

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Laura Botelho Merij**

**ANÁLISE FÍSICA E BIOQUÍMICA DE VESÍCULAS  
EXTRACELULARES ISOLADAS COM DEPLEÇÃO DE  
LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS**

Juiz de Fora

2022

**Laura Botelho Merij**

**ANÁLISE FÍSICA E BIOQUÍMICA DE VESÍCULAS  
EXTRACELULARES ISOLADAS COM DEPLEÇÃO DE  
LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS**

Dissertação de Mestrado do Curso de pós-graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

**Orientador: Dr. Eugenio Damaceno Hottz**

Juiz de Fora

2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Botelho Merij, Laura .

ANÁLISE FÍSICA E BIOQUÍMICA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES ISOLADAS COM DEPLEÇÃO DE LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS / Laura Botelho Merij. -- 2022. 90 p. : il.

Orientador: Eugenio Damaceno Hottz  
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2022.

1. Vesículas extracelulares. 2. Isolamento. 3. Contaminação por lipoproteínas. 4. Gradiente de densidade. 5. SEC. I. Damaceno Hottz, Eugenio , orient. II. Título.





## AGRADECIMENTOS

Nessa longa travessia que foi o mestrado não foram poucas as pessoas que me ajudaram a ter coragem e seguir apesar de todas as dificuldades e dúvidas pelo caminho. A tarefa de transformar sentimentos em palavras é um desafio, mas serei eternamente grata a todos vocês, pessoas imprescindíveis para a realização e conclusão desse trabalho!

Início agradecendo à minha família por todo o incentivo e por acreditarem nos meus sonhos. Ao meu pai, Flávio (*in memoriam*), e ao meu irmão, Vitor (*in memoriam*), por terem me dado o privilégio de ter feito parte de suas vidas e terem sempre me rodeado de muito amor e apoio. E à minha mãe, Cristina, que é meu porto seguro, me ensinou a lutar pelos meus objetivos e esteve ao meu lado em todas as adversidades que surgiram no meio do caminho.

Agradeço também ao meu orientador, Prof. Dr. Eugenio Hottz, por sempre ter acreditado e depositado sua confiança em mim ao longo de todos esses anos de trabalho que se iniciaram ainda na graduação. Sem sua orientação, apoio, compreensão e confiança, nada disso seria possível.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Imunotrombose (LIT) que tive a chance de conhecer durante essa jornada. Principalmente as amigas de bancada e de vida, Stephane, Cecília, Fernanda e Paula, pelos momentos vividos (ainda que alguns de puro estresse e desespero), pelas conversas, pelas ajudas, pelas risadas e pelos conselhos. Vocês deram leveza aos meus dias e me provaram que a amizade pode brotar em qualquer lugar. Obrigada por toda a troca e até por todas as agulhadas!

As amigas da vida, Bárbara, Amanda, Cris, Mari, Lívia e Duda, por todo o apoio, incentivo e especialmente por estarem ao meu lado em um dos momentos mais difíceis que passei e me ajudarem a seguir em frente.

Ao técnico de laboratório e amigo, Arthur, por toda ajuda concedida a mim e ao projeto, seja ela com contas, equipamentos ou soluções! Obrigada pela paciência, disponibilidade, conversas e risadas.

Aos colaboradores da FIOCRUZ. Particularmente a Dr<sup>a</sup> Patrícia Bozza, Dr<sup>a</sup> Monique Trugilho e Dr<sup>a</sup> Adriana Silva. E os colegas Remy e Luana por toda ajuda nos dias corridos de experimentos.

Aos professores do PPGCBio-UFJF e ICB por todos os ensinamentos, em especial a Prof. Dr<sup>a</sup> Jacy Gameiro. E também por permitirem prontamente a utilização de seus laboratórios sempre que necessário.

A equipe do Laboratório Integrado de Pesquisas (LIP) pela atenção e assistência.

A Fernanda, responsável pela secretaria, que facilitou e contribuiu com todos os trâmites administrativos necessários para a realização desse trabalho, ainda que fora dos prazos.

Por fim, as agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro fundamental para a realização desse e qualquer outro trabalho. Sem investimento, não há ciência!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,  
mas pensar o que ninguém ainda pensou  
sobre aquilo que todo mundo vê”.

Arthur Schopenhauer

## RESUMO

Vesículas extracelulares (EVs) são pequenas vesículas membranosas liberadas por todos os tipos de células. As EVs são capazes de transportar diversas biomoléculas provenientes da célula parental e transferi-las para as células-alvo de forma objetiva. Assim, as EVs podem participar de vários processos biológicos mediando a comunicação celular, a resposta imune e a homeostase. Tentativas anteriores de isolar EVs do plasma mostraram contaminação por lipoproteínas, o que é um complicador nos estudos de EVs, uma vez que as lipoproteínas também podem modular respostas metabólicas e inflamatórias. Dessa forma, nosso objetivo foi padronizar protocolos para isolamento de EVs evitando contaminação por lipoproteínas. No primeiro trabalho abordado nessa dissertação apresentamos um protocolo padronizado por nosso grupo para a separação concomitante de EVs e lipoproteínas de baixa ou muito baixa densidade (LDLs ou VLDLs) do plasma através da ultracentrifugação de um gradiente de densidade (G-UC). No trabalho seguinte, avaliamos diferentes métodos para isolamento de EVs sem contaminação por lipoproteínas após a depleção das lipoproteínas por G-UC. Primeiramente, o plasma foi aplicado a G-UC para a depleção de lipoproteínas e foi então submetido a centrifugação seriada (SC) ou a uma coluna de cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) para isolamento das EVs. A análise e identificação da população de EVs foi feita por meio da análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) e citometria de fluxo. A ausência de lipoproteínas nas populações de EVs isoladas foi confirmada através da quantificação de colesterol e detecção da apolipoproteína B100 (apoB-100) por *western blot*. Complementarmente, realizamos análise proteômica visando a investigação em larga escala de proteínas das EVs isoladas através das diferentes abordagens. Nossos resultados demonstraram que a SEC separa EVs de lipoproteínas de alta densidade (HDL), mas não de LDLs ou VLDLs, que permaneceram contaminantes. O G-UC, por sua vez, foi eficiente na separação de lipoproteínas da fração plasmática, permitindo o isolamento subsequente de EVs depletadas da contaminação por lipoproteínas. Análise proteômica, quantificação de colesterol e detecção de apo B-100 confirmaram a eliminação da contaminação por LDL e VLDL das EVs isoladas através da SEC após G-UC. Além disso, a análise proteômica identificou números de proteínas e vias biológicas semelhantes em EVs isoladas, independentemente da depleção de lipoproteínas, o que foi consistente com as fontes celulares semelhantes identificadas por citometria de fluxo. Conjuntamente, nossos resultados demonstram que a combinação de G-UC seguida de SEC pode fornecer EVs livres de lipoproteínas sem viés de origem e função celular, permitindo a obtenção de EVs de alta pureza com potenciais implicações para ensaios funcionais e análises lipidômicas.

**Palavras-chave:** Vesículas extracelulares. Isolamento. Contaminação por lipoproteínas. Gradiente de densidade. SEC. Proteômica.

## ABSTRACT

Extracellular vesicles (EVs) are small membranous vesicles shed by all cell types. EVs are able to transport several biomolecules from parental cell and transfer then to target cells in an objective way. Therefore, EVs participate in many biological processes mediating cells communication, immune response and homeostasis. Previous attempts of isolating EVs from plasma have shown contamination with lipoproteins, which is a setback on EVs' studies once lipoproteins can also modulate metabolic and inflammatory responses. Therefore, our aim was to standardize protocols for EVs isolation avoiding lipoprotein contamination. In the first work addressed in this dissertation, we present a protocol standardized by our group for the concomitant isolation of EVs and low or very low-density lipoproteins (LDL or VLDL) from plasma through ultracentrifugation of a density- based gradient (G-UC). In the following work, we tested different methods for isolating EVs without lipoprotein contamination following lipoprotein depletion by G-UC. Firstly, plasma was applied to G-UC for lipoprotein depletion and then subjected to serial centrifugation (SC) or applied to a size exclusion column (SEC) for isolation of EVs. The analysis of EVs population was made through nanoparticle tracking analysis (NTA) and flow cytometry. The absence of lipoproteins in the isolated EVs was confirmed through quantification of cholesterol and detection of apolipoprotein B100 (apoB-100) through western blot analysis. We employed bottom-up proteomics aiming the large-scale analysis of proteins in EVs isolated through the different approaches. We showed that SEC separates EVs from high-density lipoproteins (HDL) but not from LDLs or VLDLs, which remained contaminants. G-UC was efficient in separating lipoproteins from the EVs-enriched plasma fraction, allowing subsequent isolation of EVs depleted from lipoprotein contamination. Combined analysis from EVs proteomics, cholesterol quantification and apo B-100 detection confirmed the elimination of LDL and VLDL contamination by G-UC before EVs isolation. Proteomic analysis identified similar protein numbers and similar biological pathways in isolated EVs regardless of lipoprotein depletion, which was consistent with similar cellular source identified by flow cytometry. Taken together our results demonstrate that the combination of G-UC followed by SEC can provide lipoprotein-free EVs without bias of cellular origin and function, allowing the obtention of high pure EVs with potential implications for functional assays and lipidomic analysis.

**Keywords:** Extracellular vesicles. Isolation. Contamination by lipoproteins. Density Gradient. SEC. Proteomics.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Principais subtipos de vesículas extracelulares e seus mecanismos de formação: exossomos, corpos apoptóticos e microvesículas. ....	19
Figura 2: Vesículas extracelulares podem ser secretadas por diversas populações celulares mediante diferentes estímulos. ....	20
<b>Figura 3:</b> Interações entre EVs e células alvo - internalização, fusão de membrana, interação com receptores de superfície. ....	21
<b>Figura 4:</b> Vesículas extracelulares podem apresentar espectros de densidade e diâmetro similares as lipoproteínas, comprometendo seu isolamento através dessas características físicas. ....	25
<b>Figura 5:</b> Modelo esquemático das principais subclasses de lipoproteínas.. ....	28
<b>Figura 6:</b> Atuação das lipoproteínas na distribuição de lipídeos no organismo. ....	30

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Composição das lipoproteínas plasmáticas.....	29
<b>Tabela 2:</b> Vantagens e desvantagens do uso da cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) e da combinação da ultracentrifugação de gradiente (G-UC) com centrifugação seriada (G-UC + SC) ou SEC (G-UC + SEC), no isolamento de vesículas extracelulares (EVs). .....	82

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACD – Anticoagulante contendo ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose;

ApoB-100 – Apolipoproteína B-100

Col – Colesterol;

DAMP – Padrões Moleculares Associados a Patógenos (do inglês *Damage-Associated Molecular Pattern*);

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético;

EVs – Vesículas extracelulares (do inglês *extracellular vesicles*);

FITC – Isotiocinato de Fluoresceína;

G-UC – Ultracentrifugação de gradiente (do inglês *gradiente ultracentrifugation*);

HDL – Lipoproteína de alta densidade (do inglês *high density lipoprotein*);

IL – Interleucina;

ISEV – Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (do inglês *International Society of Extracellular Vesicles*);

KBr - Brometo de Potássio;

LDL – Lipoproteínas de baixa densidade (do inglês *low density lipoprotein*);

LPS – Lipopolissacarídeos;

MISEV - Informações Mínimas para Estudos de Vesículas Extracelulares (do inglês *Minimal Information for the Study of Extracellular Vesicles*);

MPs – Micropartículas;

MVs – Microvesículas;

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleico fosfato (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*);

NaCl – Cloreto de sódio;

NTA – Análise de rastreamento de nanopartículas (do inglês *nanoparticle tracking analysis*);

oxLDL – LDL oxidada;

PBS – Tampão Fosfato e Salina;

pH – Potencial Hidrogeniônico;

PRP – Plasma rico em plaquetas;

PRR – Receptor de reconhecimento de padrão (do inglês *pattern recognition receptor*);

RNA – Ácido Ribonucleico (do inglês *ribonucleic acid*);

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês *reactive oxygen species*);

SEC – Cromatografia de exclusão por tamanho (do inglês *size exclusion chromatography*);

TAG – Triglicerídeos;

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa (do inglês *tumoral necrosis factor*);

VLDL – Lipoproteínas de muito baixa densidade (do inglês *very low density lipoprotein*).

