



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

EXOSSOMAS - UMA NOVA ABORDAGEM TERAPÊUTICA

Trabalho submetido por
Maria Margarida Garcia Mirante Camoesas
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

novembro de 2016



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

EXOSSOMAS - UMA NOVA ABORDAGEM TERAPÊUTICA

Trabalho submetido por
Maria Margarida Garcia Mirante Camoesas
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Professora Doutora Catarina Bernardes

novembro de 2016

Dedicatória

Com muita paz,

Para a minha Avó Nanda.

Agradecimentos

Agradeço ao Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz e seu corpo docente pois, durante estes 5 anos me disponibilizaram todas as ferramentas para conseguir estar aqui hoje e ser Farmacêutica como sempre sonhei.

À minha orientadora, Professora Doutora Catarina Bernardes, pela capacidade excepcional de me transmitir o seu conhecimento com tanto rigor e paixão, sempre com a maior paciência e disponibilidade para ajudar. "Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes." Robert Hooke.

À Mãe Xia, porque é a mulher que eu mais admiro e tudo o que sou hoje o devo a ela.

Ao Pai Zé, que sempre me transmitiu segurança e força, guiando me pelo melhor caminho.

À minha Irmã Inês, que será sempre o meu ombro amigo em qualquer circunstância, e à minha sobrinha Madalena que alegra a minha vida.

À minha Tia Cristina, que tem sido uma segunda mãe.

A todos os meus amigos, porque sem eles eu não era tão feliz.

Um agradecimento muito especial às minhas amigas Rita Bizarro, Marisa Pires, Tânia Sequeira e Margarida Cândido, pelo seu apoio e carinho incondicional.

Resumo

Os exossomas são vesículas biológicas, com interesse crescente na biotecnologia pela descoberta das suas potencialidades e propriedades promissoras em diversas áreas, nomeadamente na terapêutica e diagnóstico. Como consequência do aumento do seu estudo, na última década, barreiras inerentes à sua descoberta já foram ultrapassadas, como a dificuldade de nomenclatura por semelhança com outras vesículas. Sucessivamente tem ocorrido uma grande evolução no seu conhecimento, nomeadamente a marcante identificação de material genético na sua composição, o que proporciona uma nova visão acerca das aplicações médicas destas vesículas extracelulares e alarga ainda mais o leque da sua utilização como agentes terapêuticos, sobretudo porque têm capacidade de naturalmente transferirem moléculas quer localmente quer a nível sistémico.

Apesar de alguns dos mecanismos e associações dos exossomas ao organismo humano estarem a ser explorados, ainda existe muito por entender acerca da sua forma de atuação havendo poucos testes laboratoriais que permitam o seu uso na clínica corrente e por parte das indústrias farmacêuticas. O facto dos exossomas existirem na maioria dos fluidos corporais humanos, desvenda um pouco do seu encanto pela facilidade de quantificação de exossomas *in vivo*.

O objetivo desta monografia é explorar algumas das mais recentes aplicações dos exossomas, após uma introdução à sua biogénese, salientando as inúmeras facetas destas vesículas não só a nível tecnológico como também da sua aplicação a nível do diagnóstico e prognóstico de algumas doenças, bem como o seu uso quer como alvos ou como vetores em abordagens terapêuticas.

Palavras chave: Exossomas; Vesículas extracelulares; Terapêutica; Diagnóstico.

Abstract

Exosomes are biological vesicles of increasing interest in the field of biotechnology given the recent discovery of their potential applications and promising properties for use in various fields, namely therapeutic and diagnostic sciences. As a consequence of the increased number of studies performed on these in the past decade, some of the barriers associated with their discovery were overcome, such as the difficulty of nomenclature due to their similarity with other vesicles. There has been a successive advancement in the knowledge concerning these, such as the groundbreaking discovery of genetic information in their composition, which created a new view on the medical applications of these extracellular vesicles and widened the range of their utility as therapeutic agents, but above all because of their capability to naturally transfer molecules locally as well as at the system level.

Despite the fact that some of the exosomes mechanisms and relations to the human body have already been explored, there is still much to understand regarding their behavior, since there are still very few laboratory tests that allow their use in current clinical work or by pharmaceutical companies. The fact that exosomes exist in the majority of human's bodily fluids, unveils some of their mystery given how easy it is to quantify exosomes in vivo.

The objective of this thesis is to explore some of the most recent applications of exosomes, after an introduction to their biogenesis, emphasizing the numerous facets of these vesicles, not only at the technological level but also regarding their application for diagnostic and prognostic of illnesses, as well as their use as targets or means in therapeutic approaches.

Keywords: Exosomes; Extracellular vesicles; Therapy; Diagnosis.

Índice Geral

Índice de Figuras	7
Índice de Tabelas	9
Lista de Abreviaturas.....	11
1.Introdução.....	13
2.Exossomas	15
2.1Biogénese dos exossomas.....	16
2.1.1Fontes celulares de exossomas.....	18
2.2Estrutura molecular dos exossomas.....	19
2.3. Conteúdo exossomal.....	21
2.3.1 Proteínas.....	22
2.3.3 Ácidos nucleicos	24
2.4Comunicação intercelular dos exossomas.....	25
3. Obtenção de exossomas.....	27
3.1 Extração, purificação e caracterização.....	27
4. Aplicações terapêuticas dos exossomas	31
4.1 Análise da biologia intrínseca dos exossomas para os seus efeitos na saúde.....	32
4.1.1 Doença cardiovascular	33
4.1.2 Doença renal.....	35
4.1.3 Doença pulmonar	35
4.1.4 Processos neurodegenerativos.....	36
4.1.5 Invasão Tumoral.....	38
4.1.6 Cicatrização e regeneração celular.....	39
4.2 Exossomas e biomarcadores celulares	39
4.2.1 Proteínas exossomais como biomarcadores	40
4.2.2 Ácidos nucleicos como biomarcadores exossomais.....	42

4.3 Exossomas para veiculação de fármacos	42
4.4 Associação dos exossomas à vacinação.....	46
4.5 Terapia genética	47
4.6 Imunoterapia	48
5. Conclusão	51
6. Bibliografia.....	53

Índice de Figuras

Figura 1: Representação esquemática da libertação de microvesículas membranares no espaço extracelular. A – Libertação de exossomas e gemulação de microvesículas. As proteínas dos endossomas precoces são recicladas nos MVBs ou nos ILVs. B – Corpos apoptóticos com resíduos resultantes da degradação do conteúdo nuclear e citoplasmático	17
Figura 2: Exemplo de diversos fluidos biológicos que contêm vesículas extracelulares no organismo humano. As cores rosa, verde e amarelo diferenciam o gênero em que é característico o fluido.	18
Figura 3: Tipos de microvesículas extracelulares e variação das suas dimensões.....	19
Figura 4: Esquema estrutural representativo do exossomas.....	21
Figura 5: Representação da composição proteica dos exossomas, categorizada consoante as funções das proteínas	23
Figura 6: Efeitos da transferência de informação genética dos exossomas e microvesículas.	24
Figura 7: Diferentes tipos de vesículas derivadas de células eucarióticas, isoladas por centrifugação diferencial e fotografadas por TEM. A – exossomas com um diâmetro inferior a 100nm; B – microvesículas com diâmetro superior a 100 nm; C – exossomas e partículas membranares; D – célula a libertar corpos apoptóticos.	28
Figura 8: Técnicas para análise de exossomas no sangue, segundo o fenótipo, tamanho e carga de RNA com as suas principais vantagens e limitações	29
Figura 9: Potenciais aplicações clínicas dos exossomas, a – patologia cardíaca; b – lesão renal; c- lesão hepática; d- lesão pulmonar; e- cicatrização	32
Figura 10: Propriedades cardioprotetoras de exossomas libertados por cardiomiócitos lesionados num enfarte do miocárdio.....	34
Figura 11: Interação exossomal entre várias células neuronais. Tabela anexa de moléculas exossomais e as patologias às quais estas estão associadas.	37
Figura 12: Componentes essenciais para o design de sistemas de veiculação farmacológica.	44
Figura 13: Diferentes abordagens para a incorporação de fármacos em exossomas. ...	45
Figura 14: Ilustração esquemática de estímulos associados à libertação de fármacos de diferentes veículos	46

Figura 15: Mecanismos de atuação de vesículas extracelulares: apresentação antigénica e imunidade adquirida em diferentes células..... 49

Índice de Tabelas

Tabela 1: Características das vesículas extracelulares.	20
Tabela 2: Possíveis aplicações para diagnóstico a partir de biomarcadores exossomais proteicos	41
Tabela 3: RNAs exossomais associados a patologias e potencial da sua aplicação como biomarcadores de diagnóstico	42

Lista de Abreviaturas

CD63 - Tetraspanina 63

CD81 - Tetraspanina 81

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EVs - Vesículas extracelulares

GTPase - Hidrolase de trifosfato de guanosina

HL-1- Linha celular do músculo cardíaco

hubMSC - Células estaminais mesenquimais do cordão umbilical

ILVs - Vesículas intraluminares

ISEV - Sociedade Internacional de vesículas extracelulares

miR - MicroRNA

mRNA - RNA mensageiro

RNAse - Ribonuclease com capacidade de degradar RNA

MSC - Células estaminais mesenquimais

MVBs - Corpos multivesiculados

ncRNA - RNA não codificante

Rabs - GTPases de baixo peso molecular

RNA - Ácido ribonucleico

rRNA - RNA ribossômico

siRNA - Pequeno RNA de interferência

TEM - Microscopia eletrônica de transmissão

1. Introdução

A biotecnologia é uma área de estudo emergente que permite incidir no diagnóstico e terapêutica de numerosas patologias humanas (Ponnappan & Chugh, 2015). Com o passar das décadas surgem novas doenças, aumenta a incidência de doenças que predominam na sociedade atual e são adquiridas diferentes resistências, incluindo a fármacos. Assim, ferramentas como o desenvolvimento de meios biotecnológicos, são uma promessa para este problema, por exemplo, o estudo de terapias de alvo celular (Azmi, Bao, & Sarkar, 2013). O uso de microvesículas, como os exossomas, revela-se então uma aposta com diversos alvos de aplicação, dependendo da sua forma, tamanho e função.

Segundo alguns autores (Mathivanan, Ji, & Simpson, 2010) os exossomas foram referidos pela primeira vez pelo investigador Johnstone quando estudava culturas de reticulócitos celulares (R. M. Johnstone, Adam, Hammond, Orr, & Turbide, 1987), tendo sido caracterizados como vesículas formadas em compartimentos endossomais (endossomas multivesiculados) secretados para o espaço extracelular e que transportavam informação biológica entre células. Desde então, os exossomas são considerados como uma potencial forma de comunicação intercelular (Yellon & Davidson, 2014). Uma das particularidades dos exossomas, relativamente aos endossomas, é o facto de preservarem o folheto extracelular da membrana plasmática na sua totalidade como uma face extracelular da sua membrana (Milosevits, Szebeni, & Krol, 2015).

As células secretam uma grande variedade de vesículas (juntamente com macromoléculas, normalmente em complexos, e com moléculas mais pequenas como sais e cofatores) para o espaço extracelular. Estas vesículas são de diversos tipos e dependem da sua origem e da célula que as forma, bem como do seu estado, por exemplo se esta se encontra transformada, diferenciada, estimulada ou até em *stress* celular. As vesículas extracelulares podem ser exossomas, corpos apoptóticos, vesículas de secreção, microvesículas ou ectossomas. A maioria destas denominações baseia-se na sua origem ou presumível função celular (Vlassov, Magdaleno, Setterquist, & Conrad, 2012a).

Com o reconhecimento das várias potencialidades dos exossomas, o interesse do estudo destas vesículas tem sido crescente uma vez que, pela capacidade de interação e comunicação com outras células, conseguindo inclusive transferir informação, detêm inúmeras possibilidades terapêuticas. Contudo, há que ter em consideração o facto de ser também uma via de promoção e avanço para determinadas patologias, como por exemplo o cancro. Assim, o completo conhecimento do mecanismo de comunicação celular e de todos os processos biológicos inerentes são uma janela para o desenvolvimento de possíveis aplicações clínicas (Rose M. Johnstone, 2006).

A atual facilidade de extração e isolamento de exossomas a partir de métodos bioquímicos não invasivos contribui também para o desenvolvimento e estudo científico, aumentando o seu potencial para aplicações não só a nível terapêutico como também para o diagnóstico e marcação molecular (Bryniarski, 2015).

A presente tese tem como objetivo, fazer uma abordagem aos exossomas como microvesículas, presentes nos sistemas biológicos, assim como a sua estrutura molecular, formação, função e por outro lado refletir sobre a aplicação dos exossomas a novas abordagens terapêuticas.

2. Exossomas

As células eucarióticas além de conterem organitos intracelulares, têm também a capacidade de formar organitos extracelulares que libertam no microambiente. Estes organitos extracelulares, onde se incluem os exossomas, microvesículas e corpos apoptóticos podem exibir diferentes funções biológicas (EL Andaloussi, Lakhali, Mäger, & Wood, 2013).

A diferenciação dos diferentes tipos de vesículas extracelulares é por vezes confusa, devido à terminologia usada para designar estes organitos, havendo assim uma necessidade crescente de melhorar a sua nomenclatura e métodos de purificação (Mathivanan et al., 2010). Esta dificuldade para se encontrar uma nomenclatura uniforme na bibliografia, está relacionada como a variabilidade de vesículas extracelulares secretadas por diferentes tipos de células e a incapacidade de se conseguirem distinguir facilmente com os métodos bioquímicos existentes (Vlassov et al., 2012a). Devido a esta heterogeneidade de vesículas existente na literatura, no ano de 2011, foi criada a International Society of Extracellular Vesicles (ISEV) com o objetivo de alargar o estudo desta área proporcionando conferências internacionais, assim como, promover a nível global, a uniformização de nomenclatura e registo (<https://www.isev.org>).

Os exossomas são formados em corpos multivesiculares, por invaginação da membrana endossomal e são libertados no espaço extracelular depois daqueles fundirem com a membrana plasmática. Ao longo dos anos o conhecimento sobre estas vesículas, foi aprofundado, evoluindo de uma hipótese em que os exossomas eram apenas vesículas secretadas pela membrana plasmática, para o atual conhecimento, em que os exossomas são secretados por vários tipos de células e podem estar relacionados com diferentes processos, como por exemplo a estimulação de células T, supressão de crescimento tumoral, neurotransmissão, biogénese da bainha de mielina e migração endotelial celular (Yeo et al., 2013; Bátiz et al., 2015).

Atualmente os exossomas são vistos como novos mediadores de comunicação celular, tendo a sua importância e aplicações clínicas vindo a ser reconhecidas exponencialmente ao longo dos anos, em grande parte por conterem uma série de elementos capazes de modular a comunicação intercelular, permitindo a manutenção da

homeostase do organismo multicelular em causa (Bátiz et al., 2015; Ha, Yang, Nadithe, & Pharmaceutica Sinica, 2016) ou seja, são reconhecidos por derivarem da secreção que ocorre na maioria dos diversos tipos de células (incluindo células normais e patológicas) e também por serem cruciais mensageiros reguladores de processos celulares e transportadores de moléculas entre células e até tecidos diferentes.

O seu conteúdo molecular, deriva especificamente do tipo de célula que lhes deu origem, um facto que torna muito viável a sua aplicação como biomarcadores ou em métodos de diagnóstico (Akers, Gonda, Kim, Carter, & Chen, 2013).

