasão e migração tumoral (MINCIACCHI; FREEMAN; DI VIZIO, 2015). A transferência de proteínas como PDL-1 em oncossomas para células T inibe a sua atividade, conferindo escape imunológico em torno do microambiente tumoral (SEAN et al., 2017). Além disso oncossomos liberados por células de câncer de mama podem

transferir miRNA para células fibroblásticas adjacentes a tumores, induzindo-as a se tornarem mais pró-tumorais, promovendo o crescimento e a invasão do tumor (GU et al., 2021). Em câncer de mama, oncosomas podem ser direcionados para os pulmões, onde alteram as células locais para tornar o ambiente mais acolhedor para células de câncer de mama metastáticas (MEDEIROS; ALLAN, 2019). Isso pode acontecer antes de qualquer célula cancerosa realmente chegar ao pulmão (GU et al., 2021).

Corpos apoptóticos têm entre 1-5 μm de diâmetro e são liberados da membrana plasmática como bolhas à medida que as células sofrem apoptose (morte celular programada), e transportam para o meio extracelular fragmentos de DNA, RNAs não codificantes e organelas celulares (BATTISTELLI; FALCIERI, 2020). Durante o processo de apoptose as células se fragmentam em vesículas maiores que contêm uma fração do citosol da célula. Esta formação ocorre através da condensação do núcleo e do citoplasma, seguida pela fragmentação do DNA e reorganização da membrana plasmática, culminando na formação desses corpos que são então fagocitados por células vizinhas, especialmente macrófagos (BATTISTELLI; FALCIERI, 2020).

Os migrassomas são uma classe de VEs que foram recentemente descritas sendo liberadas por células durante a migração (MA et al., 2015). Células em migração deixam fibras de retração para trás, e vesículas com diâmetros de até 3 μm crescem nas pontas ou nas interseções das fibras de retração. Estas vesículas foram denominadas “migrassomas” e contêm numerosas vesículas menores, com diâmetros de cerca de 50-100 nm (MA et al., 2015). É gerado em uma variedade de células, como células do sistema imunológico, células tumorais metastáticas, outras células funcionais especiais, como podócitos e células de organismos em desenvolvimento. Desempenha papéis importantes em vários campos, especialmente na troca de informações entre células (ZHANG et al., 2023).

Figura 1 - Vesículas extracelulares (VEs), biogênese, liberação e captação



Fonte: Adaptado de (MARZAN; STEWART, 2021)

As microvesículas apresentam um diâmetro entre 100–1000 nm e são formadas a partir do brotamento externo diretamente a partir da membrana plasmática das células vivas. Outras VEs também brotam diretamente da membrana plasmática, mas de células em processos ou estados celulares distintos, como os migrassomas (500-3000) derivados de células em migração, grandes oncosomos (1-10 μ m) liberados por células tumorais e corpos apoptóticos (1-5 μ m) liberados por células durante a apoptose. Exossomos (30-150 nm) diferentemente das outras VEs, são caracterizados por sua origem endossômica. Em sua biogênese primeiro invaginações são formadas na membrana plasmática dando origem a endossomos precoces (EE). No citosol celular, esses endossomos precoces maturam em endossomos tardios e, internamente, formam vesículas intraluminais, dando origem a corpos multivesiculares (MVB). Após amadurecerem, ainda no citosol os corpos multivesiculares interagem com o complexo de Golgi modificando a composição proteica e lipídica, de sua membrana e consequentemente das vesículas intraluminais. Por fim, os MVB podem fundir-se com o lisossomo e degradar seu conteúdo, ou podem fundir-se com a membrana celular liberando os exossomos para o espaço extracelular.

Devido à complexidade de distinguir os diferentes subtipos de VEs obtidos de fluidos biológicos ou meios de cultura com base em sua origem, métodos técnicos de classificação estão sendo utilizados na atualidade (THÉRY et al., 2018). Assim, VEs também podem ser classificadas com base em seu tamanho, por exemplo, de tamanho pequeno, médio ou grande. As VEs de tamanho médio/grande são normalmente descritas com tamanhos superiores a 200 nm, enquanto o termo de pequenas VEs tem sido adotado para descrever exclusivamente VEs com tamanhos inferiores a 200 nm (THÉRY et al., 2018). Além disso, com o desenvolvimento de técnicas que extraem VEs usando especificidade imunológica para proteínas em sua superfície, as VEs têm sido classificadas com base na presença de marcadores como CD9, CD81, entre outros (THÉRY et al., 2018). Essas mais recentes classificações têm sido particularmente úteis para o avanço nos estudos que avaliam a subgrupos específicos de VEs para biomarcadores, efeitos funcionais das VEs e para terapias baseadas em VEs (JEPPESEN et al., 2023).

2.2 COMPOSIÇÃO DE VES

As VEs contêm uma variedade de lipídios, proteínas, DNA e uma abundância de RNAs, incluindo mRNAs e miRNAs (THÉRY; ZITVOGEL; AMIGORENA, 2002). A base de dados ExoCarta lista 9.769 proteínas, 1.116 lipídios, 3.408 mRNAs e 2.838 miRNAs encontrados em VEs (<http://www.exocarta.org/> acesso 15/09/2023).

2.2.1 Proteínas presentes nas VEs

A composição de proteínas presente nas VEs depende do tipo e estado celular que a originou além do mecanismo que a originou. As proteínas nas VEs desempenham funções variadas, por exemplo, favorecendo a adesão celular (Integrinas), a apresentação de antígenos através dos complexos de histocompatibilidade (MHC-I e MHC-II), a resposta ao estresse celular (proteínas de choque térmico 70 e 90) (MOLLAEI; SAFARALIZADEH; POULADI, 2017), e à migração celular (actina, tubulina), entre outras (KAHLERT et al., 2014). Além disso, as VEs estão envolvidas em cascatas de sinalização (quinases), transcrição, e síntese proteica (MROWCZYNSKI; ZACHARIA; CONNOR, 2019). As VEs também abrigam as proteínas do complexo ESCRT, enzimas metabólicas, como peroxidases e β -enolase, e tetraspaninas, incluindo a CD81 e a CD63 (BARILE; VASSALLI, 2017).

Outras proteínas nas VEs são responsáveis pelo transporte e fusão de membranas, como anexinas e Rabs (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). As VEs podem também carregar metaloproteinases de matriz (MMPs) que são proteoliticamente ativas, incluindo, as MT1-MMP, MMP13 e MMP3 (SHIMODA; KHOKHA, 2017). Estas MMPs degradam a matriz extracelular, facilitando a migração celular.

2.2.2 Proteínas marcadoras de origem de VEs

Algumas proteínas têm sido utilizadas como marcadores para a caracterização e purificação de vesículas de diferentes origens. Por exemplo CD31, também conhecida como PECAM-1, é uma molécula de adesão expressa em células endoteliais, leucócitos e algumas outras células, e pode indicar VEs derivadas de células endoteliais. Além disso, CD45, uma proteína tirosina fosfatase expressa em leucócitos pode indicar VEs com origem em células do sistema imunológico, como linfócitos ou células dendríticas. Ainda, MHC II Complexo de Histocompatibilidade Maior Classe II é expresso em células apresentadoras de antígeno como células dendríticas, macrófagos e alguns linfócitos B. Sua presença pode indicar VEs originadas de tais células.

Tabela 1 – Principais proteínas marcadoras de origens das VEs

Fonte de célula	Proteína marcadora	MM (kDa)	Referência
THP-1, MSCs	Alice	96	(JESUS et al., 2018; TIAN et al., 2018)
U937, MSC, TPH-1, DCs	CD9	24	(FURUTA et al., 2016)
DCs, MSC	CD31	83	(BLANC et al., 2005; LIN et al., 2016; WANG et al., 2016)
THP-1, U937, Jurkat T	CD45	250	(COREN; SHATZER; OTT, 2008)
Plaquetas, MSCs, células T	CD47	50	(KAUR et al., 2014; KIM et al., 2012; SADALLAH et al., 2011)
U937, MSCs, THP-1, DCs	CD63	30–60	(KOMAKI et al., 2017)

U937, MSC, THP-1, DCs, CEs, Plaquetas	CD81	22–26	(GOETZL et al., 2017; JANG et al., 2013; SALOMON et al., 2013)
DCs, células B	HSC70	73	(THÉRY et al., 2006)
DCs, células B, células T	MHC II	30	(KOWAL et al., 2016)
THP-1, MSCs	TSG101	45	(TOOI et al., 2016; YAO et al., 2019)
THP-1	LAMP-1 ou 2	120	(SHYONG; CHANG; LIN, 2018)

Abreviaturas: THP-1, monócitos, C, cardiomiócitos; DCs, células dendríticas; CE, células endoteliais; MSCs, células-tronco mesenquimais

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Essas proteínas, juntamente com outras moléculas, ajudam na identificação e no estudo funcional das VEs. É importante ressaltar que a composição proteica de uma VE pode variar dependendo das condições fisiológicas e patológicas da célula de origem. Assim, o perfil proteico completo pode fornecer insights valiosos sobre a função e a origem das vesículas em estudo.

2.2.3 Lipídeos presentes nas VEs

VEs são compostas por diferentes em lipídios, como esfingomiélin, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilinositol, que são constituintes comuns das membranas plasmáticas e responsáveis pela sinalização e fusão das VEs com as células-alvo (GENG et al., 2021).

Os EXOS, são particularmente ricos em esfingolipídios, como ceramidas, e apresentam altas concentrações de colesterol, fosfatidilserina e glicolipídios, mas baixas quantidades de fosfatidilcolina em comparação com membranas celulares (ZABOROWSKI et al., 2015). Por outro lado, as MVs, possuem uma composição lipídica mais próxima da membrana celular original, sendo ricas em fosfatidilserina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomiélinas e colesterol (FITZNER et al.,

2011). Já os corpos apoptóticos, apresentam translocação de fosfatidilserina para o exterior da membrana e, embora contenham colesterol e outros fosfolipídios, suas proporções diferem das observadas em MVs e EXOS (BATTISTELLI; FALCIERI, 2020)

A composição lipídica das VEs desempenha um papel crucial em suas funções. Por exemplo, a fosfatidilserina, frequentemente encontrada na superfície das VEs, não só serve como um "sinal comestível" que promove a fagocitose de corpos apoptóticos (HOHENSINNER et al., 2021), mas também participa da coagulação sanguínea, interagindo com fatores de coagulação como a protrombina (ZARGARIAN et al., 2017). Esse posicionamento externo da fosfatidilserina principalmente em corpos apoptóticos é atípico, já que, nas células saudáveis, essa molécula está predominantemente localizada na camada interna da bicamada lipídica (ZARGARIAN et al., 2017).

Além disso, os esfingolipídios e ceramidas, ricos nas VEs, são vitais na modulação de várias respostas celulares. A ceramida, por exemplo, tem sido associada à indução da apoptose, e sua presença nas VEs pode influenciar a morte celular (HORBAY et al., 2022). E mais, os esfingolipídios podem atuar como moléculas de sinalização bioativa, modulando processos como a inflamação através de sua interação com receptores específicos nas células-alvo (DINKINS; WANG; BIEBERICH, 2017; PIENIMAEKI-ROEMER et al., 2013).

O colesterol, outro componente fundamental das VEs, não apenas confere rigidez e estabilidade à membrana vesicular, mas também tem papel em processos como a fusão vesicular (SKOTLAND et al., 2020). Ao se associar a proteínas específicas, como as tetraspaninas (por exemplo, CD63 e CD81)(MULCAHY; PINK; CARTER, 2014), o colesterol pode facilitar a interação das VEs com células receptoras, garantindo uma comunicação intercelular eficiente e específica (ANDREU; YÁÑEZ-MÓ, 2014; STIPP; KOLESNIKOVA; HEMLER, 2003).

2.2.4 Ácidos nucleicos presentes nas VEs

VEs são conhecidas por transportar uma variedade de ácidos nucleicos, não se limitando apenas aos miRNAs, que são frequentemente o foco das investigações, mas também incluem uma gama ampla de outras espécies de RNA e, surpreendentemente, DNA gnômico (YÁÑEZ-MÓ et al., 2015).

Entre as espécies de DNA, até 2014, apenas DNA de fita simples (ssDNA), DNA mitocondrial (mtDNA) e transposons repetitivos haviam sido descritos como estando em VEs, incluindo exossomos (GHANAM et al., 2022). Em 2014, surgiram as primeiras evidências de dsDNA em exossomos de câncer. A partir de uma abordagem de digestão baseada em DNase I que digere de forma inespecífica o DNA de fita simples e dupla, mostrou a existência de DNA genômico em exossomos derivados de células cancerosas pancreáticas (KAHLERT et al., 2014). No mesmo ano, utilizando desta vez uma abordagem diferente, enzimática dupla incluindo a nuclease S1 que digere o ssDNA e uma dsDNase de camarão que hidrolisa especificamente o dsDNA foi mostrado que a maior parte do DNA genômico associado aos exossomos é dsDNA (THAKUR et al., 2014)

A comunicação intercelular mediada por VEs tem sido implicada como um importante mecanismo funcional na imunidade, com o DNA de VEs sendo proposto especificamente como um mediador dos sistemas imunológicos inato e adaptativo (TORRALBA et al., 2018; ZHOU et al., 2020). O papel fisiológico do DNA em VEs também foi explorado no contexto da manutenção da homeostase celular, através da qual as células excretam DNA danificado potencialmente prejudicial para evitar a indução de apoptose (TAKAHASHI et al., 2017). No entanto, os papéis adicionais do DNA em VEs na saúde normal permanecem em grande parte desconhecidos além destes estudos (MALKIN; BRATMAN, 2020).

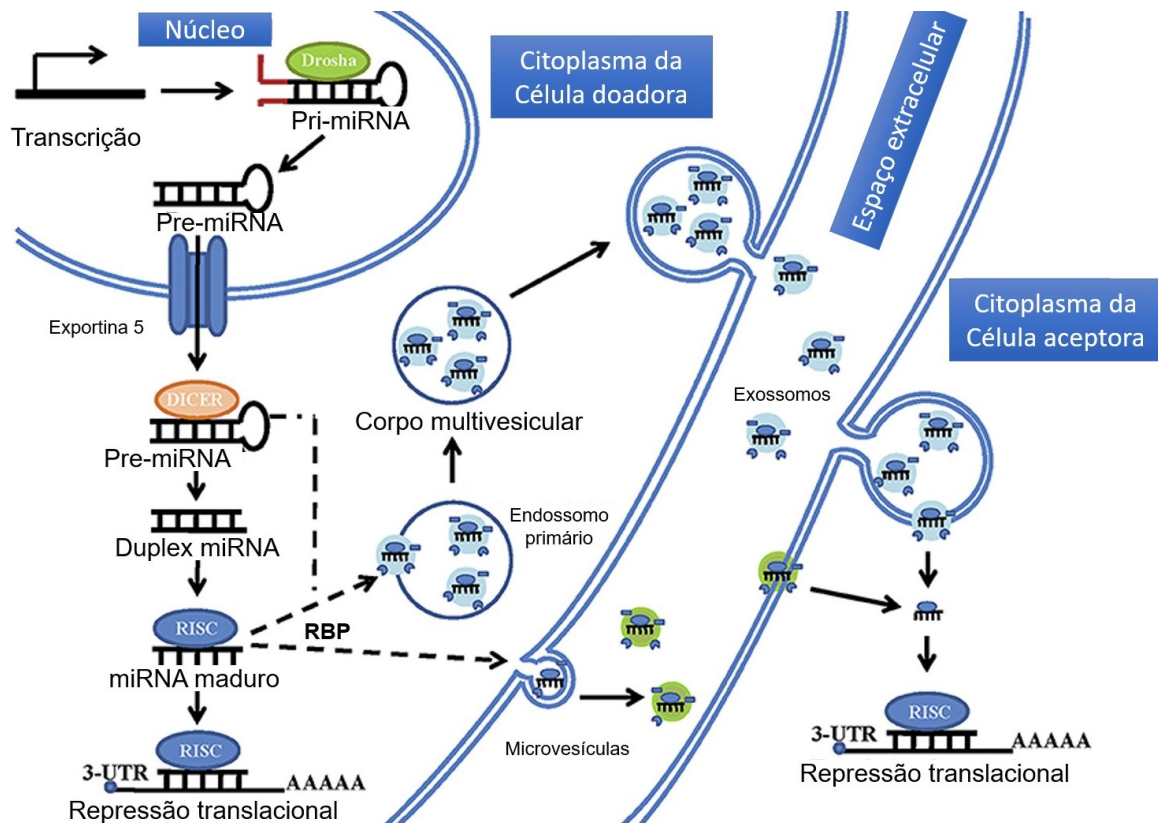
RNAs de carga de vesículas extracelulares incluem vários biótipos que representam uma porção selecionada do conteúdo de RNA da célula fonte, com uma forte tendência para RNAs não codificantes pequenos, embora mRNA fragmentado e intacto, RNA ribossômico (rRNA) e RNA não codificante longo (lncRNA) podem ser encontradas. (O'BRIEN et al., 2020; THÉRY; ZITVOGEL; AMIGORENA, 2002). Cada tipo de RNA tem potenciais implicações funcionais. Por exemplo, os mRNAs encapsulados podem ser traduzidos nas células receptoras, enquanto os lncRNAs (e os miRNA podem desempenhar a regulação gênica pós transcricionais (O'BRIEN et al., 2020).

Os miRNAs, ou microRNAs, são pequenas moléculas de RNA não codificantes compostas por aproximadamente 20 nucleotídeos (ZHANG, 2015). Eles desempenham um papel crítico na modulação da expressão gênica em nível pós-transcricional, atuando tanto na inibição da tradução de mRNAs específicos quanto

na indução de sua degradação (DE SOUSA et al., 2019). miRNAs são comumente codificados em regiões intergênicas (entre genes) ou em íntrons (regiões não codificadoras dentro de genes) de genes já existentes. Inicialmente o miRNA deriva de uma sequência precursora longa chamada pri-miRNA (Figura 2). No núcleo da célula, essa precursora é cortada pela endorribonuclease DROSHA para formar o pre-miRNA. Este pre-miRNA, por sua vez, é transportado pela proteína transportadora Exportina 5 para o citoplasma, onde é processado por outra endorribonuclease, DICER, que remove a estrutura de loop, resultando no miRNA maduro de dupla fita (duplex miRNA) (MICHLEWSKI; CÁCERES, 2019). Uma das fitas é então incorporada a um membro da família de proteínas Argonata, culminando na formação do complexo RISC (Complexo de Silenciamento Induzido por RNA). Esse complexo é fundamental para a atividade regulatória dos miRNAs, permitindo-lhes alvejar mRNAs específicos para inibição ou degradação e por consequência promovendo a repressão translacional (WINKLE et al., 2021).

Em comparação com outras VEs que apresentam menores quantidades de miRNA, a concentração elevada de certos miRNAs nos exossomos pode estar intrinsecamente ligada ao seu processo de biogênese (JANAS et al., 2015). Isso se deve ao fato de que os corpos multivesiculares têm sido associados a complexos proteicos que são efetores de miRNAs, especialmente as proteínas de ligação ao RNA (RBPs). As RBPs são cruciais na formação das VEs e na incorporação de miRNAs. Alguns RBPs específicos, presentes em endossomos tardios, identificam sequências ou padrões únicos nos miRNAs, facilitando assim a sua ligação e subsequente encapsulamento nas vesículas (JANAS et al., 2015). Um exemplo notável é a proteína hnRNPA2B1, uma RBP, capaz de se ligar ao miRNA-121 permitindo a o aumento da liberação deste miRNA encapsulado em VEs de células de câncer de pulmão (LI et al., 2021). Esta liberação promoveu a migração de células hepáticas, que podem desempenhar papéis no estabelecimento de um microambiente pré-metastático e na metástase hepática de câncer de pulmão(LI et al., 2021)

Figura 2 – Esquema ilustrando a biogênese de microRNA e a transferência de microRNA em vesículas extracelulares



Fonte: adaptado de (CHEN; HU; PAN, 2017)

No núcleo da célula, o pri-miRNA é cortado pela endorribonuclease DROSHA para formar o pre-miRNA. Este pre-miRNA, por sua vez, é transportado pela proteína transportadora Exportina 5, para o citoplasma onde é processado por DICER, que remove a estrutura de loop, resultando no miRNA maduro de dupla fita (duplex miRNA). Uma das fitas é então incorporada a um membro da família de proteínas Argonauta, culminando na formação do complexo RISC (Complexo de Silenciamento Induzido por RNA). As fitas de miRNA maduras podem efetuar a repressão gênica, ser transportadas por proteínas de ligação de RNA (RBP) em direção a corpos multivesiculares (MVBs) para carregamento de exossomos, ou em direção à membrana plasmática para secreção em microvesículas. Os endossomos também podem ser transportados para a rede trans-Golgi, direcionados aos lisossomos para degradação.

2.3

FUNÇÃO BIOLÓGICA DAS VES

A função biológica das VEs é determinada por sua composição molecular, que inclui tanto a carga interna quanto os componentes de sua membrana (VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018). A composição biológica permite que VEs liberadas por um tipo celular possa ser reconhecida e internalizada por outros tipos celulares, desempenhando papel importante na comunicação interórgãos sob condições fisiológicas e patológicas (HU; HU; YAN, 2023). As VEs podem interagir com as

células de diversas maneiras, seja através de um mecanismo ligante-receptor, como a apresentação de antígenos, ou sendo internalizadas através de fusão de membranas ou endocitose (Figura 1) (BISSONNETTE et al., 2020)

Ao ancorar-se na membrana plasmática das células receptoras as VEs podem induzir respostas funcionais. Estas respostas são provocadas através da ativação de receptores presentes nas células receptoras (ZABOROWSKI et al., 2015). Um dos primeiros relatos deste tipo de interação, mostrou que os exossomos originados de células B e células dendríticas poderiam apresentar antígenos às células T, gerando uma resposta antigênica específica (RAPOSO et al., 1996; ZITVOGEL et al., 1998). Além disso, microvesículas provenientes de tumores transportam fibronectina, que ao se ligar à integrina em fibroblastos, promove o crescimento destas células e contribui para sua transformação tumorigênica (ANTONYAK et al., 2011). Outras microvesículas, originadas de células-tronco embrionárias, facilitam a invasão do tecido materno pelo trofoblasto, essencial para a implantação do embrião (DESROCHERS et al., 2016). Há ainda VEs que participam na transferência de genes morfogênicos para células em embrionárias e na progressão do câncer (ZHANG; WRANA, 2014).

Após a internalização nas células receptoras, o conteúdo entregue pelas VEs pode induzir diversos processos (WEI et al., 2016). Em células dendríticas, por exemplo, proteínas dos exossomos são processadas de maneira semelhante aos antígenos, auxiliando na regulação da resposta imune (MALLEGOL et al., 2007). Estas vesículas podem se fundir com membranas celulares, liberando seu conteúdo intraluminal no citoplasma, o que é crucial para a transferência de miRNA (VALADI et al., 2007) e mRNA (SKOG et al., 2008), impactando a expressão gênica. Esta fusão também permite a troca de proteínas e lipídios transmembranares, regulando espécies lipídicas bioativas (RECORD et al., 2014). Em contextos patológicos, VEs podem transferir proteínas amiloides patogênicas, contribuindo para a disseminação transcelular destas proteínas (COLEMAN; HILL, 2015). O destino mais comum das VEs é a direção aos lisossomos, resultando na degradação de seu conteúdo, o que pode fornecer uma fonte valiosa de metabolitos para as células receptoras (VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018).

As VEs também estão associadas a várias doenças, apesar disso os mecanismos utilizados são complexos e multifatoriais. Em condições patológicas,

como câncer (BECKER et al., 2016), condições inflamatórias (BUZAS et al., 2014), infecções virais (MARCILLA et al., 2014) e doenças neurodegenerativas (LAULAGNIER et al., 2018), as vesículas podem facilitar a progressão da doença transferindo moléculas patogênicas entre células. No contexto inflamatório por exemplo, as VEs funcionam como veículos parácrinos e têm capacidade de transportar mediadores pró-inflamatórios particularmente em infecções e doenças crônicas, como a artrite reumatoide (BUZAS et al., 2014; WITHROW et al., 2016). Adicionalmente, as VEs podem influenciar processos relacionados ao complemento, regulando tanto aspectos pró, ao induzir respostas inflamatórias, como anti-inflamatórios, ao promover a secreção de fatores como o fator transformador de crescimento beta (KARASU et al., 2018)

2.3.1 Pequenas VEs, artrite reumatoide e doença pulmonar intersticial

Nos últimos anos um grande número de estudos tem apontado que pequenas VEs podem ser centrais em diversos processos biológicos, incluindo processos básicos da imunidade inata e adaptativa, incluindo inflamação, apresentação de antígenos e desenvolvimento e ativação de células B e células T (DAI; AHMED, 2011; NATASHA G et al., 2014; WITHROW et al., 2016). A compreensão da capacidade das pequenas VEs de influenciar na função celular e na patologia levou a um interesse renovado em sua para diversas doenças incluindo câncer, doenças metabólicas, neurodegenerativas e autoimunes como a artrite reumatoide (GU et al., 2021; HILL, 2019; HU; HU; YAN, 2023; ZHANG; ZHAO; LU, 2021)

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica de origem autoimune que pode se tornar sistêmica descrita principalmente pela inflamação das articulações sinoviais (LEE; WEINBLATT, 2001). A etiologia da AR é multifatorial e ainda não completamente elucidada, envolvendo fatores genéticos, ambientais e imunológicos na sua patogênese (SILMAN; PEARSON, 2002; SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2017). A fisiopatologia da AR inicia-se com a ativação do sistema imunológico, levando à produção de autoanticorpos, como o fator reumatoide (FR) e os anticorpos antipeptídeos citrulinados cíclicos (anti-CCP)(DAI et al., 2021). Esses autoanticorpos formam complexos imunes que se depositam nas articulações, ativando o complemento e recrutando células inflamatórias. Os linfócitos T ativados no local produzem citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa

(TNF- α) e interleucinas (IL-1 β e IL-6), que promovem o recrutamento e ativação de fibroblastos sinoviais (FREITAS et al., 2004; WITHROW et al., 2016). IL-1 β estimula estes fibroblastos secretarem proteínases, como a Metaloproteinases de matriz 3 (MMP3) que degradam a cartilagem articular e o osso, causando desgaste membrana sinovial, formando o "pano sinovial", uma estrutura invasiva que contribui ainda mais para a destruição articular (AINOLA et al., 2005).