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
2.1 VESÍCULAS EXTRACELULARES .....	18
2.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES .....	23
2.3 LIPOPROTEÍNAS .....	27
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	32
2.1 OBJETIVO GERAL .....	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
<b>3 ARTIGOS</b> .....	33
3.1 CAPÍTULO I: ISOLAMENTO DE MICROVESÍCULAS DE AMOSTRAS DE PLASMA EVITANDO CONTAMINAÇÃO POR LIPOPROTEÍNAS. ....	33
3.2. CAPÍTULO II: ANÁLISE PROTEÔMICA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES ISOLADAS POR DIFERENTES MÉTODOS VISANDO ELIMINAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR LIPOPROTEÍNAS. ....	45
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	78
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	83
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	84

## 1 INTRODUÇÃO

Vesículas extracelulares (EVs) são um grupo heterogêneo de partículas membranosas nanodimensionadas secretadas pelas células no espaço extracelular (LIANGSUPREE; MULTIA; RIEKKOLA, 2021; O'BRIEN et al., 2020). Microvesículas, exossomos e corpos apoptóticos são os três principais subtipos de EVs, que se distinguem por sua biogênese, mecanismos de liberação, tamanho, composição e função (DOYLE; WANG, 2019; YÁÑEZ-MÓ et al., 2015). EVs pode ser liberadas por células ativadas ou apoptóticas em consequência a diversos estímulos, incluindo estímulos endógenos como PAMPs e citocinas e exógenos como sinais de estresse celular (BURGER et al., 2013; RIDGER et al., 2017a). Essas estruturas são capazes de transportar conteúdos bastante variado incluindo RNAs, proteínas, lipídios e DNA, que podem ser entregue às células-alvo na proximidade imediata ou à distância por meio dos biofluidos, desencadeando uma variedade de respostas fenotípicas (O'BRIEN et al., 2020; RATAJCZAK et al., 2006; VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018).

Devido a estudos que revelaram os papéis únicos desempenhados pelas EVs na comunicação célula-a-célula, essas estruturas têm atraído grande interesse nas últimas décadas, interesse esse reforçado por sua potencial utilidade clínica como marcadores prognósticos e sua participação em condições fisiológicas e patológicas (DE TORO et al., 2015; XU et al., 2016). EVs podem participar da sinalização imune (MARAR; STARICH; WIRTZ, 2021); na apresentação de antígenos (LINDENBERGH; STOORVOGEL, 2018; ROBBINS; MORELLI, 2014); na regulação do estresse oxidativo (QI et al., 2021); na amplificação inflamatória por meio do transporte de citocinas e recrutamento celular (HOTTZ et al., 2013; RATAJCZAK et al., 2006); na hemostasia e trombose patológica (ZIFKOS; DUBOIS; SCHÄFER, 2021), além de em muitos outros sistemas. Além disso, EVs podem desempenhar papéis patológicos e revelar o estado metabólico do corpo em diversas condições (SHAH; PATEL; FREEDMAN, 2018), incluindo no câncer (LAZAR; GOLDFINGER, 2021), doenças cardiovasculares (YANG et al., 2021), neurodegenerativas (XIAO et al., 2021) e infecciosas (GIANNESSI et al., 2020). No

entanto, estudos visando a caracterização e a avaliação funcional das EVs a partir de amostras clínicas ainda enfrentam um grande problema relativo aos contaminantes co-isolados (THÉRY et al., 2018; WEBBER; CLAYTON, 2013a).

Atualmente, diversas são as técnicas empregadas para o isolamento de EVs, como ultracentrifugações associadas ou não a gradientes, centrifugações seriadas (SC), cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), ultrafiltração, precipitação e captura por imunoafinidade. Todavia, a padronização desses métodos ainda é bastante discutida e um “padrão ouro” ainda não foi definido (LIANGSUPREE; MULTIA; RIEKKOLA, 2021; RIDGER et al., 2017a). Outra grande dificuldade no estudo dessas vesículas é garantir a pureza das amostras, principalmente quando advindas de biofluidos como plasma, saliva, urina ou efusões cancerígenas, o que é de fundamental importância para comprovar que um determinado fenômeno observado está associado as EVs e não a contaminantes co-isolados (THÉRY et al., 2018; WEBBER; CLAYTON, 2013b). Segundo a literatura as lipoproteínas são consideradas o principal contaminante de EVs isoladas do plasma devido ao fato de compartilharem tamanhos e densidades semelhantes a vários subconjuntos de EVs, tornando-as um dos maiores problemas no estudo dessas estruturas (KREIMER et al., 2015; LIANGSUPREE; MULTIA; RIEKKOLA, 2021; THÉRY et al., 2018).

As lipoproteínas são complexos biomoleculares esféricos constituídos por uma monocamada de fosfolipídios e apolipoproteínas, que são responsáveis pelo transporte de lipídios apolares, como triglicerídeos e colesterol-ésteres (AFONSO; SPICKETT, 2019). Elas participam da homeostase no nosso organismo transportando e redistribuindo entre os tecidos lipídios que exercem várias funções biológicas, como componentes de membranas, síntese de hormônios esteroides, formação de ácidos biliares, isolantes térmicos e reservas de energia (AFONSO; SPICKETT, 2019; MAHLEY et al., 1984). Além disso, estudos demonstram que lipoproteínas podem atuar na imunopatogênese de diversas doenças inflamatórias, principalmente quando oxidadas, agindo como padrões moleculares associados a danos (DAMPs), ativando receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), induzindo resposta imune e contribuindo para o processo inflamatório (MILLER; SHYY, 2017). Assim, eliminar a contaminação por lipoproteínas das amostras de EVs é essencial para investigar a participação das EVs em processos fisiológicos e

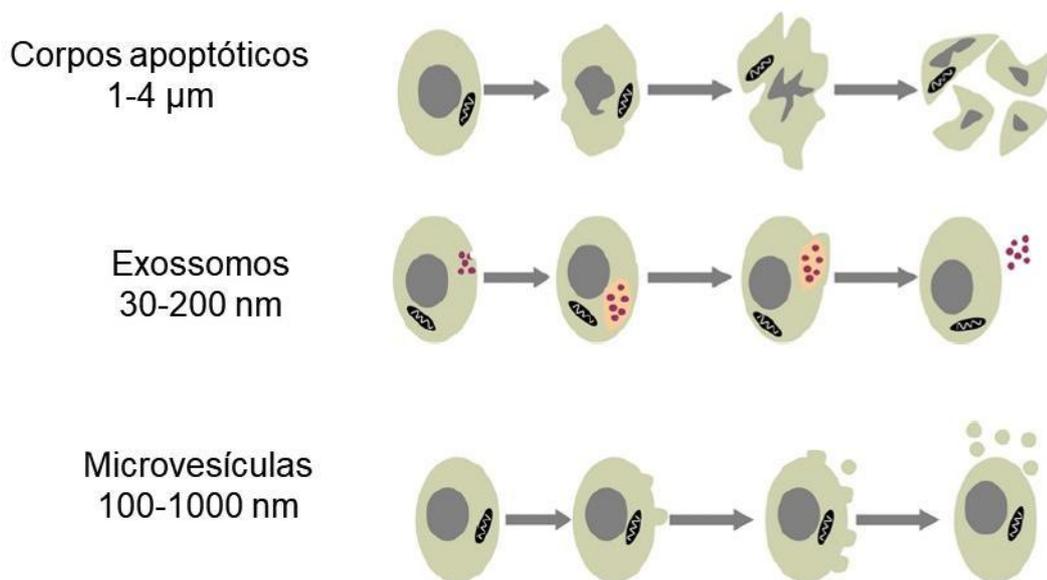
patológicos, evitando qualquer viés que possa vir da bioatividade das lipoproteínas (RIDGER et al., 2017b).

Dessa forma, nosso objetivo foi padronizar e propor métodos para isolamento de EVs do plasma evitando contaminações por lipoproteínas. Em um dos trabalhos apresentados nesta dissertação (item 3.1, Capítulo I), demonstramos ser possível isolar lipoproteínas de baixa (LDLs) e muito baixa densidade (VLDLs) do plasma a partir da ultracentrifugação em gradientes de densidade (G-UC) com posterior recuperação das EVs. Essas EVs, no entanto, permaneceram contaminadas por lipoproteínas de alta densidade (HDLs). No segundo trabalho referenciado aqui (item 3.2, Capítulo II), avaliamos a execução da G-UC como uma etapa preliminar para eliminar as LDLs e VLDs do plasma antes do isolamento das EVs por SC ou SEC. O isolamento de EVs do plasma após G-UC através da SEC resultou em EVs altamente puras em relação as diferentes lipoproteínas, uma vez que a G-UC foi capaz de eliminar as LDLs e VLDLs enquanto a SEC foi capaz de separar as EVs das HDLs. Análises combinadas de EVs por proteômica, quantificação de colesterol e detecção de apo B-100 por *western blot* confirmaram a eliminação da contaminação por lipoproteínas das EVs processadas por G-UC e isoladas por SEC. Também caracterizamos e analisamos as EVs obtidas por meio de cada método testado quanto à origem celular dessas vesículas. Nossos dados demonstraram que não houve viés nas populações de EVs recuperadas, o que é importante para a representatividade da amostra. Análises proteômicas adicionais confirmaram o status livre de lipoproteínas das EVs e a preservação do número total de proteínas e proteínas associadas a vias biológicas em EVs isoladas, independentemente da depleção das lipoproteínas.