2.1 Biogénese dos exossomas

O sistema polimórfico endossomal é um sistema altamente regulado e unidirecional, que consiste em vesículas primárias endocíticas, endossomas precoces, endossomas tardios, lisossomas e por vezes corpos multivesiculados (MVBs) (Bellingham, Guo, Coleman, & Hill, 2012). Esta via endocítica é essencial à homeostase celular por contribuir, entre outras funções, para a internalização e degradação de moléculas, alteração da composição da membrana plasmática, transmissão de sinal, captação de nutrientes e defesa de microorganismos invasores (Fader & Colombo, 2009). Também pode estar interligada com a via exocítica, como acontece no processo de formação dos exossomas.

Tendo em conta a forma como as células secretam as vesículas extracelulares, estas podem ser agrupadas em duas classes: microvesículas e exossomas. As microvesículas são secretadas diretamente a partir da membrana celular, enquanto que os exossomas são libertados por exocitose aquando da fusão de MVBs com a membrana plasmática (J. Zhang et al., 2015a). Assim, os exossomas são formados a partir de uma rede endossomal (figura 1) iniciada pela invaginação da membrana celular que conduz à formação de uma vesícula endocítica; esta matura em endossoma precoce e este após processos de maturação origina um endossoma tardio (J. Zhang et al., 2015a; Roma-Rodrigues, Fernandes, & Baptista, 2014; Akers et al., 2013). O processo de maturação destes organitos consiste numa mudança gradual do seu conteúdo e numa acidificação progressiva do lúmen. No final do processo de maturação, o endossoma tardio pode

progredir para MVB, o qual pode fundir com um lisossoma (sendo destruído) ou pode fundir com a membrana plasmática, levando à libertação de vesículas intraluminais (ILVs) para o espaço extracelular. Estas vesículas são então referidas como exossomas (Roma-Rodrigues et al., 2014; Keller, Sanderson, Stoeck, & Altevogt, 2006).

A total compreensão dos mecanismos moleculares da biogénese e secreção dos exossomas ainda apresenta algumas limitações, contudo é de salientar que o processo de libertação pode ser regulado de diversas formas, nomeadamente por fatores químicos, mecânicos ou biológicos, pela síntese de ceramida, por proteínas citosólicas (ex. Rabs e GTPases), pela libertação de cálcio, acidose do meio, calor, *stress* celular e oxidativo, hipoxia, alterações no pH da membrana celular, radiação, entre outros (Yeo et al., 2013; Roma-Rodrigues et al., 2014).

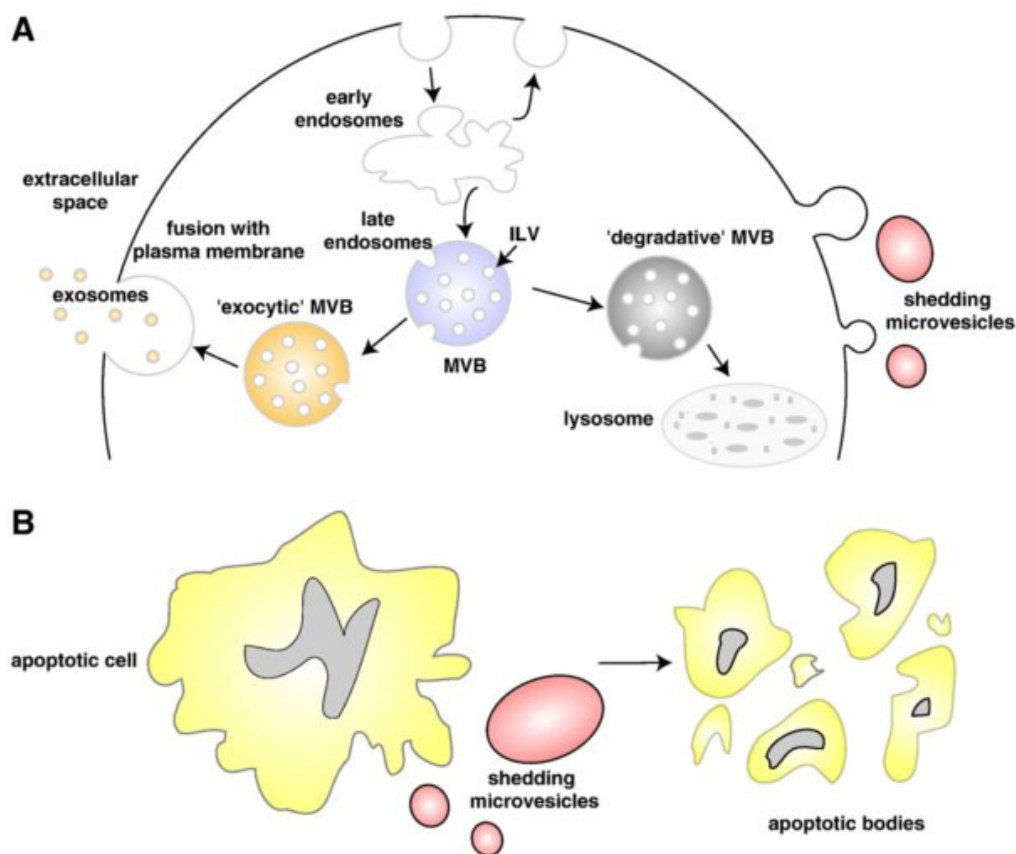


Figura 1: Representação esquemática da libertação de microvesículas membranares no espaço extracelular. A – Libertação de exossomas e gemulação de microvesículas. As proteínas dos endossomas precoces são recicladas nos MVBs ou nos ILVs. B – Corpos apoptóticos com resíduos resultantes da degradação do conteúdo nuclear e citoplasmático (Retirado e adaptado de Mathivanan et al., 2010).

2.1.1 Fontes celulares de exossomas

Os exossomas são secretados pela maioria, se não todos, os tipos de células, incluindo células dendríticas, mastócitos, células T, células B, células epiteliais, plaquetas, células estaminais mesenquimais, células neuronais de schwann e células tumorais (Koppers-Lalic, Hogenboom, Middeldorp, & Pegtel, 2013; Yeo et al., 2013; Batrakova & Kim, 2015).

Os exossomas além de serem secretados pela maioria das células, podem ser encontrados em diversos fluidos biológicos humanos (figura 2) como na saliva, urina, plasma, líquido amniótico, leite materno, sémen, lágrimas, secreções nasais, sangue, líquido cefalorraquidiano, líquido biliar, sistema linfático, entre outros, o que sugere terem um papel importante em condições celulares normais e patológicas (Raposo & Stoorvogel, 2013; Braicu et al., 2015; H. G. Zhang & Grizzle, 2014; Akers et al., 2013; Yáñez-Mó et al., 2015; Yáñez-Mó et al., 2015).

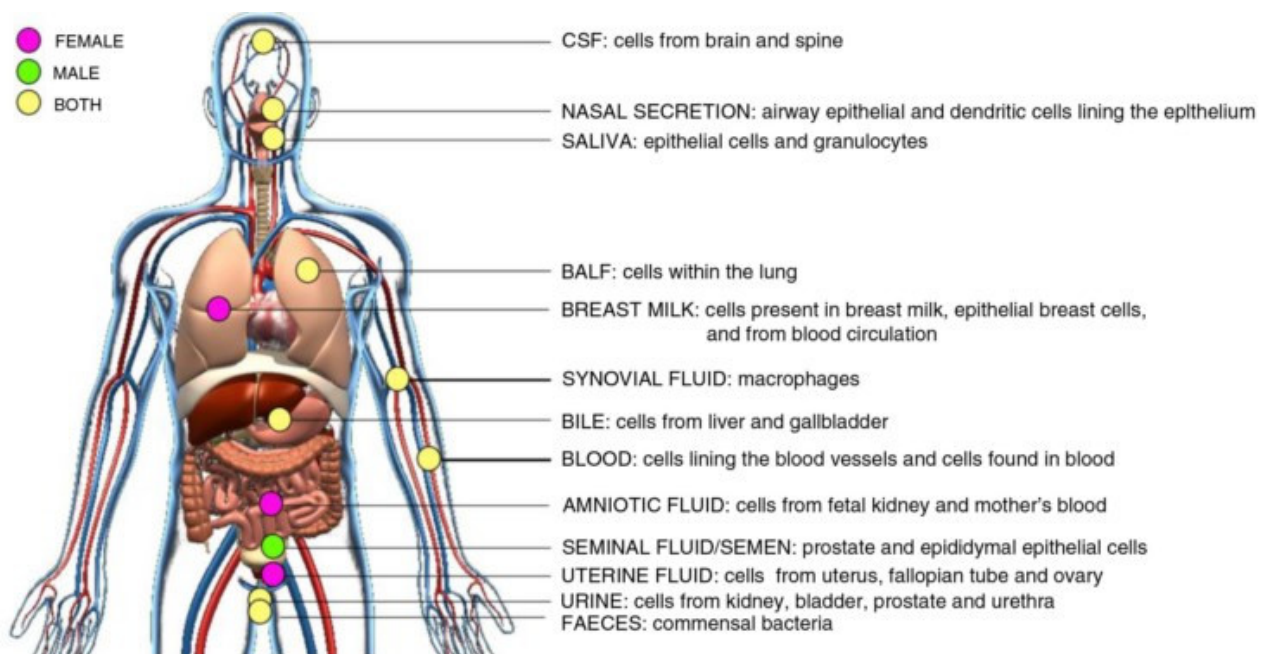


Figura 2: Exemplo de diversos fluidos biológicos que contêm vesículas extracelulares no organismo humano. As cores rosa, verde e amarelo diferenciam o gênero em que é característico o fluido (Retirado de Yáñez-Mó et al., 2015).

2.2 Estrutura molecular dos exossomas

Os exossomas são vesículas com um diâmetro que varia entre os 30/40-100 nm. O seu tamanho é um fator diferenciador das restantes vesículas extracelulares e está relacionado com a sua suspensão nos fluidos e conseqüentemente na sua distribuição no organismo (Crescitelli et al., 2013; Zhang J. et al., 2015).

Por sua vez, outras vesículas têm diâmetros mais variáveis (figura 3): as microvesículas, secretadas diretamente da membrana plasmática, encontram-se no intervalo de 50-1000 nm para uns autores (Yu, Cao, Shen, & Feng, 2015) e entre 100-500 nm para outros (Batrakova & Kim, 2015) e os corpos apoptóticos, libertados de células em morte programada apresentam 50-5000 nm de diâmetro (Crescitelli et al., 2013; Kanada et al., 2015), e segundo outros autores (Batrakova & Kim, 2015) o diâmetro varia entre 500-1000 nm.

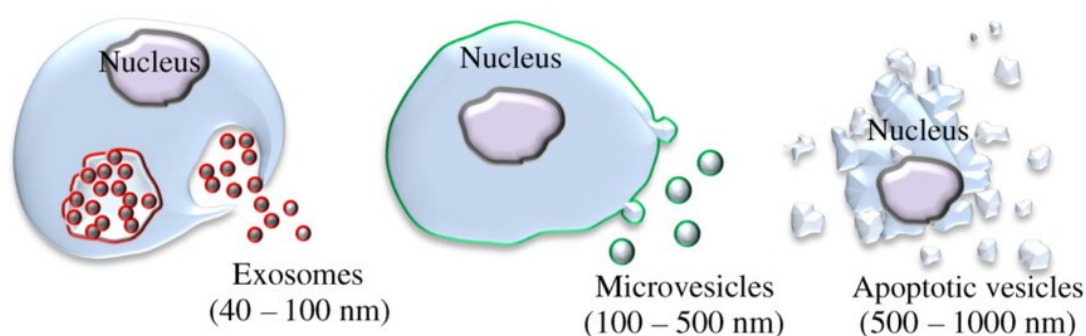


Figura 3: Tipos de microvesículas extracelulares e variação das suas dimensões (Retirado de Batrakova & Kim, 2015).

Tabela 1: Características das vesículas extracelulares (Retirado de Braicu et al., 2015).

Extracellular vehicles	Size	Biogenesis	Characteristics	Content	Role	References
Apoptotic bodies	50–5000 nm	Broad plasma membrane blobbing and breach of cell fragments	Heterogeneous group of vesicles; contains surface markers for the recognition by phagocytic cells markers: Annexin-V	Fragmented nuclei as well as cytoplasmic organelles, histone, DNA fragments	Activated as response to a cellular stress or injury	5,22,23,30
Microvesicles	50–1000 nm	Bud directly from the plasma membrane through unique cellular mechanisms	No characteristic markers; lack of transferrin receptors; secreted during normal cellular processes	Cellular proteins, lipids and RNA, including miRNAs	Intercellular communication; transfer of proteins and genetic material	5,22,23,30
Exosomes	30–100 nm	Originate from the endosomal network named multivesicular bodies (MVBs) and released upon MVB fusion with the plasma membrane	More homogenous in size than other vesicles; highly enriched in transferrin receptors; secreted during normal cellular processes; markers: CD9, CD63, Alix, flotillin-1 and Tag101	Cellular proteins, lipids and RNA, including miRNAs	Intercellular communication; transfer of proteins and genetic material	5,22,30

O tamanho do exossoma encontra-se assim diretamente relacionado com a sua origem e mecanismo de formação (Milosevits et al., 2015). Considerando os exossomas como vesículas, o seu tamanho mínimo irá depender da estrutura duma bicamada lipídica, esta bicamada tem aproximadamente 5 nm de espessura, pelo que a dimensão mínima duma vesícula é de 30 nm. Contudo, uma vez que derivam de invaginações da membrana de endossomas (200-500 nm) é previsível que o seu diâmetro máximo seja na ordem de 100 nm (Vlassov et al., 2012a).

Os exossomas sedimentam a 100,000g e têm uma densidade variável no intervalo de 1,10-1,21 g/mL; quando observados por microscopia eletrónica de transmissão apresentam uma forma arredondada, são totalmente desprovidos de organitos e apresentam uma bicamada lipídica, como anteriormente referido, com a mesma topografia das membranas plasmáticas conservando as proteínas a ela associadas (Mathivanan et al., 2010; Yellon & Davidson, 2014; Azmi et al., 2013; Yeo et al., 2013).

Assim, a membrana do exossoma possui diversas proteínas associadas, proteínas estas que desempenharão diferentes papéis na interação com alvos celulares específicos e modulação da resposta imunitária, causando uma ativação ou supressão. Além disso, como o exossoma é formado a partir de fragmentos da membrana celular conservando

todas as suas características, implica assim que não só as proteínas como também o glicocálice da célula que lhe deu origem se mantenham inalterados e consequentemente com a sua imunidade inata (Milosevits et al., 2015).