Diversos estudos têm mostrado que a transferência de miRNAs mediada por pequenas VEs pode ser crucial no processo patológico da AR (CHEN et al., 2018; WITHROW et al., 2016). Entre os diversos miRNAs já associados com o curso da AR, o miR-146a têm atraído atenção (BEG et al., 2017; ERFAN et al., 2021; NAKASA et al., 2011). Um estudo mostrou que o miRNA 146a presente em VEs de tecido sinovial de pacientes com AR estão presentes em níveis elevados quando comparados com tecido sinovial de indivíduos controle. O miR-146a regula negativamente o fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6) e a quinase 1 associada ao receptor de IL-1 (IRAK1) para suprimir a inflamação e diminuir a produção de TNF- α na AR (WITHROW et al., 2016). Quando ativada, essa quinase desencadeia uma série de fosforilações que por consequência leva à ativação e translocação nuclear do NF-kappa-B (LIU; PARK; ABRAHAM, 2008). Uma vez no núcleo o NF-kappa-B estimula a expressão de genes em células imunocompetentes. A ativação desta via induz a transcrição de genes que codificam citocinas (TNF, IL-1B e IL-2, IL-6 e IL-12), moléculas de adesão como (VCAM e ICAM) e enzimas como NOS-II (óxido nítrico sintase induzida) e COX (ciclooxigenase), além de regular a proliferação, apoptose, morfogênese e diferenciação celular (LIU et al., 2017).

Além das manifestações articulares, a AR pode ter manifestações sistêmicas, incluindo envolvimento cardiovascular, pulmonar e ósseo. A doença intersticial pulmonar (DPI) é a forma mais comum de acometimento pulmonar na AR (ESPOSITO et al., 2019). A DPI refere-se a um variado grupo de condições em que ocorre infiltração das paredes alveolares acompanhada de um processo inflamatório e/ou fibrótico, que pode evoluir para a restrição da função pulmonar por espessamento alveolar e consequente comprometimento das trocas gasosas, além disso seu curso natural é caracterizado por fibrose crônica, progressiva e irreversível (COTTIN et al., 2018). Além do envolvimento na AR, estudos recentes têm indicado que VEs também desempenham importante papel na patogênese da fibrose pulmonar contribuindo para

a proliferação anormal de fibroblastos pulmonares, deposição de matriz extracelular e aumento da resistência a apoptose em células imunocompetentes, além de muitos outros (MARTIN-MEDINA et al., 2018; WOELLER et al., 2019).

Um dos mecanismos pelo qual VEs podem estar envolvidas no curso da fibrose pulmonar na DPI é a diminuição dos níveis de miRNAs antifibróticos reguladores da via da TGF- β encontrado em VEs secretados por células epiteliais pulmonares lesionadas (FUJITA et al., 2015). Os membros da família de fatores de crescimento do fator de crescimento transformador TGF- β desempenham um papel crucial no desenvolvimento do tecido, homeostase e reparo regulando negativamente a proliferação, diferenciação e ativação de todas as células imunes (TRAVIS; SHEPPARD, 2015). A ativação normal da via de sinalização do fator- β de crescimento possui efeito pleiotrópico, que inclui diminuição da apresentação de antígeno e da função efetora de macrófagos, diminuição da maturação e apresentação de antígenos por células dendríticas, diminuição da ativação e aumento do apoptose de células T, diminuição na proliferação de células TCD8+ e TCD4+. Tais efeitos caracterizam a ativação da via como imunossupressora e restaurativa da homeostasia dos tecidos (TRAVIS; SHEPPARD, 2015). Porém a perda de membros da sinalização de TGF- β por mutações somáticas ou eventos epigenéticos, como metilação do DNA ou regulação por miRNA transferido por VEs, pode afetar o processo de sinalização levando a distúrbios autoimunes e inflamatórios (KUBICZKOVA et al., 2012). Já foi demonstrado que miRNAs associados a pequenas VEs de tecido lesado têm níveis mais baixos de miRNAs antifibróticos que participam da regulação da via TGF β . Em particular, miR-144-3p, miR-142-3p miR-34-b e miR-503-5p são esgotados em VEs derivadas de células epiteliais pulmonares lesionadas (FUJITA et al., 2015). Também foi relatado que a ativação da via TGF- β na DPI estimula fibroblastos humanos e de camundongo para secretar VEs enriquecidas em ligante de morte celular programada 1 (PD-L1). PD-L1 associado a VEs promove ainda mais a ativação e proliferação de fibroblastos pulmonares provocando a deposição de colágeno e fibrose característica da DPI ((XU et al., 2023).

Com isso fica claro que as pequenas VEs e seus miRNAs desempenham um papel significativo na patogênese e progressão da AR assim como da DPI associada, regulando processos pró e anti-inflamatórios, fibroproliferativos pulmonares, ativando vias patogênicas em tecido saudável. Estes achados sugerem que pequenas VEs de

amostras biológicas podem dar indicativos do estado fisiopatológico do organismo justificando sua investigação como substratos para busca de biomarcadores de diagnóstico e prognóstico para o nível do comprometimento pulmonar em doenças como a DPI-AR.

ISOLAMENTO DE VES

Apesar disso, a purificação de pequenas VEs com reduzida presença de VEs maiores e impurezas representa um desafio significativo para sua utilização como biomarcador, pois contaminantes podem obscurecer ou distorcer os resultados experimentais, levando a interpretações errôneas (CVJETKOVIC; LÖTVALL; LÄSSER, 2014). Além disso, diferentes tipos de VEs como pequenas e grandes VEs, possuem carga e funções biológicas distintas. Assim, a separação adequada entre esses subtipos pode ser importante para estudos focados em aplicações terapêuticas ou de diagnóstico (COLLINO et al., 2017; MINCIACCHI; FREEMAN; DI VIZIO, 2015).

Desde 2018 as principais técnicas de isolamento disponíveis têm sido classificadas quanto a sua recuperação e especificidade (Tabela 1). Recuperação refere-se à capacidade de um método isolar a quantidade máxima possível de vesículas extracelulares presentes na amostra original (THÉRY et al., 2018). Em outras palavras, indica o rendimento do processo. Uma alta recuperação garante que a maioria das vesículas foi obtida, o que é vital para análises quantitativas e qualitativas subsequentes. Especificidade, por outro lado, refere-se à capacidade do método isolar vesículas extracelulares com precisão, minimizando a coleta de outras partículas ou contaminantes presentes na amostra (THÉRY et al., 2018) (THÉRY et al., 2018). Uma alta especificidade assegura que o que foi isolado representa predominantemente vesículas extracelulares e não outras estruturas ou moléculas. Ambos os parâmetros, recuperação e especificidade, são fundamentais para garantir a confiabilidade dos resultados e a eficácia das aplicações subsequentes das vesículas extracelulares isoladas (THÉRY et al., 2018).

Tabela 2 - Princípios e classificação dos métodos mais comuns para isolamento de VEs

Método/princípio	Tempo	Classificação de acordo com MISEV2018
------------------	-------	---------------------------------------

1) <i>Ultracentrifugação diferencial</i> , etapas com força crescente separam as VEs de contaminantes	140–600 min	Recuperação intermediária / especificidade intermediária
2) <i>Ultracentrifugação de gradiente de densidade</i> , gradiente de densidade de sacarose ou iodixanol	250 min–2 dias	Recuperação intermediária / especificidade intermediária
3) <i>Cromatografia de exclusão de tamanho</i> , colunas preenchidas com polímeros com poros heterogêneos	1 ml/min + lavagem da coluna	Recuperação intermediária / especificidade intermediária
4) <i>Ultrafiltração</i> , nanomembrana ou filtros com diâmetro de poro de 0,8–0,1 μm	Em torno de 130 min	Alta recuperação / baixa especificidade
5) <i>Kits comerciais para precipitação com polímeros (exoquick, TEI e Norgen)</i> , polímeros e íons favorecem a separação de partículas insolúveis	45–65 min (às vezes durante a noite)	Alta recuperação / baixa especificidade
6) <i>Uso de anticorpos para receptores VE</i> , em particular, tetraspaninas (CD9, CD63, CD81), TSG101, epcam	Em torno de 240 min	Baixa recuperação / alta especificidade

Fonte: Adaptado de (THÉRY et al., 2018)

Considerando a diversidade de técnicas disponíveis, a escolha do método ótimo muitas vezes é ditada pela natureza da amostra, pelo subtipo de VE em foco e pelo objetivo final do isolamento, seja ele de pesquisa ou aplicação clínica. Em cenários ideais, a combinação de métodos pode ser adotada, buscando equilibrar rendimento e pureza, assegurando assim a integridade e funcionalidade das VEs isoladas (THÉRY et al., 2018).

Cada destas técnicas apresenta seu próprio conjunto de vantagens e limitações (Tabela 3). A ultracentrifugação, muitas vezes considerada o padrão-ouro, permite a separação das VEs de uma vasta gama de amostras, embora possa ser demorada e, em alguns casos, resultar na co-isolação de contaminantes ou danificar as vesículas

devido às altas forças centrífugas. Uma variação deste método, a ultracentrifugação por gradiente de densidade, visa melhorar a pureza das VEs, no entanto, é ainda mais complexa e demorada. Por outro lado, a filtração, que retém VEs através de membranas de poros definidos, destaca-se pela rapidez, embora possa resultar em baixos rendimentos e na presença de contaminantes de tamanho semelhante. Outros métodos exploram a especificidade bioquímica. A imunossorção, por exemplo, utiliza anticorpos direcionados a proteínas específicas das VEs, garantindo uma captura mais seletiva, mas podendo omitir vesículas de populações heterogêneas. A precipitação com polímeros, uma técnica simples que implica na adição de polímeros à amostra, pode, contudo, co-isolar outras partículas e proteínas.

Tabela 3 - Principais vantagens e limitações dos métodos mais comuns para isolamento de VEs

Método	Vantagens	Limitações	Referências
Ultracentrifugação diferencial	Custo (tubos podem ser reaproveitados); isolamento de grandes volumes; ausência de produtos químicos adicionais; pode concentrar a amostra em pequenos volumes;	Necessidade de equipamento de alto custo; tempo elevado; impurezas, força excessiva pode causar danos às VEs; requer padronização de acordo com o tipo de rotor, força e viscosidade da amostra;	(ABRAMOWICZ; WIDLAK; PIETROWSKA, 2016; LIANGSUPREE; MULTIA; RIEKKOLA, 2021; MOMEN-HERAVI et al., 2013; NORDIN et al., 2015; THÉRY et al., 2006, 2018)
Ultracentrifugação de gradiente de densidade	Separação de frações homogêneas; diminui o dano as VEs; isolamento de grandes volumes;	Complexidade; tempo elevado; perda de amostra; não consegue separar grandes vesículas com taxas de sedimentação e densidade semelhantes; contaminação com partículas usadas no gradiente;	(DEUN et al., 2014; TAURO et al., 2012; TAYLOR; SHAH, 2015; THÉRY et al., 2018)
Cromatografia de exclusão de tamanho	Reprodutibilidade e pureza; preserva a integridade das VEs; alta sensibilidade; grande quantidade de proteínas exossomais; previne a agregação de VEs; insensível à alta viscosidade das amostras; sem	Limitações no volume da amostra e número de amostras; equipamento especializado de alto custo; complexidade; co-isolamento de grandes agregados de proteínas e lipoproteínas; p	(ABRAMOWICZ; WIDLAK; PIETROWSKA, 2016; LEE et al., 2022; LIANGSUPREE; MULTIA; RIEKKOLA, 2021; LOZANO-RAMOS et al., 2015; THÉRY et al., 2018)

	produtos químicos adicionais;		
Ultrafiltração	Procedimento simples que permite o processamento simultâneo de muitas amostras; não requer aparelhos ou produtos químicos adicionais; sem limitações no volume da amostra;	Entupimento do filtro; perda de amostra; contaminação (proteínas); deformação de VEs; pequena quantidade de proteínas exossomais; extrusão das VEs;	(LIVSHITS et al., 2015; LOBB et al., 2015; TAURO et al., 2012; TAYLOR; SHAH, 2015; THÉRY et al., 2018)
Kits comerciais para precipitação com polímeros	Procedimento simples; preservação da integridade do VE; não há necessidade de equipamentos adicionais; pH próximo da faixa fisiológica; altas concentrações de íons;	Custo (especialmente para amostras diluídas, como urina); baixa reprodutibilidade; impurezas e retenção de polímero; baixo teor de proteínas exossomais	(LEE et al., 2022; LOBB et al., 2015; THÉRY et al., 2018)
Uso de anticorpos para receptores VE	Pureza e alta seletividade, permite extrair VEs de tipos celular específico	Alta seletividade, custo, disponibilidade de anticorpos; dificuldades com separação de moléculas e análise de vesículas intactas (tampões de eluição podem danificar a atividade funcional de EV); ligação não específica	(LIANGSUPREE; MULTIA; RIEKKOLA, 2021; PALMA et al., 2022; TAURO et al., 2012; THÉRY et al., 2018)

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

A ultracentrifugação é a técnica mais popular para a obtenção de VEs a partir de cultura de células e fluidos biológicos devido à sua versatilidade e baixo custo relativo (WILLIAMS et al., 2023). Ao longo das últimas décadas diferentes protocolos para isolamento de VEs baseados em ultracentrifugação diferencial foram publicados o que contribuiu significativamente para a expansão da área (NORDIN et al., 2015). Entretanto, a popularização dos protocolos levou a generalização das condições aplicadas para isolamento de VEs presentes em diferentes fluidos biológicos sem considerar os diferentes tipos de rotores e tubos utilizados (LÖTVALL et al., 2014). Evidências recentes mostraram que a generalização dos protocolos pode levar a perda da eficiência da extração, degradação das VEs e extração excessiva de contaminantes (CVJETKOVIC; LÖTVALL; LÄSSER, 2014; SERRANO-PERTIERRA et al., 2019). Adicionalmente, os últimos 5 anos foram marcados por um período de

grande avanço nos conhecimentos sobre as subclasses de VEs em parte impulsionada pela normalização dos termos propostos em 2018 pela Sociedade Internacional de Vesículas extracelulares (ISEV) (THÉRY et al., 2018).

Neste contexto, o isolamento eficiente de pequenas VEs tem recebido um lugar de destaque, entretanto, há uma escassez de protocolos baseados em ultracentrifugação diferencial específicos para purificação exclusivamente destas pequenas VEs em diferentes fluidos biológicos como urina e plasma.

HIPÓTESE

2.5 A ultracentrifugação diferencial permite obter pequenas VEs funcionais que podem ser utilizadas como substrato biológico para a busca de novos marcadores biológicos.

3 OBJETIVO GERAL

Estabelecer um método de isolamento de pequenas VEs funcionais presentes em plasma e urina humano baseado em ultracentrifugação diferencial.

Objetivos específicos

Padronizar um método de extração de VEs de fluidos biológicos baseado na ultracentrifugação diferencial.

Quantificar o tamanho de VEs pela técnica de dispersão dinâmica de luz dispersão.

4 Identificar a funcionalidade do cargo das VEs mediante a quantificação e proteínas totais, conteúdo de RNA total, e quantidade relativa de mRNA de DHFR.

4.1

MATERIAIS E MÉTODOS:

MATERIAL

NORMAS ÉTICAS

As amostras de sangue e urina utilizadas para realização testes e para a validação dos protocolos metodológicos foram coletadas no Hospital Universitário

Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa (HU-UFSC) Catarina, Florianópolis, Santa Catarina. As amostras foram coletadas a partir de três voluntários saudáveis com idade entre 21 e 31 anos, sendo dois do sexo masculino e um do sexo feminino. Após a coleta das amostras os tubos contendo o material biológicos foram transportados acondicionados em gelo e protegidos da luz para o Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo (LABOX). As amostras foram processadas dentro de um período de 15 minutos.

Amostras de urina de indivíduos afetados por DPI-AR sem identificação foram coletadas na Universidade de Campinas, Campinas, SP. As amostras foram mantidas por aproximadamente um ano sob refrigeração - 80 °C até serem transportadas a -20 °C. No LABOX foram mantidas a - 80 °C até a análise.

COLETA E PREPARO DO MATERIAL BIOLÓGICO

4.2

As amostras de plasma utilizadas para testes e padronização dos protocolos foram coletadas em tubos de 4 mL a vácuo contendo anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético. Após a coleta no HU-UFSC os tubos contendo a amostra biológica foram transportados até o LABOX onde foram centrifugados a 300 x g por 10 min a temperatura ambiente para separação do plasma. O plasma resultante foi armazenado em alíquotas de 1 mL em tubos de centrifugação e mantidos a - 80 °C até a extração das VEs. Amostras de urina com duas horas de retenção foram coletadas em frasco apropriado e armazenadas em alíquotas de 2 mL em tubos que foram acondicionados a - 80 °C até a extração das VEs. As amostras de urina coletadas na UNCAMP, foram armazenadas em alíquotas de 1 mL em tubos criogênicos e mantidos a - 80 °C por aproximadamente um ano até o envio para o LABOX, onde permaneceram por 6 meses até a extração das VEs a - 80 °C.

4.3

PROCEDIMENTO E MATERIAIS UTILIZADOS NO ISOLAMENTO DE VES DE PLASMA E URINA

No momento da extração, os tubos de congelamento contendo alíquotas de plasma e urina congelados foram mantidas sob gelo até o descongelamento completo. Os tubos foram levemente homogeneizados, adicionados de solução de cloreto sódico (NaCl) 0,9 % até completar um volume final de 2 mL. A seguir os tubos contendo as amostras diluídas foram submetidos a etapas de centrifugação de baixa rotação a 4

°C em uma centrifuga refrigerada NT805 (Nova Técnica, Brasil). Após as centrifugações, o sobrenadante foi cuidadosamente coletado sem perturbar o pellet e transferido para um tubo falcon de 15 mL. O tubo foi preenchido até 11 mL com solução de NaCl 0,9% determinando uma segunda diluição 1:10 (V/V). A solução foi aspirada com uma seringa de 20 mL equipada com agulha hipodérmica descartável 25 x 0,70 mm estéril. A agulha foi substituída por um filtro Millex-gv com poro de 0,22 µm de membrana hidrofílica de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Merck, Millipore, Darmstadt, Alemanha) e a solução foi filtrada para um tubo de polipropileno de 12,5 mL com fundo arredondado (Beckman Coulter Life Sciences, Estados Unidos). Os tubos foram submetidos a diferentes condições de ultracentrifugações seriadas em uma ultracentrífuga Optima XE-100 (Beckman Coulter Life Sciences, Estados Unidos) empregando um rotor sw41Ti. O pellet gerado nas etapas de ultracentrifugação foi aspirado e solubilizado em duas alíquotas de 50 µL de solução de NaCl 0,9 % que foram armazenadas em tubo criogênico de 300 µL livre de RNAase a -20 °C para posterior análise.

MÉTODOS

4.4 ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (DLS)

O diâmetro hidrodinâmico médio (Z-average) e índice de polidispersão e pico de maior intensidade referentes à distribuição de tamanhos das partículas em suspensão foram obtidos no equipamento Zetasizer nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido) que tem como fundamento o espalhamento dinâmico de luz (DLS). Simplificadamente, 10 µL de suspensão de VEs foram diluídos 1:2 (V/V) em solução de NaCl 0,9 % diretamente numa cubeta de quartzo de 45 µL de volume. O líquido foi lentamente homogeneizado com a pipeta e inserido no aparelho. As medições foram realizadas com um laser Hélio/Neônio (633 nm) em um ângulo de detecção de 173 ° a 25 ° C.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A MET foi usada para visualizar e confirmar a morfologia e o tamanho das VEs na suspensão. As amostras diluídas 1:1 (V/V) foram fixadas em paraformaldeído 2 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 30 min. Um grid de cobre de 300 mesh

revestido com filme de carbono amorfo foi depositado sobre 10 µL da suspensão por 20 min. Em seguida o grid foi depositado sob uma gota de glutaraldeído 1 % por 10 min e lavado com 8 gotas de água destilada. O grid foi depositado por 5 minutos no escuro sobre uma gota de acetato de uranila 5 % filtrada com filtro de 0,22 µm. Após 48 h os grids foram analisados sob uma tensão de aceleração de 50 kV em um microscópio eletrônico de transmissão JEM-1011 (Jeol LTD, Japão). Estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Microscopia Central (www.lcme.ufsc.br).

QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA

4.6 A quantidade de proteínas nas VEs foi medida pelo ensaio de Lowry em amostras submetidas ao protocolo mais aprimorado para estimar quantitativamente a eficiência da purificação. Simplificadamente 50 µL da suspensão de VEs foi diluída 1:1 (V/V) em solução de NaCl 0,9 % no caso do plasma e não diluídas no caso da urina e em seguida submetida a reação de Lowry (REFERÊNCIA). A absorbância foi medida a 650 nm em um leitor de placas Infinite M200 (Tecan, Suíça).

4.7

EXTRAÇÃO DE ÁCIDO RIBONUCLEICO (RNA) TOTAL

O RNA total foi isolado de VEs de plasma e urina de indivíduos saudáveis e de urina de indivíduos afetados por DPI-AR utilizando o método TRIzol®/clorofórmio/isopropanol. Após homogeneização das amostras em 0,5 mL do reagente TRIzol® a separação da fase aquosa foi realizada pela adição de 0,2 mL de clorofórmio (Merck, Whitehouse Station, NJ, Estados Unidos), seguido pela centrifugação (12.000 x g) por 15 min a 4 °C. Ao término da centrifugação a fase aquosa foi coletada (sobrenadante) em tubos novos devidamente identificados, sendo desprezada a fase orgânica junto ao tubo. Em seguida o RNA foi precipitado pela adição de 0,5 mL de isopropanol absoluto gelado (Merck, Whitehouse Station, NJ, Estados Unidos). Após a incubação por 10 min a temperatura ambiente as amostras foram novamente centrifugadas (12.000 x g por 15 min). Ao término da centrifugação o isopropanol foi descartado por inversão e o RNA precipitado (*pellet*) foi lavado com etanol 75 %. A quantidade e pureza do RNA extraído foi estimada em aparelho de espectrofotometria após sua suspensão em 50 µL de água tratada com dietil

pirocarbonato, utilizando as razões de densidade óptica 260/280 e 260/230 (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience, EUA). As amostras contendo o extraído de RNA total foram armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (CDNA)

4.8 O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir da reação de transcrição reversa do RNA total extraído de cada amostra de VEs na presença de 2 U da enzima transcriptase reversa (Kit Superscript II, Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Para o procedimento foram seguidas as instruções recomendadas pelo fabricante. A primeira fita de cDNA foi gerada em reação com volume final de 20 μL contendo 500 mM de dNTP, 25 mg/mL de OLIGO dT, 1X solução tampão de primeira fita, 40 U de inibidor de RNase, 10 mM de DTT pela enzima Superscript II. Inicialmente, a mistura de RNA, água e iniciador foi incubada a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min para promover a abertura de possíveis estruturas secundárias. Em seguida a reação de síntese aconteceu durante 50 min a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ com posterior inativação enzimática a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min. Após o término da reação o cDNA sintetizado foi diluído para concentração final de 100 ng/ μL e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.9

QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (RT-QPCR)

Para o estudo do padrão de expressão gênica as reações foram realizadas com iniciadores específicos e tiveram como controle endógeno o gene *RNU6*. Todas as reações tiveram volume final de 10 μL ; contendo 5 μL de SYBR Green I Master, 0,4 mM de iniciadores específicos, 1 μL do cDNA sintetizado e água Milli-Q livre de RNAase até o volume de 5 μL . A quantidade relativa dos transcritos foi determinada pelo método limiar crítico comparativo $2^{-\Delta\text{Ct}}$. Neste método, a média do Ct do gene alvo foi subtraída pela média do Ct dos controles utilizados, resultando em um ΔCt . Para o cálculo da expressão foi substituído o valor de ΔCt obtido na fórmula $2^{-\Delta\text{Ct}}$. Os valores finais foram apresentados como razão entre a expressão do gene de interesse *DHFR* em relação à média da expressão gênica do *RNU6* utilizado como normalizador.

ANÁLISES DOS DADOS

Os dados de distribuição de tamanho obtidos por DLS foram descritos como médias das triplicatas \pm o desvio padrão. Devido ao caráter exploratório da padronização dos protocolos não foram realizados testes estatísticos ou de variância entre os protocolos. O teste piloto de expressão genica de *DHFR* não possuía n amostral relevante para a realização de testes estatísticos.