## 2.1 VESÍCULAS EXTRACELULARES

EVs são vesículas membranosas de tamanho variado (de 30 a 5000 nm), geralmente de origem endossomal ou da membrana plasmática, que apresentam uma bicamada lipídica e são liberadas por diversos tipos celulares no ambiente extracelular mediante diferentes estímulos (KONOSHENKO et al., 2018; LIANGSUPREE; MULTIA; RIEKKOLA, 2021; RAPOSO; STLOORVOGEL, 2013). Primeiramente descritas na década de 60 como '*platelet dust*' (poeira plaquetária) (WOLF, 1967) e associadas a coagulação sanguínea, as EVs são atualmente reconhecidas e estudadas por participarem na comunicação celular e também na regulação de processos fisiológicos e patológicos, mediando o compartilhamento de moléculas bioativas entre as células (BUZAS, 2022; LI et al., 2019; YÁÑEZ-MÓ et al., 2015). Além disso, evidências crescentes apontam um grande potencial clínico das EVs como biomarcadores diagnósticos e terapêuticos de diversas doenças (LI et al., 2019). Com isso, as EVs podem ser uma importante ferramenta para a clínica médica, uma vez que elas podem ser detectadas em diversos fluidos corporais (sangue, urina, saliva, entre outros) sem a necessidade de processos muito invasivos. As EVs podem ser divididas em três subpopulações principais de acordo com seu tamanho, mecanismo de formação e conteúdo: corpos apoptóticos, exossomos e microvesículas (Figura 1) (BURGER et al., 2013; DOYLE; WANG, 2019). Os corpos apoptóticos são partículas de tamanho maior que 1000 nm formadas durante o processo de morte celular por apoptose e que contém material nuclear, organelas compactadas e conteúdo citosólico em seu interior, e não serão avaliadas neste trabalho. Os exossomos são classicamente conhecidos como nanopartículas cujo tamanho varia entre 30-200 nm e que são formados através da invaginação da membrana plasmática formando corpos multivesiculados que são secretados pela célula através de exocitose. E as microvesículas ou micropartículas, que são vesículas com tamanho variando entre 100-1000 nm formadas a partir de evaginações da membrana plasmática da célula (BURGER et al., 2013; DOYLE; WANG, 2019; LI et al., 2019). Contudo, a recomendação geral na área feita pela Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) é usar 'EVs' como um termo geral, a menos que investigações específicas permitam determinar se as EVs

foram liberadas através de brotamentos da membrana plasmática ou exocitose, e incluir uma descrição detalhada dos métodos de isolamento e detecção usados no estudo das EVs (LÖTVALL et al., 2014; PUHM; FLAMAND; BOILARD, 2022; THÉRY et al., 2018).



**Figura 1:** Principais subtipos de vesículas extracelulares e seus mecanismos de formação: exossomos, corpos apoptóticos e microvesículas. Fonte: Adaptado de BURGER et al., 2013.

As EVs podem ser secretadas por diversos tipos de células, sendo as principais fontes de vesículas circulantes no plasma as plaquetas e os eritrócitos (BURGER et al., 2013; GARNIER et al., 2017; PUNYADEE et al., 2015). Elas são liberadas sob condições fisiológicas ou de estresse celular, principalmente quando as células estão ativadas ou apoptóticas, através de mecanismos ainda não completamente elucidados e que podem variar entre as populações celulares (BURGER et al., 2013; BUZAS, 2022; RIDGER et al., 2017a). Além das amplas mudanças estruturais que governam a formação das EVs, diferentes estímulos podem inibir ou induzir a liberação dessas vesículas. Dentre eles, estímulos químicos pró-inflamatórios - moléculas derivadas de patógenos como lipopolissacarídeos (LPS); citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas (IL-1 $\alpha$ , IL-6, outras); mediadores da coagulação (trombina, colágeno);

e, diversos sinais fisiológicos e de estresse celular como espécies reativas de oxigênio (ROS), influxo de cálcio, mudanças no pH - mas também estímulos físicos como forças de cisalhamento e estímulos exógenos como a exposição a fumaça de tabaco e a nicotina (Figura 2) (BURGER et al., 2013; CHEN; LI; LIU, 2018; CORDAZZO et al., 2014; LI et al., 2013; MOBAREZ et al., 2020).

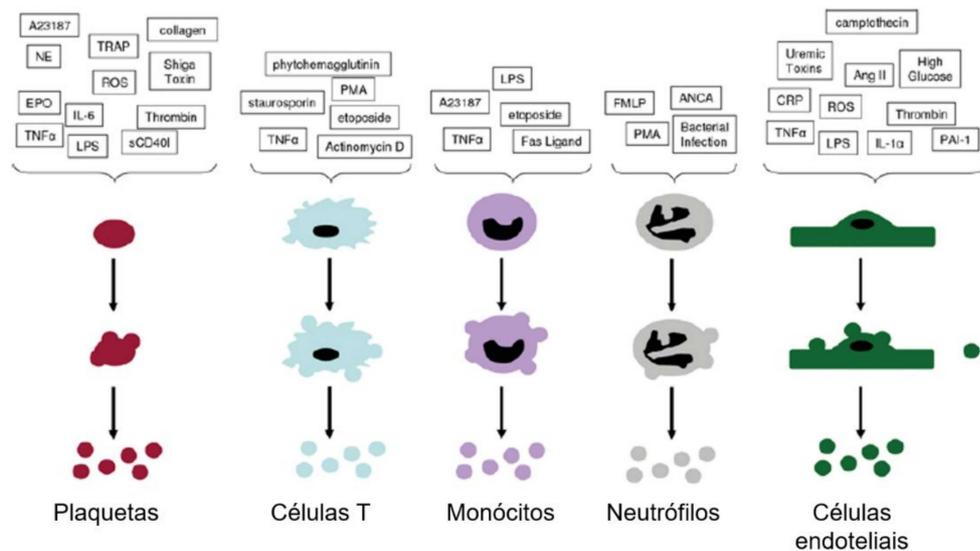
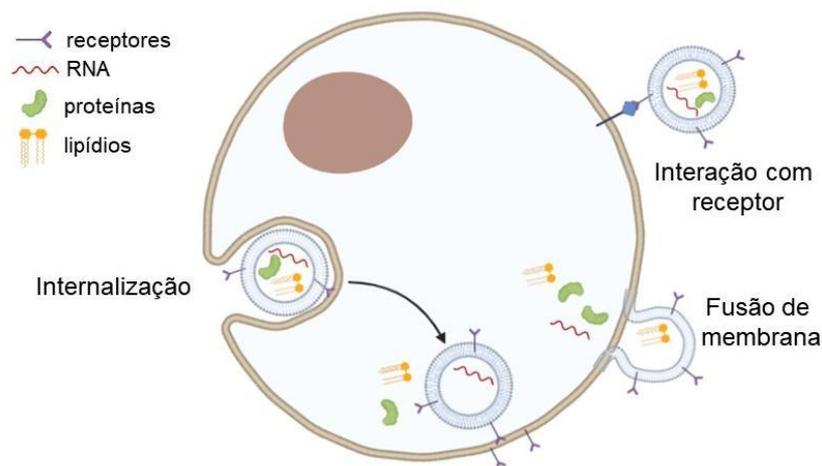


Figura 2: Vesículas extracelulares podem ser secretadas por diversas populações celulares mediante diferentes estímulos. Fonte: Adaptado de BURGER et al., 2013.

É importante ressaltar que um mesmo tipo celular pode secretar diferentes subgrupos de vesículas dependendo de fatores ambientais, topografia celular ou estímulo de ativação resultando na grande heterogeneidade característica das EVs (CHEN; LI; LIU, 2018; DE TORO et al., 2015; PALLET et al., 2013). Além disso, a natureza e abundância de cargas das EVs são específicas de cada tipo celular e muitas vezes são influenciadas pelo estado fisiológico ou patológico da célula doadora, pelos estímulos que modularam sua produção e liberação e dos mecanismos moleculares que levaram à sua biogênese (KALRA; DRUMMEN; MATHIVANAN, 2016; VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018). O conteúdo das EVs compreende diferentes biomoléculas como proteínas, lipídios, peptídeos, ácidos nucleicos, receptores de superfície e RNA, provenientes de sua célula parental,

tornando-as importantes biomarcadores em diversos processos patológicos e permitindo a sua detecção e intervenção precoces (BURGER et al., 2013; YÁÑEZ-MÓ et al., 2015). Estudos apontam uma correlação entre o aumento no número de EVs circulantes em condições patológicas e a gravidade de doenças como na dengue e em doenças cardiovasculares sugerindo um envolvimento na patogênese dessas doenças (BURGER et al., 2013; CAMUS et al., 2015; PUNYADEE et al., 2015; YANG et al., 2021). Além de seu papel como biomarcadores, evidências crescentes sugerem que as EVs são capazes de modular ativamente uma variedade de eventos celulares e participar da comunicação celular transportando e entregando seu conteúdo para células de forma objetiva. Os mecanismos pelos quais as EVs interagem com suas células-alvo ainda são pouco elucidados, mas algumas das rotas de interação das EVs com as células-alvo mais conhecidas são endocitose mediada por receptor, fagocitose/macropinocitose e possivelmente fusão direta de membranas (Figura 3) (CHEN; LI; LIU, 2018; HERRMANN; WOOD; FUHRMANN, 2021; KALLURI; LEBLEU, 2020; RIDGER et al., 2017a). Ademais, alguns dos receptores de superfície das células-alvo aos quais as EVs podem se ligar, induzindo vias de sinalização, já descritos são sulfato de heparano, um proteoglicano localizado na superfície celular, bem como a lectinas, integrinas e até tetraspaninas (BARRÈS et al., 2010; CHRISTIANSON et al., 2013; HASSANPOUR et al., 2020; HOSHINO et al., 2015; MULCAHY; PINK; CARTER, 2014).



**Figura 3:** Interações entre EVs e células alvo - internalização, fusão de membrana, interação com receptores de superfície. Fonte: autoral, criado com Biorender e baseado em RIDGER et al., 2017.