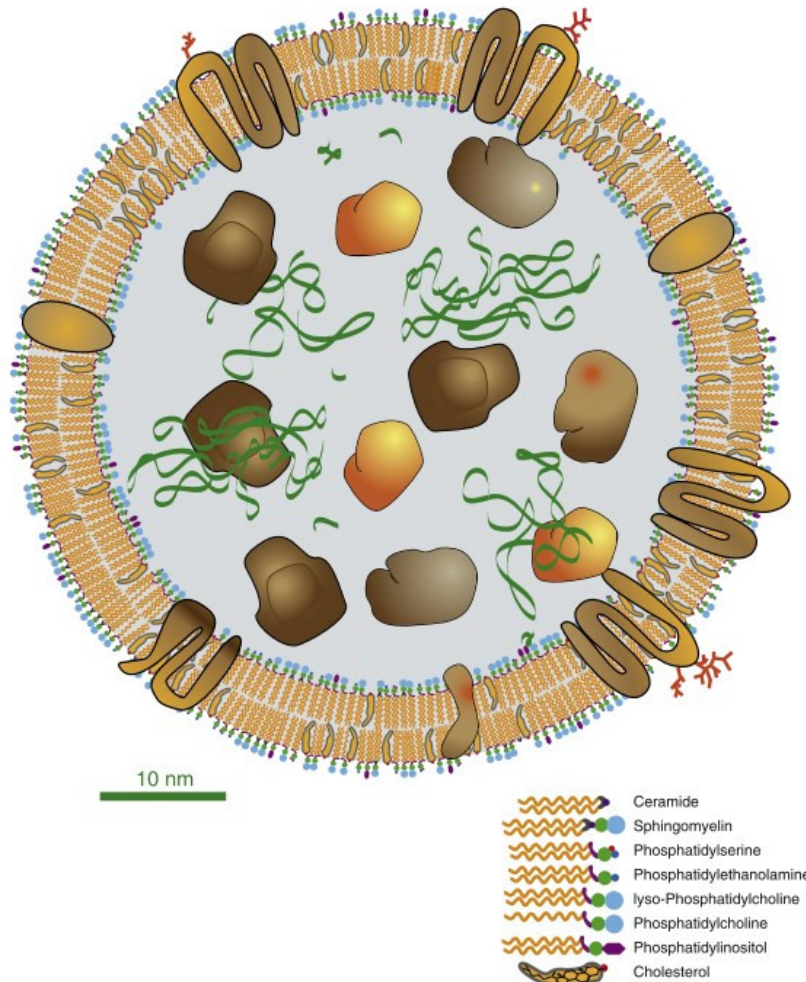


Figura 4: Esquema estrutural representativo do exossomas (Retirado de Vlassov, Magdaleno, Setterquist, & Conrad, 2012b).

2.3. Conteúdo exossomal

A composição do lúmen dos exossomas varia com o tipo de célula e com o microambiente. Os exossomas libertados por células do mesmo tipo podem conter cargas diferentes consoante as condições em que a célula se encontra – normais ou patológicas. No entanto, genericamente os exossomas podem conter lípidos, proteínas e outras moléculas citosólicas específicas. O conteúdo exossomal, devido à sua grande variedade,

está a ser compilado em bases de dados como a *ExoCarta database* (<http://www.exocarta.org/>) ou *EVpedia* (Keerthikumar et al., 2016; Mathivanan, Fahner, Reid, & Simpson, 2012).

De acordo com a última versão da *ExoCarta database* os exossomas são muito complexos, com cerca de 9769 proteínas, 1116 lípidos, 3408 mRNAs e 2838 miRNAs já reconhecidos em diferentes tipos de células e organismos, o que os permite identificar e diferenciar de outras vesículas (Bátiz et al., 2015; ExoCarta,2016).

2.3.1 Proteínas

As proteínas são um dos componentes principais dos exossomas (figura 5). A composição proteica dos exossomas tem sido intensivamente estudada e sabe-se que depende do tipo de célula ou tecido que os origina e também das variações fisiológicas (Hannafon & Ding, 2013). Assim, por exemplo, por análise proteómica de diferentes linhas celulares e fluidos biológicos, verifica-se que nos exossomas podem ser encontradas proteínas envolvidas na biogénese de MVBs, proteínas de fusão, proteínas de transporte, proteínas de choque térmico, proteínas de transdução de sinal, tetraspaninas, integrinas, chaperones e enzimas metabólicas, entre outras (Bátiz et al., 2015). A função de todas estas proteínas nos exossomas nem sempre é conhecida; pode referir-se, por exemplo, que nos exossomas frequentemente são detetadas tetraspaninas as quais quando presentes numa célula, têm a função de mediar a fusão, migração, sinalização e adesão celular, mas cuja função nos exossomas ainda não está bem conhecida (Bátiz et al., 2015; Record, Carayon, Poirot, & Silvente-Poirot, 2014; Villarroya-Beltri, Baixauli, Gutiérrez-Vázquez, Sánchez-Madrid, & Mittelbrunn, 2014). Por outro lado, as integrinas estão envolvidas em processos de adesão, mas das vesículas à membrana alvo (Ha et al., 2016).

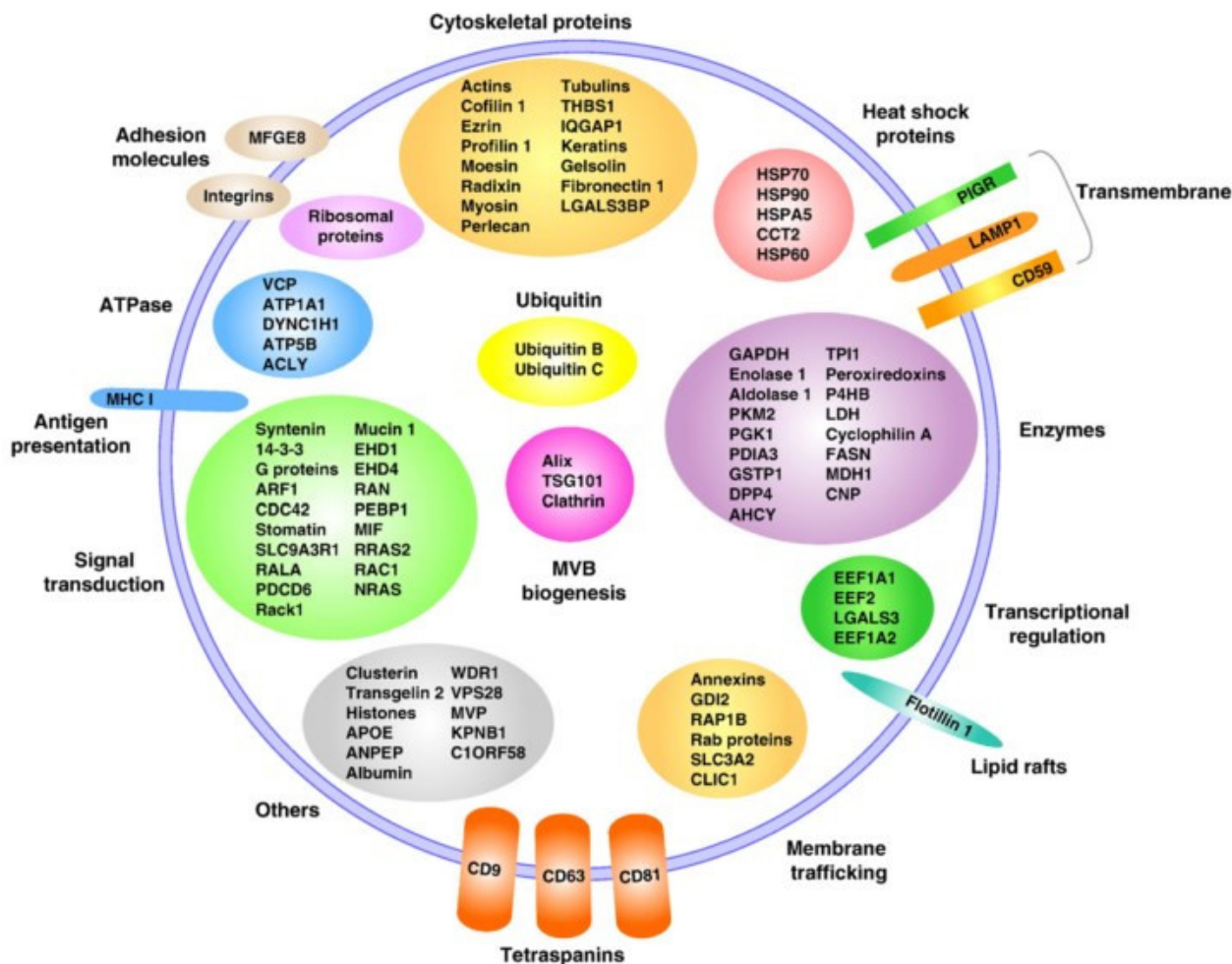


Figura 5: Representação da composição proteica dos exossomas, categorizada consoante as funções das proteínas (Retirado de (Mathivanan et al., 2010).

2.3.2 Lípidos

Os exossomas, para além das proteínas, também contêm compostos lipídicos tais como ceramida, colesterol, esfingolípidos e fosfolípidos. Estes constituintes dão resistência à bicamada lipídica, conferindo assim maior estabilidade aos exossomas no seu ambiente. Por outro lado, podem estar relacionados com os processos em que os exossomas vão participar, como acontece por exemplo na fosfatidilserina que está envolvida na ancoragem de proteínas do folheto externo da membrana exossomal,

permitindo a sinalização e fusão do exossomas com a membrana celular (Ha et al., 2016; Roma-Rodrigues et al., 2014; Villarroya-Beltri et al., 2014; Vlassov et al., 2012b).

2.3.3 Ácidos nucleicos

Os exossomas também podem conter moléculas de DNA e RNA, principalmente mRNA, miRNA, ncRNA e rRNA (J. Zhang et al., 2015; Chistiakov, Orekhov, & Bobryshev, 2016). A descoberta da presença de moléculas de RNA no interior do exossoma levou à conclusão de que existe uma mediação de mRNA e miRNA pelos exossomas, sendo assim considerado um mecanismo de troca de informação genética. Consequentemente, este facto, sugere que os exossomas têm a capacidade para transportar material genético à distância, o que os torna candidatos ideais para veículos de transferência de moléculas biológicas ativas com capacidade para influenciar a expressão dos genes (figura 6). No entanto, deve ter-se em conta que a transferência de informação genética pode resultar em benefícios ou prejuízos para a saúde do Homem (Van Dommelen et al., 2012; Villarroya-Beltri et al., 2014).

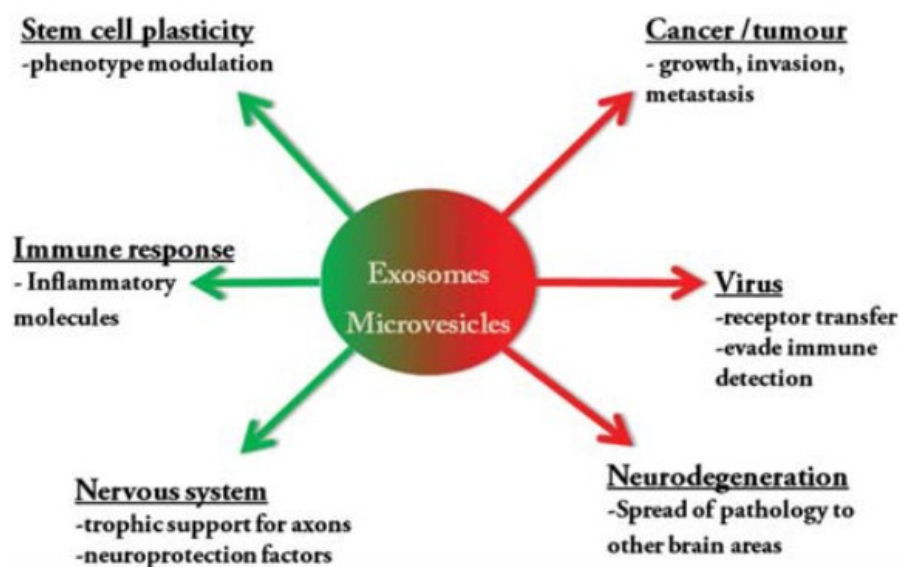


Figura 6: Efeitos da transferência de informação genética dos exossomas e microvesículas (Retirado de Y. Lee, El Andaloussi, & Wood, 2012).

2.4 Comunicação intercelular dos exossomas

A comunicação intercelular é essencial para estabelecer e manter as condições fisiológicas e homeostase do organismo (Shifrin, Beckler, Coffey, & Tyska, 2013). A quebra da homeostase celular, tem diferentes e importantes repercussões, podendo resultar numa morte celular ou, pelo contrário, numa proliferação e crescimento celular descontrolados (Braicu et al., 2015). Portanto, essa comunicação é um mecanismo fundamental dos organismos multicelulares e pode ser mediado por contacto direto célula-célula ou por transferência de moléculas por elas secretadas (Raposo & Stoorvogel, 2013).

Nas duas últimas décadas, emergiu um terceiro mecanismo de comunicação intercelular com o conhecimento de que as vesículas extracelulares (EVs) têm a capacidade para transferir material e informação entre as células. Também a libertação de corpos apoptóticos durante a apoptose, assim como o facto de células perfeitamente saudáveis partilharem vesículas provenientes das suas membranas plasmáticas foi associado à comunicação intercelular (Raposo & Stoorvogel, 2013).

As funções das EVs nos processos patológicos e fisiológicos dependem da sua capacidade de interagir com células recetoras/alvo, de modo a partilhar o seu conteúdo proteico, lipídico e RNAs, sendo o ambiente externo relevante para o mecanismo de fusão dos exossomas com membranas celulares (Bátiz et al., 2015).

Geralmente, na transferência de informação existem três mecanismos de interação dos exossomas com as células alvo:

1) Proteínas membranares dos exossomas interagem diretamente com os recetores das células alvo, permitindo a fusão com a membrana celular e libertação directa da carga ou conteúdo vesicular no citoplasma (Van Dommelen et al., 2012; Urbanelli et al., 2013);

2) Internalização do exossoma por endocitose, podendo também ocorrer por pinocitose ou fagocitose, sendo este o mecanismo mais eficiente de entre estes (Roma-Rodrigues et al., 2014; Van Dommelen et al., 2012);

3) Interação das proteínas da membrana exossomal com os seus recetores nas células alvo, ativando deste modo a sinalização intracelular (Urbanelli et al., 2013; Kahlert & Kalluri, 2013).

Conhecendo estes mecanismos, surgem novas possibilidades de aplicação terapêutica em diversas situações (Bátiz et al., 2015). Contudo, o mecanismo detalhado de comunicação intercelular e transferência de informação entre os exossomas e as células vizinhas ainda não está totalmente compreendido (J. Zhang et al., 2015a).

3. Obtenção de exossomas

A classificação de vesículas membranares e os seus protocolos de isolamento têm vindo a ser intensamente desenvolvidos e estudados, acompanhando a evolução do conhecimento atual relativamente aos exossomas. É crucial existirem métodos de isolamento e separação destas vesículas para evitar contaminação cruzada e obter resultados eficazes, sabendo à partida a sua dificuldade pela semelhança dos exossomas com outras vesículas (Crescitelli et al., 2013).

Um dos maiores desafios deste campo é assim melhorar e padronizar os métodos de isolamento e análise (Raposo & Stoorvogel, 2013). Devido ao aumento do interesse nos exossomas e outras EVs e pelo seu potencial uso terapêutico como biomarcadores, existem kits disponíveis para permitir um fácil e rápido procedimento de isolamento, que têm sido continuamente desenvolvidos e estudados. Contudo, estas abordagens necessitam se ser aplicadas cautelosamente devido a alguma probabilidade de erro em distinguir EVs de diferentes tamanhos assim como agregados moleculares (Raposo & Stoorvogel, 2013).

Os protocolos mais rigorosos para isolamento de exossomas baseiam-se na centrifugação diferencial de fluidos ou quando se requer uma preparação mais pura, em gradientes de concentração (Vlassov et al., 2012a).

3.1 Extração, purificação e caracterização

Os protocolos de isolamento de vesículas como exossomas passam maioritariamente por uma centrifugação diferencial (Crescitelli et al., 2013; Raposo & Stoorvogel, 2013). Esta centrifugação diferencial envolve múltiplos passos sequenciais de centrifugação, em que existe a recolha do pellet e sobrenadante em cada tempo, e implica o aumento da força de centrifugação progressiva para isolar os componentes mais pequenos e densos em passos sucessivos (Xitong & Xiaorong, 2016).