RESULTADOS

PADRONIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO PARA O ISOLAMENTO DE VES A PARTIR DOS FLUÍDOS BIOLÓGICOS, PLASMA E URINA

5

Protocolo T1

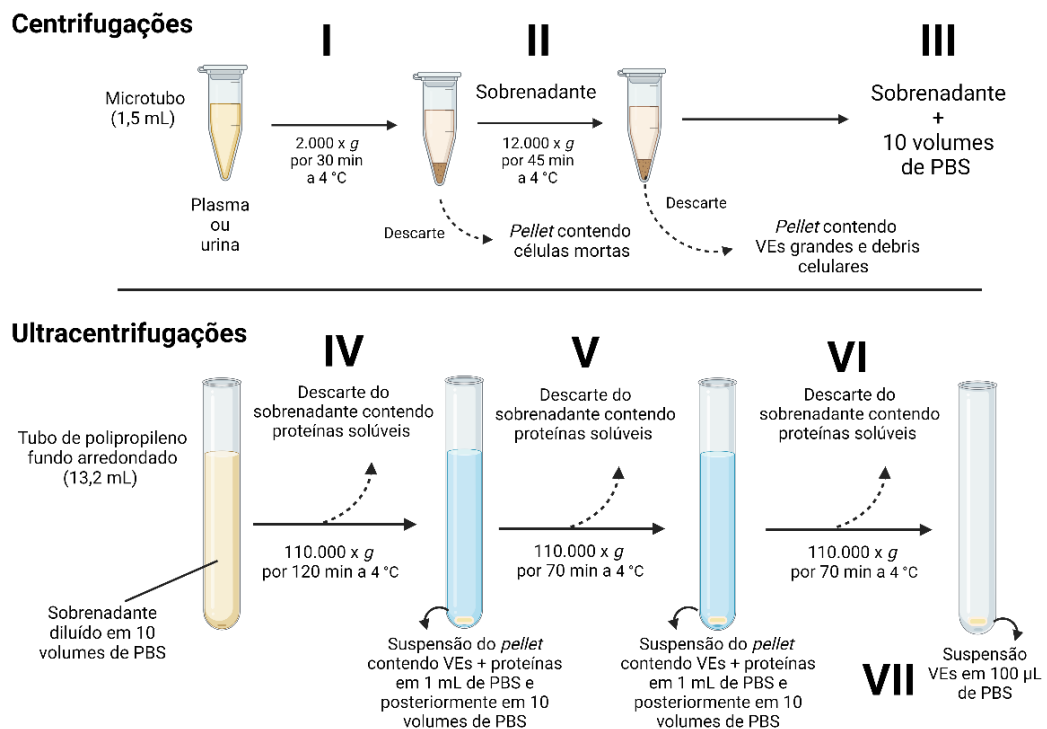
5.1

Para estabelecer um método para a separação de VEs a partir de fluídos biológicos se teve como ponto de partida protocolos previamente publicados por grupos de pesquisa com reconhecida experiência na área. O primeiro protocolo que foi testado, aqui chamado de **T1**, foi o publicado por Clotilde Théry, uma das pioneiras na pesquisa de VEs no mundo (THÉRY et al., 2006). Para este teste foram utilizadas duas alíquotas de plasma humano de 500 μ L (PL1 e PL2) e duas alíquotas de urina humana de 500 μ L (U1 e U2). A metodologia envolveu o uso de duas centrifugações e três ultracentrifugações para separar VEs de outros componentes celulares, subcelulares e biomoléculas presentes nas matrizes.

Como indicado na Figura 3, as amostras de plasma e urina foram centrifugadas a 2.000 x g por 30 min a 4 °C (Figura 3; passo I). Essa etapa permitiu separar células mortas do sobrenadante o qual foi posteriormente transferido para novos microtubos. O sobrenadante foi centrifugado a 12.000 x g por 45 min a 4 °C e o pellet contendo *debris* celulares e proteínas agregadas foi descartado (Figura 3; passo II). A seguir, o sobrenadante foi diluído 1:10 V/V PBS e transferido para tubos de polipropileno de 13,2 mL com fundo arredondado para submeter as amostras pré-processadas a ultracentrifugação (Figura 3; passo III). O sobrenadante diluído foi agora ultracentrifugado a 110.000 x g por 120 min a 4 °C, e a seguir o pellet contendo as VEs foi suspenso em 1 mL de PBS, e em seguida foi diluído 1:10 V/V PBS. Neste caso, o sobrenadante foi descartado (Figura 3; passo IV). O sobrenadante diluído foi agora ultracentrifugado a 110.000 x g por 120 min a 4 °C, e a seguir o *pellet* contendo as VEs foi suspenso em 1 mL de PBS e posteriormente foi diluído 1:10 V/V do mesmo solvente. Nesta etapa, o sobrenadante foi descartado. O pellet diluído foi a seguir novamente ultracentrifugado a 110.000 x g por 70 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado por inversão e o *pellet* contendo VEs e proteínas foi suspenso em 1 mL de PBS em um novo tubo de ultracentrifugação (Figura 3; passo V). No mesmo tubo, a amostra foi diluída 1:10 V/V em PBS e centrifugada a 110.000 x g por 70 min a 4 °C (Figura 3; passo VI). O sobrenadante foi descartado por inversão e o *pellet* foi

suspensão em 100 μL de PBS e armazenado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ para posterior análises (Figura 3; passo VII).

Figura 3 - Passos metodológicos empregados no protocolo teste 1 (T1) para o isolamento de vesículas extracelulares (VEs) a partir de fluidos biológicos humanos.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Os números romanos I a VII indicam os passos. **Passo 1:** Amostras de plasma e urina foram centrifugadas a $2.000 \times g$ por 30 min a $4\text{ }^\circ\text{C}$, o sobrenadante foi armazenado e o pellet descartado. **Passo 2:** O sobrenadante foi centrifugado a $12.000 \times g$ por 45 min a $4\text{ }^\circ\text{C}$ e o pellet foi descartado. **Passo 3:** O sobrenadante foi diluído 1:10 V/V em PBS e transferido para tubo de ultracentrifugação. **Passo 4:** O tubo foi ultracentrifugado a $110.000 \times g$ por 120 min a $4\text{ }^\circ\text{C}$, o sobrenadante foi descartado e o pellet contendo as VEs foi suspenso em 1 mL e depois foi diluído 1:10 V/V em PBS. **Passo 5:** O tubo foi ultracentrifugado a $110.000 \times g$ por 70 min a $4\text{ }^\circ\text{C}$, o sobrenadante foi descartado e o pellet contendo as VEs foi suspenso em 1 mL e depois foi diluído 1:10 V/V em PBS em um novo tubo. **Passo 6:** O tubo foi ultracentrifugado a $110.000 \times g$ por 70 min a $4\text{ }^\circ\text{C}$, o sobrenadante foi descartado. **Passo 7:** O pellet final contendo as VEs foi suspenso em 100 μL de PBS e armazenado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ para posterior análise. Abreviações: PBS: Tampão fosfato salino.

A distribuição de tamanho das VEs encontradas aplicando o protocolo T1 foi avaliado por DLS. Esta técnica mede a variação de intensidade de luz espalhada gerada pelo movimento browniano de partículas em uma suspensão sob a incidência de um laser. O uso de DLS permite mensurar parâmetros como, o diâmetro médio hidrodinâmico das partículas presentes (medida de *Z-Average*), além de informar o

quão polidispersa a suspensão é (medida de Pdl), também mostra o tamanho de partícula mais frequente encontrada na amostra (pico de maior intensidade).

Para submeter a suspensão a DLS, 15 μL de suspensão do pellet contendo as VEs foi diluído 1:2 V/V em PBS em uma cubeta de quartzo de pequeno volume (45 μL). A cubeta foi inserida em um aparelho que mensura o DLS chamado de Zetasizer Nano (Malvern Panalytical Ltd; Malvern; Reino Unido) e após um minuto de estabilização foram realizadas as leituras. A Tabela 4 mostra o resultado das leituras de DLS para VEs de plasma ($n=2$) e urina ($n=2$), encontradas aplicando o protocolo **T1**. As leituras mostraram *Z-Average* similar para a mesma matriz e diferente entre matrizes. Conforme a Tabela 1, as partículas encontradas no plasma apresentaram *Z-average* entre $31,2 \pm 0,3$ nm e $446 \pm 114,2$ nm, e na urina entre $187,2 \pm 26,2$ e $352 \pm 40,6$ nm. De acordo com as últimas diretrizes sobre as definições e classificações de VEs (LÖTVALL et al., 2014; THÉRY et al., 2018) (ver descrição na página 21 desta dissertação), as VEs isoladas de plasma humano aplicando o protocolo T1 possuem diâmetro inferior a 200 nm portanto correspondem a dimensões de pequenas VEs. Por outro lado, as VEs que foram isoladas de urina humana são consideradas como VEs médias (> 200 nm). Os valores de Pdl encontrados em T1 variaram em uma faixa entre 0,4 a 1, sendo consideradas suspensões polidispersas. Esses valores podem indicar que foram extraídas partículas com tamanho muito variável, ou que a amostra não apresentava estabilidade (as partículas podem agregar, podem decompor ou podem solubilizar). O tamanho médio do pico de maior intensidade representa o tamanho mais frequente dentre o conjunto total de partículas analisadas. Sua comparação com o valor de *Z-Average* pode indicar quanto o tamanho médio se distancia do tamanho mais frequente e essa comparação oferece uma noção de faixas de tamanho, distribuição e abundância dos grupos isolados. O tamanho médio do pico de maior intensidade para plasma variou entre 3,7 e 6,5 nm para amostra PI1 e entre 41,9 e 54,8 nm para a amostras PI2. Para urina variou entre 236,1 e 301,4 para amostra U1 e 369,5 e 1175,0 nm para amostras U2. Os valores de *Z-Average* e tamanho médio do pico de maior intensidade mostrados na Tabela 1, não foram semelhantes em alguns casos como PI1 e U2 que apresentaram *Z-Average* respectivamente maior e menores que tamanho médio do pico de maior intensidade. Isso pode indicar a presença agregados de grandes dimensões, porém pouco abundantes, formados a partir de partículas de dimensões muito pequenas no caso de PL1 e médias no caso de U2. Por outro lado, as amostras PI2 e U1 apresentaram

valores similares. Outro resultado interessante é o aumento do tamanho médio visto no pico de maior intensidade ao longo das triplicatas da amostra U2. Este tipo de resultado que mostra aumento das dimensões a cada leitura, pode indicar que novos grupos de agregados estão se formando, sugerindo que a amostra não estava estável.

Conclusão da aplicação do protocolo T1: Este primeiro teste experimental T1 não permitiu realizar o isolamento exclusivo de pequenas VEs a partir de amostras de plasma e urina. As diferentes condições de centrifugação e as sucessivas e numerosas etapas de suspensão de *pellets* podem ter comprometido a integridade física das vesículas, resultando em suspenções de VEs pouco estáveis, que podem ter agregado gerando altos índices de polidispersão.

Tabela 4 - Caracterização do tamanho das vesículas extracelulares (VEs) isoladas pelo protocolo teste 1 (T1) analisadas pela dispersão dinâmica de luz (DLS)

Amostras biológicas humanas	Z-Average (nm)	Média \pm desvio padrão (nm)	Pdl	Tamanho médio do pico de maior intensidade (nm)
PI1	554,5		1,00	4,4
PI1, duplicata	327,5	446,2 \pm 114,2	0,49	6,5
PI1, triplicata	456,6		0,52	3,7
PI2	31,6		0,41	41,9
PI2, duplicata	31,1	31,2 \pm 0,3	0,40	54,8
PI2, triplicata	31,0		0,39	43,8
U1	211,4		0,43	301,4
U1, duplicata	159,3	187,2 \pm 26,2	0,48	236,1
U1, triplicata	191,0		0,40	248,6
U2	345,6		0,61	369,5
U2, duplicata	314,9	352,0 \pm 40,6	0,69	846,0
U2, triplicata	395,5		0,84	1175,0

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

A tabela 4 mostra os tamanhos de partículas das VEs isoladas aplicando o protocolo teste 1 (T1). Amostras de plasma (PI) e de urina (U) foram submetidas a DLS e o diâmetro hidrodinâmico médio (*Z-average*), o índice de polidispersão (Pdl), tamanho médio do pico de maior intensidade foram obtidos no equipamento Zetasizer nano ZS. As medições foram realizadas em triplicata a 25 °C (para detalhes ver M&M).

Protocolo T2

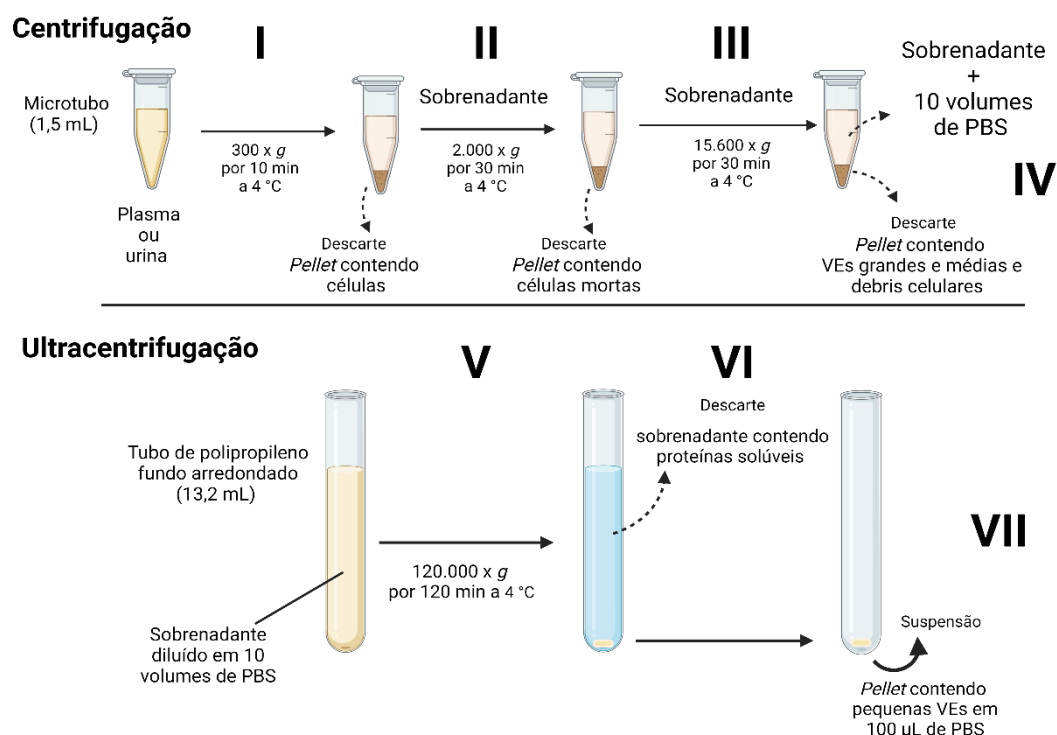
A seguir foram adaptadas algumas etapas do protocolo **T1** com o intuito de isolar soluções de VEs mais estáveis, com tamanho homogêneo e comparável com o apresentado por pequenas VEs. Para introduzir as modificações descritas a seguir foi utilizada como referência um protocolo descrito por um grupo de pesquisadores do Mitchell Cancer Institute, University of South Alabama que nos últimos anos tem contribuído ativamente para o entendimento do papel de vesículas extracelulares na fisiopatologia e escape imunológico do câncer de pâncreas e de mama. Em um trabalho de comparação entre métodos de isolamento os autores apresentam um protocolo com uma etapa de centrifugação extra e duas etapas ultracentrifugação a menos do que as etapas vistas no protocolo **T1** (PATEL et al., 2019). Menos ultracentrifugações implicam em menos etapas de suspensão do *pellet*, possivelmente resultando em menor risco de formação de agregados de VEs e perda de material.

Para testar o protocolo **T2** (Figura 4) foram utilizadas duas alíquotas de plasma de 500 µL (PI3 e PI4) e duas alíquotas de urina de 500 µL (U3 e U4). Como indicado na Figura 4, as amostras de plasma e urina foram centrifugadas a 300 x g por 10 min a 4 °C (Figura 4; passo I). Essa força centrífuga foi utilizada para separar células do sobrenadante o qual foi posteriormente transferido para novos microtubos de 1,5 mL. O sobrenadante foi centrifugado a 2.000 x g por 30 min a 4 °C e o pellet contendo células mortas foi descartado (Figura 4; passo II). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e centrifugado a 15.600 x g por 30 min a 4 °C. O pellet, possivelmente contendo VEs médias e grandes e proteínas agregadas, foi descartado (Figura 4; passo III). O sobrenadante foi diluído 1:10 v/v em PBS e transferido para tubos de ultracentrifugação. O sobrenadante diluído foi agora ultracentrifugado a 120.000 x g por 120 min a 4 °C (Figura 4; passo IV). O sobrenadante foi descartado (Figura 4; passo V). O *pellet* contendo pequenas VEs foi suspenso em 100 µL de PBS e armazenado a - 20 °C para posterior análises (Figura 4; passo VI).

A suspensão do pellet contendo as VEs obtidas em T2 foi submetida a DLS o resultado é mostrado na tabela 5. É possível observar distribuições de partículas em

várias faixas de tamanho diferentes que vão de perto de 200 até acima de 1000 nm. As distribuições médias de tamanho encontradas para plasma foram 214,1 e 1846 nm, e para urina 444,2 e 2308 nm com tamanhos dentro e fora da faixa de tamanho que classifica para VEs. Os valores de Pdl na tabela 5 indicam que a suspensão foi moderadamente polidispersa, ou seja, o protocolo foi pouco seletivo e permitiu a extração de grupos de vesículas com grande variação em tamanho e até partículas acima do tamanho dos comumente descritos para VEs. Os valores de tamanho médio do pico de maior intensidade encontrados para T2 ficaram entre de 380 a 740 nm para a PI3, e 305 a 410 nm para a PI4. Para a urina ficou entre 694 a 1131nm para a amostra U3, e 244 a 795 nm para a U4. Assim como em T1, os valores de tamanho médio do pico de maior intensidade aumentaram a cada leitura (dentro de cada triplicata) que pode indicar a formação de novos agregados durante a leitura. Além disso, em todas as amostras, Z-Average e valores médios do pico de maior intensidade, apresentaram valores muito distintos e isso pode sugerir que a amostra não estava estável, portanto, que o protocolo **T2** com as novas modificações não trouxe vantagens ao protocolo **T1**.

Figura 4 - Passos metodológicos empregados no protocolo teste 2 (T2) para o isolamento de vesículas extracelulares (VEs) a partir de fluidos biológicos humanos.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Os números romanos **I** a **VII** indicam os passos. **Passo 1:** Amostras de plasma e urina foram centrifugadas a 300 x g por 10 min a 4 °C, o sobrenadante foi armazenado e o pellet descartado. **Passo 2:** O sobrenadante foi centrifugado a 2.000 x g por 30 min a 4 °C e o pellet foi descartado. **Passo 3:** O sobrenadante foi centrifugado a 15.600 x g por 30 min a 4 °C e o pellet foi descartado. **Passo 4:** O sobrenadante foi diluído 1:10 ^{V/V} em PBS e transferido para tubo de ultracentrifugação. **Passo 5:** O tubo foi ultracentrifugado a 120.000 x g por 120 min a 4 °C. **Passo 6:** O sobrenadante foi descartado. **Passo 7:** O pellet final contendo as VEs foi suspenso em 100 µL de PBS e armazenado a -20 °C para posterior análise. Abreviações: PBS: Tampão fosfato salino.

Conclusão da aplicação do protocolo T2: Este teste experimental **T2** não permitiu o isolamento exclusivo de pequenas VEs a partir de plasma e urina. Ainda, a ausência de etapas extras de limpeza após a longa ultracentrifugação como os presentes em T1 pode ter contribuído para sedimentar contaminantes das matrizes junto as VEs, resultando em grandes agregados de VEs pouco estáveis.

Tabela 5 - Caracterização do tamanho das vesículas extracelulares (VEs) isoladas pelo protocolo teste (T2) analisadas pela dispersão dinâmica de luz (DLS)

Amostras biológicas humanas	Z-Average (nm)	Média ± desvio padrão (nm)	Pdl	Tamanho médio do pico de maior intensidade (nm)
PI3	1561,0	1826,0 ± 290,3	0,93	388,7
PI3, duplicata	2136,0		1,00	386,6
PI3, triplicata	1780,0		0,88	740,0
PI4	182,9	214,1 ± 28,5	0,48	319,2
PI4, duplicata	238,8		0,49	305,3
PI4, triplicata	220,7		0,40	410,8
U3	1817,0	2308,0 ± 444,6	0,52	694,0
U3, duplicata	2683,0		0,51	1131,0
U3, triplicata	2424,0		0,88	895,9
U4	536,5	444,2 ± 88,5	0,45	244,5
U4, duplicata	436,1		0,25	560,1
U4, triplicata	360,0		0,64	975,0

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

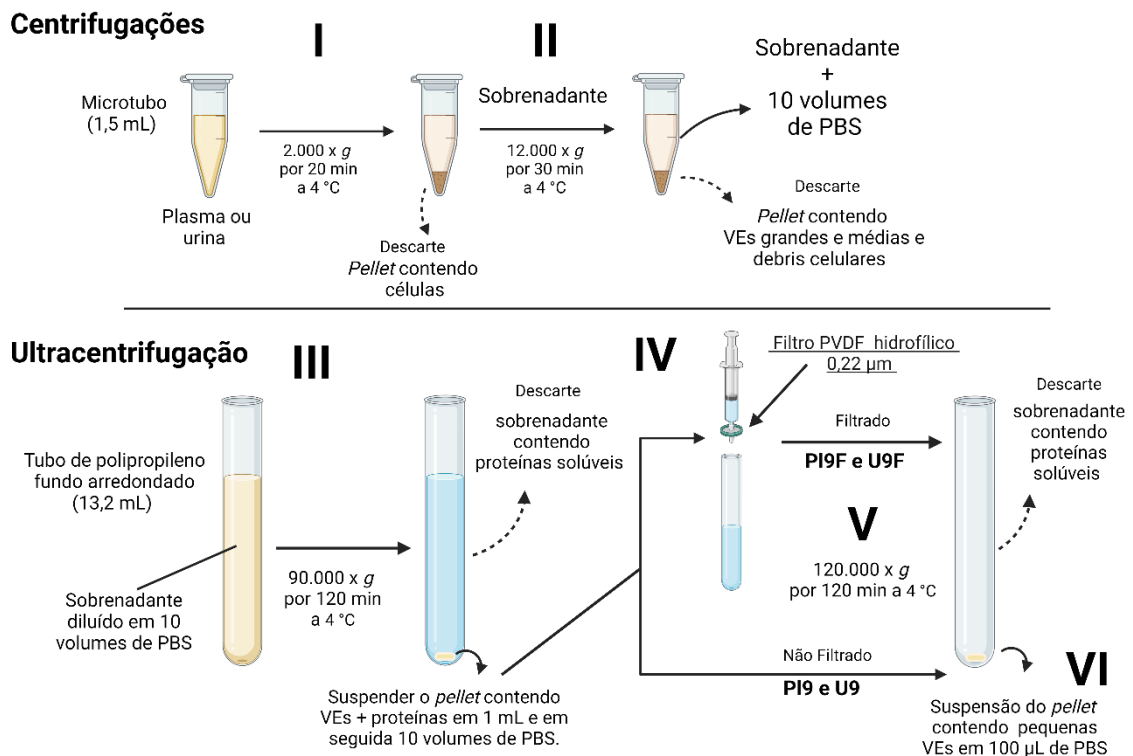
A tabela mostra os tamanhos de partículas das VEs isoladas aplicando o protocolo T2. Amostras de plasma (PI) e de urina (U) foram submetidas a DLS e o diâmetro hidrodinâmico médio (*Z-average*), o índice de polidispersão (Pdl), tamanho médio do pico de maior intensidade foram obtidos no equipamento Zetasizer nano ZS. As medições foram realizadas em triplicata a 25° C (para detalhes ver M&M).

Protocolo T3

Como foi mencionado, nenhum dos dois protocolos anteriores T1 e T2, permitiram um isolamento satisfatório de pequenas VEs; assim, o próximo passo foi introduzir etapas diferentes nas centrifugações e nas ultracentrifugações com o intuito de aprimorar os protocolos.

Para o protocolo teste 3 (T3; Figura 5) a primeira centrifugação a 300 x *g* foi removida pois não há relato de grandes quantidades de células presentes na urina e no plasma. No lugar foram adicionadas 2 centrifugações com força centrífuga para remover *debris* e VEs médias ou grandes (>200 e <1000). As últimas duas etapas de T3 incluíram ultracentrifugações, a primeira para sedimentar VEs utilizando força inferior aos protocolos T1 e T2 para reduzir a compressão das vesículas sedimentadas no fundo dos tubos, e a segunda de mesma força para reduzir contaminações solúveis presentes no pellet. Também foi testado no protocolo T3 a inclusão de uma etapa de filtração empregando filtro de PVDF de 0,22 µm para reduzir o tamanho das partículas extraídas. Os tempos de ultracentrifugação foram os mesmos utilizados em T1.