Dentre suas mais diversas funções, já foi demonstrado que as EVs são fortes promotoras da coagulação pois, além de expressarem a fosfatidilserina, que induz uma superfície carregada negativamente permitindo a interação com domínios catiônicos das proteínas de coagulação, algumas populações apresentam ainda o fator tecidual na sua superfície que é um componente crítico nos estágios iniciais da coagulação (DATE; ETTELAIE; MARAVEYAS, 2017; GOMES et al., 2017). As EVs também podem estar envolvidas na regulação da produção de ROS, induzindo a produção de superóxido principalmente através da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (CAMUS et al., 2015; JANSEN et al., 2013; PUHM et al., 2019). Nos processos inflamatórios elas podem participar como promotoras, induzindo a secreção de citocinas e aumentando a expressão de moléculas de adesão, ou como consequências do processo, uma vez que estímulos pró-inflamatórios desencadeiam sua liberação (BOILARD et al., 2010; HOTTZ et al., 2013). EVs também participam de processos infecciosos sendo capazes de induzir a infecção viral em células saudáveis e modular a resposta imune do hospedeiro (FLEMING et al., 2014; GIANNESI et al., 2020; HASSANPOUR et al., 2020). Durante a oncogênese, as células tumorais podem aumentar a produção de EVs, permitindo não apenas a modulação das células saudáveis circundantes, a desregulação de células imunes e a proliferação tumoral, mas também comunicação com tecidos distantes podendo desencadear o processo de metástase (LAZAR; GOLDFINGER, 2021; PEINADO et al., 2012; WIECKOWSKI et al., 2009; XU et al., 2018). Na aterosclerose e em outras doenças cardiovasculares, induzem proliferação e migração de células, disfunção endotelial, processos homeostáticos metabólicos e vasculares (NIU et al., 2016; VAJEN et al., 2017; YANG et al., 2021). Além disso, as EVs podem atravessar a barreira hematoencefálica para atingir o sistema nervoso central podendo atuar como neuroprotetores ou transportar proteínas patogênicas relacionadas a doenças neurodegenerativas (KALANI et al., 2016; SAMAN et al., 2012; XIAO et al., 2021). Outro processo do qual as EVs podem participar é a angiogênese, podendo induzir ou inibir proliferação celular e a formação de novos vasos como é o caso de EVs extraídas de placas ateroscleróticas ou EVs linfocíticas, respectivamente (LEROYER et al., 2008; YANG et al., 2010). Por fim, apesar da apoptose ser um potente estímulo para a formação das EVs, estas também são capazes de regular processos apoptóticos por mecanismos que envolvem a entrega de caspase 3 a células alvo ou da remoção da

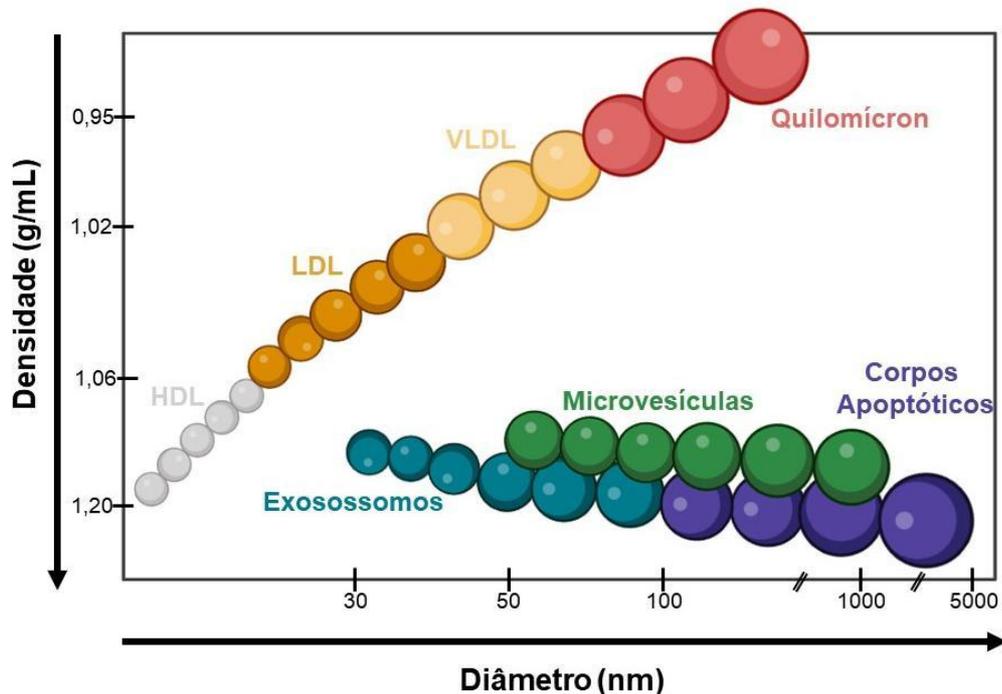
maquinaria apoptótica da célula através da EV (ABID HUSSEIN et al., 2005, 2007; BURGER et al., 2013).

## 2.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

Atualmente, o interesse pela pesquisa envolvendo EVs e seu papel em processos fisiológicos e/ou patológicos vem crescendo exponencialmente. Contudo, ainda existem grandes desafios no que diz respeito a padronização de métodos para isolamento, detecção e caracterização dessas estruturas visando um melhor entendimento de seu papel biológico no organismo (BURGER et al., 2013; THÉRY et al., 2018). A ausência de um 'padrão ouro' para técnicas empregadas no estudo de EVs obtidas a partir de biofluidos resulta em um grande problema de reprodutibilidade. Dessa forma, se faz urgente a padronização com intuito de permitir uma real comprovação da relevância clínica das EVs de uma maneira geral (RIDGER et al., 2017a; THÉRY et al., 2018). Além disso, as dificuldades encontradas quando se trata da criação de uma nomenclatura unificada, também estão associadas em parte à atual ausência desses métodos padronizados (KONOSHENKO et al., 2018). Resultados descritos na literatura sobre quantificações de EVs no plasma, por exemplo, variam amplamente, o que está intrinsecamente relacionado não apenas a falta de ensaios específicos e bem padronizados, mas também a variações nas condições pré-analíticas (THÉRY et al., 2018; YUANA; BERTINA; OSANTO, 2011). Por isso, torna-se clara a necessidade da padronização de todo o processo, desde processos pré-analíticos, protocolos para isolamento até ensaios biológicos e funcionais. Além disso, há casos em que a análise direta de EVs é empregada visando prevenir perdas e buscando preservar a morfologia das vesículas, dado que certas metodologias empregadas no seu isolamento são apontadas como responsáveis por formação de agregados e podem afetar a integridade da membrana (BÖING et al., 2014; YUANA; BERTINA; OSANTO, 2011). Contudo, é importante ressaltar que ao optar por avaliar as EVs diretamente na amostra das quais foram obtidas, sem um procedimento de

purificação/isolamento prévio, deve-se levar em consideração a contaminação dessas amostras por outros componentes carregados conjuntamente as EVs nesses biofluidos como, por exemplo, proteínas plasmáticas, hormônios e lipoproteínas (BUZAS, 2022; HARGETT; BAUER, 2013; KREIMER et al., 2015; THÉRY et al., 2018).

Contaminações são problemas bem descritos e recorrentes em estudos envolvendo lipidômicas e proteômicas de EVs (LIANGSUPREE; MULTIA; RIEKKOLA, 2021; SMALLEY et al., 2007; ZHANG; YEO; LIM, 2019). EVs obtidas de plasma, por exemplo, possuem as lipoproteínas como um dos principais contaminantes (KARIMI et al., 2018; LIANGSUPREE; MULTIA; RIEKKOLA, 2021; THÉRY et al., 2018). Tal contaminação se justifica pela quantidade de lipoproteínas no plasma ser expressivamente superior a quantidade de EVs (1012-1015 lipoproteína/mL, 107-109 EVs/mL, podendo variar quanto ao estado metabólico ou fisiopatológico), além de EVs e lipoproteínas, principalmente as LDLs e HDLs, compartilham uma sobreposição no seu espectro de densidade e de diâmetro (Figura 4) (KARIMI et al., 2018; LIANGSUPREE; MULTIA; RIEKKOLA, 2021; SMALLEY et al., 2007; ZHANG; YEO; LIM, 2019). Diminuir ou até mesmo eliminar por completo contaminações das amostras de EVs é de primordial importância para determinar com precisão a verdadeira participação dessas estruturas em processos fisiológicos e patológicos do organismo. Dessa forma, evitamos qualquer viés nos resultados que possa ser causado pela presença de outras biopartículas também capazes de desencadear processos celulares, as lipoproteínas em particular, principalmente em sua forma oxidada, são capazes de ativar células e induzir produção de citocinas entre outras respostas (MILLER; SHYY, 2017; RIDGER et al., 2017a).



**Figura 4:** Vesículas extracelulares podem apresentar espectros de densidade e diâmetro similares as lipoproteínas, comprometendo seu isolamento através dessas características físicas. Fonte: Adaptado de LIANGSUPREE et al., 2021.

No intuito de minimizar o problema de contaminações no isolamento de EVs, diversas técnicas vêm sendo testadas atualmente, sendo que as mais populares incluem SC, ultracentrifugação, SEC, ultrafiltração, precipitação e captura por imunoafinidade (LIANGSUPREE; MULTIA; RIEKKOLA, 2021). Uma nova pesquisa conduzida em 2019 pela ISEV (ROYO et al., 2020) mostrou que na maioria dos estudos as EVs são isoladas do plasma e outros fluidos por centrifugações com velocidade entre 10.000 x g e 20.000 x g precedidas ou não de centrifugações seriadas que buscam eliminar células e restos celulares da amostra; ou por ultracentrifugações com velocidades acima de 100.000 x g, associadas ou não a gradientes compostos por fases com diferentes densidades que permitem separar as partículas existentes na amostra de acordo com sua densidade (HARGETT; BAUER, 2013; KONOSHENKO et al., 2018). Outra técnica que vem sendo amplamente empregada para isolamento das EVs do plasma é a SEC, que tem por princípio a separação de partículas com base na diferença de seus tamanhos (BÖING et al., 2014; KARIMI et al., 2018; ROYO et al., 2020). Na SEC, é empregado

um gel de sefarose específico que possui microesferas com poros de diâmetro conhecido por onde as partículas de menor tamanho presentes na amostra entram percorrendo um caminho mais longo até o fundo da coluna e assim sendo recuperadas nas frações finais, enquanto partículas de maiores tamanho percorrem um caminho mais curto por fora das esferas, sendo recolhidas nas primeiras frações (KADDOUR; TRANQUILLE; OKEOMA, 2021). Apesar da evolução dos métodos empregados para isolamento das EVs, é ainda necessário ter em mente que dados obtidos por métodos distintos podem diferir significativamente e até mesmo variações nas configurações dos dispositivos de medição podem influenciar consideravelmente os resultados obtidos (KONOSHENKO et al., 2018).

Uma vez isoladas, diversas metodologias podem ser empregadas na detecção e caracterização de EVs (BURGER et al., 2013; THÉRY et al., 2018). As metodologias empregadas atualmente para estudar EVs podem ser divididas com base na sua capacidade em detectar EVs isoladamente ou em conjunto (RIDGER et al., 2017a). Citometria de fluxo, microscopia eletrônica e análise de rastreamento de nanopartículas (*Nanoparticle tracking analysis* - NTA), são os métodos mais comuns para o estudo individual de EVs e são capazes de fornecer diversas informações como tamanho e/ou origem celular, podendo ser mais adequados na detecção de subpopulações específicas de EVs (RIDGER et al., 2017a; ROYO et al., 2020). Por outro lado, ensaios que permitem analisar conjuntos de EVs como, por exemplo, *western blot*, ensaios funcionais, de imunocaptura, ou híbridos (captura seguida de análise de função ou fenótipo), apresentam grande potencial no processamento de amostras clínicas por serem muitas vezes mais econômicos e de fácil manipulação (GARDINER et al., 2016a; RIDGER et al., 2017a; ROYO et al., 2020). Ademais, uma nova metodologia que vem sendo extensivamente empregada na caracterização das EVs, principalmente em termos de conteúdo, é a análise proteômica por espectrometria de massas que é um método usado para identificar o maior número possível de proteínas dentro de uma amostra (DOYLE; WANG, 2019).