A centrifugação diferencial, não é uma técnica específica para a purificação dos exossomas, podendo a sua fração ficar contaminada com agregados proteicos e outras

partículas. De referir que, além do tamanho e densidade das vesículas, a eficácia de isolamento das vesículas depende da forma e da viscosidade da solução, assim como da temperatura, tempo de centrifugação e o tipo de rotor usado (Muller, Hong, Stolz, Watkins, & Whiteside, 2014).

A combinação de diferentes técnicas pode aumentar o grau de pureza. Assim, por exemplo a associação da centrifugação diferencial com filtração membranar (0,1-0,2 μm) possibilita eliminar uma grande parte dos contaminantes de vesículas extracelulares. Outra possibilidade para se obterem frações mais puras é fazer-se uma centrifugação em gradiente de densidade com sacarose (Hannafon & Ding, 2013; Muller et al., 2014). Além das técnicas acima referidas podem usar-se outros métodos alternativos como a ultracentrifugação, que é um método bastante rápido, ou a extração por cromatografia líquida que oferece um elevado grau de purificação (Muller et al., 2014).

Para efetuar a caracterização dos exossomas, são necessariamente aplicadas outras técnicas. São exemplos, entre outras, técnicas de immunoblotting, espectrometria de massa, análise de nanopartículas, westernblot e técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (TEM), que é o único método em que pode ser determinado simultaneamente quer o tamanho quer a morfologia das vesículas isoladas (figura 7 e 8) (Crescitelli et al., 2013). Outra alternativa, é usar como marcadores exossomais algumas das suas proteínas, e em particular as integrinas ou tetraspapas (Ha et al., 2016; Van Dommelen et al., 2012; Raposo & Stoorvogel, 2013; Mathivanan et al., 2010).

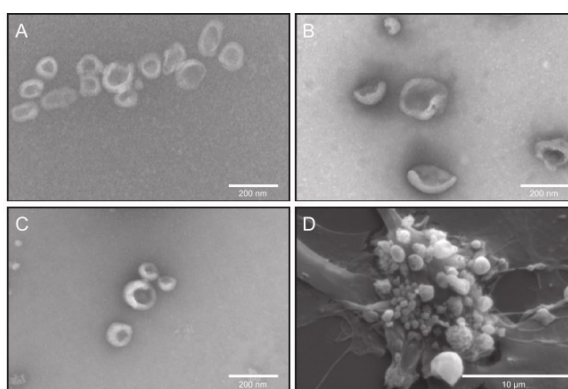


Figura 7: Diferentes tipos de vesículas derivadas de células eucarióticas, isoladas por centrifugação diferencial e fotografadas por TEM. A – exossomas com um diâmetro inferior a 100nm; B – microvesículas com diâmetro superior a 100 nm; C – exossomas e partículas membranares; D – célula a libertar corpos apoptóticos (Retirado de E. van der Pol, Böing, Harrison, Sturk, & Nieuwland, 2012).

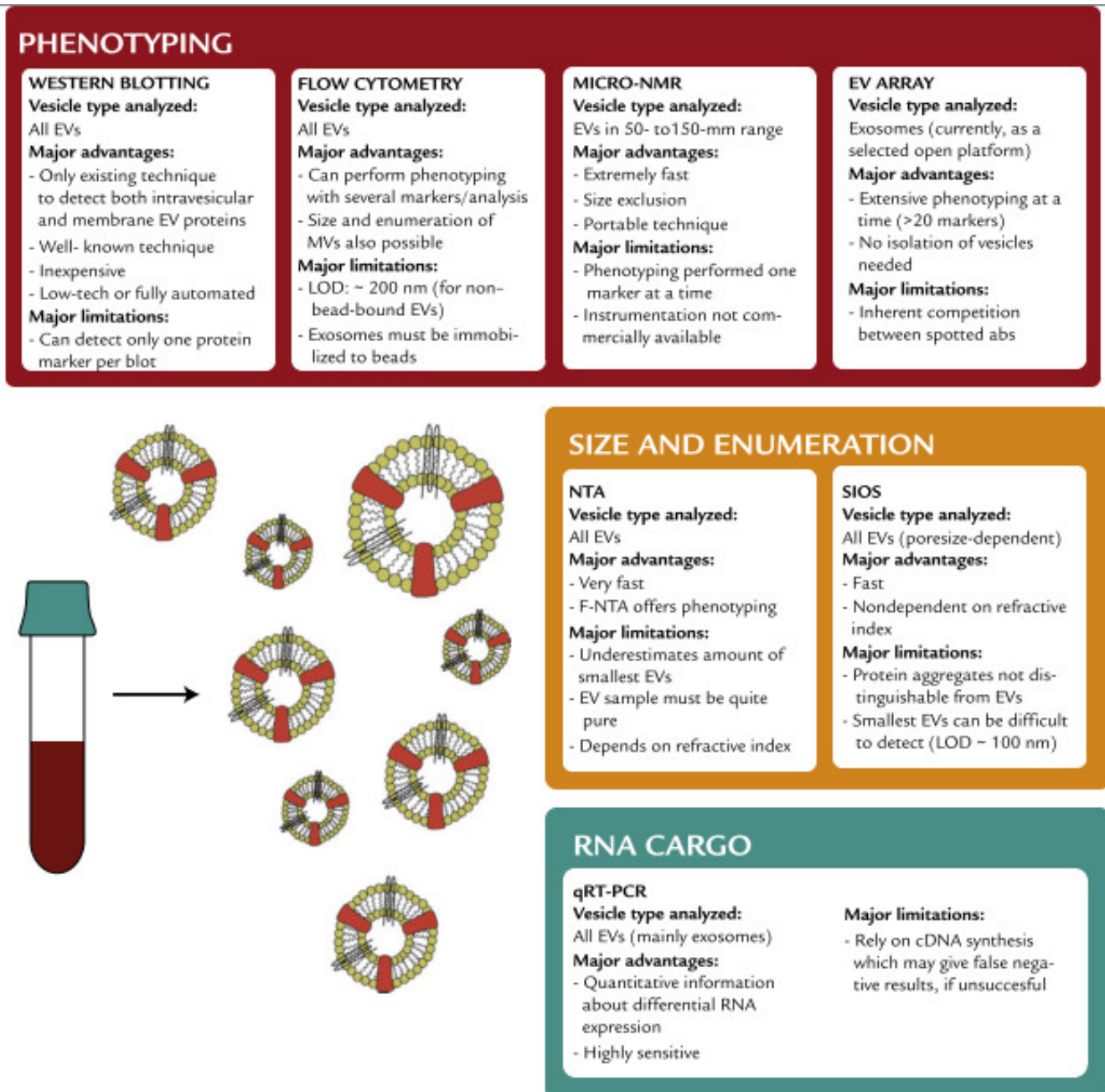


Figura 8: Técnicas para análise de exossomas no sangue, segundo o fenótipo, tamanho e carga de RNA com as suas principais vantagens e limitações (Retirado de Revenfeld et al., 2014).

Da adaptação do conhecimento de todas estas técnicas ao cotidiano da prática clínica, foram desenvolvidos *kits* comerciais com resinas para o isolamento exossomal com base na imunoafinidade, conseguindo a sua purificação por ligação das proteínas membranares a anticorpos específicos (Xitong & Xiaorong, 2016; Vlassov et al., 2012b).

4. Aplicações terapêuticas dos exossomas

A eficácia de veiculação de fármacos com os métodos atuais ainda está longe de atingir novas aplicações clínicas ou segurança da terapêutica desejáveis. Assim, é necessário que os agentes de veiculação apresentem determinadas características tais como um alto nível de especificidade e eficiência, com um mínimo de imunogenicidade. Idealmente, o transportador deverá associar-se facilmente à carga terapêutica pretendida, como por exemplo a ácidos nucleicos, proteínas ou fármacos (Koppers-Lalic et al., 2013).

Dependendo das características da membrana, superfície celular e tamanho, estas vesículas são recebidas pela célula recetora através de diferentes vias, como a via endocítica, macropinocitose ou fagocitose. Contudo, nem sempre todas estas vias de entrega possibilitam realizar uma distribuição e libertação da carga de forma adequada no compartimento intracelular desejado. Os exossomas podem assim representar uma grande vantagem, passível de ser adaptada no *targeting* e transporte *in vivo* de siRNA ou miRNA. Assim, esta nanovesícula transportadora pode vir a ser considerada de excelência e com um eficiente transporte e libertação de material genético no alvo pretendido (Koppers-Lalic et al., 2013).

4.1 Análise da biologia intrínseca dos exossomas para os seus efeitos na saúde

As vesículas extracelulares têm capacidade de transporte de informação biológica complexa e que provoca reações pleiotrópicas nas células recetoras. Esta interação permite que os exossomas participem na manutenção das condições fisiopatológicas do organismo humano (Xu, Greening, Zhu, Takahashi, & Simpson, 2016). Os exossomas não estão apenas relacionados com estados celulares alterados ou patológicos, como exemplificado na figura 9, podem também ser estudados e aplicados em áreas como a reprodução e desenvolvimento embrionário, medicina regenerativa, reparação tecidual, calcificação óssea, entre inúmeras outras aplicações (Yáñez-Mó et al., 2015). Algumas das aplicações clínicas seguidamente referidas apesar de ainda não se encontrarem em protocolos clínicos de rotina ou *guidelines*, são pioneiras no desenvolvimento tecnológico para a saúde, encontrando-se muitas delas em aprofundamento científico (Corrado et al., 2013).

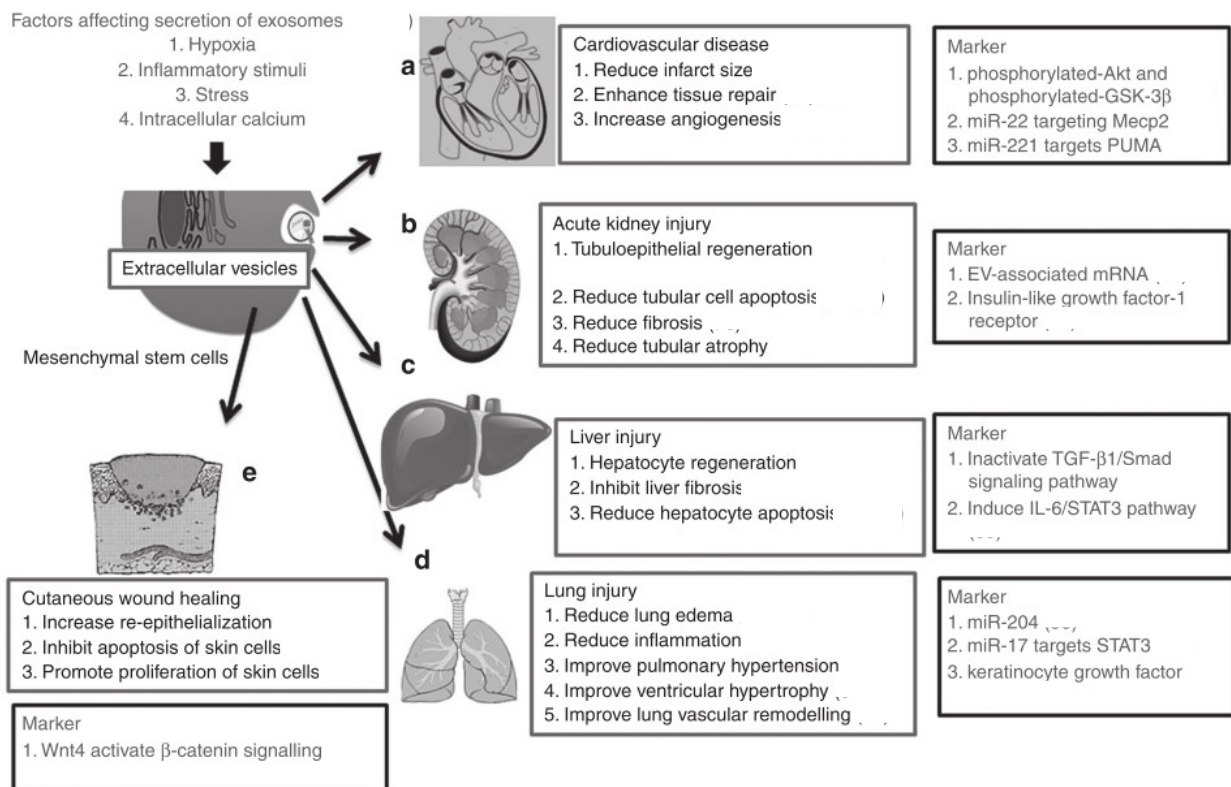


Figura 9: Potenciais aplicações clínicas dos exossomas, a – patologia cardíaca; b – lesão renal; c- lesão hepática; d- lesão pulmonar; e- cicatrização (Retirado e adaptado de Rani, Ryan, Griffin, & Ritter, 2015).

4.1.1 Doença cardiovascular

A patologia cardíaca é umas das principais causas de morte nas sociedades modernas (Greenberg, 2015). O desenvolvimento da terapia genética tem sido uma grande contribuição nesta área, contudo com o aumento da heterogeneidade genética das patologias cardiovasculares os efeitos adversos associados com a terapia tradicional continuam a ser notórios, como a toxicidade, imunogenicidade, efeitos *off-target* e baixa eficiência a nível de terapêutica farmacológica (Xitong & Xiaorong, 2016).

Tendo em conta estas dificuldades, os exossomas podem ser uma ferramenta útil no diagnóstico e tratamento da doença cardiovascular, já que são importantes na manutenção da homeostase cardíaca. As células cardíacas produtoras de exossomas contêm elevados níveis de miR-210 e miR-132, que quando incubados em culturas com células HL-1, sugerem um aumento da internalização dos exossomas das células de origem pelas células HL-1 (Cervio, Barile, Moccetti, & Vassalli, 2015). Estes exossomas, têm a capacidade de proteger os cardiomiócitos de isquémia cardíaca ou de lesão tecidular (Vicencio et al., 2015). Sabe-se também, que após um enfarte do miocárdio, os exossomas contêm fatores de proteção como o miR-21 e miR-210, entre outros, protegendo os cardiomiócitos da apoptose, estimulando a angiogénese e ativando mecanismos endógenos de reparação, melhorando a função cardíaca após o enfarte (Foglio et al., 2015). Assim, após enfarte do miocárdio, a libertação de exossomas com material genético de células específicas é essencial para a cardioproteção, que irá induzir a reparação tecidular, e outras funções, como ilustrado na figura 10. Estas descobertas, racionalizaram o uso dos exossomas como o veículo de informação genética para a patologia cardiovascular (Xitong & Xiaorong, 2016).

A nível de diagnóstico, a utilização dos exossomas é pertinente pois quando ocorre lesão do miocárdio, existe um aumento de miRNAs produzidos pelos cardiomiócitos, miRNAs estes que estão envolvidos na regulação da cardiogénese e função cardíaca, nomeadamente na contractilidade. Estes miRNAs indicadores da lesão aparecem aumentados rapidamente na circulação sanguínea e podem ser detetados em tempos inferiores aos de outros indicadores, geralmente em <4 horas após enfarte do miocárdio (Chistiakov et al., 2016). Este facto corresponde a uma grande vantagem comparativamente aos indicadores tradicionais de lesão cardíaca, pois possibilita o diagnóstico mais rápido da patologia, e por outro lado é também mais sensível e específico. Adicionalmente os miRNAs podem ser detetados na urina, o que constitui outro aspeto importante e promissor para a utilização dos miRNAs específicos dos exossomas cardíacos como biomarcadores no diagnóstico precoce do enfarte agudo do miocárdio.