Figura 5 - Passos metodológicos empregados no protocolo teste 3 (T3) para o isolamento de vesículas extracelulares (VEs) a partir de fluidos biológicos humanos



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Os números romanos I a VII indicam os passos. **Passo 1:** Amostras de plasma e urina foram centrifugadas a 2.000 x g por 20 min a 4 °C, o sobrenadante foi armazenado e o pellet descartado. **Passo 2:** O sobrenadante foi centrifugado a 12.000 x g por 30 min a 4 °C o pellet foi descartado e o sobrenadante foi diluído 1:10 V/V em PBS e transferido para tubo de ultracentrifugação. **Passo 3:** O tubo foi ultracentrifugado a 90.000 x g por 120 min a 4 °C o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 1 mL e depois diluído 1:10 V/V em PBS. **Passo 4:** O pellet em 11 mL de PBS foi filtrado e transferido para um novo tubo (PI9 e U9) ou apenas transferido para um novo tubo (PI9 e U9). **Passo 5:** O tubo foi ultracentrifugado a 120.000 x g por 120 minutos a 4 °C. **Passo 6:** O sobrenadante foi descartado e o pellet final contendo as VEs foi suspenso em 100 µL de PBS e armazenado a -20 °C para posterior análise. Abreviações: PBS: Tampão fosfato salino.

Para testar o protocolo T3 foram utilizadas duas alíquotas de plasma de 500 µL (PI5 e PI5F), e duas alíquotas de urina de 500 µL (U5 e U5F). Como indicado na Figura 5, as amostras de plasma e urina foram centrifugadas a 2.000 x g por 20 min a 4 °C (Figura 5; passo I). Essa força centrífuga foi utilizada para separar *debris* celulares e células inteiras do sobrenadante, o qual foi posteriormente transferido para novos microtubos de 1,5 mL. O sobrenadante foi centrifugado a 12.000 x g por 30 min a 4 °C e o *pellet* contendo VEs grandes e *debris* celulares foi descartado (Figura 5; passo II). O sobrenadante foi diluído 1:10 V/V em PBS e transferido para tubos de

ultracentrifugação de 12,5 mL. O sobrenadante diluído foi ultracentrifugado a 90.000 x g por 120 min a 4 °C (Figura 5; passo III). O sobrenadante foi descartado. O *pellet* contendo VEs foi suspenso em 1 mL e posteriormente diluído 1:10 v/v em PBS. O sobrenadante das amostras PI9F e U9F foram aspirados para uma seringa de 20 mL e em seguida filtrados com filtro de membrana de PVDF 0,22 μ m hidrofílico direto para um novo tubo de ultracentrifugação. As amostras PI9 e U9 foram transferidas para um novo tubo de ultracentrifugação sem filtração prévia (Figura 5; passo IV). Os tubos foram ultracentrifugados a 120.000 x g por 120 min a 4 °C (Figura 5; passo V). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi suspenso em 100 μ L de PBS e armazenado a - 20 °C para posterior análises (Figura 5; passo VI).

Os *pellets* obtidos após aplicar o protocolo T3 foram submetidos a DLS para a determinação do *Z-Average*, Pdl, e pico de maior intensidade, e os resultados são apresentados na Tabela 6. As matrizes biológicas apresentaram perfis diferentes de distribuição de tamanho de partícula. No plasma, o valor de *Z-Average* obtido para as VEs foi entre 24,3 e 359,6 nm, enquanto na urina entre 121,1 e 339 nm. Os tamanhos das VEs isoladas em PI5F e U5F se correspondem com aqueles apresentados por pequenas VEs (entre 30 e 200 nm). No entanto, as VEs extraídas de PI5 e U5 foram consideradas VEs de tamanho médio por possuírem tamanho superior a 200 nm. Os valores de Pdl encontrados indicam que as suspensões foram altamente polidispersas para as amostras PI5, U5 e U5F, enquanto a amostra PI9F mostrou valores moderados. Pode se concluir que a adição do processo de filtração não foi eficaz para reduzir os valores de Pdl em todas as amostras testadas. O tamanho médio do pico de maior intensidade encontrados para plasma foram 555,1 nm para a amostra de plasma PI5, e 30,73 nm para a amostra de plasma PI5F. Para a urina o tamanho médio do pico de maior intensidade foi 482,5 nm para a amostra U5 e 267,5 nm para U5F. Coletivamente estes dados podem sugerir que (i) o protocolo permitiu o isolamento de vesículas dentro do tamanho das pequenas VEs, porém não foi reprodutível; (ii) há um grande discrepância entre os valores de tamanho de *Z-average* e de pico de maior intensidade que podem se dar em função do excesso de força e/ou de tempo de ultracentrifugação; (iii) todas as amostras apresentaram Pdl alto e próximo de valores que as tornam inadequadas para avaliações com DLS.

Conclusão da aplicação do protocolo T3: Apesar de apresentar índices considerados ruins como valores altos de Pdl e valor de *Z-average* superior ao de VEs pequenas, este protocolo adaptado mostrou alguma potencialidade visto que o

tamanho das partículas foi consideravelmente menor e mais reprodutível quando comparado com os outros protocolos (T1 e T2). A utilização de filtros parece contribuir para a desagregação das VEs formadas na ultracentrifugação o que gerou suspensões com VEs de menor tamanho. No entanto, isso não foi refletido em redução dos valores de Pdl.

Tabela 6 - Caracterização do tamanho das vesículas extracelulares (VEs) isoladas pelo protocolo teste 3 (T3) analisadas por dispersão dinâmica de luz (DLS)

Amostras biológicas humanas	Z-Average (nm)	Média ± desvio padrão (nm)	Pdl	Tamanho médio do pico de maior intensidade (nm)
PI5	427,6	359,6 ± 61	0,70	672,9
PI5, duplicata	341,6		0,79	817,6
PI5, triplicata	309,5		0,54	175
PI5F	24,2	24,3 ± 0,3	0,37	26,2
PI5F, duplicata	24,0		0,37	37,7
PI5F, triplicata	24,7		0,36	28,3
U5	339,6	339,0 ± 23	0,72	504,6
U5, duplicata	361,6		0,51	469,4
U5, triplicata	315,8		0,73	473,6
U5F	117,9	121,1 ± 8,0	0,81	243,8
U5F, duplicata	115,2		0,94	289,9
U5F, triplicata	130,3		0,78	268,9

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

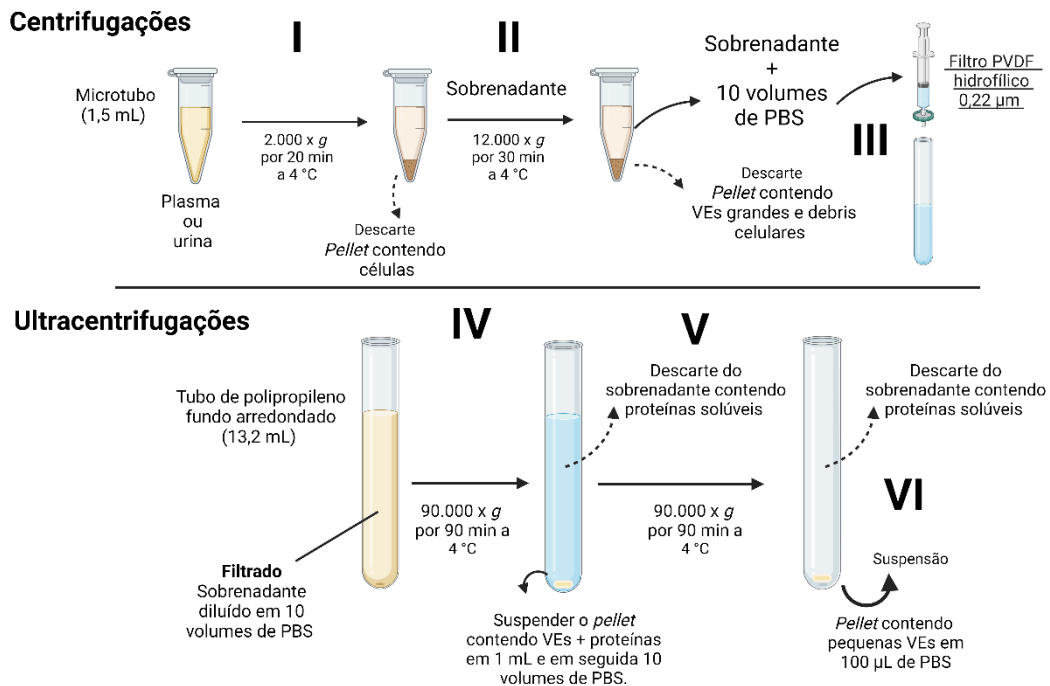
A tabela mostra os tamanhos de partículas das VEs isoladas aplicando o protocolo T3. Amostras de plasma (PI) e de urina (U) sem filtração e amostras de plasma (PIF) e de urina (UF) foram submetidas a DLS e o diâmetro hidrodinâmico médio (*Z-average*), o índice de polidispersão (Pdl), tamanho médio do pico de maior intensidade foram obtidos no equipamento Zetasizer nano ZS. As medições foram realizadas em triplicata a 25° C (para detalhes ver M&M).

Protocolo T4

No protocolo teste 4 (T4) foi mantido o número de centrifugações e ultracentrifugações realizadas no protocolo T3, porém o tempo e força das ultracentrifugações foram reduzidas com objetivo de potencialmente reduzir os valores de Pdl e o nível de agregação das partículas. Além disso, a filtração foi adicionada

etapas mais iniciais do processo para que grandes VEs e agregados de proteínas residuais pudessem ser removidos antes das ultracentrifugações. O protocolo T4 foi aplicado em três alíquotas de plasma de 500 μ L (PI6, PI7 e PI8) e três alíquotas de urina de 500 μ L (U6, U7 e U8). Conforme mostrado na Figura 6, as amostras de plasma e urina foram centrifugadas a 2.000 x *g* por 20 min a 4 °C (Figura 6; passo I). O sobrenadante foi centrifugado a 12.000 x *g* por 30 min a 4 °C e o *pellet* contendo grandes VEs e *debris* celulares foi descartado (Figura 6; passo II). O sobrenadante foi diluído 1:10 ^{V/V} em PBS e em seguida foram aspirados para uma seringa de 20 mL e filtrados com filtro de membrana de PVDF 0,22 μ m hidrofílico direto para um tubo de ultracentrifugação (Figura 6; passo III).

Figura 6 - Passos metodológicos empregados no protocolo teste 4 (T4) para o isolamento de vesículas extracelulares (VEs) a partir de fluidos biológicos humanos.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Os números romanos I a VII indicam os passos. **Passo 1:** Amostras de plasma e urina foram centrifugadas a 2.000 x g por 20 min a 4 °C, o sobrenadante foi armazenado e o pellet descartado. **Passo 2:** O sobrenadante foi centrifugado a 12.000 x g por 30 min a 4 °C o pellet foi descartado. **Passo 3:** O sobrenadante foi diluído 1:10 V/V em PBS e filtrado em um filtro 0,22 µm hidrofílico direto para um tubo de ultracentrifugação. **Passo 4:** O tubo foi ultracentrifugado a 90.000 x g por 90 min a 4 °C o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 1 mL e depois diluído 1:10 V/V em PBS e transferido para um novo tubo de ultracentrifugação. **Passo 5:** O tubo foi ultracentrifugado a 90.000 x g por 90 minutos a 4 °C. **Passo 6:** O sobrenadante foi descartado e o pellet final contendo as VEs foi suspenso em 100 µL de PBS e armazenado a -20 °C para posterior análise. Abreviações: PBS: Tampão fosfato salino.

O sobrenadante diluído e filtrado foi agora ultracentrifugado a 90.000 x g por 90 min a 4 °C (Figura 6; passo IV). O sobrenadante foi descartado. O *pellet* contendo VEs foi suspenso em 1 mL e posteriormente diluído 1:10 V/V em PBS em um novo tubo de ultracentrifugação. Os tubos foram ultracentrifugados a 90.000 x g por 90 min a 4 °C (Figura 6; passo V). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi suspenso em 100 µL de PBS e armazenado a -20 °C para posterior análises (Figura 6; passo VI).

Os *pellets* gerados aplicando T4 foram submetidos a DLS (Tabela 7). O valor de *Z-average* encontrado para plasma variou entre 33,2 e 64,2 nm, enquanto VEs de amostras de urina variaram entre 239,0 e 288,7 nm. De acordo com seus diâmetros as VEs isoladas em PI6, PI7, PI8 e U8 foram consideradas pequenas VEs (< 200 nm),

enquanto as e U6 e U7 foram consideradas como VEs de tamanho médio por possuírem tamanho superior a 200 nm. Os valores de Pdl indicados na Tabela 7 indicam que as suspensões foram moderadamente polidispersas para todas as amostras exibindo alguns valores acentuados principalmente nas amostras de urina U6 e U8. Os valores médios do pico de maior intensidade obtidos foram 52,94 nm para a amostra de plasma PI6, 74,10 nm para a PI7, e 51,30 nm para PI8. Para a urina os valores foram 921,73 nm para a amostra U6, 614,93 nm para a amostra U6, e 130,03 nm para U5F. Coletivamente estes dados sugerem que (i) todas as amostras de plasma apresentaram valores semelhantes entre *Z-average* e pico de maior intensidade. No entanto, estes valores foram discrepantes para amostras de urina; (ii) o tamanho semelhante dentre VEs da mesma matriz e destoantes entre as VEs de matrizes diferentes dá indícios de que as matrizes possuem VEs com características físicas e/ou morfológicas diferentes; (iii) a filtração antes da ultracentrifugação pode ter contribuído para a maior reprodutibilidade do protocolo.

Conclusão da aplicação do protocolo T4: A força resultante da centrifugação a 90.000 x *g* parece ter sido apropriada para gerar um pellet de VEs com valores de *Z-average* homogêneos, em torno de 30 nm para o plasma. No entanto, isto não foi confirmado para amostras de urina. Os resultados acumulados indicam que as VEs presentes nas matrizes são diferentes e necessitam de condições diferentes para minimizar o estado de agregação. A filtração antes da etapa de ultracentrifugação pode ter contribuído para homogeneização das amostras e consequente diminuição da discrepância entre os valores de *Z-average* e pico de maior intensidade. Apesar disso, valores elevados de Pdl e a variação entre valores de *Z-average* e pico de maior intensidade, podem indicar que ainda há presença de material agregado para as duas matrizes (por exemplo, VEs e proteínas contaminantes que se agregaram durante a ultracentrifugação).

Tabela 7 - Caracterização do tamanho das vesículas extracelulares (VEs) isoladas pelo protocolo teste (T4) analisadas por dispersão dinâmica de luz (DLS)

Amostras biológicas humanas	Z-Average (nm)	Média ± desvio padrão (nm)	Pdl	Tamanho médio do pico de maior intensidade (nm)
PI6	29,1		0,70	31,1
PI6, duplicata	91,9	101,1 ± 77	0,67	21,0
PI6, triplicata	182,3		0,69	27,5
PI7	26,0		0,61	37,5
PI7, duplicata	26,4	27,6 ± 2,4	0,56	71,2
PI7, triplicata	30,4		0,72	39,3
PI8	32,2		0,45	163,4
PI8, duplicata	35,3	33,7 ± 1,5	0,44	27,2
PI8, triplicata	33,6		0,66	24,6
U6	266,1		0,75	867,3
U6, duplicata	239,0	252,5 ± 13,5	0,79	957,8
U6, triplicata	252,3		0,94	940,1
U7	286,2		0,61	127,7
U7, duplicata	288,7	284,7 ± 4,9	0,71	887,6
U7, triplicata	279,1		0,59	829,5
U8	246,5		0,69	142,3
U8, duplicata	243,1	250,6 ± 10,2	0,78	118,2
U8, triplicata	262,3		0,86	129,6

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

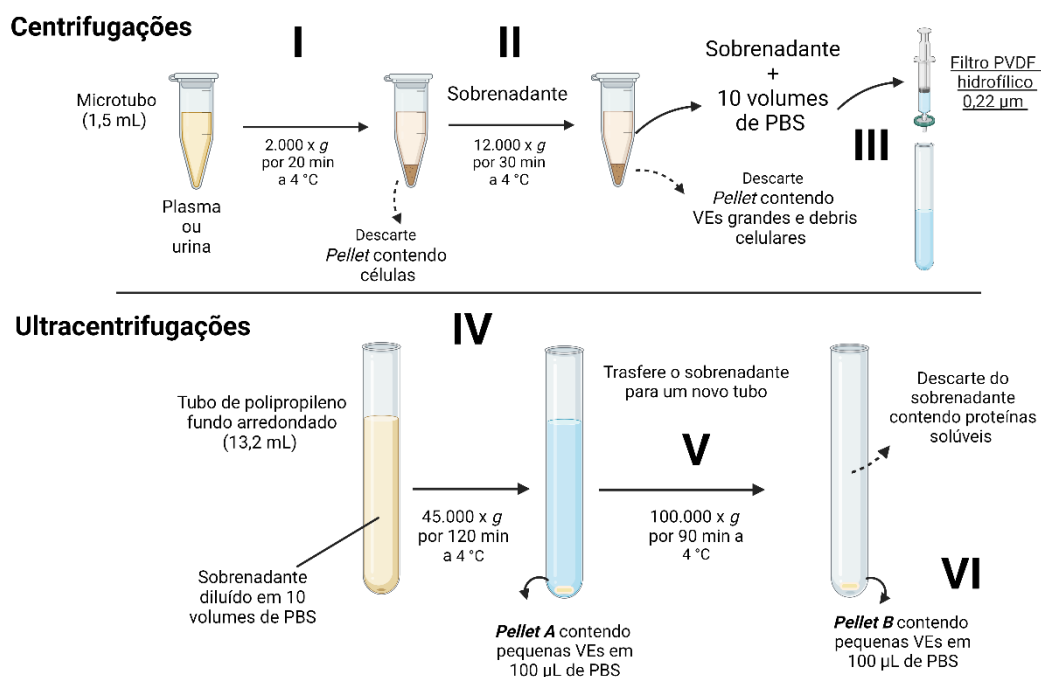
A tabela mostra os tamanhos de partículas das VEs isoladas aplicando o protocolo T4. Amostras de plasma (PI) e de urina (U) foram submetidas a DLS e o diâmetro hidrodinâmico médio (*Z-average*), o índice de polidispersão (Pdl), tamanho médio do pico de maior intensidade foram obtidos no equipamento Zetasizer nano ZS. As medições foram realizadas em triplicata a 25° C (para detalhes ver M&M).

Protocolo T5

As alterações incluídas no protocolo Teste 5 (T5) tiveram por objetivo diminuir a agregação de material no fundo do tubo para melhorar a integridade das VEs e consequentemente reduzir o Pdl. A grande diferença deste protocolo é que na etapa de ultracentrifugação ao invés de submeter diretamente 90.000 x *g* por 90 min (como em T4), o pellet foi fracionado em duas extrações. A primeira foi realizada com força

centrífuga intermediária por um período maior (45.000 x g por 120 min) o pellet foi reservado como **pellet A**. Em seguida o sobrenadante desta ultracentrifugação foi submetido a uma nova extração desta vez a 100.000 x g por 90 min gerando o **pellet B**.

Figura 7 - Passos metodológicos empregados no protocolo teste 5 (T5) para o isolamento de vesículas extracelulares (VEs) a partir de fluídos biológicos humanos.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Os números romanos I a VII indicam os passos. **Passo 1:** Amostras de plasma e urina foram centrifugadas a 2.000 x g por 20 min a 4 °C, o sobrenadante foi armazenado e o pellet descartado. **Passo 2:** O sobrenadante foi centrifugado a 12.000 x g por 30 min a 4 °C e o pellet foi descartado. **Passo 3:** O sobrenadante foi diluído 1:10 v/v em PBS e em seguida filtrado com filtro 0,22 µm hidrofílico direto para um tubo de ultracentrifugação. **Passo 4:** O tubo foi ultracentrifugado a 45.000 x g por 120 min a 4 °C e o pellet foi ressuspenso em 100 µL de PBS e armazenado a -20 °C para posterior análise (**pellet A**). **Passo 5:** O sobrenadante da etapa anterior foi transferido para um novo tubo e ultracentrifugado a 100.000 x g por 90 minutos a 4 °C. **Passo 6:** O sobrenadante foi descartado e o pellet final foi suspenso em 100 µL de PBS e armazenado a -20 °C para posterior análise (**pellet B**). Abreviações: PBS: Tampão fosfato salino.

Conforme mostrado na Figura 7, as amostras de plasma e urina foram centrifugadas a 2.000 x g por 20 min a 4 °C (Figura 7; passo I). O sobrenadante foi centrifugado a 12.000 x g por 30 min a 4 °C e o *pellet* foi descartado (Figura 7; passo II). O sobrenadante foi diluído 1:10 v/v em PBS e em seguida filtrados com filtro de

membrana de PVDF 0,22 μm hidrofílico direto para um tubo de ultracentrifugação (Figura 7; passo **III**). O sobrenadante diluído e filtrado foi agora ultracentrifugado a 45.000 x g por 120 min a 4 °C (Figura 7; passo **IV**). O **pellet A** foi suspenso 100 μL de PBS e armazenado a - 20 °C para posterior análise. O sobrenadante da etapa anterior foi transferido para um novo tubo de ultracentrifugação que foi ultracentrifugado a 100.000 x g por 90 min a 4 °C (Figura 7; passo **V**). (Figura 7; passo **VI**). O sobrenadante foi descartado e o **pellet B** foi suspenso em 100 μL de PBS e armazenado a - 20 °C para posterior análise.

Para caracterizar a distribuição de tamanho das VEs de plasma que o protocolo T5 permitiu isolar, os **pellets A** e **B** de plasma (Tabela 8) foram submetidos a DLS. A Tabela 5 mostra que a distribuição de tamanho das VEs no **pellet A** para as três amostras (PI9 48,41 \pm 1,4 nm; PI10 54,17 \pm 9,7 nm e PI11 34,19 \pm 0,9 nm) são compatíveis com o diâmetro de pequenas VEs, porém o **pellet B**, apresentou valores inferiores aos descritos para VEs (PI9 19,2 \pm 0,3 nm; PI10 23,21 \pm 0,4 nm e PI11 25,17 \pm 1,0 nm). Ambos **pellets A** e **B** apresentaram valores moderados de Pdl e similares entre valor de *Z-Average* e o tamanho médio do pico de maior intensidade o que indica poucas faixas de tamanho de VEs extraídas. Coletivamente os dados encontrados no protocolo T5 aplicado a plasma sugerem que (i) as duas ultracentrifugações a 45.000 e 100.000 x g extraíram numerosas partículas de tamanho inferior a 30 nm que estão presentes no plasma em grande quantidade. Por serem muito abundantes, essas partículas reduzem o valor médio de tamanho encontrado comprometendo a identificação da presença de partículas de tamanho superior que podem ter se encontrado em menor número. A presença destas partículas ocorreu em menor proporção no **pellet A** gerado após aplicar a centrifugação de 45.000 x g ; (ii) o Pdl dos **pellets A** e **B** ainda apresentaram valores moderados, provavelmente por causa da grande variedade de tamanho de VEs presentes no plasma ou pela formação de agregados.

Com a aplicação do protocolo T5 para plasma foi possível extrair VEs com tamanhos correspondentes a pequenas VEs, porém foram extraídas inúmeras partículas com tamanho médio inferior a 30 nm presentes na matriz em níveis diferentes nos **pellets A** e **B**. A presença destas numerosas partículas reduz o tamanho médio das VEs e esconde a presença de coleções com outros tamanhos. Além disso, quanto mais tempo e mais força é empregado na ultracentrifugação, menor é o diâmetro médio das VEs encontradas para plasma, indicando que a matriz

está repleta de partículas com estas dimensões e novos ajustes serão necessários para reduzir esta contaminação.

Tabela 8 - Caracterização do tamanho das vesículas extracelulares (VEs) isoladas de plasma pelo protocolo teste (T5) analisadas por dispersão dinâmica de luz (DLS)

Amostras biológicas humanas	Z-Average (nm)	Média ± desvio padrão (nm)	Pdl	Tamanho médio do pico de maior intensidade (nm)
pellet A				
PI9 A	46,8		0,46	49,7
PI6, duplicata	48,7	48,41 ± 1,4	0,18	41,6
PI6, triplicata	49,7		0,32	67,5
PI0 A	53,6		0,57	97,1
PI7, duplicata	64,2	54,17 ± 9,7	0,44	90,4
PI7, triplicata	44,7		0,54	34,8
PI11 A	35,0		0,81	56,5
PI8, duplicata	34,4	34,19 ± 0,9	0,71	52,7
PI8, triplicata	33,2		0,76	44,7
pellet B				
PI9 B	19,5		0,35	30,5
PI6, duplicata	19,0	19,2 ± 0,3	0,35	25,5
PI6, triplicata	19,1		0,34	24,0
PI0 B	23,0		0,49	32,1
PI7, duplicata	23,7	23,21 ± 0,4	0,50	25,1
PI7, triplicata	23,0		0,39	27,5
PI11 B	24,0		0,42	29,3
PI8, duplicata	25,7	25,17 ± 1,0	0,42	31,7
PI8, triplicata	25,9		0,43	24,9

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

A tabela mostra os tamanhos das VEs isoladas de plasma aplicando o protocolo T5. Amostras enriquecidas de VEs de plasma extraídas na 1ª Ultracentrifugação 45.000 x g por 120 minutos (**pellet A**); e extraídas na 2ª ultracentrifugação a 100.000 x g 90 minutos (**pellet B**) foram submetidas a DLS e o diâmetro hidrodinâmico médio (*Z-average*), o índice de polidispersão (Pdl), tamanho médio do pico de maior intensidade foram obtidos no equipamento Zetasizer nano ZS. As medições foram realizadas em triplicata a 25 °C (para detalhes ver M&M).