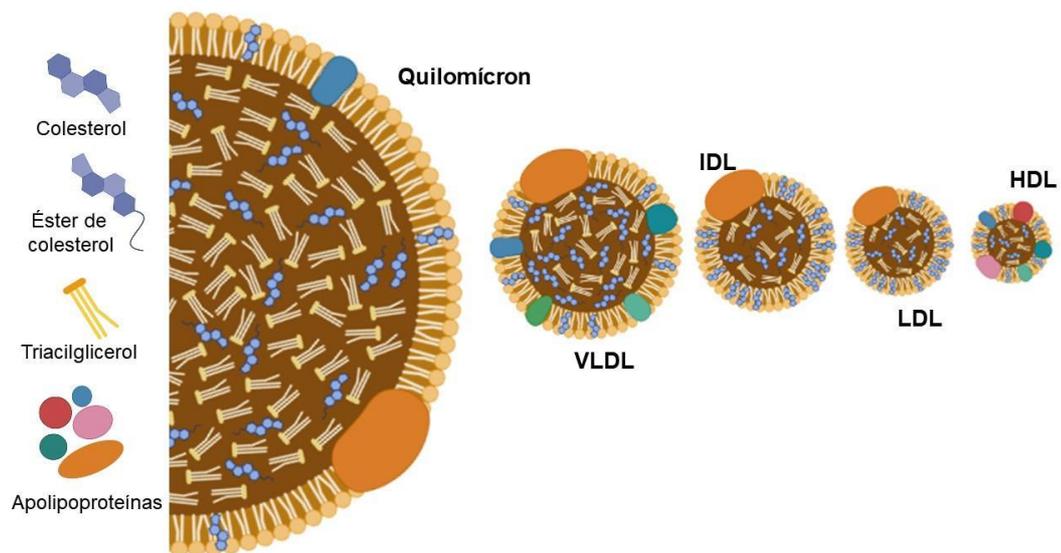
A citometria de fluxo é uma das abordagens mais difundidas atualmente, permitindo uma melhor enumeração dentre as técnicas empregadas na caracterização de EVs e também com potencial para fornecer informações bioquímicas e físicas a nível populacional ou de uma única partícula (BURGER et al., 2013; ROYO et al., 2020). Através da citometria de fluxo as propriedades

fluorescentes e de dispersão de luz de células e partículas em suspensão numa amostra são avaliadas quando elas passam por um laser. Assim, através da utilização de Anexina V, uma proteína capaz de se ligar a fosfatidilserina externalizada pela maioria das EVs, e de anticorpos conjugados a fluorocromos capazes de se ligar a antígenos na superfície celular dessas estruturas, a citometria de fluxo permite a determinação da origem das EVs, uma vez que elas carregam receptores de membrana de sua célula parental, e a quantificação das EVs em suspensão numa amostra (BURGER et al., 2013). Além de possibilitar a análise rápida de várias amostras a citometria ainda é vantajosa por estar à disposição na maioria dos centros de pesquisa que possuem citômetros cada vez mais modernos, com limites de detecção cada vez mais baixos permitindo uma caracterização precisa das EVs (BURGER et al., 2013; HARGETT; BAUER, 2013). Embora a citometria de fluxo tenha se provado eficiente em caracterizar as EVs, ela fica restrita a caracterização, visto que, contaminantes não detectados por ela, principalmente as lipoproteínas, serão ainda capazes de influenciar análises funcionais e provocar dados desconformes com outros métodos (*western blot*, lipidômicas, proteômicas). Dessa forma, reforça-se a imprescindível necessidade de padronização de um método eficiente para isolamento e purificação das EVs, principalmente se tratando da contaminação por lipoproteínas (CAMONT et al., 2013; RIDGER et al., 2017a).

### 2.3 LIPOPROTEÍNAS

As lipoproteínas dividem-se em classes variadas de acordo com seu peso, densidade e conteúdo, sendo que cada classe possui funções metabólicas específicas (MAHLEY et al., 1984). LDLs e HDLs, por exemplo, possuem papéis independentes e opostos, sendo a primeira considerada a principal carreadora de colesterol para tecidos periféricos e a segunda capaz de retirar o colesterol em excesso dos tecidos e retorná-lo para o fígado para excreção (AHOTUPA, 2017; KARIMI et al., 2018).

As lipoproteínas plasmáticas são complexos biomoleculares esféricos que apresentam um núcleo central de lipídeos apolares (triglicerídeos e ésteres de colesterol) envolvido por uma monocamada de lipídeos anfipáticos (fosfolipídios e colesterol) a qual estão associadas as apolipoproteínas (AFONSO; SPICKETT, 2019; FERENÇE; KASTELEIN; CATAPANO, 2020) (Figura 5). A composição das lipoproteínas é considerada heterogênea (Tabela 1), uma vez que seu conteúdo lipídico e proteico pode variar bastante, dividindo as lipoproteínas em diferentes classes de acordo com sua densidade, sendo que cada uma dessas classes de lipoproteína apresenta funções metabólicas específicas estabelecida de acordo com seu local de síntese e conteúdo (MAHLEY et al., 1984; NELSON; COX, 2014).



**Figura 5:** Modelo esquemático das principais subclasses de lipoproteínas. Fonte: autoral, criado com Biorender.

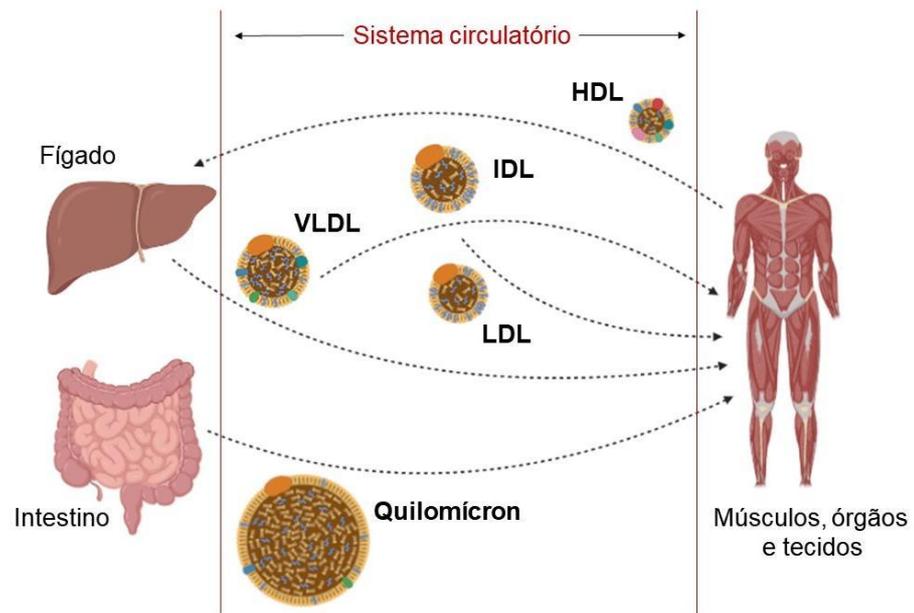
**Tabela 1:** Composição das lipoproteínas plasmáticas.

Lipoproteína	Densidade (g.cm <sup>-3</sup> )	Proteínas totais (%)	Lipídios totais (%)	% dos lipídios totais			
				Fosfo- lipídios	Col.	TAG	Ésteres de col.
Quilomicron	0,90	2	98	8	2	87	4
VLDL	0,98	8	93	18	8	58	13
IDL	1,01	17	83	24	9	30	28
LDL	1,04	22	78	22	9	10	42
HDL	1,14	48	53	33	7	8	21

Col, colesterol; TAG, triacilglicerol.

Fonte: Adaptado de MARZOCCO; TORRES, 2017.

Uma das principais funções das lipoproteínas no organismo é a redistribuição dos lipídeos do seu sítio de absorção ou síntese para os demais tecidos (figura 6), sendo as principais lipoproteínas envolvidas os quilomícrons - lipoproteínas maiores e menos densas que possuem grandes quantidade de triglicerídeos e são sintetizadas no intestino contendo os lipídeos provenientes da dieta - e as VLDLs, que são sintetizadas no fígado e contém altos níveis de triglicerídeos e ésteres de colesterol (AFONSO; SPICKETT, 2019; FERENC; KASTELEIN; CATAPANO, 2020; KHOSRAVI; HOSSEINI-FARD; NAJAFI, 2018). Com a perda de triglicerídeos para os demais tecidos as VLDLs dão origem as lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e as LDLs, que vão ser formadas após a perda quase total dos triglicerídeos, restando apenas colesterol e ésteres de colesterol, e que são as principais carreadoras de colesterol para os tecidos periféricos (NELSON; COX, 2014). Por fim, as HDLs, que são originadas no fígado e intestino delgado, são ricas em proteínas, não possuem triglicerídeos e são responsáveis pelo transporte reverso do colesterol, recolhendo o excesso dos tecidos e retornando-o para o fígado, onde serão eliminados na forma de sais biliares (AHOTUPA, 2017; KHOSRAVI; HOSSEINI-FARD; NAJAFI, 2018; NELSON; COX, 2014).



**Figura 6:** Atuação das lipoproteínas na distribuição de lipídeos no organismo. Fonte: autoral, criado com Biorender e baseado em NELSON; COX, 2014.

Além disso, as lipoproteínas plasmáticas exercem um papel central na homeostase do nosso organismo, atuando como transportadoras de substâncias lipofílicas no ambiente aquoso do sangue, além de atuarem também como mediadores cruciais na captação de lipídios circulantes (AHOTUPA, 2017). Sua participação na imunopatogênese de diversas doenças inflamatórias já é bem descrita na literatura, principalmente quando na sua forma oxidada, podendo atuar como DAMPs, ativando PRRs e induzindo ativação imune e inflamatória (KAPETANOVIC; BOKIL; SWEET, 2015; MILLER; SHYY, 2017; PIRILLO; NORATA; CATAPANO, 2013). A LDL oxidada (oxLDL), por exemplo, além da sua participação na formação de células espumosas (macrófagos pró-inflamatórios ricos em lipídeos), possui vários outros efeitos biológicos, podendo atuar como quimioatraente para monócitos e macrófagos, apresentar citotoxicidade para células endoteliais em cultura e sendo capaz de inibir o efeito vasodilatador do óxido nítrico (AHSAN et al., 2015; ALBERTINI; MORATTI; DE LUCA, 2002; KUGIYAMA et al., 1990; TJADEN et al., 2018).