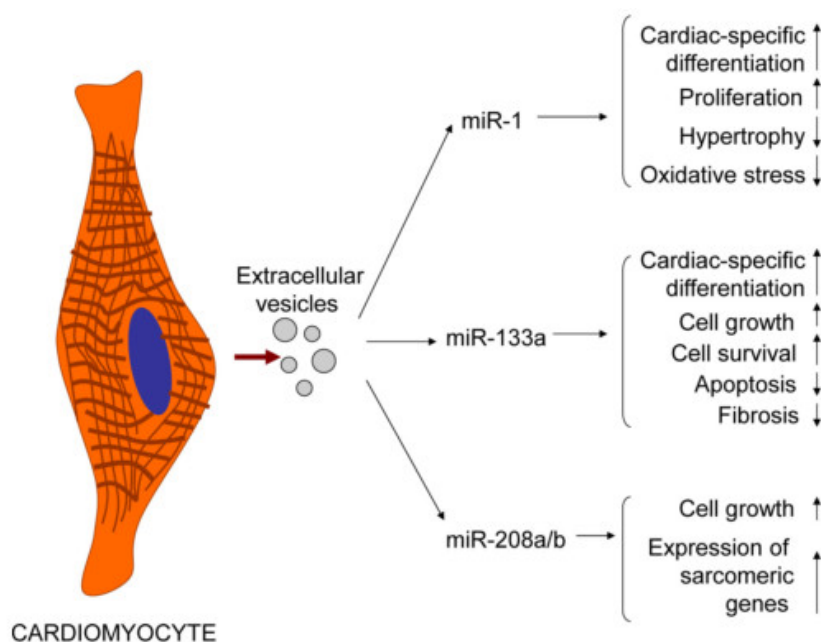


Figura 10: Propriedades cardioprotetoras de exossomas libertados por cardiomiócitos lesionados num enfarte do miocárdio (Retirado de Chistiakov et al., 2016).

Além das aplicações acima referidas, estão a ser desenvolvidas outras abordagens a nível terapêutico e medicina regenerativa, como a veiculação, por exemplo de proteínas

reguladoras, também estas cruciais para a regulação da angiogénese e proteção cardíaca, sendo auxiliares nos processos regenerativos e na promoção da neovascularização em zonas lesionadas (Chistiakov et al., 2016).

4.1.2 Doença renal

A patologia renal, nomeadamente a insuficiência renal aguda é frequente e ocorre devido a diversos fatores, alguns deles incluindo reações adversas da terapêutica por exposição a compostos nefrotóxicos, por exemplo agentes quimioterapêuticos, o que se reflete em perda de volume urinário ou em obstrução das vias. Sabe-se que células mesenquimais, estão implicadas nos processos reguladores pro-inflamatórios, sendo estas propriedades fulcrais no tratamento destas patologias. Além das funções de células mesenquimais, os exossomas por elas libertados têm também a capacidade de modular células T (Kilpinen et al., 2013). Em contrapartida, alguns autores (Helmke & von Vietinghoff, 2016), referem que as EVs, onde incluem os exossomas, desempenham um papel funcional na vasculite renal e que a quantidade destas vesículas aumenta na doença ativa. Os mesmos autores consideram que as EVs podem ser usadas como marcadores no prognóstico da patologia renal, bem como em novas abordagens terapêuticas. Atualmente, este tipo de terapia para a doença renal aguda é realizado promovendo a inibição da libertação de EVs pelas plaquetas. Um estudo, desenvolvido por Gatti, (Gatti et al., 2011) demonstrou que as vesículas extracelulares quando acumuladas nos glomérulos e túbulos renais provocam um aumento da proliferação celular e reduzem a apoptose de células epiteliais tubulares, acelerando assim o processo de recuperação do doente renal (Rani et al., 2015).

4.1.3 Doença pulmonar

Tal como a lesão renal, a sintomatologia de patologia pulmonar está relacionada com alterações dos processos inflamatórios. Neste caso, uma das causas é a acumulação de endotoxinas o que resulta num aumento da permeabilidade proteica pulmonar, causando uma resposta inflamatória alveolar, podendo levar a estados de pneumonia ou

sépsis. Assim, os exossomas podem diminuir o fluxo de células inflamatórias e neutrófilos ao local, nomeadamente ao pulmão. Esta supressão da inflamação pulmonar é acompanhada pela redução da permeabilidade proteica, prevenindo a formação do edema pulmonar. Consequentemente, é possível associar a diminuição da hipertensão pulmonar, hipertrofia ventricular e vascularização pulmonar com o aumento progressivo da concentração de exossomas provenientes de células mesenquimais, sendo esta abordagem uma futura possível terapêutica (C. Lee et al., 2012;Gatti et al., 2011).

4.1.4 Processos neurodegenerativos

Os exossomas têm a capacidade de promover a comunicação intercelular entre células, não sendo exceção as células do sistema nervoso. Astócitos, neurónios e oligodendrócitos são exemplos celulares que libertam exossomas, o papel dos exossomas na atividade sináptica assim como na libertação proteica em diversas doenças neurodegenerativas (Lachenal et al., 2011). Assim, a comunicação neuronal tem um facilitador exossomal, interferente em patologias do foro neurológico como se encontra referido na figura seguinte (Corrado et al., 2013).

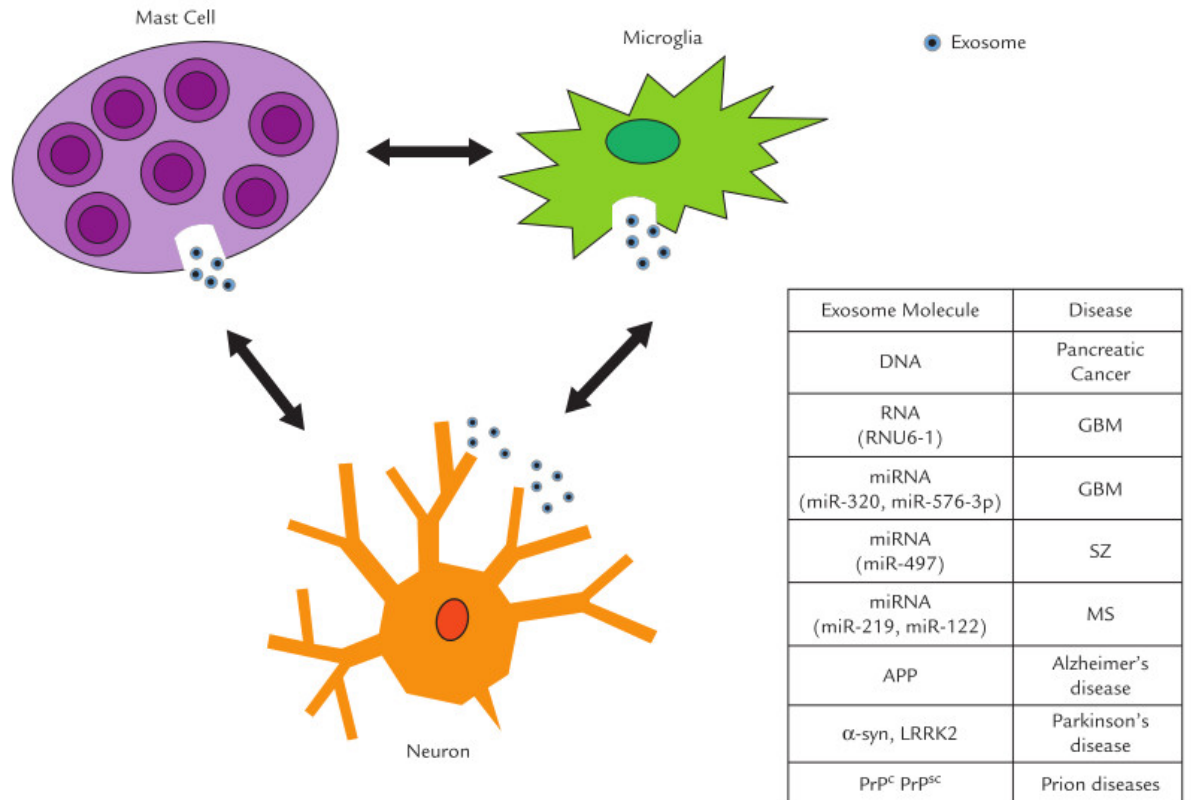


Figura 11: Interação exossomal entre várias células neuronais. Tabela anexa de moléculas exossomais e as patologias às quais estas estão associadas (Retirado de Tsilioni, Panagiotidou, & Theoharides, 2014).

A doença de Alzheimer como de Parkinson são caracterizadas pela acumulação de proteínas amilóides, que interferem com a função neuronal podendo inclusive resultar em morte celular (Tsilioni et al., 2014).

Os neurónios têm a capacidade de processar estas proteínas amilóides pela via endossomal, levando a uma degradação a nível dos lisossomas ou por vesículas extracelulares (Lai & Breakefield, 2012). A incorporação destas proteínas nos exossomas é uma forma de as transporte destas facilitando a sua distribuição, o que pode induzir processos patológicos ou, por outro lado, pode auxiliar o processo de degradação proteica, evitando a progressão da doença (Corrado et al., 2013).

4.1.5 Invasão Tumoral

A evolução de patologias tumorais, nomeadamente carcinomas invasivos, requer uma colaboração entre os diversos fatores existentes, como células epiteliais malignas, matriz extracelular, fibroblastos, células inflamatórias do sistema imunitário e células normais mesenquimais. Todas estas células podem secretar exossomas (Corrado et al., 2013).

Quanto à sua capacidade de transportarem moléculas, os exossomas também têm sido considerados como veículos para moléculas associadas a tumores como citoquinas, fatores de crescimento e adesão molecular, entre outras. Assim, desempenham um papel na comunicação intercelular, incluindo entre células cancerígenas e células normais, pelo que podem contribuir para a propagação do fenótipo transformado, com relevante interesse de estudo (Taylor & Gercel-Taylor, 2011). Assim, os exossomas podem ser considerados modificadores de células normais, com vista a induzir o crescimento e invasão tumoral, através de mecanismos como a supressão de resposta imune, estimulando a angiogénese e modulação celular. A sua composição em RNAs, caso estes derivem de células cancerígenas, é também uma importante referência, pois aumenta a possibilidade de supressão imunitária, após a interação com outras células (Lai & Breakefield, 2012).

Um exemplo concreto, foi descrito num estudo (Luga et al., 2012), em que os autores observaram que os exossomas secretados de fibroblastos associados a estados tumorais, têm a capacidade de estimular a atividade de células cancerígenas mamárias por sinalização, promovendo a migração destas e conseqüentemente levando a um processo invasivo, ou seja, logo a uma progressão da doença. Por outro lado, os exossomas libertados por células cancerígenas além de poderem afetar o crescimento tumoral, invasão, metastização e angiogénese podem também estar relacionados com a resistência à quimioterapia. Assim, os exossomas podem desempenhar um papel negativo, contribuindo para a progressão tumoral e o desenvolvimento de metástases por interferência com agentes terapêuticos, por exemplo pela possibilidade de estes transportarem proteínas envolvidas em resistências farmacológicas, ou por capturarem agentes quimioterapêuticos, diminuindo a sua concentração intracelular (Corrado et al., 2013).

No entanto, tal como noutras patologias, os exossomas provenientes de células cancerígenas apresentam (glico)proteínas específicas que podem ser usadas como marcadores. Além disso, os Ag tumorais da superfície celular neles transportados, confere-lhes a possibilidade de serem usados na vacinação contra o cancro.

4.1.6 Cicatrização e regeneração celular

Os exossomas, como anteriormente referido, têm uma ação anti-inflamatória, pro-angiogénica, contêm fatores e proteínas que no caso tecidual, irão ter uma ação reparadora e regenerativa de uma lesão ou alteração do tecido (Anthony & Shiels, 2013).

Células mesenquimais derivadas do cordão umbilical (hubMSC) e os seus exossomas respetivos são uma ferramenta com possível utilidade na cicatrização cutânea, contribuindo para o aumento da vascularização local (B. Zhang et al., 2015). Os exossomas de hubMSC, quando internalizados em células endoteliais, aceleram o processo de re-epitelização, promovendo assim a proliferação celular e a inibição da apoptose celular cutânea, nomeadamente após alteração da plasticidade celular, como por exemplo devido à exposição de condições de *stress* por temperatura (B. Zhang et al., 2015). Assim, pode-se entender que o mecanismo de regeneração celular é em parte, regulado pela transferência de vesículas extracelulares e promissor para o desenvolvimento da medicina regenerativa (Yáñez-Mó et al., 2015).

4.2 Exossomas e biomarcadores celulares

Um biomarcador é considerado um medidor de características indicadoras de uma determinada patologia ou condição clínica. Assim, os biomarcadores são aplicados na medicina como ferramentas de prognóstico ou de diagnóstico. Com esta importância, os biomarcadores deverão ser bem caracterizados e validados para cada caso específico, resultando assim numa técnica de confiança clínica (Harrison, n.d.; Olsen & Jørgensen, 2014; Strimbu & Tavel, 2011).

Para se considerar o biomarcador adequado são necessárias diversas características, entre as quais a sua especificidade (importante para evitar os falsos positivos no diagnóstico); ser completamente relacionado com a patologia em causa (idealmente preditivo, para que se consiga relacionar a gravidade da doença com a sua quantidade detetada); a sua fácil acessibilidade e de preferência por um processo minimamente invasivo; elevado grau de sensibilidade da técnica de deteção do biomarcador, para permitir avaliar a extensão real da alteração (Strimbu & Tavel, 2011;Stremersch et al., 2016).

Atualmente, a possibilidade de adaptação da terapia ao paciente, nomeadamente de acordo com o seu fenótipo específico é uma realidade, sendo então uma abordagem com uma elevada viabilidade de aplicação. Assim, o desenvolvimento paralelo de um biomarcador e da terapia, aumenta a facilidade de diagnóstico e a escolha de uma terapêutica eficaz (Stremersch et al., 2016;Olsen & Jørgensen, 2014).

Os exossomas como biomarcadores revelam então requisitos para a sua aplicação, como a libertação de exossomas no espaço extracelular que oferece uma oportunidade para os detetar nos fluidos corporais e conseqüentes possíveis alterações do local de análise. O acesso a estas vesículas bioativas de forma não-invasiva ou minimamente invasiva nos fluidos anteriormente descritos, é uma potencial estratégia para o diagnóstico de determinadas patologias (Mathivanan et al., 2010).

4.2.1 Proteínas exossomais como biomarcadores

Os exossomas contêm um vasto número de proteínas que são um reflexo do estado da célula a partir da qual foram formados. Estas proteínas podem ser consideradas como biomarcadores para diversas patologias, incluindo muito frequentemente o cancro, doenças neurológicas, metabólicas, cardiovasculares, renais e hepáticas, entre outras (Stremersch et al., 2016;Lin et al., 2015).

Exemplos concretos desta associação é o aumento de CD63 (marcador exossomal) em pacientes com melanoma, comparando com os valores em pessoas sem a doença (Logozzi et al., 2009). Assim, numa análise proteica exossomal comparativa, um

resultado com maior concentração de CD63, conduz a uma evidência de presença de alteração oncológica (Yoshioka et al., 2013).

O CD81, outro marcador exossomal, está associado a hepatite C, estando a sua concentração mais elevada no plasma de doentes com hepatite C crónica, o que se associa a um processo inflamatório ou fibrose. A quantificação de CD81 entre as tetraspaninas presentes em exossomas, pode constituir um marcador para o diagnóstico e controlo da resposta terapêutica do doente com hepatite (Welker et al., 2012).