Os **pellets A** e **B** obtidos com a aplicação do protocolo T5 para urina também foram submetidos a análise de tamanho de partícula por DLS. A Tabela 6 mostra que o tamanho médio ou *Z-Average* encontrado para o **pellet A** nas três amostras testadas resultaram VEs de 138,6 ± 1,5 nm, 140,0 ± 1,4 nm, e 148,4 ± 1,2 nm compatíveis com

o tamanho de pequenas VEs. A avaliação do **pellet B** ($6,3 \pm 1,5$ nm, $20,1 \pm 5,2$ nm, e $6,7 \pm 1,2$ nm) revelou a ausência de partículas com tamanho descritos para pequenas VEs. O Pdl do **pellet A** e **B** apresentou valores baixos, a maioria próximo de 2, apontando para estabilidade da amostra e seletividade no tamanho das VEs extraídas. Além disso, os valores de *Z-Average* e o tamanho médio do pico de maior intensidade foram muito similares entre amostras do **pellet A** e amostras do **pellet B**.

Coletivamente os dados de DLS encontrados no protocolo T5 aplicado nas amostras de urina sugerem que (i) a maior parte das VEs estavam presentes no **pellet A**, tendo sido separadas na primeira ultracentrifugação ($45.000 \times g$). Dessa forma, a segunda ultracentrifugação ($100.000 \times g$) que gerou o **pellet B** não teve material orgânico para ser isolado; (ii) os valores baixos de Pdl indicam que a força utilizada na primeira ultracentrifugação foi apropriada para extrair VEs sem formar agregados e isso parece ter aumentado a estabilidade das partículas; (iii) a similaridade entre os valores das replicatas técnicas de *Z-Average*, e o tamanho médio do pico de maior intensidade indicam que houve seletividade para separar VEs em uma faixa restrita de *Z-Average* em torno de 150 nm.

Tabela 9. Caracterização do tamanho das vesículas extracelulares (VEs) isoladas de urina pelo protocolo teste (T5) analisadas por dispersão dinâmica de luz (DLS)

pellet A				
U9 A	138,2		0,19	172,5
U9, duplicata	140,4	$138,6 \pm 1,5$	0,20	167,8
U9, triplicata	137,3		0,18	162,2
U10 A	141,7		0,30	208,9
U10, duplicata	137,2	$140,0 \pm 1,4$	0,35	198,5
U10, triplicata	141,0		0,28	169,1
U11 A	149,3		0,21	190,8
U11, duplicata	148,9	$148,4 \pm 1,2$	0,22	192,7
U11, triplicata	146,9		0,23	190,8
pellet B				
U9 B	5,0		0,40	3,4
U9, duplicata	6,1	$6,3 \pm 1,5$	0,20	4,5
U9, triplicata	8,0		0,18	3,4
U10 B	25,8		0,30	7,8
U10, duplicata	15,3	$20,1 \pm 5,2$	0,35	5,6
U10, triplicata	19,3		0,28	3,4
U11 B	7,8	$6,7 \pm 1,2$	0,35	7,8

U11, duplicata	5,3	0,22	9,2
U11, triplicata	7,0	0,23	9,0

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

A tabela mostra os tamanhos de partículas das VEs isoladas de urina aplicando o protocolo T5. Amostras enriquecidas de VEs de urina foram extraídas na 1ª Ultracentrifugação 45.000 x g por 120 minutos (**pellet A**); e extraídas na 2ª ultracentrifugação a 100.000 x g 90 minutos (**pellet B**) foram submetidas a DLS e o diâmetro hidrodinâmico médio (*Z-average*), o índice de polidispersão (Pdl), tamanho médio do pico de maior intensidade foram obtidos no equipamento Zetasizer nano ZS. As medições foram realizadas em triplicata a 25 °C (para detalhes ver M&M).

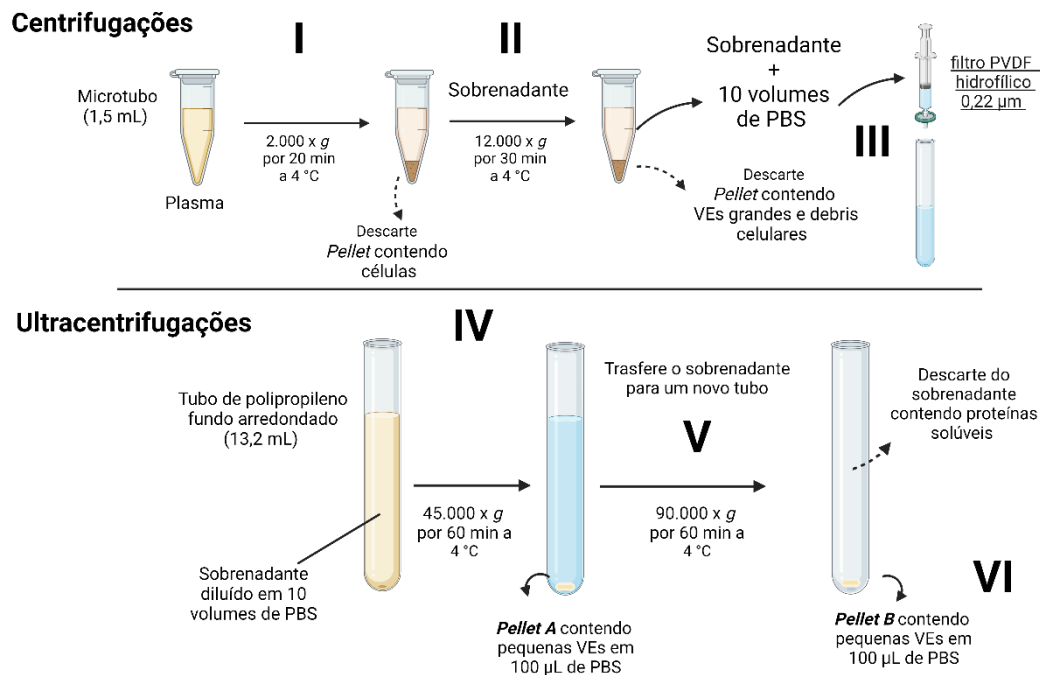
Conclusão da aplicação do protocolo T5: A aplicação deste protocolo permitiu melhorar a integridade das VEs extraídas por reduzir a formação de agregados, e a extração de material contaminante. Além disso, os dados indicam que houve grande seletividade para separar pequenas VEs com tamanho inferior a 200 nm em amostras de plasma e urina, porém somente no *pellet* obtido na primeira ultracentrifugação. Além disso, o **pellet A** obtido de plasma está repleto de partículas com tamanho inferior a 30 nm e novas etapas ou ajustes podem ser necessários para reduzir tal contaminação. Estes dados sugerem que o protocolo T5 é um método satisfatório para extração de pequenas VEs presentes em **urina** e está adequado para análises de morfologia e conteúdo.

Protocolo T6

O protocolo teste 6 (T6) é um novo ajuste no protocolo T5 com objetivo de reduzir a contaminação do *pellet* por partículas com tamanho inferior a 30 nm muito abundantes no **plasma**. Assim, foram realizadas duas alterações: 1) redução do tempo da primeira ultracentrifugação, e 2) redução do tempo e da força da segunda ultracentrifugação. Como mostrado na Figura 8, amostras de plasma foram centrifugadas a 2.000 x g por 20 min a 4 °C (Figura 8; passo I). O sobrenadante foi centrifugado a 12.000 x g por 30 min a 4 °C e o *pellet* foi descartado (Figura 8; passo II). O sobrenadante foi diluído 1:10 V/V em PBS e em seguida filtrado com filtro de 0,22 µm hidrofílico direto para um tubo de ultracentrifugação (Figura 8; passo III). O tubo foi ultracentrifugado a 45.000 x g por 60 min a 4 °C (Figura 8; passo IV). O *pellet* adquirido nesta Ultracentrifugação chamado **pellet A** foi suspenso 100 µL de PBS e armazenado a - 20 °C para posterior análise. O sobrenadante desta ultracentrifugação foi transferido para um novo tubo (Figura 8; passo V). O tubo foi ultracentrifugado a

90.000 x g por 60 min a 4 °C (Figura 8; passo **VI**). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* adquirido, chamado **pellet B** foi suspenso em 100 µL de PBS e armazenado a -20 °C para posterior análise.

Figura 8 - Passos metodológicos empregados no protocolo teste 6 (T6) para o isolamento de vesículas extracelulares (VEs) a partir de plasma.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Os números romanos **I a VII** indicam os passos. **Passo 1:** Amostras de plasma foram centrifugadas a 2.000 x g por 20 min a 4 °C, o sobrenadante foi armazenado e o *pellet* descartado. **Passo 2:** O sobrenadante foi centrifugado a 12.000 x g por 30 min a 4 °C o *pellet* foi descartado. **Passo 3:** O sobrenadante da etapa anterior foi diluído 1:10 v/v em PBS e filtrado em um filtro 0,22 µm hidrofílico direto para um tubo de ultracentrifugação. **Passo 4:** O tubo foi ultracentrifugado a 45.000 x g por 60 min a 4 °C o *pellet* foi ressuspenso em 100 µL de PBS e armazenado a -20 °C para posterior análise (**pellet A**). **Passo 5:** O sobrenadante da etapa anterior foi transferido para um novo tubo e ultracentrifugado a 90.000 x g por 60 minutos a 4 °C. **Passo 6:** O sobrenadante da etapa anterior foi descartado e o *pellet* final foi suspenso em 100 µL de PBS e armazenado a -20 °C para posterior análise (**pellet B**). Abreviações: PBS: Tampão fosfato salino.

Para caracterizar a distribuição de tamanho das VEs de plasma que o protocolo T6 permitiu isolar, os **pellets A** e **B** foram submetidos a DLS. A Tabela 8 mostra a distribuição de tamanho das VEs no **pellet A** (65,2 ± 16,3 nm; 175,7 ± 21,5 nm e 140,7 ± 0,7 nm) compatível com pequenas VEs, porém o **pellet B**, apresentou valores inferiores aos descritos para VEs em 2 das 3 amostras (20,7 ± 0,9 nm; 23,7 ± 0,1 nm e 34,3 ± 0,7 nm). O Pdl para ambos os **pellets** apresentou valores baixos e moderados indicando suspensão polidispersa. O *Z-Average* e o tamanho médio do pico de maior intensidade foram similares para duas das 3 amostras de **pellet A**, e

todas as amostras de **pellet B**.

Tabela 10 - Caracterização do tamanho das vesículas extracelulares (VEs) isoladas de plasma pelo protocolo teste (T6) analisadas por dispersão dinâmica de luz (DLS)

Amostras biológicas humanas	Z-Average (nm)	Média ± desvio padrão (nm)	Pdl	Tamanho médio do pico de maior intensidade (nm)
pellet A				
PI12 A	58,7	65,2 ± 16,3	0,61	181,3
PI12, duplicata	53,2		0,56	167,1
PI12, triplicata	83,8		0,60	141,8
PI13 A	194,6	175,7 ± 21,5	0,82	163,5
PI13, duplicata	152,3		0,57	117,8
PI13, triplicata	180,2		0,65	145,3
PI14 A	140,7	140 ± 0,7	0,26	167,3
PI14, duplicata	140,1		0,26	153,0
PI14, triplicata	139,3		0,26	150,3
pellet B				
PI12 B	19,7	20,7 ± 0,9	0,41	23,6
PI12, duplicata	21,6		0,41	25,5
PI12, triplicata	20,8		0,41	23,1
PI13 B	23,7	23,7 ± 0,1	0,41	27,6
PI13, duplicata	23,8		0,41	26,5
PI13, triplicata	23,8		0,41	27,1
PI14 B	35,2	34,3 ± 0,7	0,57	22,3
PI14, duplicata	33,7		0,54	22,7
PI14, triplicata	34,2		0,54	30,6

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

A tabela mostra os tamanhos das VEs isoladas de plasma aplicando o protocolo T6. Amostras enriquecidas de VEs de plasma extraídas na 1ª Ultracentrifugação 45.000 x g por 60 minutos (**pellet A**); e extraídas na 2ª ultracentrifugação a 90.000 x g 60 minutos (**pellet B**) foram submetidas a DLS e o diâmetro hidrodinâmico médio (Z-average), o índice de polidispersão (Pdl), tamanho médio do pico de maior intensidade foram obtidos no equipamento Zetasizer nano ZS. As medições foram realizadas em triplicata a 25 °C (para detalhes ver M&M).

As alterações no utilizadas no protocolo T6 foram eficientes em reduzir a presença de partículas contaminantes com tamanho médio inferior a 30 nm no **pellet A**. A ausência destas partículas permitiu visualizar outras VEs de tamanho superior que se encontravam em menor proporção nas amostras, isso pode ter resultado no aumento dos valores de Z-Average observado para este **pellet**. Apesar disso, houve

grande variabilidade nos tamanhos de VEs presentes no **pellet A** que refletiram valores de Pdl ainda considerados elevados. Considerando que a presença destas pequenas partículas contaminantes parece estar em magnitude bem superior comparado com VEs, os resultados obtidos neste protocolo foram considerados adequados para análises de morfologia e conteúdo.

TAMANHO E MORFOLOGIA DAS VES POR MET

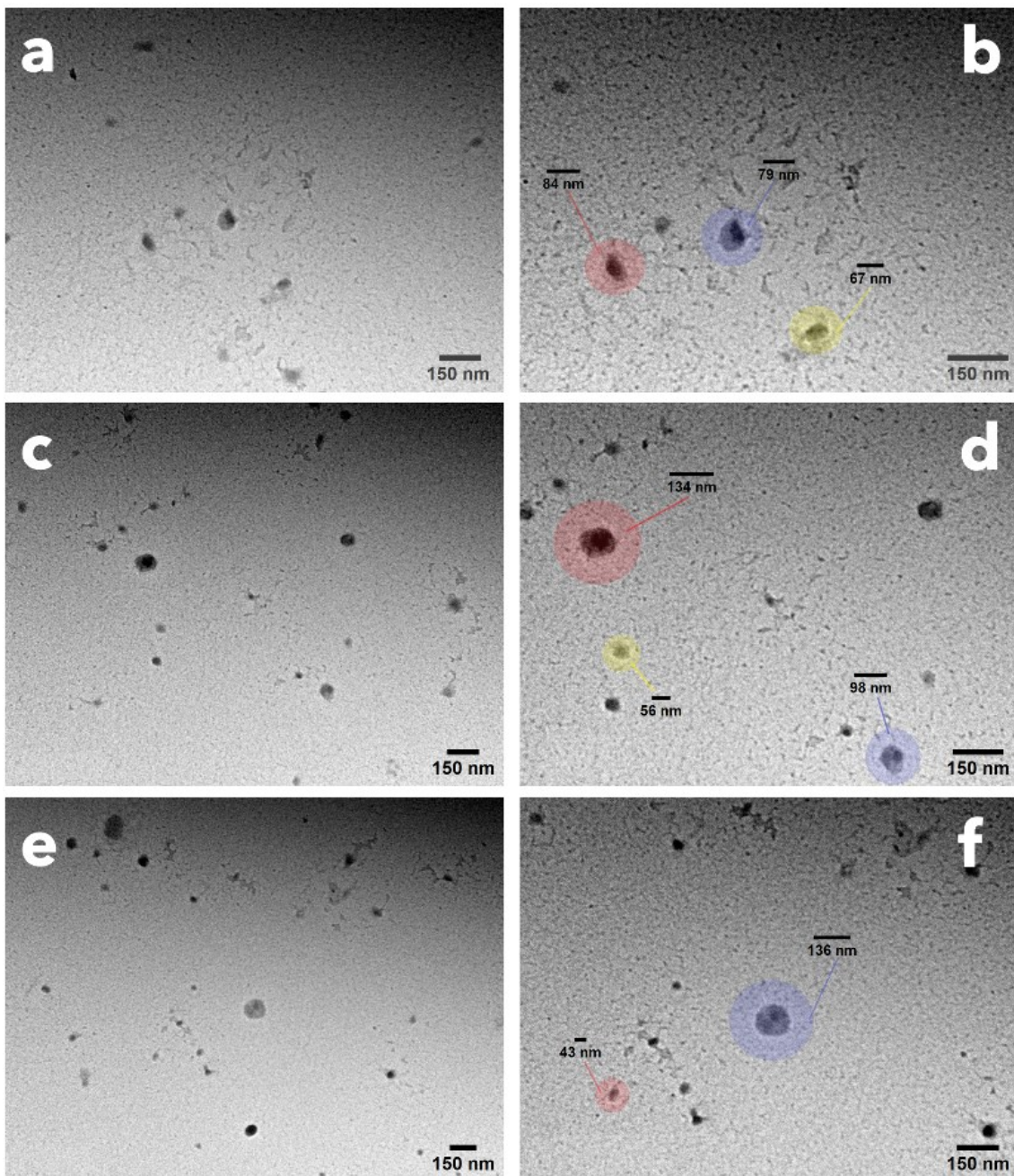
5.2 Para investigar a morfologia e tamanhos das VEs isoladas aplicando os protocolos mais aprimorados (T5 em urina e T6 em plasma) foi utilizada a MET. A ISEV orienta que para reportar resultados de técnicas que fornecem imagens de VEs em alta resolução, como é o caso de MET, imagens de campo amplo e com magnificação superior devem ser fornecidas. A Figura 9 apresenta eletromicrografias obtidas de VEs presentes no **pellet A** isoladas a partir da aplicação do protocolo T5 nas amostras de urina U9, U10 e U11. As Figuras 9 a, c, e e mostram em campo amplo com uma magnificação de 80.000 X pequenas estruturas com diferentes intensidades de contraste, frequentemente com maior intensidade no centro e menor nas bordas obtidas no **pellet A** de amostras de urina (**U9, 11 e 12**). A densidade de partículas é pequena de forma que estão espaçadas nas micrografias e sua distribuição relativa é homogênea. As Figuras 9b, d e f obtidas pela magnificação de uma região do campo das imagens acima mencionadas (100.000 X), foram utilizadas para destacar estruturas com melhor resolução.

A Figura 9b mostra algumas VEs com diferentes estruturas obtidas a partir da amostra U9, (1) estrutura com formato de “taça” (indicada com círculo em azul) medindo aproximadamente 79 nm de diâmetro com o centro escuro (alto contraste no MET); (2) outra estrutura com estrutura semelhante a um “esferoide regular” (indicada com círculo em amarelo) com aproximadamente 67 nm de diâmetro e contraste relativamente claro e homogêneo; (3) e uma estrutura com morfologia semelhante a um “disco achatado” (indicada com círculo em vermelho) com aproximadamente 87 nm de diâmetro com bordas com menor contraste que o centro. As Figura 9d e 7f mostram estruturas obtidas a partir das amostras U11 e U12, respectivamente, com formatos e tamanhos similares àquelas apresentadas na Figura 9f. No entanto a Figura 9f ainda mostra três partículas com formato de disco achatado com centro mais escuro medindo 36, 42 e 43 nm (uma das estruturas é destacada em vermelho), e

uma estrutura também de formato similar às partículas anteriormente citadas, mas com um tamanho levemente maior (indicada com círculo em azul; 136 nm).

De forma geral o **pellet A** apresentou partículas com morfologia similar nas diferentes amostras de urina com uma faixa de tamanho entre 43 e 136 nm compatíveis com pequenas VEs. O **pellet B** deste protocolo também foi submetido a MET, porém não apresentou partículas semelhantes em dimensão e morfologia às descritas aqui e, portanto, registros não foram adquiridos.

Figura 9 - Eletromicrografias de vesículas extracelulares (VEs) obtidas a partir de urina humana



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

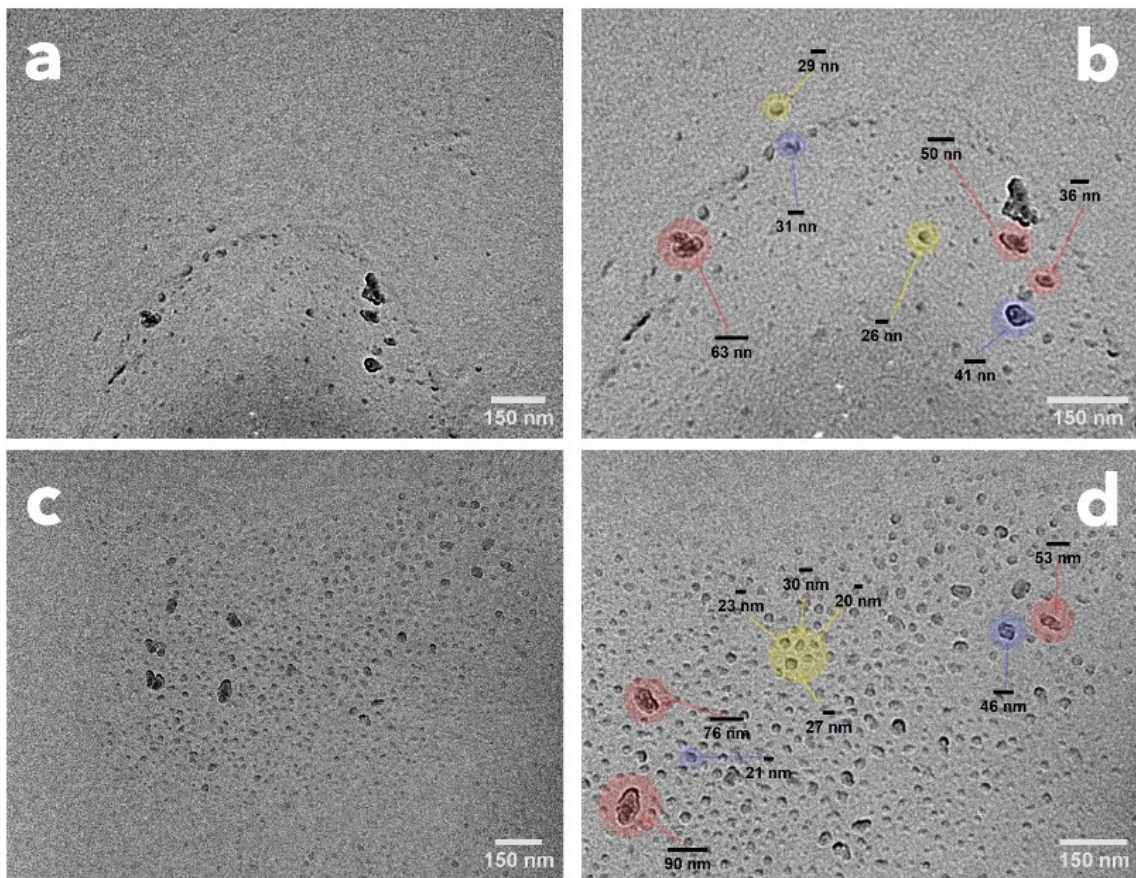
As VEs foram extraídas das amostras de urina U9 (a, b), U10 (c, d), e U11 (e, f) aplicando o protocolo T5 (ver o texto para detalhes sobre os processamentos das amostras biológicas). As micrografias foram geradas mediante a aplicação de microscopia eletrônica no pellet A gerado por uma ultracentrifugação a 45.000 x g por 120 min. (a, c, e) Magnificação ~ 80.000 X; (b, d, f) Magnificação ~100.000 X. As partículas mostradas em (b) apresentaram tamanhos de 67 nm (círculo amarelo), 79 nm (círculo azul), e 84 nm (círculo vermelho); em (d) apresentaram tamanhos de 56 nm (círculo amarelo), 98 nm (círculo azul), e 134 nm (círculo vermelho) e em (f) apresentaram tamanhos de 136 nm (círculo azul), e 43 nm (círculo vermelho). Os círculos em azul destacam partículas com formato semelhante a taça, os vermelhos destacam as que possuem formato semelhante a discos achatados com bordas mais claras e centros mais escuros e os amarelos destacam esferoides regulares. Algumas barras de escala foram

adicionadas para comparação direta do tamanho das VEs revelando que as VEs encontradas estão na faixa de tamanho predominante entre 43 nm e 136 nm, compatível pequenas VEs.

A Figura 10 mostra eletromicrografias geradas após aplicação de MET em amostras do **pellet A** (45.000 x g por 60 min) e **pellet B** (90.000 x g por 60 min) obtidas com a aplicação do protocolo T6 nas amostras de **plasma** PI12 e PI14 em uma magnificação de 80.000 X (a, c) e 100.000 X (b, d). A Figura 10a e c obtidas em campo amplo com magnificação de 80.000 X mostram pequenas estruturas com diferentes intensidades de contraste, onde frequentemente as maiores apresentam maior intensidade no centro e menor nas bordas e as menores possuem contraste homogêneo. As menores são mais abundantes em 10c do que em 10a. Em 10a as partículas estão dispostas no plano em forma de semicírculo irregular e estão muito próximas umas das outras incluindo a presença de agregado de VEs. Já em 10c as partículas estão dispostas de forma homogênea e a densidade de partículas é alta estando muito próxima uma das outras, porém sem sinais claros de agregação. As Figuras 10 b e d obtidas pela magnificação (100.000 X), de uma região do campo das imagens a e c foram utilizadas para destacar estruturas com melhor resolução.