Em razão dessa ampla participação de lipoproteínas em processos biológicos, é incontestável a necessidade da busca por alternativas para isolamento de EVs erradicando a contaminação das amostras por essas moléculas, principalmente em ensaios que busquem avaliar as características funcionais das EVs uma vez que os resultados podem ser enviesados pela presença das lipoproteínas (MAHLEY et al., 1984; ZHANG; YEO; LIM, 2019).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar protocolos para o isolamento de vesículas extracelulares do plasma humano eliminando a contaminação por lipoproteínas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Caracterizar a contaminação por lipoproteínas de EVs isoladas do plasma humano;
- II. Avaliar a eficiência da depleção de lipoproteínas por G-UC anteriormente ao isolamento das EVs;
- III. Caracterizar as EVs isoladas após depleção de lipoproteínas quanto a concentração, origem celular e vias biológica em seu proteoma.

### 3 ARTIGOS

#### 3.1 CAPÍTULO I: ISOLAMENTO DE MICROVESÍCULAS DE AMOSTRAS DE PLASMA EVITANDO CONTAMINAÇÃO POR LIPOPROTEÍNAS.

##### “Isolation of microvesicles from plasma samples avoiding lipoprotein contamination”

Vesículas extracelulares (EVs) atuam protegendo seu conteúdo do meio extracelular e entregando moléculas bioativas para células-alvo via sinalização de superfície ou fusão de membrana, podendo dessa forma participar de processos patológicos. Níveis aumentados e diferenças na composição de EVs séricas são descritos em pacientes com dengue grave. Estudos demonstram que as EVs derivadas de plaquetas contribuem para a hiperpermeabilidade endotelial, um sinal associado à progressão para dengue grave. Dessa forma, EVs tornaram-se potenciais biomarcadores para a prognose da doença, além de estarem envolvidas nos seus mecanismos fisiopatológicos. No entanto, tentativas anteriores de isolamento de EVs circulantes no plasma apresentaram contaminação com lipoproteínas, o que é um entrave para os estudos funcionais de EVs, uma vez que, as lipoproteínas também podem modular respostas inflamatórias. Através da ultracentrifugação do plasma aplicado a um gradiente de densidade bifásico seguido por SC para precipitação das EVs purificadas, nós demonstramos ser possível isolar EVs sem contaminação por LDL e isolar também as próprias lipoproteínas em paralelo.

**Merij, L. B.**, Andrade, F. B., Silva, A. R. & Hottz, E. D. Isolation of Microvesicles from Plasma Samples Avoiding Lipoprotein Contamination. *Methods in Molecular Biology*. 2022; 2409: 245–255. doi: 10.1007/978-1-0716-1879-0\_17.



## Chapter 17

### Isolation of Microvesicles from Plasma Samples Avoiding Lipoprotein Contamination

Laura B. Merij, Fernanda B. Andrade, Adriana R. Silva,  
and Eugenio D. Hottz

#### Abstract

Dengue is an infectious disease caused by Dengue Virus, mainly transmitted by *Aedes aegypti* mosquitoes. Severe dengue is a potentially fatal syndrome in consequence of overwhelmed inflammation, in which thrombocytopenia and increased vascular permeability are frequently observed. Several experimental evidences point to the participation of both microvesicles (MVs) and circulating lipoproteins in inflammatory amplification in dengue pathogenesis. On this regard, many protocols for isolating plasma MVs have shown lipoproteins as the main contaminant. This is a limitation to studies aiming at the functional characterization of MVs, since both MVs and lipoproteins can modulate inflammatory responses. Here, we describe a biphasic density-based gradient ultracentrifugation as a tool for concomitant isolation of MVs and lipoproteins without cross-contamination. Flow cytometry for MVs quantification and western blot for detection of apoB100 may be used to confirm the isolation and purity of the MVs.

**Key words** Extracellular vesicles, Microvesicles, Lipoproteins, Isolation protocols, Gradient ultracentrifugation

#### 1 Introduction

Dengue is an infectious disease caused by Dengue Virus (DENV), mainly transmitted by *Aedes aegypti* mosquitoes. A wide spectrum of clinical manifestations is observed in DENV infection, which may characterize a mild dengue syndrome with self-limited clinical course or progress to severe disease, with complications involving thrombocytopenia and increased vascular permeability [1]. Even though the pathophysiological mechanisms of severe dengue are not completely understood, a strong inflammatory response is known to mediate vasculopathy, tissue damage, and organ impairment [2]. In this context, increased levels of circulating inflammatory microvesicles (MVs) are described in patients with severe dengue [3]. DENV infection alters the levels and

composition of serum MVs, which are potential biomarkers for dengue prognosis [3, 4] as well as being involved in pathophysiological mechanisms [5].

Extracellular vesicles (EV) or MV are membrane fragments released into the extracellular space by virtually all cells under activation/stress conditions, contributing to pathological processes [6]. They act by protecting their content from the extracellular milieu and delivering bioactive molecules to target cells via surface signaling or membrane fusion [6]. MVs generated from erythrocytes and platelets comprised two major populations in the circulation of dengue patients [3] and platelet-derived microvesicles have been shown to contribute to endothelial hyperpermeability, a signal associated with progression to severe dengue [5]. However, previous attempts of isolating circulating MVs have shown contamination with lipoproteins, mainly low-density lipoprotein (LDL) [7]. This contamination is a setback on MVs functional studies once lipoproteins can also modulate inflammatory responses [8].

In this chapter, we present an optimized protocol for the isolation of MVs samples avoiding contamination by LDL, and also allowing the isolation of lipoproteins in parallel. The protocol includes a biphasic density-based gradient ultracentrifugation with subsequent dialysis followed by centrifugation to pellet the purified MVs. Isolated MVs are further analyzed through flow cytometry and their purity confirmed by detection of ApoB100 (the apolipoprotein present in LDL [9]) by Western Blot.

---

## 2 Materials

1. Conical polypropylene sterile tubes (50 mL and 1.5 mL).
2. Tube racks.
3. Beakers.
4. Centrifuges.
5. Laminar flow cabinet.
6. Analytical scale.
7. Bunsen burner.
8. Agitator.
9. Vortex.
10. Laboratory water bath.
11. Plate spectrophotometer.
12. Ultrasonic bath.
13. Cytometer.

- 2.1 Isolation of Plasma**
1. Blood collection materials.
  2. Acid-citrate-dextrose (ACD): 22.4 g/L sodium citrate, 8 g/L citric acid, 2 g/L dextrose, pH 5.1, in ultrapure water (Milli-Q quality), 0.22  $\mu\text{m}$  vacuum filtered.
  3. Butylated hydroxytoluene (BHT) diluted in ethanol (2 mg/mL).
- 2.2 Gradient Assembly and Handling**
1. 8 mL polypropylene round-top ultracentrifuge tubes with heat-sealing.
  2. Fixed-angle vertical or near-vertical ultracentrifuge rotor.
  3. Sterile glass Pasteur pipette with rubber bulb.
  4. Saline solution: 0.9% NaCl w/v.
  5. Potassium bromide.
  6. Quick-Seal Cordless Tube Topper kit (Beckman Coulter).
  7. Sterile needles (18G, 1.2  $\times$  40 mm).
- 2.3 Dialysis and MVs Precipitation**
1. Pore membranes: 1 kDa *cut-off*, 2 mL.
  2. Phosphate-Buffer Saline (PBS): 0.137 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.01 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.0015 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  diluted in Ultrapure water (Milli-Q quality), pH 7.4.
- 2.4 Colorimetric Assays**
1. Triacylglycerol liquiform kit.
  2. Cholesterol liquiform kit.
  3. BCA Protein Assay kit.
  4. Albumin quantification kit.
- 2.5 Flow Cytometry**
1. Annexin V-PE conjugate probe.
  2. 10 $\times$  Annexin V Binding Buffer (AVBB): 0.1 M HEPES (pH 7.4), 1.4 M NaCl, and 25 mM  $\text{CaCl}_2$ , filtered in 0.2- $\mu\text{m}$  syringe filter.
  3. 1  $\mu\text{m}$  latex beads ( $4.55 \times 10^{10}$  particles/mL).
  4. 5 mL round bottom polystyrene test tube.
- 2.6 Western Blot**
1. Vertical mini gel electrophoresis system.
  2. Mini transfer system including gel holder cassettes, foam pads, electrode assembly plus thick blot filter paper.
  3. Basic power supply with power pack adaptor cords.
  4. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE):
    - (a) Polyacrylamide separating gel: 6% Acrylamide/bis Acrylamide Solution (ratio: 37.5:1), 0.375 M Tris-HCl pH 8.8; 0.1% SDS (m/v), 0.2% APS—Ammonium persulfate (m/v), 0.08% tetramethylethylenediamine (TEMED) in ultrapure water (Milli-Q quality).

- (b) Polyacrylamide Stacking gel: 4% Acrylamide/bis Acrylamide Solution (ratio: 37.5:1), 0.25 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS (m/v), 0.1% APS—Ammonium persulfate (m/v), 0.01% Bromophenol Blue (BPB), 0.16% TEMED, in ultrapure water (Milli-Q quality).
5. 5× concentrated lysis buffer: 750 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 2.5% Triton X-100 (v/v), 5% Protease inhibitor in ultrapure water (Milli-Q quality).
  6. 5× concentrated sample buffer: 5% SDS (m/v), 12.5% β-mercaptoethanol (BME) (v/v), 25% Glycerol (v/v), 156.25 mM Tris-HCl, 0.01% BPB (m/v), pH 6.8.
  7. High molecular weight (MW) range protein ladders.
  8. Running buffer: 25 mM Tris-base, 190 mM Glycine, 0.1% SDS (m/v) in ultrapure water (Milli-Q quality).
  9. Transfer buffer: 25 mM Tris-base, 190 mM Glycine, 0.1% SDS (m/v), 5% methanol (v/v) in ultrapure water (Milli-Q quality).
  10. Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane.
  11. Tris-buffered saline with Tween-20 (TBS-T) buffer: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20 (v/v).
  12. Blocking solution: 5% non-fat dried milk in TBS-T.
  13. Primary antibody against Apo B100.
  14. Secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP) generated against host species of primary antibody.
  15. Super Signal enhanced chemiluminescent substrate.
  16. Hyperfilm ECL-high performance chemiluminescent film 18 × 24 cm and X-ray film cassette.

---

### 3 Methods

#### 3.1 Plasma Isolation

1. Centrifuge the blood tubes at  $700 \times g$  for 20 min at room temperature without applying the centrifuge brake to obtain platelet-poor plasma (PPP). Collect the PPP in a new centrifuge tube.
2. Perform a second centrifugation at  $2500 \times g$  for 15 min, at room temperature, without brake, to exclude apoptotic bodies, membrane fragments, and cell debris obtaining the platelet-free plasma (PFP) (*see* **Notes 1** and **2**).
3. Collect the PFP and add BHT (1 μL/mL) to prevent ex vivo oxidation of plasma lipoproteins (*see* **Note 3**).
4. Separate a fraction of PFP plasma to be used as a control of MVs isolated without lipoprotein elimination later.