Outros autores (Zhou et al., 2006), associaram proteínas provenientes de exossomas extraídos da urina à lesão renal aguda e cancro da próstata. Na tabela seguinte, apresentam-se mais exemplos de patologias em que a análise proteica pode ser uma forma de diagnóstico e controlo (Lin et al., 2015).

Tabela 2: Possíveis aplicações para diagnóstico a partir de biomarcadores exossomais proteicos (Retirado de Lin et al., 2015).

Biofluid	Disease	Associated proteins
Plasma	Chronic hepatitis C	CD81
	Melanoma	CD63, caveolin-1, TYRP2, VLA-4, HSP70, HSP90
	Glioblastoma	Epidermal growth factor receptor VIII
	Prostate cancer	Survivin
	Plasma cell dyscrasias	c-src
Urine	Acute kidney injury	Fetuin-A, ATF 3
	Liver injury	CD26, CD81, Slc3A1, CD10
	Bartter syndrome type 1	NKCC2
	Bladder cancer	EGF, α subunit of Gs, resisitin, retinoic acid-induced protein 3, and so forth.
	Prostate cancer	PSA, PCA3
Plasma, cell culture medium, and ascites	Human ovarian cancer	LICAM, CD24, ADAM10, EMMPRIN, claudin

Os exemplos anteriores, são apenas algumas das possíveis aplicações das proteínas exossomais como biomarcadores, considerando-se que é necessário futuramente aprofundar esta área, pois tem um grande potencial de utilização no diagnóstico e prognóstico da doença.

4.2.2 Ácidos nucleicos como biomarcadores exossomais

O miRNA exossomal tem sido explorado como um biomarcador para o diagnóstico de cancro. Alguns autores (Taylor & Gercel-Taylor, 2008) demonstraram que no cancro do ovário os miRNA exossomais atingem níveis quantificáveis em exossomas circulantes de amostras, mas não são detetados em amostras normais de controlo, sugerindo que estes miRNAs têm potencial para serem utilizados como marcadores de diagnóstico (Taylor & Gercel-Taylor, 2008).

Existem outras possibilidades de aplicação de miRNA e possivelmente de mRNA no diagnóstico de doenças, como indicado na tabela seguinte (Lin et al., 2015).

Tabela 3: RNAs exossomais associados a patologias e potencial da sua aplicação como biomarcadores de diagnóstico (Retirado de Lin et al., 2015).

Biofluid	Disease	Associated RNAs
Plasma	Ovarian cancer	miR-21, -141, -200a, -200b, -200c, -203, -205, -214
	Lung cancer	miR-17, -3p, -21, -20b, -223, -301, let-7f
	Prostate cancer	miR-141, miR-375
	Esophageal squamous cell cancer (ESCC)	miR-21, miR-1246
	Breast cancer	miR-21
	Cardiovascular disease	miR-1, miR-133a
Cell culture medium	Gastric cancer	Let-7 family miRNAs
	Colorectal cancer	mRNAs
Urine	Renal fibrosis	miR-29c, CD2APmRNA

4.3 Exossomas para veiculação de fármacos

Os exossomas podem ser considerados um potencial veículo farmacológico e serem assim uma promissora nova abordagem terapêutica (Bátiz et al., 2015). O facto dos exossomas existirem e poderem ser incorporados na circulação sanguínea, conseguindo distribuir-se por diversos órgãos, e assim atingirem rapidamente determinados alvos terapêuticos, abre a possibilidade do seu uso para a distribuição específica de alguns fármacos. Esta potencialidade, estende-se então a inúmeros agentes terapêuticos, como pequenas moléculas (tanto hidrofílicas como hidrofóbicas), pépticos, ácidos nucleicos, etc (Akers et al., 2013; Ali, 2004).

As nanovesículas têm propriedades particulares para serem usadas como veículos, tais como: estabilidade (a sua carga é protegida de RNAses e proteases), ausência de imunogenicidade (quando derivam do mesmo paciente) e capacidade de atravessar barreiras biológicas (Bátiz et al., 2015).

Por outro lado, a inclusão de nova carga molecular nas nanovesículas, nomeadamente a incorporação de fármacos, pode potenciar as propriedades da sua carga, o que as valoriza como veículos. Um destes exemplos, é o aumento da solubilidade e estabilidade da molécula de interesse, potenciando os seus efeitos farmacológicos (Langer, 1998). O aumento do efeito farmacológico permite a manutenção da concentração do fármaco dentro da sua janela terapêutica durante mais tempo, por libertação gradual do fármaco pelo exossoma (Moghimi, 2006). Além desta possibilidade pode ainda manipular-se a superfície da vesícula, para que desta forma se aumente o seu tempo na circulação sanguínea, influenciando a biodistribuição e a entrada nos tecidos alvo (Figura 12) (Brigger, Dubernet, & Couvreur, 2002; Turturici, Tinnirello, Sconzo, & Geraci, 2014).

A veiculação em vesículas, irá assegurar que o fármaco não seja libertado ou extravasado durante a circulação, sendo apenas libertado no alvo (Liu, Yang, Xiong, & Gu, 2016). Este facto está relacionado com uma grande vantagem farmacocinética dos exossomas enquanto veículo farmacológico que é a não existência de acumulação hepática do fármaco, evitando assim os efeitos de primeira passagem antes de atingir o local alvo (Ha et al., 2016).

Assim, com a conjugação de todas estas potencialidades, é possível que o fármaco atinja a concentração terapêutica no alvo pretendido, aumentando a sua biodisponibilidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e estabilidade em condições fisiológicas, ou seja, o fármaco pode ter uma alta capacidade de ação, sem colocar em causa factores toxicológicos sistémicos (Ali, 2004; Liu, Yang, Xiong, & Gu, 2016). Todos

estes aspectos, bem como a eficácia e segurança terapêutica são requisitos primários para a aplicação clínica dos exossomas como veículos (Liu et al., 2016).

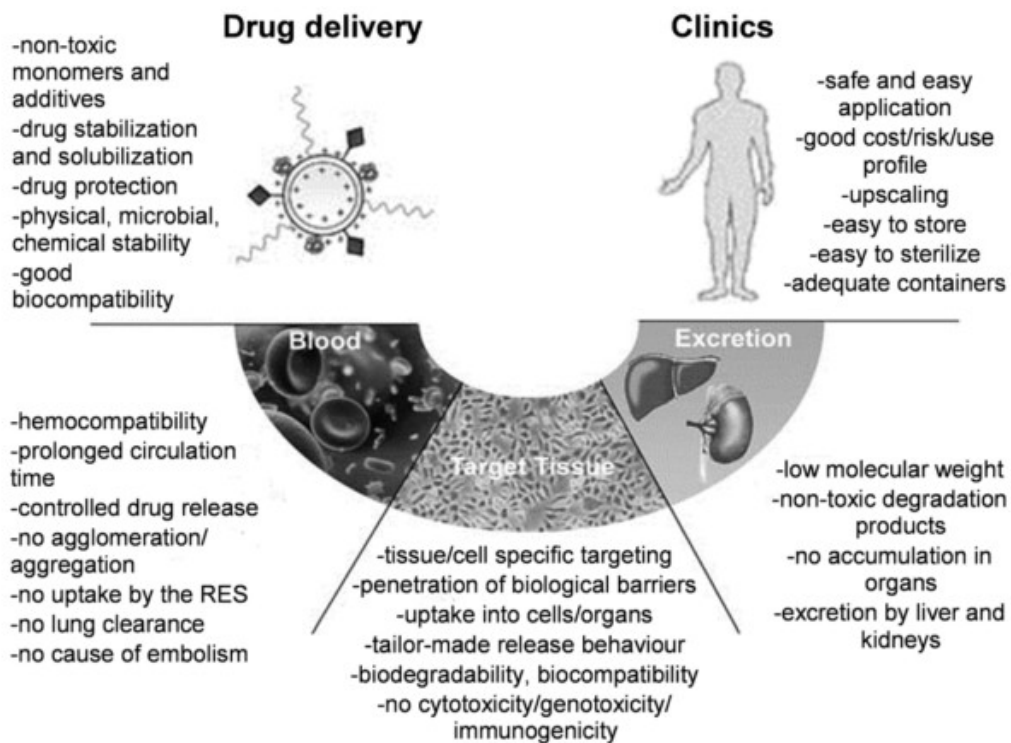


Figura 12: Componentes essenciais para o design de sistemas de veiculação farmacológica (Retirado de Liu et al., 2016).

Para fazer o carregamento molecular dos exossomas podem ser usadas diferentes abordagens de incorporação, representados esquematicamente da figura 13.

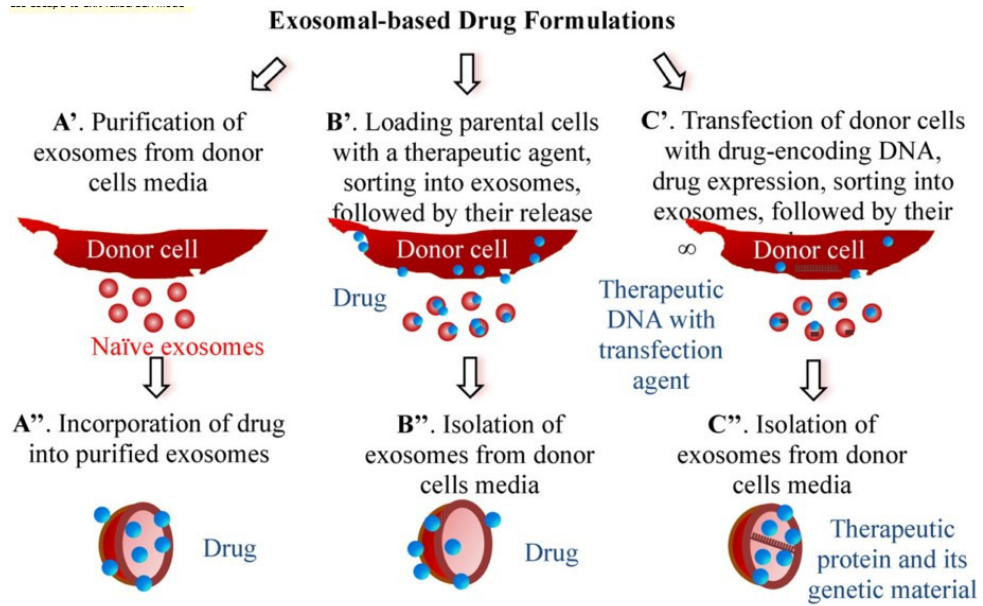


Figura 13: Diferentes abordagens para a incorporação de fármacos em exossomas (Retirado de Batrakova & Kim, 2015).

O tipo de moléculas mais frequentemente incorporadas, apesar de haver um grande leque de possibilidades, são moléculas pequenas e lipofílicas, por incubação a temperaturas específicas. Assim, moléculas antioxidantes, agentes de quimioterapia (como a doxirrubicina e o paclitaxel), antifúngicos, analgésicos (Ha et al., 2016) e outras classes de fármacos são exemplos desta aplicação (Rani, Ryan, Griffin, & Ritter, 2015; Sun et al., 2010; Kalani, Tyagi, & Tyagi, 2014).

A libertação do fármaco no local pretendido, pode ser estimulada por diversos fatores, endógenos e exógenos (figura 14). Alguns estímulos endógenos (ex. variação de pH do meio, nível hormonal do organismo, concentração enzimática, biomoléculas, ou gradientes de glucose) são variáveis de acordo com as características patológicas do alvo (Mura, Nicolas, & Couvreur, 2013; Kelley, Albert, Sullivan, & Epps III, 2013). Quanto aos potenciadores exógenos de libertação farmacológica no alvo podem ser referidos a temperatura, campos magnéticos e ultra sons, eletricidade pulsada ou energia de radiação (Liu et al., 2016).

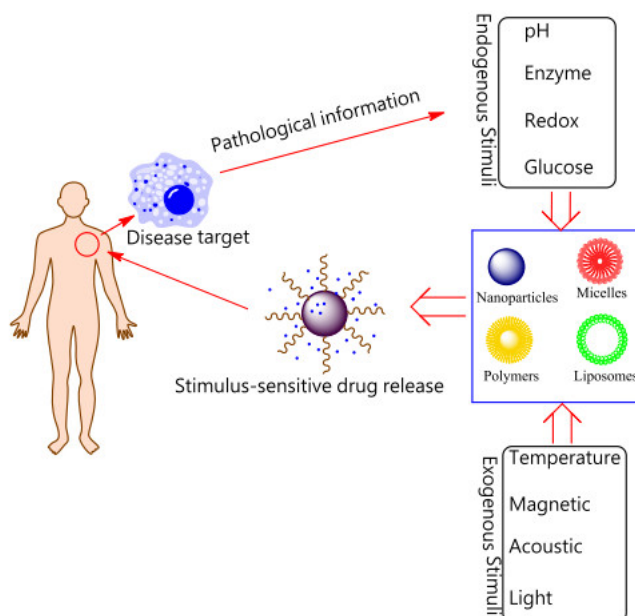


Figura 14: Ilustração esquemática de estímulos associados à liberação de fármacos de diferentes veículos (Retirado de Liu et al., 2016).

Apesar da evolução ocorrida no conhecimento relativo quer às técnicas de incorporação de fármacos em exossomas, quer à sua liberação, ainda é necessário ocorrer o desenvolvimento de novos métodos nível industrial de detecção molecular, controlo de qualidade de produção, estudos farmacocinéticos e toxicológicos rigorosos e ensaios clínicos (Batrakova & Kim, 2015), pelo que as apostas nesta área de desenvolvimento são promissoras.

4.4 Associação dos exossomas à vacinação

As propriedades imunológicas dos exossomas, são uma característica indicadora da sua possível aplicação em vacinas para a prevenção de diversas patologias devido à sua segurança e eficácia terapêutica, das quais o cancro ou doenças infecciosas são uma prioridade (Chaput & Théry, 2010).

Segundo alguns autores (Corrado et al., 2013) algumas patentes para o uso de exossomas na produção de vacinas foram introduzidas por diversas indústrias, desencadeando os ensaios clínicos para a sua aplicação clínica. No seu desenvolvimento,

é necessário que a vacina contenha ou se assemelhe ao elemento etiológico da patologia, para que consiga desencadear uma resposta imunológica a este, envolvendo o sistema imunitário do organismo em causa (L. van der Pol, Stork, & van der Ley, 2015). Neste sentido, o tamanho adequado e a existência de expressão de um antigénio de um agente patogénico específico nos exossomas possibilita a sua potencial utilização na produção de uma vacina livre de células (Schorey & Bhatnagar, 2008).

Apesar terem sido obtidos bons resultados experimentais do uso de exossomas como vacinas, a sua aplicação no cancro é limitada pelo facto de ser necessário preparar os exossomas localmente, usando células dendríticas do paciente, podendo as concentrações do antigénio ser inferiores às desejadas. Desta forma, é mais difícil a difusão e ampliação destes tratamentos por serem tão personalizados (Corrado et al., 2013) assim como a existência de compostos exossomais, como proteínas ou material genético, que causem imunossupressão, podem interferir com a resposta imune pretendida (L. van der Pol et al., 2015).

Apesar das dificuldades, os exossomas já são atualmente usados como ferramentas de vacinação em diversas doenças, existindo ensaios clínicos completos para aplicação terapêutica de vesículas extracelulares e duas vacinas para a meningite B e uma para o cancro da próstata (Stremersch et al., 2016).