A Figura 10b mostra algumas VEs com diferentes estruturas obtidas a partir da amostra PI12, (1) duas estruturas com formato de “taça” (indicada com círculo em azul) medindo aproximadamente 31 e 41 nm de diâmetro com o centro escuro (alto contraste no MET); (2) outras duas com estrutura semelhante a um “esferoide regular” (indicada com círculo em amarelo) com aproximadamente 26 e 31 nm de diâmetro e contraste relativamente claro e homogêneo; (3) três estruturas com morfologia semelhante a um “disco achatado” (indicada com círculo em vermelho) com aproximadamente 36 50 e 63 nm de diâmetro com bordas com menor contraste que o centro. A Figura 10d mostra estruturas obtidas a partir da amostra PI14, com formatos e tamanhos similares àquelas apresentadas na Figura anterior. No entanto na Figura 10d as estruturas com formato de esferoides regulares são muito mais numerosas que qualquer outra estrutura, apesar disso ainda é possível observar partículas com formato de disco achatado com centro mais escuro medindo 53, 76 e 90 nm (indicada com círculo em vermelho) e uma estrutura também de formato similar às partículas anteriormente citadas como taças com dimensões de 46 e 21 nm (indicadas com círculos em azul).

Figura 10 - Eletromicrografias de vesículas extracelulares (VEs) obtidas a partir de plasma humano.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

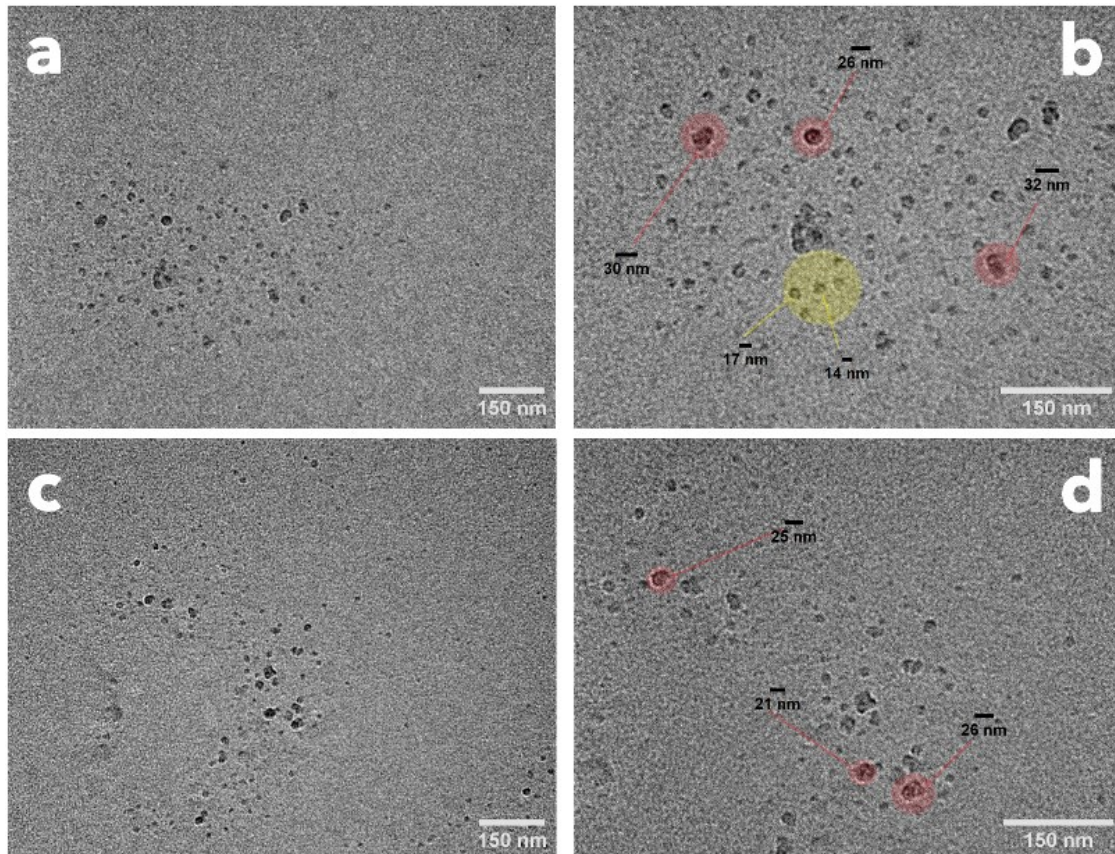
As VEs foram extraídas das amostras de plasma PI12 (a, b), PI14 (c, d) (ver o texto para detalhes das amostras biológicas) aplicando o protocolo T6. As micrografias foram tomadas mediante a realização de microscopia eletrônica no **pellet A** gerado por uma ultracentrifugação a 45.000 x g por 60 min. Magnificação ~80.000 vezes (a e c) e Magnificação ~100.000 vezes (b e d). As partículas mostradas em (b) apresentaram tamanhos de 29 e 26 nm (círculo amarelo), 31 e 41 nm (círculo azul), e 36, 50 e 63 nm (círculo vermelho); em (d) apresentaram tamanhos de 20, 23, 27 e 30 nm (círculo amarelo), 21 e 46 nm (círculo azul), e 53, 76 e 90 nm (círculo vermelho). Os círculos em azul destacam partículas com formato semelhante a taça, os vermelhos destacam as que possuem formato semelhante a discos achatados com bordas mais claras e centros mais escuros e os amarelos destacam esferoides regulares. Algumas barras de escala foram adicionadas para comparação direta do tamanho das VEs revelando VEs na faixa de tamanho predominante entre 30 nm e 90 nm compatível pequenas VEs, além de inúmeras partículas com tamanho inferior a 30 nm.

A Figura 11 mostra eletromicrografias obtidas de VEs presentes no **pellet B** (90.000 x g por 60 min) separadas a partir da aplicação do protocolo T6 nas amostras de plasma PI12 e PI14 em uma magnificação de 80.000 X (a, c) e 120.000 X (b, d). Nas Figuras 8a e c obtidas em campo aberto, é possível observar conjuntos de pequenas estruturas com dimensões e intensidade de contraste relativamente semelhantes entre si e que estão dispostas com maior frequência no centro da figura.

A densidade de partículas é moderada, estando bem próximas umas das outras. Já as Figuras 9b e d obtidas pela magnificação de uma região do campo das imagens a e c, mostram destaques em estruturas representativas com melhor resolução. Em 9b em vermelho é possível observar uma estrutura semelhante a um disco achatado com 27 nm de diâmetro e em amarelo uma esfera regular com 16 nm de comprimento. Já na Figura 11d, círculos em amarelos destacam a presença de uma partícula esférica de 22 nm de comprimento e em vermelho destaca uma partícula com morfologia semelhante a um disco com 24 nm de comprimento. Em geral o **pellet B** das duas amostras de plasma apresentaram partículas com formato de disco e esferoides regulares, porém as partículas encontradas não possuíam dimensões compatíveis com pequenas VEs.

A partir da MET foi possível confirmar a separação de partículas com dimensões e morfologia compatíveis com VEs no **pellet A** o que não ocorreu no **pellet B** o que pode indicar que o protocolo foi capaz de isolar pequenas VEs que possuem tamanho entre 30 e 200 nm de comprimento apenas na primeira etapa de ultracentrifugação, enquanto na segunda etapa só foi possível isolar partículas com tamanho muito próximo ou inferiores a 30 nm. Além disso, o mesmo protocolo resultou na coextração destas partículas com dimensões sub 30 nm em níveis diferentes no **pellet A** sendo mais abundantes na amostra PI14 do que na amostra PI12.

Figura 11 - Eletromicrografias de vesículas extracelulares (VEs) obtidas a partir de plasma humano



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

- As VEs foram extraídas das amostras de plasma PI12 (a, b), PI14 (c, d) (ver o texto para detalhes das amostras biológicas) aplicando o protocolo T6. As micrografias foram tomadas mediante a realização de microscopia eletrônica no pellet B gerado por uma ultracentrifugação a 90.000 x g por 60 min. Magnificação ~80.000 vezes (A e C) e Magnificação ~100.000 vezes (b e d). As partículas mostradas em (b) apresentaram tamanhos de 17 e 14 nm (círculo amarelo), e 26, 30 e 32 nm (círculo vermelho); em (d) apresentaram tamanhos de 21 e 26 nm (círculo vermelho). Os círculos em vermelhos destacam partículas que possuem formato semelhante a discos achatados com bordas mais claras e centros mais escuros e os amarelos destacam esferoides regulares. Algumas barras de escala foram adicionadas para comparação direta do tamanho das VEs revelando VEs na faixa de tamanho muito próximo ou abaixo de 30 nm incompatíveis com o tamanho descrito para pequenas VEs.

CONTEÚDO BIOLÓGICO NAS VES

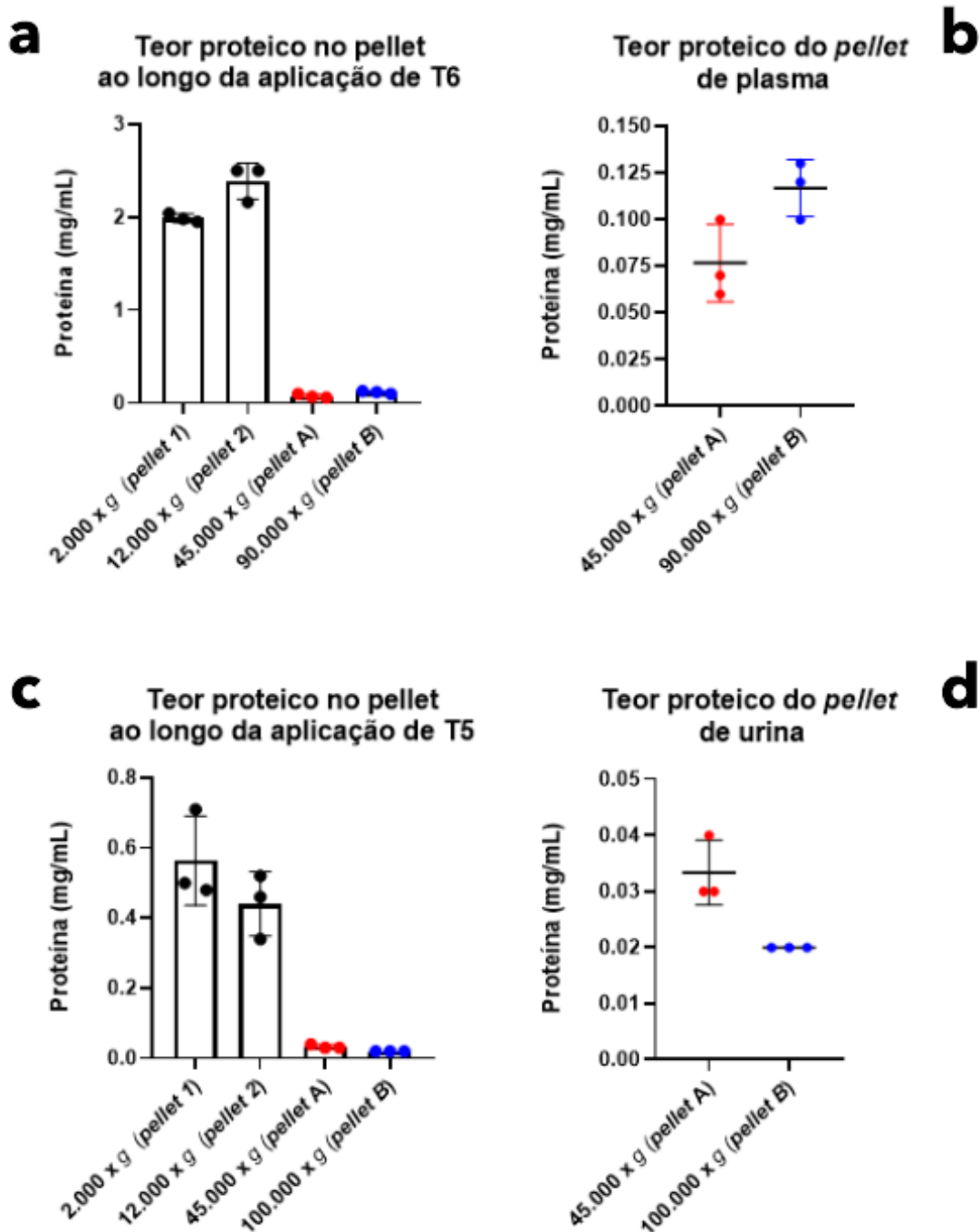
5.3.1 Concentração de proteínas no *pellet*

O conteúdo proteico total de cada *pellet* gerado durante as duas etapas de centrifugação (*pellet 1* e *pellet 2*) e de ultracentrifugação (***pellet A*** e ***pellet B***) dos protocolos T6 e T5 aplicados às amostras de plasma PI12, PI13 e PI14 e urina U9, U10 e U11 foi avaliado como forma de caracterizar o conteúdo biológico das VEs. A Figura 12 mostra que a maior parte das proteínas da amostra são removidas logo nas

duas primeiras centrifugações tanto em plasma quanto em urina. Apesar disso, o *pellet* 1 do plasma apresentou menor concentração de proteínas que o *pellet* 2, enquanto para urina ocorreu o oposto uma vez que o *pellet* 1 é que foi responsável por conter a maior concentração de proteínas. Já os **pellets A e B** de plasma e urina apresentaram concentrações mais baixas dentre todos os *pellets*. Semelhante ao que foi observado para os *pellets* 1 e 2, em plasma o **pellet A** apresenta menor concentração que o **pellet B**, enquanto para urina é o **pellet A** que contém maior concentração de proteínas. Apesar disso, o **pellet B** de urina das 3 amostras apresentou exatamente a mesma concentração.

A avaliação da concentração de proteínas em cada *pellet* permitiu verificar a variação do conteúdo ao longo da aplicação dos dois protocolos mostrando que a quantidade de proteína nos **pellets A e B** gerados pelos protocolos T5 e T6 foram semelhantes para estas amostras apesar das distintas forças de centrifugação empregadas. O **pellet A** de urina mostrou maior conteúdo proteico que o **pellet B**, possivelmente devido ao maior tempo de centrifugação o que levou à decantação de maior número de VEs e de outras proteínas solúveis. Para plasma, o **pellet A** apresentou menor concentração de proteínas do que o **pellet B** indicando que a condição escolhida não apresentou força centrífuga apropriada para remover completamente VEs e proteínas. Assim, restou material a ser isolado na segunda ultracentrifugação. Apesar da concentração média no **pellet A** de plasma e urina apresentarem valores semelhantes o volume inicial de amostra de plasma foi 4 vezes menor. Outro ponto importante a se destacar é que se tratando de VEs é esperado que um percentual alto do conteúdo proteico associado esteja protegido na parte interior da VEs, portanto estes valores podem representar apenas uma fração das proteínas totais.

Figura 12 - Conteúdo proteico em cada *pellet* ao longo da extração de vesículas extracelulares (VEs)



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Para quantificação foi utilizada a técnica de Lowry. Cada pellet foi gerado a partir de um volume inicial de 1 mL de plasma aplicando o protocolo T6 (a, b) ou 2 mL de urina aplicando protocolo T5 (c, d) (ver o texto para detalhes das amostras biológicas). (a) Mostra a concentração de proteína em cada pellet durante o isolamento das VEs das amostras de plasma PI12, PL13 e PI14. (b) compara a concentração

de proteínas encontradas pellet A (pellet contendo as VEs) e pellet B (sobrenadante residual da centrifugação). (c) Mostra a concentração de proteína em cada pellet durante o isolamento de VEs das amostras U9, U10 e U11. (d) Compara a concentração de proteínas encontradas pellet A (pellet contendo as VEs) e pellet B (sobrenadante residual da centrifugação)

5.3.2 Concentração de RNA total no pellet

Com objetivo de avaliar a quantidade de RNA total presente nas preparações de VEs, amostras dos pellets A e B obtidas a partir da aplicação do protocolo T6 em 1 mL das amostras de plasma PI12, PI13 e PI14 (Tabela 11); e amostras dos pellets A obtido a partir da aplicação do protocolo T5 em 2 mL das amostras de urina U9, U10 e U11 (Tabela 12) foram submetidas a procedimento de extração de RNA total baseada no reagente Trizol. Além disso, 5 alíquotas de 1 mL de urina sem identificação coletada de indivíduos portadores de DPI-AR foram submetidas ao protocolo T5 e em seguida ao procedimento de extração de RNA total (Tabela 12).

A Tabela 11 mostra que 50 µL do pellet A das amostras de plasma PI12 e PI13 apresentaram uma quantidade de RNA total maior que na amostra PI14. No pellet B foi observado que o RNA total nas amostras PI13 e PI14 apresentaram concentrações maiores que a amostra PI12. Essas diferenças podem significar falhas durante o processo de extração. Por exemplo a razão da absorbância 260/280 maior que 1,8 é empregado como um índice da pureza do ácido nucleico, pode ser observado que na amostra PI14 essa razão foi de 1,55. Outro fator que orienta à falhas no processo extrativo é a razão 260/230, a qual deveria ser maior que 2 para indicar ausência de contaminantes. No entanto, houve sucesso na extração de RNA total de algumas VEs.

Tabela 11. Quantificação de RNA total em vesículas extracelulares (VEs) isoladas de plasma no *pellet A* e B pelo protocolo teste 6 (T6) analisadas por Nanodrop

Amostras biológicas humanas	concentração ng/µL	260/280	260/230
pellet A plasma			
PI12	1123,3	2,49	0,81
PI13	1115,2	1,62	0,45
PI14	106,7	1,55	0,32
pellet B plasma			
PI12	1,3	1,64	0,44
PI13	83,2	1,53	0,29
PI14	76,5	1,54	0,27

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

A tabela mostra a concentração de RNA total, razão 260/280 e 260/230 encontradas para extração a partir de VEs isoladas de plasma aplicando o protocolo teste 6 (T6). Amostras enriquecidas de VEs de plasma extraídas na 1ª ultracentrifugação 45.000 x g por 60 min (**pellet A**); e extraídas na 2ª ultracentrifugação a 90.000 x g 60 min (**pellet B**) foram submetidas a extração de RNA total pelo método de extração baseado em Trizol (para detalhes ver M&M).

A *Tabela 12* mostra que 50 µL do **pellet A** apresentou RNA total em uma faixa de concentração variando entre 72,5 e 380,8 ng/µL para as amostras U9, U10 e U11 enquanto que nas amostras de portadores de DPI-AR a concentração variou entre 17,6 e 739,1 ng/µL. A razão 260/280 para todas as amostras de RNA total obtidas a partir do **pellet A** apresentaram valores entre 1,51 e 1,97 portanto próximas do valor ideal (1,8) o que indica boa pureza de ácidos nucleicos e relação a contaminação por proteínas. Por outro lado, a razão 260/230 encontrado a partir do mesmo *pellet* apresentou valores entre 0,27 e 1,64, portanto inferior do considerado ideal (valores próximos de 2,0). Semelhante ao encontrado para plasma, foi possível extrair RNA com baixa concentração de proteínas (razão 260/280), a partir das amostras de VEs de urina presentes no **pellet A**, apesar disso, as amostras continham níveis elevados de sais, fenol ou outros compostos orgânicos derivados do método de extração de RNA total.

Tabela 12. Quantificação de RNA total em vesículas extracelulares (VEs) isoladas de urina no *pellet A* pelo protocolo teste 5 (T5) analisadas por Nanodrop

Amostras biológicas humanas	concentração ng/µL	260/280	260/230
pellet A urina			
U9	380,8	1,90	1,32
U10	72,5	1,52	0,28
U11	221,2	1,71	0,56
DPI-AR Urina 1	264,5	1,74	0,68
DPI-AR Urina 2	420,6	1,97	1,64
DPI-AR Urina 3	17,6	1,52	0,27
DPI-AR Urina 4	373,3	1,87	1,20
DPI-AR Urina 5	739,1	1,59	0,33

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

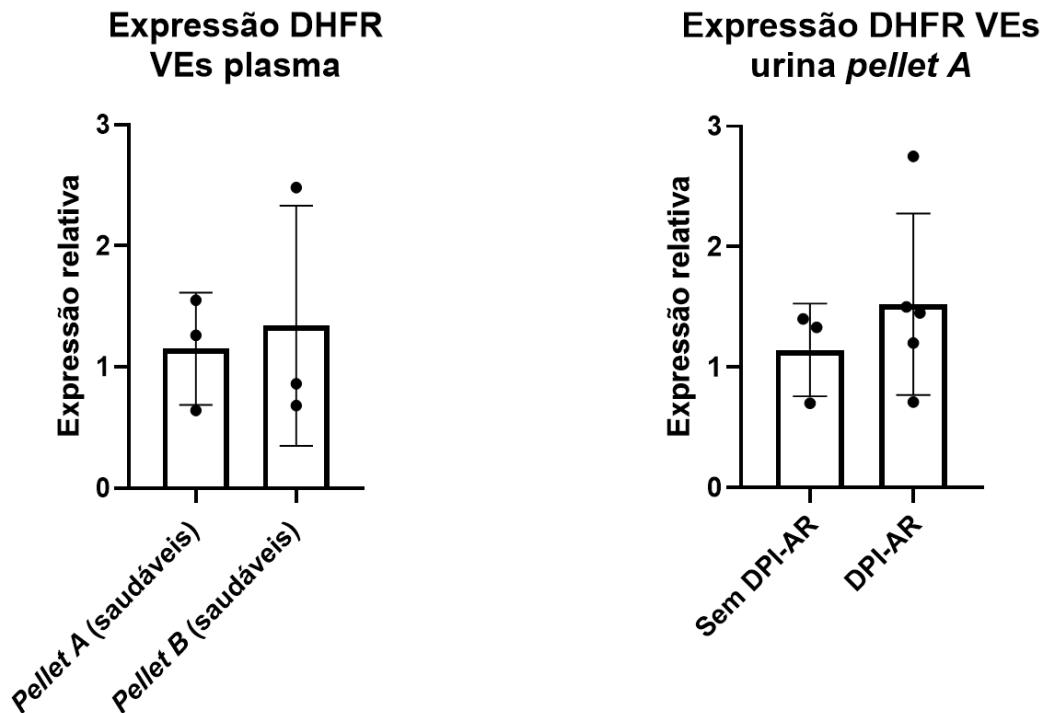
A tabela mostra a concentração de RNA total, razão 260/280 e 260/230 encontradas para extração a partir de VEs isoladas de urina aplicando o protocolo teste 5 (T5). Amostras enriquecidas de VEs de plasma extraídas na 1ª ultracentrifugação 45.000 x g por 60 minutos (**pellet A**) foram submetidas a extração de RNA total pelo método de extração baseado em Trizol (para detalhes ver M&M).

A extração de RNA efetuada permitiu separar RNA total de contaminantes com lipídeos e proteínas presentes nas VEs, porém o método de extração baseado em Trizol tem suas limitações, principalmente considerando o pouco, pouco volume do material de partida utilizado (50 µL) o que resultou em contaminação por solventes orgânicos. Além disso foi possível confirmar a presença de RNA em amostras obtidas a partir da aplicação dos protocolos teste T5 e T6 em níveis suficientes para análises downstream.

5.3.3 Quantificação da expressão gênica por RT-qPCR

Com objetivo de avaliar a qualidade e integridade do RNA extraído a partir de amostras dos pellets A e B obtidas com a aplicação do protocolo T6 em 0,5 mL das amostras de plasma PI12, PI13 e PI14; amostras dos pellets A obtidas a partir da aplicação do protocolo T5 em 2 mL das amostras de urina U9, U10, U11 e 0,5 mL de urinas DPI-AR de 1 a 5, foram submetidas a síntese de DNA complementar (cDNA) em seguida RT-qPCR (Figura 13). Neste trabalho utilizamos como transcritos de interesse o codificado pelo gene DHFR.

Figura 13 - Expressão relativa de DHFR em VEs de plasma e urina



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Expressão relativa de DHFR no pellet A x B das amostras PI12, PI13 PI14 (esq.) Expressão de DHFR no pellet A de urina das amostras U9, U10, U11 x DPI-AR 1-5 (dir.). Amostras de RNA proveniente dos pellets A e B do protocolo T6 e amostras dos pellets A do protocolo T5 e urinas DPI-AR de 1 a 5, foram submetidas a síntese de DNA complementar (cDNA) em seguida RT-qPCR em comparação relativa ao gene RNU6.

A expressão relativa de DHFR entre no **pellet A** e **B** do protocolo T6 aplicado a amostras de plasma (Figura 11) indica que apesar da presença de contaminação por fenol, foi possível amplificar cDNA derivado de RNA extraído de ambos os **pellets**. Foi possível observar que no **pellet A** a expressão do gene DHFR estava de 0,64 a 1,55 vezes maior que o gene de referência contra uma faixa de 0,68 a 2,48 vezes maior no **pellet B**. A expressão relativa de DHFR no **pellet A** do protocolo T5 aplicado a amostras de urina de pessoas sem DPI-AR versus DPI-AR (Figura 13), mostrou que os indivíduos sem DPI-AR apresentaram expressão de DHFR numa faixa de 0,7 a 1,4 vezes maior que o gene de referência enquanto indivíduos DPI-AR apresentaram expressão de 0,71 a 2,75 vezes maior que o gene de referência. Resultados preliminares da técnica de RT-qPCR representada pela expressão diferencial de DHFR permitiram identificar a presença de cDNA em níveis quantificáveis.

DISCUSSÃO

O glossário Biomarkers, EndpointS and other Tools (BEST) elaborado pela FDA define um biomarcador como uma característica que é medida como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas a uma exposição ou intervenção, incluindo intervenções terapêuticas (CAGNEY et al., 2018). Tradicionalmente, muitos biomarcadores têm sido obtidos por meio de técnicas invasivas, como a coleta de amostra de sangue, biopsias e punções, para rastrear, identificar, ou permitir o seguimento do curso de uma doença ou de um tratamento (ESTEBAN; CASTAÑO, 2009). Embora esses métodos sejam eficazes para obter marcadores biológicos, eles podem ser invasivos, desconfortáveis e potencialmente associados a riscos e complicações. Além disso, diversos biomarcadores tem apresentado limitações quanto a sua estabilidade e durabilidade fora dos sistemas biológicos e este fato tem diminuído o tempo máximo em que estes marcadores podem ser analisados de forma confiável após a coleta (MAYEUX, 2004). Por estes motivos, a busca por novos biomarcadores em sistemas mais estáveis, preferencialmente obtidos através de métodos não invasivos ou minimamente invasivos, tem sido uma demanda ainda não atendida na pesquisa em áreas de biomedicina e afins.