### 3.2 Gradient Assembly

1. Dilute 0.5 g/mL of KBr in PFP and thoroughly homogenize, avoiding foam formation according to Fig. 1.
2. Add 2 mL of PFP containing 0.5 g/mL of KBr in the polypropylene round-top quick-seal centrifuge tubes using a sterile glass Pasteur pipette with rubber bulb (Fig. 1a) (*see Note 4*).
3. Using another sterile glass Pasteur pipette with rubber bulb, gently add sterile saline solution (NaCl 0.9% w/v) above the PFP-KBr mixture in the same tube until it is completely filled (Fig. 1a).
4. Check the weight of the tubes making sure opposite tubes have the same weight to ensure proper balance at the time of ultracentrifugation (*see Note 5*).
5. Seal the tube for ultracentrifugation.
6. Ultra-centrifugate the tubes at  $150,000 \times g$  for 2 h and 40 min at 4 °C with medium acceleration and deceleration.
7. Warm the needle in the Bunsen burner and pierce two holes in each tube, one on the bottom and the other at the top (Fig. 1b). Be careful, once you pierce the second hole the drops will start to fall.
8. Collect 26 fractions from the bottom to the top of the gradient in individual 1.5 mL conical tubes (Fig. 1b) (*see Note 6*).

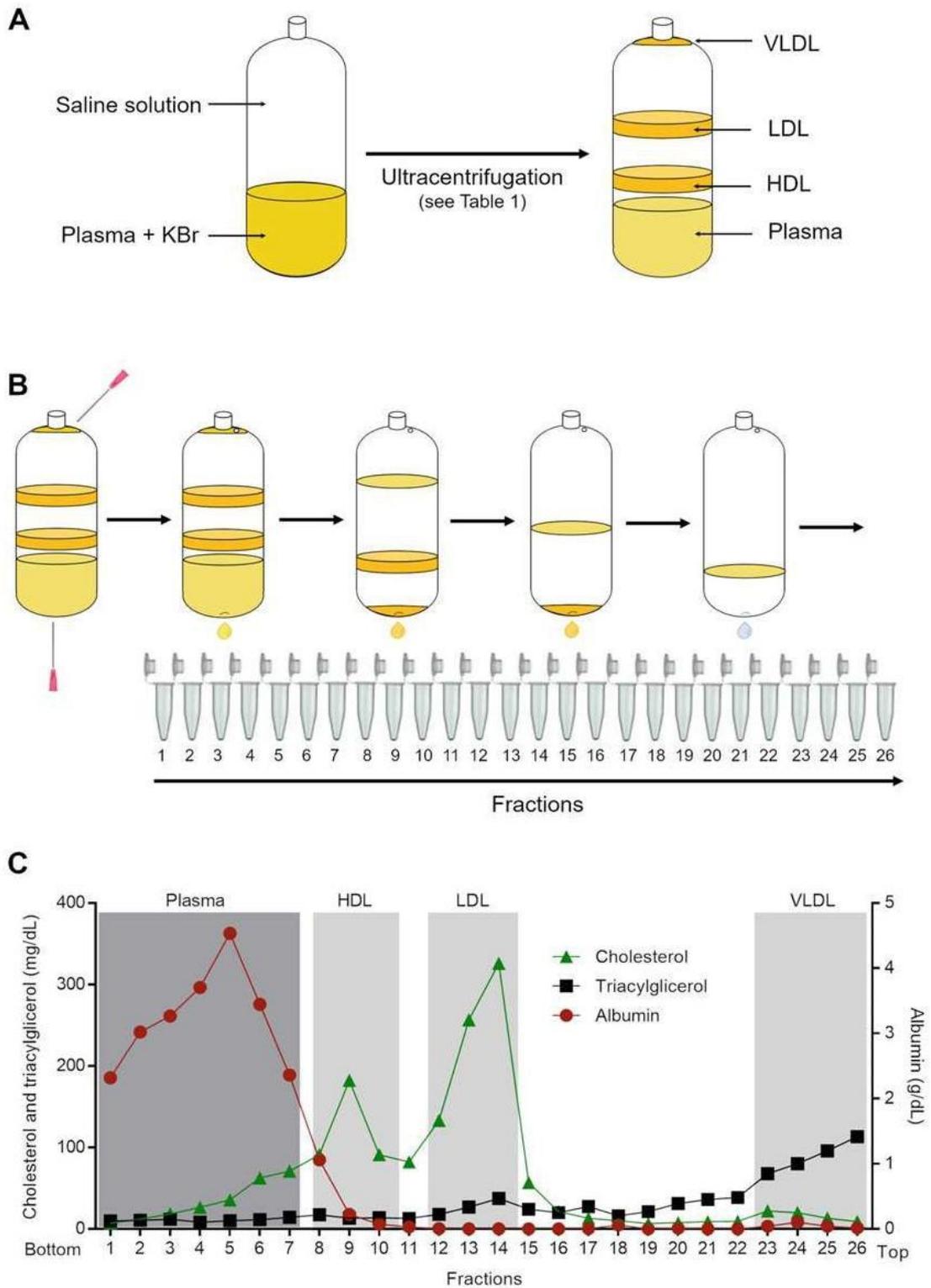
### 3.3 Quantification of Plasma Lipoproteins and Albumin

1. Locate the plasma lipoproteins and albumin in each fraction. For this you must quantify cholesterol, triacylglycerol (TAG), and albumin in all fractions obtained after ultracentrifugation using specific colorimetric assay kits as per manufacturer's instructions. Through this step, you will be able to identify the fractions containing very low-density lipoprotein (VLDL—rich in TAG at the top of the gradient), low-density lipoprotein (LDL—rich in cholesterol below VLDL), high-density lipoprotein (HDL—rich in cholesterol below LDL), and plasma (rich in albumin at the bottom) (Fig. 1c).
2. For further confirmation of the LDL-containing fractions, weigh 100  $\mu$ L of the fractions to check the density (LDL density is between 1.019 and 1.063 g/mL).

### 3.4 Quantification of MVs in Plasma Through Flow Cytometry

1. Prepare  $1 \times$  Annexin V Binding Buffer (AVBB) by diluting the  $10 \times$  stock solution in ultrapure water (Milli-Q quality).
2. Prepare an intermediate suspension of latex beads by diluting the beads stock at 1:1000 ratio in AVBB ( $1 \times$ ). Place the beads suspension in the ultrasonic bath. Beads must remain in ultrasound until the moment of use to prevent aggregation (*see Note 7*).
3. Separate a sample of each fraction of the gradient in 1.5 mL conical tubes and add the  $10 \times$  concentrated AVBB and

250 Laura B. Merij et al.



**Fig. 1** Schematic representation of the biphasic gradient assembly and fractionation. (a) The layout of the solutions used to assemble the gradient (left) and the expected distribution of the lipoproteins and plasma fractions after ultracentrifugation (right). (b) Schematic representation of suitable locations for needle drilling

PE-labeled Annexin V at 1:10 dilution (for 40  $\mu\text{L}$  of sample, add 5  $\mu\text{L}$  of AVBB 10 $\times$  and 5  $\mu\text{L}$  of Annexin V).

4. Let it rest for 30 min protected from light and then complete the volume with AVBB 1 $\times$  so that it is ten times diluted.
5. To set the flow cytometer, prepare a tube containing beads only by diluting the intermediate bead suspension at 1:100 ratio in AVBB (1 $\times$ ). Acquire the bead sample to set a gate including events of 1  $\mu\text{m}$  or smaller (<beads population) and excluding the electrical noise (Fig. 2a left panel).
6. Right before the acquisition, add the intermediate latex beads suspension to the sample at 1:100 dilution (5  $\mu\text{L}$  in 500  $\mu\text{L}$  of sample). Beads should not be added to all samples at once, only when they are about to be acquired, avoiding aggregation.
7. Among events smaller than 1  $\mu\text{m}$ , set one gate in the population of beads and one gate in the population of MVs (annexin V-positive events) (Fig. 2a right panel).
8. To estimate the concentration of MVs in each sample, calculate the MVs/beads ratio and multiply for the bead concentration in the acquired sample. MVs will be found in the plasma fraction together with albumin (Fig. 2b).

### 3.5 Sample Dialysis

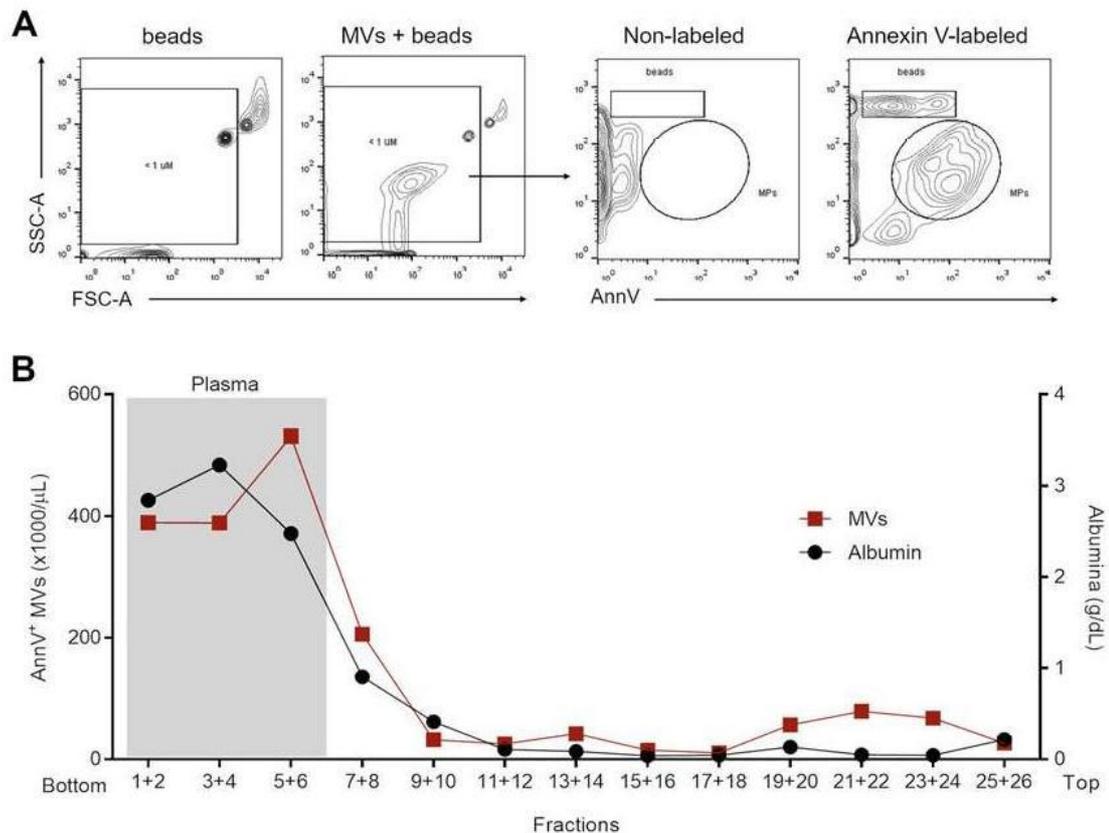
1. Pool the gradient fractions containing the lipoprotein of interest and the fractions containing plasma in individual tubes.
2. Deposit each sample type (plasma, VLDL, LDL, and/or HDL) into a pore membrane dialysis system.
3. Dialyze against PBS for 18 h at 4  $^{\circ}\text{C}$  under slow homogenization using a magnetic agitator. Replace the PBS at least once.
4. Recover the dialyzed samples, fractionate into smaller aliquots, and freeze until use.