4.5 Terapia genética

O transporte de material genético por parte dos exossomas, como já foi referido, pode conferir-lhes algumas particularidades negativas já revelou como anteriormente descrito, algumas particularidades negativas, nomeadamente pelo facto da transferência de informação genética ou de proteínas que poder facilitar o desenvolvimento de uma patologia, como por exemplo como o cancro ou uma doença neurodegenerativa (Y. Lee et al., 2012). Apesar disso, esta composição genética, quando controlada, permite usar os exossomas vetores da informação pretendida com um fim terapêutico.

Na verdade, os exossomas são vetores ideais para a terapia genética pois possuem componentes naturais biológicos e não virais, presentes tanto a nível sistémico como local. Adicionalmente, o pequeno tamanho e flexibilidade permite a passagem pela

maioria das membranas biológicas, e tal como já possui uma bicamada que irá impedir a degradação proteica como do RNA, facilitando a entrega ao alvo pretendido (Y. Lee et al., 2012).

Apesar do uso promissor de exossomas a nível da terapia genética, estão a ser encontradas algumas dificuldades nesta área, nomeadamente no transporte de RNAs, como miRNA e siRNA, com um curto tempo de semi-vida no plasma, bem como na falta de estudos relativos à acumulação hepática e renal, e ainda pelo facto da carga negativa do miRNA, causar dificuldades em atravessar a membrana celular hidrofóbica, dificultando a troca de conteúdo (Seto, 2010). Estratégias para ultrapassar estas dificuldades passam pela reestruturação dos exossomas como vetores de transporte genético, sem constituírem uma preocupação de reconhecimento imunológico e indução de resposta inflamatória (Seow & Wood, 2009).

Apesar das adversidades encontradas, é possível direccionar os exossomas para um alvo, a carga genética ser carregada nos exossomas e estes não conduzirem a uma resposta imunológica, pelo que estes aspetos são indicadores bastante importantes e perspetivam viabilidade de utilização dos exossomas como vetores para a terapia genética de múltiplas patologias (Lässer, 2012).

4.6 Imunoterapia

Os exossomas possuem particularidades de resistência celular como a capacidade de evitar os mecanismos de lise celular e resistir à degradação de RNA como referido anteriormente, aumentando desta forma a estabilidade e proteção do seu conteúdo em material genético *in vivo* (Rodrigues, Nimrichter, Oliveira, Nosanchuk, & Casadevall, 2008). Existe assim a capacidade dos exossomas modularem ou adaptarem a resposta imunológica, tendo os antigénios maior capacidade de estimulação quando se encontram associados às vesículas (Zeelenberg et al., 2008). Contudo, os exossomas são capazes de promover não só uma resposta imunológica, como também têm a capacidade de a suprimir, consoante o mecanismo de atuação em causa (Greening, Gopal, Xu, Simpson, & Chen, 2015).

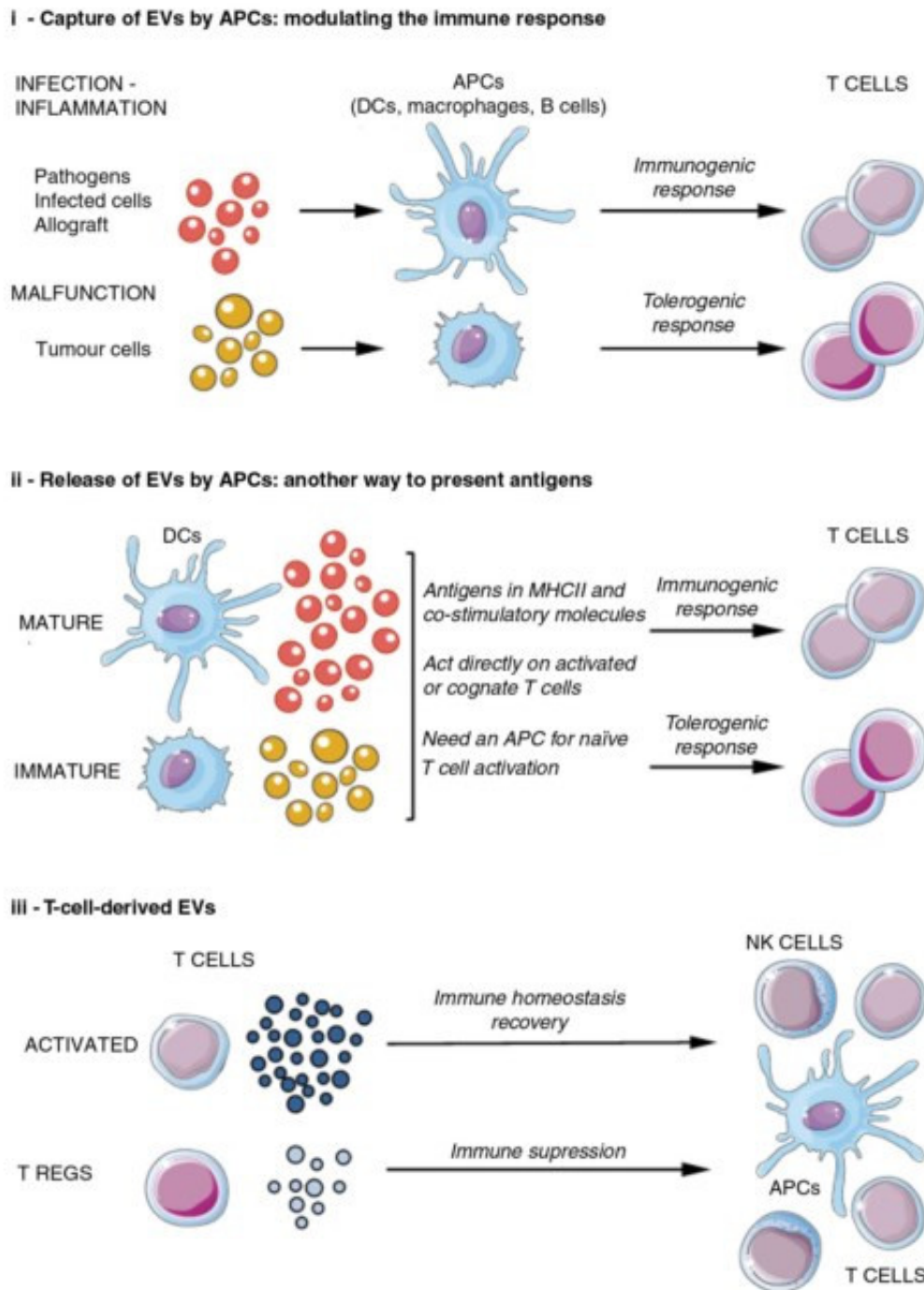


Figura 15: Mecanismos de atuação de vesículas extracelulares: apresentação antigénica e imunidade adquirida em diferentes células (Retirado de Yáñez-Mó et al., 2015).

A nível de manipulação tecnológica, os exossomas apresentam uma marcada vantagem quando derivam de células dendríticas, pois podem ser criopreservados mantendo a sua estabilidade por mais de seis meses numa temperatura de -80°C com o seu fenótipo funcional preservado. No entanto, existe a falta de estudos *in vivo* relativos

à biodistribuição, internalização celular, ou propriedades farmacocinéticas de exossomas criopreservados (Chaput & Théry, 2010).

O desenvolvimento da imunoterapia é da maior importância, tendo em conta os efeitos adversos e insucesso das terapias atuais em doenças autoimunes, caracterizadas pela inaptidão do sistema imunitário de controlar a proliferação e crescimento celular. Deste modo, esta aplicação clínica dos exossomas neste campo poderá permitir contornar as dificuldades terapêuticas existentes, podendo ser adaptada a uma estimulação ou a uma supressão do sistema imunitário (Tran, Mattheolabakis, Aldawsari, & Amiji, 2015).

5. Conclusão

A medicina e a tecnologia são áreas em constante desenvolvimento e são fundamentais para a melhoria da qualidade de vida e bem-estar dos indivíduos. Nesse sentido, também a nível dos cuidados de saúde, mais do que existir uma preocupação com o alívio dos sintomas associados a uma doença, existe sobretudo um interesse crescente de se investigar a causa das doenças e encontrar a adequada terapia com o objetivo de se alcançar a cura. Assim, atualmente tem ocorrido grande aposta na investigação de técnicas de diagnóstico e de prognóstico mais rigorosas e com maior sensibilidade, bem como de novas abordagens terapêuticas de diversas patologias.

Os exossomas, enquanto vesículas biológicas, respondem a estas preocupações e constituem uma ferramenta inovadora e promissora na nanomedicina. Uma vez que estas vesículas são mediadores de comunicação celular, podem ser utilizados como veículos de transporte para inúmeras substâncias, nomeadamente de fármacos, para que estes alcancem um determinado destino. Além disso, estando implicados na transferência de mRNAs, miRNAs, proteínas e lípidos entre células, possuem também a capacidade de modificar as funções da célula alvo, podendo por essa razão desempenhar um papel importante em diferentes áreas clínicas.

Tal como foi referido, o papel dos exossomas é fundamental na manifestação e progressão de diversas patologias, bem como na tolerância a fármacos, sendo assim importante o mapeamento das suas funções na comunicação intercelular e também a completa compreensão do seu envolvimento nos mecanismos patológicos. Contudo, hoje em dia já existe alguma aplicação dos exossomas como biomarcadores de patologias já que, quer a nível da sua membrana quer no seu lúmen, transportam numerosas moléculas que podem ser utilizadas para essa finalidade.

Adicionalmente, a sua presença nos fluidos biológicos facilita a deteção destes biomarcadores e permite recorrer a estudos analíticos sem interferir grandemente com o conforto do doente, uma vez que alguns desses fluidos podem ser obtidos sem necessidade de se executarem procedimentos invasivos.

No entanto, a identificação de material genético na sua composição contribuiu para o conhecimento do seu grau de complexidade e ampliou as suas potencialidades de aplicação na biomedicina pois, além de poderem ser utilizados como veículos de fármacos, oferecem também a possibilidade de alterar a expressão genética de células alvo e conseqüentemente as suas funções. Assim, os exossomas podem oferecer uma nova ferramenta também para a terapia genética.

Apesar de todas estas potenciais aplicações dos exossomas, na prática clínica diária são colocados desafios relativamente ao seu uso, como por exemplo a falta de técnicas aprovadas para a sua extração e quantificação. Outra dificuldade no seu uso clínico corrente é o facto de ainda não terem sido desenvolvidos ensaios clínicos relativos à segurança e eficácia de muitas das aplicações referidas nesta monografia.

Independentemente de existirem ainda algumas barreiras para o total conhecimento destas vesículas extracelulares, pode concluir-se que pelas suas particularidades biológicas os exossomas oferecem possibilidades inovadoras na prevenção de patologias, técnicas de diagnóstico e prognóstico das mesmas e são de facto uma nova abordagem terapêutica em pleno desenvolvimento.

6. Bibliografia

- Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S., & Chen, C. C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of Neuro-Oncology*, *113*(1), 1–11. <http://doi.org/10.1007/s11060-013-1084-8>
- Ali, S. A. M. (2004). *Drug Delivery*. *Drug Delivery*. <http://doi.org/10.1081/E-ESMC>
- Anthony, D. F., & Shiels, P. G. (2013). Exploiting paracrine mechanisms of tissue regeneration to repair damaged organs. *Transplantation Research*, *2*(1), 10. <http://doi.org/10.1186/2047-1440-2-10>
- Azmi, A. S., Bao, B., & Sarkar, F. H. (2013). Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: A comprehensive review. *Cancer and Metastasis Reviews*, *32*(3-4), 623–642. <http://doi.org/10.1007/s10555-013-9441-9>
- Bátiz, L. F., Castro, M. A., Burgos, P. V., Velásquez, Z. D., Muñoz, R. I., Lafourcade, C. A., ... Wyneken, U. (2015). Exosomes as Novel Regulators of Adult Neurogenic Niches. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*(January), 501. <http://doi.org/10.3389/fncel.2015.00501>
- Batrakova, E. V., & Kim, M. S. (2015). Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, *219*, 396–405. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.07.030>
- Bellingham, S. A., Guo, B. B., Coleman, B. M., & Hill, A. F. (2012). Exosomes: Vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Frontiers in Physiology*, *3* MAY(May), 1–12. <http://doi.org/10.3389/fphys.2012.00124>
- Braicu, C., Tomuleasa, C., Monroig, P., Cucuianu, A., Berindan-Neagoe, I., & Calin, G. A. (2015). Exosomes as divine messengers: are they the Hermes of modern molecular oncology? *Cell Death and Differentiation*, *22*(1), 34–45. <http://doi.org/10.1038/cdd.2014.130>

- Brigger, I., Dubernet, C., & Couvreur, P. (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(5), 631–651. [http://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00044-3](http://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00044-3)
- Bryniarski, K. (2015). Exosomes as mediators of intercellular communication : clinical implications Exosomes as mediators of intercellular communication: clinical implications, 125(5), 370–380.
- Cervio, E., Barile, L., Moccetti, T., & Vassalli, G. (2015). Exosomes for intramyocardial intercellular communication. *Stem Cells International*, 2015. <http://doi.org/10.1155/2015/482171>
- Chaput, N., & Théry, C. (2010). Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Seminars in Immunopathology*, 1–22. <http://doi.org/10.1007/s00281-010-0233-9>
- Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2016). Cardiac extracellular vesicles in normal and infarcted heart. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(1), 1–18. <http://doi.org/10.3390/ijms17010063>
- Corrado, C., Raimondo, S., Chiesi, A., Ciccia, F., De Leo, G., & Alessandro, R. (2013). Exosomes as intercellular signaling organelles involved in health and disease: Basic science and clinical applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 5338–5366. <http://doi.org/10.3390/ijms14035338>
- Crescitelli, R., Lässer, C., Szabo, T. G., Kittel, A., Eldh, M., Dianzani, I., ... Lötvall, J. (2013). Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2, 1–10. <http://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20677>
- EL Andaloussi, S., Lakhali, S., Mäger, I., & Wood, M. J. A. (2013). Exosomes for targeted siRNA delivery across biological barriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(3), 391–397. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2012.08.008>
- Exocarta database, <http://www.exocarta.org/> [Consultado em novembro de 2016]
- Fader, C. M., & Colombo, M. I. (2009). Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell Death and Differentiation*, 16(1), 70–8.