A literatura tem sugerido que VEs presentes em fluidos biológicos podem representar uma matriz mais apropriada para o estudo de biomarcadores do que o próprio fluido biológico. Esse entendimento está fundamentado no fato de que biomoléculas como, miRNAs, proteínas, metabólitos, entre outras, podem degradar se o material biológico não for imediatamente processado. Tem sido extensamente demonstrado que a estabilidade de miRNAs plasmáticos fica comprometida se a extração do RNA não ocorrer em até 48 h, ainda mesmo quando o material é mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (SOURVINOU; MARKOU; LIANIDOU, 2013). Resultados similares foram observados para os miRNAs urinários miRNA-16 e miRNA-21 que resultaram na redução do conteúdo em 86 % e 90 %, respectivamente após um único ciclo de congelamento e descongelamento (MALL et al., 2013). Esses efeitos estiveram em parte associados à ação de proteases e nucleases, as que se encontram de forma abundante em fluidos biológicos (ALAN, 1993; HERRICK et al., 1990). Ainda, deve ser mencionado que estudos clínicos que envolvem a coleta seriada de material biológico, a qual pode ocorrer em vários centros – nacionais e internacionais –,

apresentam a dificuldade de não poder processar as amostras biológicas de forma imediata, já que cada sítio de coleta deveria apresentar pessoal capacitado e toda a infraestrutura necessária para o processamento das amostras biológicas. Assim, embora exista uma assinatura de biomarcadores para uma determinada condição presente em fluídos biológicos, essa pode ser inadvertida pelos pesquisadores por causa da baixa estabilidade de algumas biomoléculas. Tal fato, justifica a busca por novas matrizes que possam manter a estabilidade do analito por mais tempo.

Em contrapartida, vários biomarcadores presentes em VEs têm sido demonstrado permanecer estáveis décadas após a coleta do material sem mostrar grandes perdas do cargo, por exemplo, nos níveis de RNA (ENDERLE et al., 2015). Neste cenário, estudos separados mostraram que o conteúdo e qualidade do RNA presente em VEs de plasma não apresentaram claras marcas de degradação quando o material biológico foi armazenamento a 4 °C, -20 °C ou -80 °C, ou quando foi submetido a dois ciclos de congelamento e descongelamento (GE et al., 2014; SANZ-RUBIO et al., 2018). Esses dados estão de acordo com a estabilidade mostrada para os miRNAs, miRNA-let-7a e miR-142-3p, presentes em VEs de plasma após o material ter sido mantido a temperatura ambiente por dois dias (ENDERLE et al., 2015).

VEs presentes em fluidos biológicos, especialmente as com tamanho entre 30 e 200 nm tem sido consideradas biopsias líquidas por apresentarem proteínas, lipídios e RNAs, entre outras biomoléculas característica da célula que a originou (PATHAN et al., 2019). Essa característica permite identificar o tipo e o estado – fisiológico ou patológico – da célula que originou as VEs (NIKOLOFF et al., 2021). Assim, pode ser avaliada a homeostasia de diferentes tecidos/órgãos mediante o estudo de VEs no plasma de forma pouco invasiva (PATHAN et al., 2019). Por exemplo, o acúmulo anormal de proteína amiloide β e transferência de proteína tau hiperfosforilada em células do sistema nervoso central tem sido frequentemente observado em condições neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (MORISHIMA-KAWASHIMA; IHARA, 2002). Os níveis destes marcadores no líquido cefalorraquidiano têm sido considerado potencial biomarcador para a identificação da doença de Alzheimer (ALVES et al., 2010). No entanto, considerando que existem dificuldades inerentes à coleta do líquido cefalorraquidiano para a identificação destas proteínas e seu conteúdo plasmático não acompanha a gravidade da doença, VEs presentes no plasma transportando proteína amiloide β e Tau hiperfosforilada têm sido

apresentados como um biomarcador alternativo pouco invasivo (HILL, 2019; QUEK; HILL, 2017).

Adicionalmente, algumas doenças não possuem biomarcadores que indiquem a real extensão e severidade da condição no plasma ou urina, e a análise de VEs tem sido particularmente útil para essa finalidade. Por exemplo, indivíduos com doença renal diabética apresentam redução da atividade da gelatinase e acúmulo anormal de ceruloplasmina no rim (GUDEHITLU et al., 2015). Tais alterações foram observadas em VEs urinárias, mas não na urina, demonstrando a grande vantagem de contar com VEs para a busca de novos marcadores biológicos. Outro exemplo, que ressalta a vantagem de usar VEs para o diagnóstico e seguimento de doenças é a recente identificação da presença do miRNA-21 em VEs obtidas de plasma de indivíduos afetados por câncer de próstata (JOKOVIĆ et al., 2022). É sabido que o aumento no sangue do biomarcador antígeno prostático específico é suspeita de câncer de próstata (STAMEY et al., 1987). No entanto, a quantificação desse marcador apresenta baixa especificidade e os níveis podem ser modulados pelo uso de medicamentos, infecções urinárias, prostatite, reposição androgênica, entre outros (CARTER et al., 1992; MESSNER et al., 2020). Neste caso, a quantificação do miRNA-21 em VEs de plasma permitiu o diagnóstico com alta sensibilidade e especificidade e distinguiu o fenótipo mais agressivo da doença. Porém, a quantificação plasmática do mi-RNA-21 não evidenciou tais associações (JOKOVIĆ et al., 2022).

Assim as vantagens acima exemplificadas do uso de VEs para a busca de biomarcadores encontram seu fundamento na própria biologia das VEs, por representar uma matriz biológica que preserva o cargo outorgando maior estabilidade ao longo do tempo devido à presença de uma membrana, e por apresentar uma assinatura molecular que permite identificar a célula que deu origem.

Embora as VEs representem uma revolução na identificação de novos biomarcadores, existe um outro desafio que deve ser enfrentado pela comunidade científica. O isolamento de VEs a partir de fluídos biológicos necessita de processos específicos de extração, o que pode ser considerado uma desvantagem quando comparado com a coleta de uma amostra de urina ou de plasma. Em função da tecnologia empregada, os métodos de isolamentos atuais resultam em níveis diferentes de rendimento, pureza e reprodutibilidade (WILLIAMS et al., 2023). Adicionalmente, o custo, o volume de amostra necessários e a aplicação de

metodologias subsequentes têm sido reportados com fatores determinantes na escolha do método de isolamento (THÉRY et al., 2018).

A ultracentrifugação diferencial foi a primeira técnica utilizada para separar VEs de fluidos e corresponde ao método mais utilizado em pesquisas com VEs (WILLIAMS et al., 2023; WOLF, 1967). Uma vertente dos estudos nesta área relata as limitações da técnica destacando como fatores negativos a baixa recuperação de proteínas de VEs, a baixa reprodutividade das extrações, perda do estado funcional das VEs e/ou alto custo dos equipamentos de ultracentrifugação. Entretanto, outros estudos ressaltam que a ultracentrifugação diferencial apresenta boa capacidade de separação de VEs, baixo custo adicional e alta integridade e funcionalidade das VEs após o processo. Essas discrepâncias parecem encontrar seu fundamento em que protocolos que se restringiram a seguir fielmente os dados disponíveis na literatura, como a adoção da força g relativa final entre 100.000 e 200.000 x g e tempo de centrifugação entre 60 e 120 min, não atentaram para outros fatores como a viscosidade do fluido biológico que está se utilizando, o comprimento do tubo de extração, e o tipo de rotor oscilante ou de ângulo fixo (LIVSHITS et al., 2015; TAYLOR; SHAH, 2015). Por exemplo, VEs de sobrenadante de cultura isoladas em duas etapas de ultracentrifugação de 100.000 X g por 60 min foram descritas como estruturas que perderam a integridade quando analisados por MET e espectroscopia de correlação de fluorescência (MOL et al., 2017). Além disso, o perfil de distribuição de tamanho das VEs obtidas através de ultracentrifugação tem mostrado VEs com tamanho maior aos encontrados para outras técnicas equivalentes, como por exemplo a SEC (TAYLOR; SHAH, 2015). Neste sentido, o tamanho maior pode ser resultado da agregação ou fusão de VEs durante a ultracentrifugação (LINARES et al., 2015; NORDIN et al., 2015). Outra observação importante é que a ultracentrifugação de VEs é diretamente influenciada pela viscosidade do biofluido. Assim, tem sido demonstrado uma menor eficiência de sedimentação de VEs quando a viscosidade é maior. Por exemplo, o plasma apresenta uma viscosidade a 20 °C de 1,65 centipoise (cP), o soro de 1,4 cP, e o meio de cultura de 1,1 cP (MOMEN-HERAVI et al., 2013).

Além disso, os rotores oscilantes parecem permitir isolamento de vesículas com coeficientes de sedimentação semelhantes, enquanto os rotores de ângulo fixo são mais eficientes na separação de vesículas com coeficientes de sedimentação diferentes (CVJETKOVIC; LÖTVALL; LÄSSER, 2014). O coeficiente de sedimentação é calculado em função do tamanho da partícula, da densidade do fluido, do ângulo de

centrifugação e do percurso que as partículas devem percorrer até o fundo do tubo (portanto do comprimento do tubo em si). Estes dados evidenciam a necessidade de estabelecer condições específicas de ultracentrifugação para cada fluido biológico, levando em consideração sua densidade, tipo de rotor e comprimento do tubo conforme tem sido encorajado pela ISEV desde 2018 (THÉRY et al., 2018).

Diferentes técnicas de isolamento de VEs são frequentemente comparadas para estimar a eficiência relativa da extração. Foi mostrado que a ultracentrifugação diferencial, a cromatografia de exclusão de tamanho e a captura por imunoafinidade produziram VEs de tamanho entre 40 nm e 100 nm, tamanho correspondente com pequenas VEs (TAURO et al., 2012). A ultracentrifugação diferencial também apresentou resultados semelhantes à cromatografia em termos de conteúdo proteico total (TAURO et al., 2012). Esses dados estão de acordo com o esperado para os parâmetros de recuperação e especificidade preconizados pela ISEF (Tabela 2). De acordo com a sociedade, ambas as técnicas apresentam recuperação e especificidade intermediárias (THÉRY et al., 2018). Por outro lado, a extração de VEs de plasma com uso de kits para precipitação de VEs resultou em preparações de VEs com quantidade de proteínas seis vezes maior que quando comparada com a ultracentrifugação diferencial (SERRANO-PERTIERRA et al., 2019). No entanto, essa diferença foi reduzida para 0,5 vezes quando as proteínas específicas de VEs foram analisadas, sugerindo que a diferença quantitativa estava principalmente determinada por contaminações por proteínas plasmáticas (SERRANO-PERTIERRA et al., 2019).

Os kits de extração baseados na precipitação de VEs pelo uso de polímeros são considerados métodos com alta recuperação, mas com baixa especificidade (THÉRY et al., 2018). O uso deste tipo de kit pode também comprometer a atividade das VEs por se encontrarem contaminadas com o próprio polímero empregado no processo de extração (LI et al., 2017; WILLIAMS et al., 2023). Neste panorama cada técnica de isolamento possui pontos fortes e fracos que devem ser considerados de acordo com a finalidade a que se destinam as VEs isoladas. Por exemplo, por ser imuno-específica, a imunocaptura de VEs pode não ser aconselhada para estudos que visem obter um perfil geral de VEs para identificação de biomarcadores, pois irá excluir todas as populações de VEs que não possuam a proteínas de interesse limitando o material da análise. Por outro lado, se o objetivo for estudar o papel de VEs de um determinado tipo celular ou tecido, o isolamento de VEs totais podem ocultar o biomarcador de interesse pela presença de contaminantes. Em geral, a

ultracentrifugação diferencial tem representado uma tecnologia equilibrada na obtenção de VEs de fluidos biológicos pela possibilidade de ser ajustada de acordo com a necessidade do estudo. Por ser escalável para grandes volumes de amostra, não requerer reagentes químicos específicos, por permitir a reutilização dos tubos e por que pode ser acessível e de baixo custo para pesquisadores ou centros que já possuam ultracentrifugas, parece representar a técnica mais apropriadas no nosso meio de pesquisa.

Considerando os prós e contras descritos na literatura para as diferentes metodologias de extração de VEs, o presente estudo focou no isolamento de pequenas VEs de plasma e urina baseado na ultracentrifugação diferencial. O método padronizado utilizou etapas prévias de centrifugações de baixa e moderada forças centrífugas para remover contaminantes como células e debris celulares. A inclusão esta etapa inicial de limpeza é amplamente aconselhada em diversos protocolos baseados em ultracentrifugação, principalmente após Théry e colaboradores mostrarem que uma etapa de limpeza pré-isolamento reduziu a presença de contaminantes, resultando no aumento do rendimento relativo de VEs de cultura de células e fluidos biológicos (THÉRY et al., 2006).

Após as duas centrifugações iniciais foi adicionada uma etapa de filtração para remover agregados de proteínas e grandes VEs. Esta etapa contou com o suporte teórico de diferentes trabalhos que mostraram que a filtração pode remover agregados proteicos presentes na matriz, ou que se formam durante as etapas de centrifugação, além de ser apresentado como uma alternativa que pode substituir as etapas iniciais de limpeza (THÉRY et al., 2006). Apesar disso, muitos trabalhos utilizam a filtração com filtro de 0,22 μ M como etapa pós ultracentrifugação. Neste trabalho optamos por utilizar a filtração pré-ultracentrifugação entendendo que a formação de agregados proteicos pós-ultracentrifugação poderia obstruir os poros do filtro e reter parte das VEs reduzindo a quantidade de VEs extraídas.

Após a filtração, foi adicionada uma etapa de ultracentrifugação que resulta no ponto chave do método. Apesar de muitos trabalhos utilizarem forças g superiores, há diversos relatos de que a força e tempo excessivos de ultracentrifugação podem danificar a estrutura das VEs e permitir a coextração de materiais de origem não vesicular. Para contornar esta limitação, avaliamos qual a menor força e tempo são necessários para trazer para o pellet a maior parte das pequenas VEs, de forma que o sobrenadante residual submetidos a condições tradicionais em torno de 100.000 X

g não apresentasse VEs com as dimensões associadas a pequenas VEs quando avaliados por DLS. A condição que melhor cumpriu esta função foi 45.000 x g por 60 min plasma e 120 min para urina.

A avaliação de distribuição de tamanho por DLS neste trabalho, revelou que diferente das VEs de urina que apresentaram baixa variação de tamanho, as VEs obtidas a partir de plasma apresentaram moderada variação de tamanho. Estes resultados estão de acordo com os descritos por outros grupos que mostraram que, apesar de grande parte das VEs presentes no plasma serem originadas por plaquetas e eritrócitos (TRIPISCIANO et al., 2020), VEs de origem pulmonar, neuronal e cardíaca também podem estar presentes (MUSTAPIC et al., 2017; PANTELEEV et al., 2017). Por outro lado, VEs presentes na urina tem origens mais restritas, normalmente sendo atribuídas majoritariamente a células renais e do epitélio do sistema urinário, portanto são mais homogêneas em tamanho conforme também observado em outros trabalhos (MERCHANT et al., 2017). Apesar da variabilidade na distribuição do tamanho das VEs encontrada neste trabalho, ambas matrizes biológicas, plasma e urina, geraram majoritariamente VEs com tamanho dentro do intervalo entre 30 nm e 200 nm o que permitem que sejam consideradas como pequenas VEs.

A MET é uma técnica de imagem avançada que permite monitorar a qualidade e a pureza de amostras contendo VE. A MET também permite a distinção entre VEs e partículas tamanho semelhante, mas que não são VEs de forma mais eficiente do que outros métodos (COUMANS et al., 2017). Porém, considerando que os microscópios eletrônicos foram projetados para a observação de amostras sólidas secas sob alto vácuo, a presença de VEs na forma de suspensões compromete a análise (MALENICA et al., 2021). Ainda, as VEs não são condutores elétricos, pelo contrário, as VEs consistem em átomos leves e podem ser facilmente danificados pela exposição prolongada ao feixe de elétrons na MET (LI et al., 2017).

A análise da morfologia das VEs obtidas a partir de fluidos biológicos encontra-se em plena expansão; portanto, ainda não existem consensos claros que permitam uma caracterização plena. Frequentemente as VEs obtidas de plasma e urina são descritas na literatura como estruturas com formatos esféricos, de taça, de bola redonda ou oval perfurada, e em forma de xícara. Como essas descrições têm sido realizadas empregando a MET, foi levantada a possibilidade de existirem artefatos metodológicos que dependeriam do preparo das amostras e resultaria

nesses formatos (ARRAUD et al., 2014; DASH et al., 2021). Este problema potencial tem sido parcialmente solucionado mediante a introdução da criomicroscopia eletrônica de transmissão; técnica que permite preservar a arquitetura das VEs pelo congelamento imediato das amostras (NOBLE et al., 2020). Assim, esta técnica tem mostrado que VEs obtidas a partir de plasma apresentaram majoritariamente formato redondo, alongado e tubular preenchido, oval esférico, e tubular com formato de salsicha (LINARES et al., 2015). O significado biológico da morfologia das VEs ainda não tem sido definido, possivelmente devido à falta de padronização dos métodos. Sendo assim ainda não há evidências claras de que a morfologia das VEs possa estar associada a alguma patologia. Apesar disso, evidências muito recentes tem mostrado que VEs obtidas a partir da urina de triatletas apresentaram morfologia e composição distintas daqueles presentes na urina de indivíduos sedentários indicando que ainda há muitos aspectos desconhecidos que podem afetar a morfologia de VEs (PIETRANGELO et al., 2023).

As VEs são uma classe heterogênea de partículas secretadas por todos os tipos de células e já foram identificadas em praticamente todos os tipos de fluidos biológicos (THÉRY et al., 2018). Porém, é sabido que certas circunstâncias podem afetar as células provocando alterações na quantidade e principalmente na composição das VEs liberadas (ABRAMOWICZ; WIDŁAK; PIETROWSKA, 2019). Níveis aberrantes de diversas proteínas e ácidos nucleicos incluindo mRNA e miRNAs foram reportados em VEs isoladas de fluidos biológicos de indivíduos com condições inflamatórias agudas e crônicas, como doenças autoimunes (HILL, 2019)(DAI; AHMED, 2011), infecciosas (SCHOREY; HARDING, 2016), neurodegenerativas (HILL, 2019) e câncer (MÖLLER; LOBB, 2020). A importância central do conteúdo das VEs nos mecanismos fisiopatológicos destas condições tem alavancado o surgimento de novos biomarcadores e abordagens terapêuticas baseadas em VEs (NAITO et al., 2017). Estes fatos tem justificado novos estudos investigando o possível papel de VEs em condições semelhantes preferencialmente em fluidos de obtenção pouco ou minimamente invasivo.

No presente trabalho, além de padronizar um método para a extração de pequenas VEs de plasma e urina, também foi avaliada a funcionalidade das VEs mediante a determinação de biomoléculas transportadas pelas vesículas. Os valores de RNA total obtidos estiveram de acordo com a literatura que relata que baixas concentrações de RNA podem ser encontradas em VEs isoladas por

ultracentrifugação, principalmente devido a perdas de material ao longo das etapas de centrifugação (COUGHLAN et al., 2021; TAYLOR; SHAH, 2015). Após isolar o RNA total, como exemplo foi quantificado o conteúdo de mRNA de DHFR em vesículas que foram extraídas de urina de indivíduos saudáveis e afetados por DPI-AR. A quantificação de DHFR foi realizada nos dois grupos de VEs. Embora não houvesse amostragem estatisticamente relevante para distinguir o perfil de expressão de DHFR entre os dois grupos, foi observada uma maior expressão nas VEs extraídas de urina obtida de indivíduos com DPI-AR. Hipoteticamente, pode-se sugerir que esses indivíduos com DPI-RA apresentaram uma resposta inflamatória sustentada que foi evidenciada pelo aumento do mRNA de DHFR. De fato, tem sido proposto que um aumento de DHFR em vesículas tem um papel fundamental na ativação da resposta pró-inflamatória de macrófagos (PENG et al., 2021), podendo neste caso representar um potencial alvo terapêutico na DPI-RA.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho estabelecemos um método de isolamento de VEs baseado na ultracentrifugação diferencial que permitiu o isolamento de pequenas VEs de plasma e urina com grau de pureza e integridade satisfatório. A principal vantagem deste método é o baixo custo. As modificações que foram introduzidas aos métodos previamente descritos na literatura permitiram manter a integridade das VEs, além de eliminar a formação de agregados amplamente descritos como desvantagens associadas a ultracentrifugação. Frente a outras técnicas, este método se mostrou versátil, permitindo ajustes que aumentaram a especificidade por pequenas VEs e a redução de material de origem não vesicular. A presença de DHFR em VEs permitiu levantar a possibilidade da DHFR em DPI-RA representar um novo marcador de inflamação.

LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Este estudo apresentou algumas limitações importantes principalmente em função de atrasos na aquisição de reagentes para microscopia, PCR e tubos específicos e a falta

de acesso ao aparelho de DLS ambos em parte causados devido a emergência de COVID-19.

Outras limitações incluem a ausência de avaliação de proteínas marcadoras de VEs. Neste caso, kits contendo análise para 8 marcadores em VEs foram importados de uma empresa nos EUA, porém só recentemente chegaram a Santa Catarina. Ter avaliado tais proteínas poderia ter lançado luz sobre as características proteicas das pequenas estruturas que encontramos no plasma e que não possuem dimensões como as esperadas para pequenas VEs.

Número de partículas é um parâmetro importante que infelizmente não dispúnhamos de tecnologia para mensurar. A avaliação deste parâmetro permitiria entender um pouco melhor a distribuição de partículas recuperadas em cada pellet suportando os achados presentes neste estudo.

Ainda, o número de amostras de indivíduos com DPI-AR não permitiu inferir se havia diferença estatística entre os grupos, além disso a ausência de indivíduos com semelhanças fisiológicas como idade e sexo para serem controles dificultou a comparação direta entre os grupos.

7.2

PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectiva futura deste estudo isolaremos VEs de plasma e urina de indivíduos afetados por DPI-AR em diferentes estágios da condição. A partir disto, avaliaremos a presença de 30 miRNAs amplamente relatados na literatura por estarem relacionados a AR, DPI e processos inflamatórios entre outros de nosso interesse. Com isso pretendemos investigar padrões moleculares associados a gravidade da doença que possam ser utilizados como biomarcadores.

REFERÊNCIAS

ABRAMOWICZ, A.; WIDLAK, P.; PIETROWSKA, M. Proteomic analysis of exosomal cargo: the challenge of high purity vesicle isolation. **Molecular Bio Systems**, v. 12, n. 5, p. 1407–1419, 2016.

ABRAMOWICZ, A.; WIDLAK, P.; PIETROWSKA, M. Different types of cellular stress affect the proteome composition of small extracellular vesicles: A mini review. **Proteomes**, v. 7, n. 2, p. 1–10, 2019.

AINOLA, M. M. et al. Pannus invasion and cartilage degradation in rheumatoid arthritis: Involvement of MMP-3 and interleukin-1 β . **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 23, n. 5, p. 644–650, 2005.

ALVES, G. et al. CSF amyloid- β and tau proteins, and cognitive performance, in early and untreated Parkinson's Disease: The Norwegian ParkWest study. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 81, n. 10, p. 1080–1086, 2010.

ANDREU, Z.; YÁÑEZ-MÓ, M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. SEP, p. 1–12, 2014.

ANTONYAK, M. A. et al. Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 12, p. 4852–4857, 2011.

ARRAUD, N. et al. Extracellular vesicles from blood plasma: Determination of their morphology, size, phenotype and concentration. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 12, n. 5, p. 614–627, 2014.

BARILE, L.; VASSALLI, G. Exosomes: Therapy delivery tools and biomarkers of diseases. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 174, p. 63–78, 2017.

BATTISTELLI, M.; FALCIERI, E. Apoptotic bodies: Particular extracellular vesicles involved in intercellular communication. **Biology**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2020.

BECKER, A. et al. Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. **Cell Press**, v. 30, n. 12, p. 836–848, 2016.

BEG, F. et al. Inflammation-associated microRNA changes in circulating exosomes of heart failure patients. **BMC Research Notes**, v. 10, n. 1, p. 1–6, 2017.

BISSONNETTE, E. Y. et al. Cross-Talk Between Alveolar Macrophages and Lung Epithelial Cells is Essential to Maintain Lung Homeostasis. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. October, p. 1–12, 2020.

BLANC, L. et al. Exosome release by reticulocytes - An integral part of the red

blood cell differentiation system. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 35, n. 1, p. 21–26, 2005.

BLANC, L.; VIDAL, M. New insights into the function of Rab GTPases in the context of exosomal secretion. **Small GTPases**, v. 9, n. 1–2, p. 95–106, 2018.

BUZAS, E. I. et al. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. **Nature Publishing Group**, v. 10, n. 6, p. 356–364, 2014.