<http://doi.org/10.1038/cdd.2008.168>

- Foglio, E., Puddighinu, G., Fasanaro, P., D'Arcangelo, D., Perrone, G. A., Mocini, D., ... Limana, F. (2015). Exosomal clusterin, identified in the pericardial fluid, improves myocardial performance following MI through epicardial activation, enhanced arteriogenesis and reduced apoptosis. *International Journal of Cardiology*, *197*, 333–347. <http://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.06.008>
- Gatti, S., Bruno, S., Deregibus, M. C., Sordi, A., Cantaluppi, V., Tetta, C., & Camussi, G. (2011). Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *26*(5), 1474–1483. <http://doi.org/10.1093/ndt/gfr015>
- Greenberg, B. (2015). Gene therapy for heart failure. *Journal of Cardiology*, *66*(3), 195–200. <http://doi.org/10.1016/j.jjcc.2015.02.006>
- Greening, D. W., Gopal, S. K., Xu, R., Simpson, R. J., & Chen, W. (2015). Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *40*, 72–81. <http://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.02.009>
- Ha, D., Yang, N., Nadithe, V., & Pharmaceutica Sinica, A. B. (2016). Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *6*(4), 287–296. <http://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.02.001>
- Hannafon, B. N., & Ding, W. Q. (2013). Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(7), 14240–14269. <http://doi.org/10.3390/ijms140714240>.
- Helmke, A., & von Vietinghoff, S. (2016). Extracellular vesicles as mediators of vascular inflammation in kidney disease. *World Journal of Nephrology*, *5*(2), 125–38. <http://doi.org/10.5527/wjn.v5.i2.125>
- Johnstone, R. M. (2006). Exosomes biological significance: A concise review. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *36*(2), 315–321. <http://doi.org/10.1016/j.bcmed.2005.12.001>
- Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L., & Turbide, C. (1987). Vesicle

- formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry*, 262(19), 9412–9420. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.10.005>
- Kahlert, C., & Kalluri, R. (2013). Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *Journal of Molecular Medicine*, 91(4), 431–437. <http://doi.org/10.1007/s00109-013-1020-6>
- Kalani, A., Tyagi, A., & Tyagi, N. (2014). Exosomes: Mediators of neurodegeneration, neuroprotection and therapeutics. *Molecular Neurobiology*, 49(1), 590–600. <http://doi.org/10.1007/s12035-013-8544-1>
- Kanada, M., Bachmann, M. H., Hardy, J. W., Frimannson, D. O., Bronsart, L., Wang, A., ... Contag, C. H. (2015). Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1–10. <http://doi.org/10.1073/pnas.1418401112>
- Keerthikumar, S., Chisanga, D., Ariyaratne, D., Al Saffar, H., Anand, S., Zhao, K., ... Mathivanan, S. (2016). ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *Journal of Molecular Biology*, 428(4), 688–692. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.019>
- Keller, S., Sanderson, M. P., Stoeck, A., & Altevogt, P. (2006). Exosomes: From biogenesis and secretion to biological function. *Immunology Letters*, 107(2), 102–108. <http://doi.org/10.1016/j.imlet.2006.09.005>
- Kelley, E. G., Albert, J. N. L., Sullivan, M. O., & Epps III, T. H. (2013). Stimuli-responsive copolymer solution and surface assemblies for biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, 42(17), 7057–7071. <http://doi.org/10.1039/C3CS35512H>
- Kilpinen, L., Impola, U., Sankkila, L., Ritamo, I., Aatonen, M., Kilpinen, S., ... Laitinen, S. (2013). Extracellular membrane vesicles from umbilical cord blood-derived MSC protect against ischemic acute kidney injury, a feature that is lost after inflammatory conditioning. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2, 1–15. <http://doi.org/10.3402/jev.v2i0.21927>
- Koppers-Lalic, D., Hogenboom, M. M., Middeldorp, J. M., & Pegtel, D. M. (2013).

- Virus-modified exosomes for targeted RNA delivery; A new approach in nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(3), 348–356. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.006>
- Lachenal, G., Pernet-Gallay, K., Chivet, M., Hemming, F. J., Belly, A., Bodon, G., ... Sadoul, R. (2011). Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 46(2), 409–418. <http://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.11.004>
- Lai, C. P. K., & Breakefield, X. O. (2012). Role of exosomes/microvesicles in the nervous system and use in emerging therapies. *Frontiers in Physiology*, 3 JUN(June), 1–14. <http://doi.org/10.3389/fphys.2012.00228>
- Langer, R. (1998). Drug delivery and targeting. *Nature*. <http://doi.org/10.1517/14728222.2.1.145>
- Lässer, C. (2012). Exosomal RNA as biomarkers and the therapeutic potential of exosome vectors. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 12(December), S189–S197. <http://doi.org/10.1517/14712598.2012.680018>
- Lee, C., Mitsialis, S. A., Aslam, M., Vitali, S. H., Vergadi, E., Konstantinou, G., ... Kourembanas, S. (2012). Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*, 126(22), 2601–2611. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.114173>
- Lee, Y., El Andaloussi, S., & Wood, M. J. A. (2012). Exosomes and microvesicles: Extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Human Molecular Genetics*, 21(R1), 125–134. <http://doi.org/10.1093/hmg/dds317>
- Lin, J., Li, J., Huang, B., Liu, J., Chen, X., Chen, X.-M., ... Wang, X.-Z. (2015). Exosomes: Novel Biomarkers for Clinical Diagnosis. *The Scientific World Journal*, 2015, 1–8. <http://doi.org/10.1155/2015/657086>
- Liu, D., Yang, F., Xiong, F., & Gu, N. (2016). The smart drug delivery system and its clinical potential. *Theranostics*, 6(9), 1306–1323. <http://doi.org/10.7150/thno.14858>
- Logozzi, M., De Milito, A., Lugini, L., Borghi, M., Calabrò, L., Spada, M., ... Fais, S.

- (2009). High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS ONE*, 4(4). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0005219>
- Luga, V., Zhang, L., Vitoria-Petit, A. M., Ogunjimi, A. A., Inanlou, M. R., Chiu, E., ... Wrana, J. L. (2012). Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell*, 151(7), 1542–1556. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.024>
- Mathivanan, S., Fahner, C. J., Reid, G. E., & Simpson, R. J. (2012). ExoCarta 2012: Database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), 1–4. <http://doi.org/10.1093/nar/gkr828>
- Mathivanan, S., Ji, H., & Simpson, R. J. (2010). Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics*, 73(10), 1907–1920. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.06.006>
- Milosevits, G., Szebeni, J., & Krol, S. (2015). Exosomes: potential model for complement-stealth delivery systems. *European Journal of Nanomedicine*, 7(3), 207–218. <http://doi.org/10.1515/ejnm-2015-0005>
- Moghimi, S. M. (2006). Recent developments in polymeric nanoparticle engineering and their applications in experimental and clinical oncology. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 6(6), 553–561. <http://doi.org/10.2174/187152006778699130>
- Muller, L., Hong, C. S., Stolz, D. B., Watkins, S. C., & Whiteside, T. L. (2014). Isolation of biologically-active exosomes from human plasma. *Journal of Immunological Methods*, 411, 55–65. <http://doi.org/10.1016/j.jim.2014.06.007>
- Mura, S., Nicolas, J., & Couvreur, P. (2013). Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nature Materials*, 12(11), 991–1003. <http://doi.org/10.1038/NMAT3776>
- Olsen, D., & Jørgensen, J. T. (2014). Companion diagnostics for targeted cancer drugs - clinical and regulatory aspects. *Frontiers in Oncology*, 4(May), 105. <http://doi.org/10.3389/fonc.2014.00105>
- Ponnappan, N., & Chugh, A. (2015). Nanoparticle-Mediated Delivery of Therapeutic Drugs. *Pharmaceutical Medicine*, 29(3), 155–167. <http://doi.org/10.1007/s40290-015-0096-4>

- Rani, S., Ryan, A. E., Griffin, M. D., & Ritter, T. (2015). Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications. *Molecular Therapy*, 23(5), 812–823. <http://doi.org/10.1038/mt.2015.44>
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200(4), 373–383. <http://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
- Record, M., Carayon, K., Poirot, M., & Silvente-Poirot, S. (2014). 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*, 1841(1), 108–120. <http://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.10.004>
- Revenfeld, A. L. S., Bæk, R., Nielsen, M. H., Stensballe, A., Varming, K., & Jørgensen, M. (2014). Diagnostic and prognostic potential of extracellular vesicles in peripheral blood. *Clinical Therapeutics*, 36(6), 830–846. <http://doi.org/10.1016/j.clinthera.2014.05.008>
- Rodrigues, M. L., Nimrichter, L., Oliveira, D. L., Nosanchuk, J. D., & Casadevall, A. (2008). Vesicular trans-cell wall Transport in fungi: A mechanism for the delivery of virulence-associated macromolecules? *Lipid Insights*, 2 1(6), 27–40. <http://doi.org/10.1038/ncb1596>
- Roma-Rodrigues, C., Fernandes, A. R., & Baptista, P. V. (2014). Exosome in tumour microenvironment: Overview of the crosstalk between normal and cancer cells. *BioMed Research International*, 2014. <http://doi.org/10.1155/2014/179486>
- Schorey, J. S., & Bhatnagar, S. (2008). Exosome function: From tumor immunology to pathogen biology. *Traffic*, 9(6), 871–881. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00734.x>
- Seow, Y., & Wood, M. J. (2009). Biological Gene Delivery Vehicles: Beyond Viral Vectors. *Molecular Therapy*, 17(5), 767–777. <http://doi.org/10.1038/mt.2009.41>
- Seto, A. G. (2010). The road toward microRNA therapeutics. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42(8), 1298–1305. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.03.003>

- Shifrin, D. A., Beckler, M. D., Coffey, R. J., & Tyska, M. J. (2013). Extracellular vesicles: communication, coercion, and conditioning. *Molecular Biology of the Cell*, 24(9), 1253–1259. <http://doi.org/10.1091/mbc.E12-08-0572>
- Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares, <https://www.isev.org/> [Consultado em novembro de 2016]
- Stremersch, S., De Smedt, S. C., & Raemdonck, K. (2016). Therapeutic and diagnostic applications of extracellular vesicles. *Journal of Controlled Release*. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.07.054>
- Strimbu, K., & Tavel, J. a. (2011). What are Biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*, 5(6), 463–466. <http://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177.What>
- Sun, D., Zhuang, X., Xiang, X., Liu, Y., Zhang, S., Liu, C., ... Zhang, H.-G. (2010). A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(9), 1606–1614. <http://doi.org/10.1038/mt.2010.105>
- Taylor, D. D., & Gercel-Taylor, C. (2008). MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 110(1), 13–21. <http://doi.org/10.1016/j.ygyno.2008.04.033>
- Taylor, D. D., & Gercel-Taylor, C. (2011). Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated immunosuppressive microenvironments. *Seminars in Immunopathology*, 1–14. <http://doi.org/10.1007/s00281-010-0234-8>
- Tran, T. H., Mattheolabakis, G., Aldawsari, H., & Amiji, M. (2015). *Exosomes as nanocarriers for immunotherapy of cancer and inflammatory diseases*. *Clinical Immunology* (Vol. 160). Elsevier B.V. <http://doi.org/10.1016/j.clim.2015.03.021>
- Tsilioni, I., Panagiotidou, S., & Theoharides, T. C. (2014). Exosomes in neurologic and psychiatric disorders. *Clinical Therapeutics*, 36(6), 882–888. <http://doi.org/10.1016/j.clinthera.2014.05.005>
- Turturici, G., Tinnirello, R., Sconzo, G., & Geraci, F. (2014). Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and

- disadvantages. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 306(7), C621–33. <http://doi.org/10.1152/ajpcell.00228.2013>
- Urbanelli, L., Magini, A., Buratta, S., Brozzi, A., Sagini, K., Polchi, A., ... Emiliani, C. (2013). Signaling pathways in exosomes biogenesis, secretion and fate. *Genes*, 4(2), 152–170. <http://doi.org/10.3390/genes4020152>
- Van der Pol, E., Böing, A. N., Harrison, P., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2012). Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacological Reviews*, 64(3), 676–705. <http://doi.org/10.1124/pr.112.005983>
- van der Pol, L., Stork, M., & van der Ley, P. (2015). Outer membrane vesicles as platform vaccine technology. *Biotechnology Journal*, 10(11), 1689–1706. <http://doi.org/10.1002/biot.201400395>
- Van Dommelen, S. M., Vader, P., Lakhal, S., Kooijmans, S. A. A., Van Solinge, W. W., Wood, M. J. A., & Schiffelers, R. M. (2012). Microvesicles and exosomes: Opportunities for cell-derived membrane vesicles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 635–644. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.11.021>
- Vicencio, J. M., Yellon, D. M., Sivaraman, V., Das, D., Boi-Doku, C., Arjun, S., ... Davidson, S. M. (2015). Plasma exosomes protect the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Journal of the American College of Cardiology*, 65(15), 1525–1536. <http://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.02.026>
- Villarroya-Beltri, C., Baixauli, F., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Madrid, F., & Mittelbrunn, M. (2014). Sorting it out: Regulation of exosome loading. *Seminars in Cancer Biology*, 28(1), 3–13. <http://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.04.009>
- Vlassov, A. V., Magdaleno, S., Setterquist, R., & Conrad, R. (2012a). Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1820(7), 940–948. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.03.017>
- Vlassov, A. V., Magdaleno, S., Setterquist, R., & Conrad, R. (2012b). Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1820(7), 940–948. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.03.017>

- Welker, M. W., Reichert, D., Susser, S., Sarrazin, C., Martinez, Y., Herrmann, E., ... Kronenberger, B. (2012). Soluble serum CD81 is elevated in patients with chronic hepatitis c and correlates with alanine aminotransferase serum activity. *PLoS ONE*, 7(2), 1–8. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0030796>
- Xitong, D., & Xiaorong, Z. (2016). Targeted therapeutic delivery using engineered exosomes and its applications in cardiovascular diseases. *Gene*, 575(2), 377–384. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2015.08.067>
- Xu, R., Greening, D. W., Zhu, H., Takahashi, N., & Simpson, R. J. (2016). Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application, 126(4). <http://doi.org/10.1172/JCI81129.It>
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R.-M., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., ... De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, 27066. <http://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
- Yellon, D. M., & Davidson, S. M. (2014). Exosomes nanoparticles involved in cardioprotection? *Circulation Research*, 114(2), 325–332. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.300636>
- Yeo, R. W. Y., Lai, R. C., Zhang, B., Tan, S. S., Yin, Y., Teh, B. J., & Lim, S. K. (2013). Mesenchymal stem cell: An efficient mass producer of exosomes for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(3), 336–341. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.001>
- Yoshioka, Y., Konishi, Y., Kosaka, N., Katsuda, T., Kato, T., & Ochiya, T. (2013). Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2, 1–9. <http://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20424>
- Yu, S., Cao, H., Shen, B., & Feng, J. (2015). Tumor-derived exosomes in cancer progression and treatment failure. *Oncotarget*, 6(35), 37151–37168. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.6022>
- Zeelenberg, I. S., Ostrowski, M., Krumeich, S., Bobrie, A., Jancic, C., Boissonnas, A., ... Théry, C. (2008). Targeting tumor antigens to secreted membrane vesicles in vivo

- induces efficient antitumor immune responses. *Cancer Research*, 68(4), 1228–1235. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-3163>
- Zhang, B., Wang, M., Gong, A., Zhang, X., Wu, X., Zhu, Y., ... Xu, W. (2015). HucMSc-exosome mediated-Wnt4 signaling is required for cutaneous wound healing. *Stem Cells*, 33(7), 2158–2168. <http://doi.org/10.1002/stem.1771>
- Zhang, H. G., & Grizzle, W. E. (2014). Exosomes: A novel pathway of local and distant intercellular communication that facilitates the growth and metastasis of neoplastic lesions. *American Journal of Pathology*, 184(1), 28–41. <http://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.09.027>
- Zhang, J., Li, S., Li, L., Li, M., Guo, C., Yao, J., & Mi, S. (2015a). Exosome and exosomal microRNA: Trafficking, sorting, and function. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 13(1), 17–24. <http://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.02.001>
- Zhang, J., Li, S., Li, L., Li, M., Guo, C., Yao, J., & Mi, S. (2015b). Exosome and exosomal microRNA: Trafficking, sorting, and function. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 13(1), 17–24. <http://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.02.001>
- Zhou, H., Pisitkun, T., Aponte, A., Yuen, P. S. T., Hoffert, J. D., Yasuda, H., ... Star, R. A. (2006). Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. *Kidney International*, 70(10), 1847–57. <http://doi.org/10.1038/sj.ki.5001874>