CAGNEY, D. N. et al. The FDA NIH Biomarkers, EndpointS, and other Tools (BEST) resource in neuro-oncology. **Neuro-Oncology**, v. 20, n. 9, p. 1162–1172, 2018.

CARTER, B. H. et al. Longitudinal Evaluation of Prostate-Specific Antigen Levels in Men With and Without Prostate Disease. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 267, n. 16, 1992.

CHEN, J.; HU, C.; PAN, P. Extracellular vesicle microRNA transfer in lung diseases. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. DEC, 2017.

CHEN, Z. et al. Therapeutic Potential of Mesenchymal Cell–Derived miRNA-150-5p–Expressing Exosomes in Rheumatoid Arthritis Mediated by the Modulation of MMP14 and VEGF. **The Journal of Immunology**, v. 201, n. 8, p. 2472–2482, 2018.

COLEMAN, B. M.; HILL, A. F. Extracellular vesicles - Their role in the packaging and spread of misfolded proteins associated with neurodegenerative diseases. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 40, p. 89–96, 2015.

COLLINO, F. et al. Exosome and Microvesicle-Enriched Fractions Isolated from Mesenchymal Stem Cells by Gradient Separation Showed Different Molecular Signatures and Functions on Renal Tubular Epithelial Cells. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 13, n. 2, p. 226–243, 2017.

COREN, L. V.; SHATZER, T.; OTT, D. E. CD45 immunoaffinity depletion of vesicles from Jurkat T cells demonstrates that exosomes contain CD45: No evidence for a distinct exosome/HIV-1 budding pathway. **Retrovirology**, v. 5, p. 1–5, 2008.

COTTIN, V. et al. Presentation, diagnosis and clinical course of the spectrum of progressive-fibrosing interstitial lung diseases. **European Respiratory Review**, v. 27, n. 150, 2018.

COUGHLAN, C. et al. Comparison of Techniques for Downstream Analyses. v. 88, n. 1, 2021.

COUMANS, F. A. W. et al. Methodological guidelines to study extracellular vesicles. **Circulation Research**, v. 120, n. 10, p. 1632–1648, 2017.

CVJETKOVIC, A.; LÖTVALL, J.; LÄSSER, C. The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, n. 1, p. 1–11, 2014.

DAI, R.; AHMED, S. A. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. **Translational Research**, v. 157, n. 4, p. 163–179, 2011.

DAI, Y. et al. Rheumatoid arthritis–associated interstitial lung disease: an overview of epidemiology, pathogenesis and management. **Clinical Rheumatology**, v. 40, n. 4, p. 1211–1220, 2021.

DASH, M. et al. Exosomes isolated from two different cell lines using three different isolation techniques show variation in physical and molecular characteristics. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1863, n. 2, p. 183490, 2021.

DE SOUSA, M. C. et al. Deciphering miRNAs' action through miRNA editing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 24, p. 1–22, 2019.

DESROCHERS, L. M. et al. Microvesicles provide a mechanism for intercellular communication by embryonic stem cells during embryo implantation. **Nature Communications**, v. 7, n. May, 2016.

DEUN, J. VAN et al. The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3078, n. 12, p. 1–14, 2014.

DINKINS, M. B.; WANG, G.; BIEBERICH, E. Sphingolipid-Enriched Extracellular Vesicles and Alzheimer's Disease: A Decade of Research. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 60, n. 3, p. 757–768, 2017.

ENDERLE, D. et al. Characterization of RNA from Exosomes and Other Extracellular Vesicles Isolated by a Novel Spin Column-Based Method. p. 1–19, 2015.

ERFAN, R. et al. Long Non-Coding RNA PVT1 and Its Target miRNA-146a as Potential Prognostic Biomarkers in Rheumatoid Arthritis Patients. **LIFE**, v. 11, n. 1382, p. 14, 2021.

ESPOSITO, A. J. et al. Thoracic Manifestations of Rheumatoid Arthritis. **Clinics in Chest Medicine**, v. 40, n. 3, p. 545–560, 1 set. 2019.

ESTEBAN, M.; CASTAÑO, A. Non-invasive matrices in human biomonitoring: A review. **Environment International**, v. 35, n. 2, p. 438–449, 2009.

FITZNER, D. et al. Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 3, p. 447–458,

2011.

FREITAS, T. M. C. et al. Síndrome de Sjögren: revisão de literatura e acompanhamento de um caso clínico. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 70, n. 2, p. 283–288, 2004.

FUJITA, Y. et al. Extracellular vesicles in lung microenvironment and pathogenesis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21, n. 9, p. 533–542, 2015.

FURUTA, T. et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Promote Fracture Healing in a Mouse Model. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 5, n. 12, p. 1620–1630, 2016.

GE, Q. et al. miRNA in Plasma Exosome is Stable under Different Storage Conditions. p. 1568–1575, 2014.

GENG, T. et al. Recent Advancement and Technical Challenges in Developing Small Extracellular Vesicles for Cancer Drug Delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 38, n. 2, p. 179–197, 2021.

GHANAM, J. et al. DNA in extracellular vesicles: from evolution to its current application in health and disease. **Cell and Bioscience**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2022.

GOETZL, E. J. et al. Altered cargo proteins of human plasma endothelial cell-derived exosomes in atherosclerotic cerebrovascular disease. **FASEB Journal**, v. 31, n. 8, p. 3689–3694, 2017.

GU, P. et al. Breast Tumor-Derived Exosomal MicroRNA-200b-3p Promotes Specific Organ Metastasis Through Regulating CCL2 Expression in Lung Epithelial Cells. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, n. June, 2021.

GUDEHITHLU, K. P. et al. In Diabetic Kidney Disease Urinary Exosomes Better Represent Kidney Specific Protein Alterations Than Whole Urine. **American Journal of Nephrology**, v. 42, n. 6, p. 418–424, 2015.

HEIJNEN, H. F. G. et al. Activated platelets release two types of membrane vesicles: Microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and α -granules. **Blood**, v. 94, n. 11, p. 3791–3799, 1999.

HILL, A. F. Extracellular vesicles and neurodegenerative diseases. **Journal of Neuroscience**, v. 39, n. 47, p. 9269–9273, 2019.

HOHENSINNER, P. J. et al. Alternative activation of human macrophages enhances tissue factor expression and production of extracellular vesicles. **Leukocyte Biology**, v. 106, n. 2, p. 454–463, 2021.

HORBAY, R. et al. Role of Ceramides and Lysosomes in Extracellular Vesicle

Biogenesis, Cargo Sorting and Release. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 23, 2022.

HU, S.; HU, Y.; YAN, W. Extracellular vesicle-mediated interorgan communication in metabolic diseases. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 34, n. 9, p. 571–582, 2023.

IBRAHIM, A.; IBRAHIM, A.; PARIMON, T. Diagnostic and therapeutic applications of extracellular vesicles in interstitial lung diseases. **Diagnostics**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2021.

JANAS, T. et al. Mechanisms of RNA loading into exosomes. **FEBS Letters**, v. 589, n. 13, p. 1391–1398, 2015.

JANG, S. C. et al. Bioinspired exosome-mimetic nanovesicles for targeted delivery of chemotherapeutics to malignant tumors. **ACS Nano**, v. 7, n. 9, p. 7698–7710, 2013.

JEPPESEN, D. K. et al. Extracellular vesicles and nanoparticles: emerging complexities. **Trends in Cell Biology**, v. 33, n. 8, p. 667–681, 2023.

JESUS, S. et al. Exosomes as adjuvants for the recombinant hepatitis B antigen: First report. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 133, p. 1–11, 2018.

JOKOVIĆ, S. M. et al. MiR-375 and miR-21 as Potential Biomarkers of Prostate Cancer: Comparison of Matching Samples of Plasma and Exosomes. **Genes**, v. 13, n. 12, 2022.

KAHLERT, C. et al. Identification of doublestranded genomic dna spanning all chromosomes with mutated KRAS and P53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 7, p. 3869–3875, 2014.

KARASU, E. et al. Extracellular vesicles: Packages sent with complement. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. APR, 2018.

KAUR, S. et al. CD47-dependent immunomodulatory and angiogenic activities of extracellular vesicles produced by T cells. **Matrix Biology**, v. 37, p. 49–59, 2014.

KIM, H. S. et al. Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 2, p. 839–849, 2012.

KOMAKI, M. et al. Exosomes of human placenta-derived mesenchymal stem cells stimulate angiogenesis. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 8, n. 1, p. 1–12,

2017.

KOWAL, J. et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 8, p. E968–E977, 2016.

LAULAGNIER, K. et al. Amyloid precursor protein products concentrate in a subset of exosomes specifically endocytosed by neurons. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 4, p. 757–773, 2018.

LEE, D. M.; WEINBLATT, M. E. Rheumatoid arthritis. **THE LANCET**, v. 358, n. 9, p. 903–911, 2001.

LEE, H. et al. Isolation and Characterization of Urinary Extracellular Vesicles from Healthy Donors and Patients with Castration-Resistant Prostate Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 13, p. 1–11, 2022.

LI, C. et al. HnRNPA2B1-mediated extracellular vesicles sorting of miR-122-5p potentially promotes lung cancer progression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, 2021.

LI, P. et al. Progress in Exosome Isolation Techniques. **T h e r a n o s t i c s**, v. 7, n. 3, p. 789–804, 2017.

LIANGSUPREE, T.; MULTIA, E.; RIEKKOLA, M. Modern isolation and separation techniques for extracellular vesicles. **Journal of Chromatography A**, v. 1636, n. 12, p. 1–17, 2021.

LIN, K. C. et al. Combination of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSC) and ADMSC-derived exosomes for protecting kidney from acute ischemia-reperfusion injury. **International Journal of Cardiology**, v. 216, p. 173–185, 2016.

LINARES, R. et al. High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, n. 1, p. 1–7, 2015.

LIU, G.; PARK, Y.; ABRAHAM, E. Mediated NF-κB activation requires cytosolic and nuclear activity. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 7, p. 2285–2296, 2008.

LIU, T. et al. NF-κB signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, n. April, p. 1–9, 2017.

LIVSHITS, M. A. et al. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. **Nature Publishing Group**, n. November, p. 1–14, 2015.

LOBB, R. J. et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture

supernatant and human plasma. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 1, n. 9, p. 1–11, 2015.

LÖTVALL, J. et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: A position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, n. 1, 2014.

LOZANO-RAMOS, I. et al. Size-exclusion chromatography-based enrichment of extracellular vesicles from urine samples. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, n. 2015, p. 1–11, 2015.

MA, L. et al. Discovery of the migrasome, an organelle mediating release of cytoplasmic contents during cell migration. **Cell Research**, v. 25, n. 1, p. 24–38, 2015.

MALENICA, M. et al. Perspectives of microscopy methods for morphology characterisation of extracellular vesicles from human biofluids. **Biomedicines**, v. 9, n. 6, 2021.

MALKIN, E. Z.; BRATMAN, S. V. Bioactive DNA from extracellular vesicles and particles. **Cell Death and Disease**, v. 11, n. 7, 2020.

MALL, C. et al. Stability of miRNA in human urine supports its biomarker potential. **Biomarkers in Medicine**, v. 7, n. 4, p. 623–631, 2013.

MALLEGOL, J. et al. T84-Intestinal Epithelial Exosomes Bear MHC Class II/Peptide Complexes Potentiating Antigen Presentation by Dendritic Cells. **Gastroenterology**, v. 132, n. 5, p. 1866–1876, 2007.

MARCILLA, A. et al. Extracellular vesicles in parasitic diseases. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, n. 1, 2014.

MARTIN-MEDINA, A. et al. Increased Extracellular Vesicles Mediate WNT5A Signaling in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **1528 American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 198, n. 12, p. 1527–1538, 2018.

MARZAN, A. L.; STEWART, S. E. Elucidating the role of extracellular vesicles in pancreatic cancer. **Cancers**, v. 13, n. 22, 2021.

MAYEUX, R. Biomarkers: Potential Uses and Limitations. **NeuroRx**, v. 1, n. 2, p. 182–188, 2004.

MEDEIROS, B.; ALLAN, A. L. Molecular mechanisms of breast cancer metastasis to the lung: Clinical and experimental perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, 2019.

MERCHANT, M. L. et al. Isolation and characterization of urinary extracellular vesicles: Implications for biomarker discovery. **Nature Reviews Nephrology**, v. 13, n.

12, p. 731–749, 2017.

MESSNER, E. A. et al. The androgen receptor in prostate cancer: Effect of structure, ligands and spliced variants on therapy. **Biomedicines**, v. 8, n. 10, p. 1–19, 2020.

MICHLEWSKI, G.; CÁCERES, J. F. Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. **Rna**, v. 25, n. 1, p. 1–16, 2019.

MINCIACCHI, V. R.; FREEMAN, M. R.; DI VIZIO, D. Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 40, p. 41–51, 2015.

MOL, E. A. et al. Higher functionality of extracellular vesicles isolated using size-exclusion chromatography compared to ultracentrifugation. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 13, n. 6, p. 2061–2065, 2017.

MOLLAEI, H.; SAFARALIZADEH, R.; POULADI, N. A brief review of exosomes and their roles in cancer. **Meta Gene**, v. 11, p. 70–74, 2017.

MÖLLER, A.; LOBB, R. J. The evolving translational potential of small extracellular vesicles in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 20, n. 12, p. 697–709, 2020.

MOMEN-HERAVI, F. et al. Current methods for the isolation of extracellular vesicles. **biological chemistry**, v. 394, n. 10, p. 1253–1262, 2013.

MORISHIMA-KAWASHIMA, M.; IHARA, Y. Alzheimer's disease: β -Amyloid protein and tau. **Journal of Neuroscience Research**, v. 70, n. 3, p. 392–401, 2002.

MROWCZYNSKI, O. D.; ZACHARIA, B. E.; CONNOR, J. R. Exosomes and their implications in central nervous system tumor biology. **Progress in Neurobiology**, v. 172, n. May 2018, p. 71–83, 2019.

MULCAHY, L. A.; PINK, R. C.; CARTER, D. R. F. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, n. 1, 2014.

MUSTAPIC, M. et al. Plasma extracellular vesicles enriched for neuronal origin: A potential window into brain pathologic processes. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, n. MAY, p. 1–12, 2017.

NAITO, Y. et al. How cancer cells dictate their microenvironment: present roles of extracellular vesicles. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 4, p. 697–713, 2017.

NAKASA, T. et al. miRNA-146a in rheumatoid arthritis: a new therapeutic strategy P riority P aper E valuation. **Immunotherapy**, v. 3, n. 1, p. 829–831, 2011.

NATASHA G et al. Exosomes as Immunotheranostic Nanoparticles. **Clinical Therapeutics**, v. 36, n. 6, p. 820–829, 2014.

NAYLOR, S. Biomarkers: Current perspectives and future prospects. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 3, n. 5, p. 525–529, 2003.

NICOLAS, R. H.; GOODWIN, G. H. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. **Cells**, p. 41–68, 2019.

NIKOLOFF, J. M. et al. Identifying extracellular vesicle populations from single cells. 2021.

NOBLE, J. M. et al. Direct comparison of optical and electron microscopy methods for structural characterization of extracellular vesicles. **Journal of Structural Biology**, v. 210, n. 1, 2020.

NORDIN, J. Z. et al. Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 11, n. 4, p. 879–883, 2015.

O'BRIEN, K. et al. RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 10, p. 585–606, 2020.

PALMA, C. et al. Comparative analysis of tangential flow filtration and ultracentrifugation , both combined with subsequent size exclusion chromatography , for the isolation of small extracellular vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 11, n. 9, p. 1–22, 2022.

PANTELEEV, M. A. et al. Extracellular vesicles of blood plasma: content, origin, and properties. **Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology**, v. 11, n. 3, p. 187–192, 2017.

PATEL, G. K. et al. Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

PATHAN, M. et al. Vesiclepedia 2019: A compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D516–D519, 2019.

PENG, Y. et al. DHFR silence alleviated the development of liver fibrosis by affecting the crosstalk between hepatic stellate cells and macrophages. **Journal of**

Cellular and Molecular Medicine, v. 25, n. 21, p. 10049–10060, 2021.

PIENIMAEKI-ROEMER, A. et al. Stored platelets alter glycerophospholipid and sphingolipid species, which are differentially transferred to newly released extracellular vesicles. **Transfusion**, v. 53, n. 3, p. 612–626, 2013.

PIETRANGELO, T. et al. Endurance-dependent urinary extracellular vesicle signature: shape, metabolic miRNAs, and purine content distinguish triathletes from inactive people. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 475, n. 6, p. 691–709, 2023.

QUEK, C.; HILL, A. F. The role of extracellular vesicles in neurodegenerative diseases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 483, n. 4, p. 1178–1186, 2017.

RAPOSO, G. et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. **Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 3, p. 1161–1172, 1996.

RAPOSO, G.; STOOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 373–383, 2013.

RECORD, M. et al. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1841, n. 1, p. 108–120, 2014.

SADALLAH, S. et al. Microparticles (Ectosomes) Shed by Stored Human Platelets Downregulate Macrophages and Modify the Development of Dendritic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 11, p. 6543–6552, 2011.

SALOMON, C. et al. Exosomal Signaling during Hypoxia Mediates Microvascular Endothelial Cell Migration and Vasculogenesis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1–24, 2013.

SANZ-RUBIO, D. et al. Stability of Circulating Exosomal miRNAs in Healthy Subjects. **Scientific Reports**, p. 1–10, 2018.

SEAN, L. E. et al. Immune Escape Mediated by Exosomal PD-L1 in Cancer. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 3, p. 139–148, 2017.

SERRANO-PERTIERRA, E. et al. Characterization of plasma-derived extracellular vesicles isolated by different methods: A comparison study. **Bioengineering**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 2019.

SHIMODA, M.; KHOKHA, R. Metalloproteinases in extracellular vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1864, n. 11, p. 1989–2000, 2017.

SHYONG, Y. J.; CHANG, K. C.; LIN, F. H. Calcium phosphate particles stimulate exosome secretion from phagocytes for the enhancement of drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 171, n. July, p. 391–397, 2018.

SILMAN, A. J.; PEARSON, J. E. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. **Arthritis research**, v. 4, p. S265–S272, 2002.

SIMPSON, R. J.; JENSEN, S. S.; LIM, J. W. E. Proteomic profiling of exosomes: Current perspectives. **Proteomics**, v. 8, n. 19, p. 4083–4099, 2008.

SKOG, J. et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. **Nature Cell Biology**, v. 10, n. 12, p. 1470–1476, 2008.

SKOKOS, D. et al. Mast Cell-Dependent B and T Lymphocyte Activation Is Mediated by the Secretion of Immunologically Active Exosomes. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 2, p. 868–876, 2001.

SKOTLAND, T. et al. An emerging focus on lipids in extracellular vesicles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 159, p. 308–321, 2020.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I. Rheumatoid Arthritis. **Lancet Manuscript Rheumatoid Arthritis**, v. 388, n. March, p. 1–28, 2017.

SOURVINOU, I. S.; MARKOU, A.; LIANIDOU, E. S. Quantification of Circulating miRNAs in Plasma Effect of Preanalytical and Analytical Parameters on Their Isolation and Stability. **The journal of molecular diagnostics**, v. 15, n. 6, p. 827–834, 2013.

STAMEY, T. A. et al. Prostate-Specific Antigen as a Serum Marker for Adenocarcinoma of the Prostate. **New England Journal of Medicine**, v. 317, n. 15, p. 909–916, 1987.

STIPP, C. S.; KOLESNIKOVA, T. V.; HEMLER, M. E. Functional domains in tetraspanin proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 2, p. 106–112, 2003.

SZATANEK, R. et al. The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1–18, 2017.

TAKAHASHI, A. et al. Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. **Nature Communications**, v. 8, n. May, p. 1–14, 2017.

TAURO, B. J. et al. Comparison of ultracentrifugation , density gradient separation , and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. **Methods**, v. 56, n. 2, p. 293–304, 2012.

TAYLOR, D. D.; SHAH, S. Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes. **Methods**, v. 87, p. 3–10, 2015.

THAKUR, B. K. et al. Double-stranded DNA in exosomes: A novel biomarker in cancer detection. **Cell Research**, v. 24, n. 6, p. 766–769, 2014.

THÉRY, C. et al. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. **Current Protocols in Cell Biology**, v. 30, n. 1, p. 1–29, 2006.

THÉRY, 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. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 7, n. 1, 2018.

THÉRY, C.; ZITVOGEL, L.; AMIGORENA, S. Exosomes: Composition, biogenesis and function. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 8, p. 569–579, 2002.

TIAN, T. et al. Surface functionalized exosomes as targeted drug delivery vehicles for cerebral ischemia therapy. **Biomaterials**, v. 150, p. 137–149, 2018.

TOOI, M. et al. Placenta Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes Confer Plasticity on Fibroblasts. **Journal of cellular biochemistry**, v. 117, n. 7, p. 1658–1670, 2016.

TORRALBA, D. et al. Priming of dendritic cells by DNA-containing extracellular vesicles from activated T cells through antigen-driven contacts. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–17, 2018.

TRIPISCIANO, C. et al. Extracellular Vesicles Derived From Platelets, Red Blood Cells, and Monocyte-Like Cells Differ Regarding Their Ability to Induce Factor XII-Dependent Thrombin Generation. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, n. May, p. 1–11, 2020.

TSCHUSCHKE, M. et al. Inclusion biogenesis, methods of isolation and clinical application of human cellular exosomes. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 2, 2020.

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

VAN NIEL, G. et al. The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent and -Dependent Endosomal Sorting during Melanogenesis. **Developmental Cell**, v. 21, n. 4, p. 708–721, 2011.

VAN NIEL, G. et al. Challenges and directions in studying cell–cell communication by extracellular vesicles. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 5, p. 369–382, 2022.

VAN NIEL, G.; D'ANGELO, G.; RAPOSO, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 4, p. 213–228, 2018.

VINCENT, J. L.; BOGOSSIAN, E.; MENOZZI, M. The Future of Biomarkers. **Critical Care Clinics**, v. 36, n. 1, p. 177–187, 2020.

WANG, X. et al. Hsp20-mediated activation of exosome biogenesis in cardiomyocytes improves cardiac function and angiogenesis in diabetic mice. **Diabetes**, v. 65, n. 10, p. 3111–3128, 2016.

WEI, H. et al. Regulation of exosome production and cargo sorting. **International Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 1, p. 163–177, 2020.

WEI, X. et al. Surface phosphatidylserine is responsible for the internalization on microvesicles derived from hypoxia-induced human bone marrow mesenchymal stem cells into human endothelial cells. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–16, 2016.

WILLIAMS, S. et al. A survey to evaluate parameters governing the selection and application of extracellular vesicle isolation methods. 2023.

WINKLE, M. et al. Noncoding RNA therapeutics — challenges and potential solutions. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 22, p. 629–651, 2021.

WITHROW, J. et al. Extracellular vesicles in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Arthritis Research and Therapy**, v. 18, n. 11, p. 1–12, 2016.

WOELLER, C. F. et al. Activated human lung fibroblasts produce extracellular vesicles with anti-fibrotic prostaglandins. **Am J Respir Cell Mol Biology**, v. 60, n. 3, p. 1–51, 2019.

WOLF, P. The nature and significance of platelet products in human plasma. **British journal of haematology**, v. 13, n. 3, p. 269–288, 1967.

WOLFERS, J. et al. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. **Nature Medicine**, v. 7, n. 3, p. 297–303, 2001.

XU, R. et al. Aptamer-Assisted Traceless Isolation of PD-L1-Positive Small Extracellular Vesicles for Dissecting Their Subpopulation Signature and Function. **Analytical Chemistry**, v. 95, n. 2, p. 1016–1026, 2023.

YÁÑEZ-MÓ, M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, n. 2015, p. 1–60, 2015.

YAO, Z. et al. Label-Free Proteomic Analysis of Exosomes Secreted from THP-1-Derived Macrophages Treated with IFN- α Identifies Antiviral Proteins Enriched in Exosomes. **Journal of Proteome Research**, v. 18, n. 3, p. 855–864, 2019.

ZABOROWSKI, M. P. et al. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. **BioScience**, v. 65, n. 8, p. 783–797, 2015.

ZAKHAROVA, L.; SVETLOVA, M.; FOMINA, A. F. T Cell Exosomes Induce Cholesterol Accumulation in Human Monocytes Via Phosphatidylserine Receptor. **Journal Cellular Physiology**, v. 211, n. May, p. 736–747, 2007.

ZARGARIAN, S. et al. Phosphatidylserine externalization, “necroptotic bodies” release, and phagocytosis during necroptosis. **PLoS Biology**, v. 15, n. 6, p. 1–23, 2017.

ZHANG, B.; ZHAO, M.; LU, Q. Extracellular Vesicles in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus: Functions and Applications. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. January, p. 1–8, 2021.

ZHANG, L.; WRANA, J. L. The emerging role of exosomes in Wnt secretion and transport. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 27, p. 14–19, 2014.

ZHANG, P. Overview of micro-RNA. **MicroRNA: From Bench to Bedside**, p. 3–15, 2015.

ZHANG, X. et al. Migrasome: a new functional extracellular vesicle. **Cell Death Discovery**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2023.

ZHAO, Y. et al. Trends in the biological functions and medical applications of extracellular vesicles and analogues. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 11, n. 8, p. 2114–2135, 2021.

ZHOU, X. et al. The function and clinical application of extracellular vesicles in innate immune regulation. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 17, n. 4, p. 323–334, 2020.

ZITVOGEL, L. et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: Dendritic cell-derived exosomes. **Nature Medicine**, v. 4, n. 5, p. 594–600, 1998.