### 3.6 MVs Isolation from Plasma

1. Centrifuge the dialyzed plasma samples obtained after lipoprotein elimination and the control plasma sample in 1.5 mL conical tubes at 19,000  $\times g$  for 2 h at 4  $^{\circ}\text{C}$  to pellet the MVs.
2. Carefully discard the supernatant with a pipette leaving only 50  $\mu\text{L}$  in each tube.
3. Resuspend the MVs in 1450  $\mu\text{L}$  of 0.22 filtered sterile PBS and homogenize the sample.
4. Repeat **steps 1** and **2**. Resuspend the MVs in the remaining 100  $\mu\text{L}$ .

←  
**Fig. 1** (continued) and the method used to collect the gradient fractions. **(c)** The concentration of total cholesterol, triacylglycerol, and albumin in each fraction obtained after gradient ultracentrifugation. The gray rectangles highlight the fractions containing plasma, high-density lipoproteins (HDL), low-density lipoproteins (LDL), and very low-density lipoproteins (VLDL)

252 Laura B. Merij et al.



**Fig. 2** Microvesicles identification and quantification through flow cytometry. (a) Gating strategy for flow cytometric analysis of microvesicles (MVs). Latex beads and MVs samples were acquired in a FACSCanto (Becton Dickson) cytometer. On the left, gating strategy to analysis of particles smaller than  $1\mu\text{m}$  (known size of the latex beads). On the right, gating strategy for counting beads and MVs ( $<1\mu\text{m}$  and Annexin V<sup>+</sup> events). (b) The concentration of MVs and albumin in the fractions of the gradient. The fractions were polled two by two and analyzed in pairs. The gray rectangle highlights the fractions containing plasma and MVs

5. The recovery of MVs from control plasma and from lipoprotein-depleted plasma may be assessed through flow cytometry as described in Subheading 3.4.
6. Freeze the MVs samples until use.

### 3.7 Detection of Apo B100 Through Western Blot

1. In order to ensure that the MVs samples are not contaminated by LDL, a Western blot can be performed targeting Apo B100. The transfer of high molecular weight proteins (i.e.,  $>200$  kDa) is challenging [10]. Therefore, due to the Apo B100 high MW ( $\sim 513$  kDa), some specific practices will be addressed in this section aiming at the efficient transfer of the proteins, including:
  - (a) Low percentage of polyacrylamide separating gel (6%).
  - (b) Transfer buffer with low methanol concentration (5%) containing 0.1% SDS.

- (c) Transfer into PVDF instead of nitrocellulose membrane.
- (d) Prolonged electro-transferring (16 h) at 40 mA, 4 °C.

### 3.7.1 MVs Samples Preparation

1. Unfreeze samples of isolated MVs from control or lipoprotein-depleted plasma (obtained in Subheading 3.6) and keep them on ice until use.
2. Homogenize the samples and remove a small volume (10 µL) of samples to quantify the protein concentration.
3. Separate 16 µL of the sample with the lowest protein concentration and a smaller volume of the more concentrated ones to have the same protein amount of each sample. Normalize the volume of all samples to 16 µL with distillate water. Add 4 µL of the 5× concentrated lysis buffer stock solution to obtain 20 µL of each sample. Briefly vortex and place the samples in the ultrasonic bath for 10 min.
4. Add the sample buffer by diluting the 5× concentrated stock into each sample (5 µL in 20 µL of sample). Boil at 95 °C for 5 min.

### 3.7.2 Protein Separation by Gel Electrophoresis

1. Prepare the separating 6% polyacrylamide gel and stacking gel by mixing the items described in Subheading 2.6, **item 4** (*see Note 8*).
2. Assemble the electrophoresis apparatus and set the gel; fill the gel box chamber with the running buffer.
3. Load 25 µL of each sample in different wells of the gel along with MW marker.
4. Turn on power supply and run the samples at 32 mA for about 120 min (*see Note 9*).

### 3.7.3 Protein Transfer to PVDF Membrane

1. Treat the PVDF membrane with 100% methanol for 2 min to activate the membrane before use because PVDF membrane is water repellent.
2. Assemble a transfer sandwich on the gel support cassette, which must be placed in the tank with the transfer buffer.
3. Transfer proteins from the gel to the membrane at 4 °C overnight at 40 mA (*see Note 10*).

### 3.7.4 Membrane Blocking and Immuno-Detection

1. After electroblotting, block the membrane with 5% low-fat dried milk in TBS-T for 1 h under continuous gentle shaking at room temperature.
2. Incubate the membrane with the primary antibody against Apo B100 solution (1:2000 in 5% low-fat dried milk in TBS-T) overnight under continuous gentle shaking at 4 °C.

3. Wash the membrane five times with TBS-T and incubate with the secondary antibody solution (1:10,000 in 5% low-fat dried milk in TBS-T) for 1 h under continuous gentle shaking at room temperature.
4. Wash the membrane five times with TBS-T, soak the membrane in the pico ECL substrate, and wrap the membrane in a plastic clear sheet protector. In a dark room, expose the hyperfilm ECL to the wrapped membrane in an X-ray film cassette (*see Note 11*).
5. ApoB100 must be detected only in MVs from plasma that was not subjected through gradient ultracentrifugation.

---

#### 4 Notes

1. The quantification of MVs and other analysis such as procoagulant activity are described to be strongly influenced by pre-analytical variables in the MV isolation protocol [11, 12]. Some critical variables must be standardized in the plasma preparation stage, which are: do not use vacuum blood collection systems; handle blood carefully; use specific centrifugation conditions mentioned below; use PFP instead of PPP; use fresh tissue samples.
2. Biosafety practices must be followed by a trained blood collection team and blood should be collected in the presence of anticoagulants (15% v/v of sterile ACD). Thoroughly homogenize the blood in the syringe and transfer it to conical polypropylene sterile centrifuge tube. To avoid unnecessary agitation, transport of the tubes must be carried out with care.
3. Store samples of PFP plus BHT in refrigeration if ultracentrifugation occurs the next day or freeze at  $-20^{\circ}\text{C}$ .
4. For 8 mL ultracentrifuge tube, add 2 mL of PFP-KBR mixture plus 6 mL of 0.9% saline solution. When using clinical samples, smaller sample volumes can be adapted for other tubes and ultracentrifuge rotors.
5. Equalize the weight by carefully removing the saline from the tube with more solution using the glass Pasteur pipette. Unbalanced tubes can damage your equipment.
6. Each drop contains approximately 50  $\mu\text{L}$ , so to get 300  $\mu\text{L}$  you must collect 6 drops for each fraction.
7. Preventing latex beads aggregation is important since beads counting in flow cytometry will be used to quantify the MVs concentration.
8. The glass sandwich with gels can be stored at  $4^{\circ}\text{C}$  in running buffer for about 3 days.

9. You should see bubbles in the tank if the current is flowing. Since a low percentage polyacrylamide gel (6%) is used, low MW protein markers are expected to process faster than high MW proteins markers.
10. Place cooling ice packs in the tank around the transfer case. It is important that the system supports cooling overnight.
11. In samples where LDL is present, APOB-100 is abundant. Therefore, after 5 min of exposure there is a good detection of the protein.

## References

1. Wilder-Smith A, Ooi EE, Horstick O et al (2019) Dengue. *Lancet* 393(10169):350–363
2. de Almeida RR, Paim B, de Oliveira SA et al (2017) Dengue hemorrhagic fever: a state-of-the-art review focused in pulmonary involvement. *Lung* 195:389–395
3. Punyadee N, Mairiang D, Thiemmecca S et al (2015) Microparticles provide a novel biomarker to predict severe clinical outcomes of dengue virus infection. *J Virol* 89:1587–1607
4. Patil R, Bajpai S, Ghosh K et al (2018) Microparticles as prognostic biomarkers in dengue virus infection. *Acta Trop* 181:21–24
5. Hottz ED, Lopes JF, Freitas C et al (2013) Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. *Blood* 122:3405–3414
6. Burger D, Schock S, Thompson CS et al (2013) Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin Sci* 124:423–441
7. Sódar BW, Kittel Á, Pálóczi K et al (2016) Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection. *Sci Rep* 6:24316
8. Zhang P, Yeo JC, Lim CT (2019) Advances in technologies for purification and enrichment of extracellular vesicles. *SLAS Technol* 24:477–488
9. Shelness GS, Sellers JA (2001) Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr Opin Lipidol* 12:151–157
10. Kurien BT, Scofield RH (2006) Western blotting. *Methods* 38:283–293
11. Lacroix R, Judicone C, Mooberry M et al (2013) Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle determination: results of the international society on thrombosis and Haemostasis SSC collaborative workshop. *J Thromb Haemost* 11:1190–1193
12. Lee RD, Barcel DA, Williams JC et al (2012) Pre-analytical and analytical variables affecting the measurement of plasma-derived microparticle tissue factor activity. *Thromb Res* 129:80–85

### 3.2. CAPÍTULO II: ANÁLISE PROTEÔMICA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES ISOLADAS POR DIFERENTES MÉTODOS VISANDO ELIMINAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR LIPOPROTEÍNAS.

#### “Proteomic analysis of extracellular vesicles from isolation approaches striking lipoprotein contamination”

Neste trabalho, mostramos que a combinação da G-UC seguida por SEC é capaz de eliminar a contaminação por lipoproteínas das EVs isoladas. A SEC é um método amplamente aplicado para isolamento de EVs, sendo capaz de eliminar a contaminação por HDLs mas não por VLDLs ou LDLs. Por outro lado, a G-UC seguida por SC é capaz de eliminar a contaminação por VLDLs e LDLs mas não por HDLs. Dessa forma, ao combinarmos os dois métodos, usando a G-UC como um pré-processamento do plasma para depleção de lipoproteínas seguido da SEC para o isolamento das EVs, fomos capazes de obter EVs livres das 3 principais classes de lipoproteínas. A ausência de lipoproteínas nas populações de EVs isoladas foi confirmada através de diferentes abordagens incluindo a quantificação de colesterol, análise proteômica e detecção de apoB-100 por *western blot*. Além disso, a análise proteômica dos diferentes métodos aplicados identificou números de proteínas e vias biológicas semelhantes em EVs isoladas, independentemente da depleção de lipoproteínas, o que foi consistente com EVs de origens celulares semelhantes identificadas por citometria de fluxo.

**Laura Botelho Merij\***, Luana Rocha da Silva\*, Kemilly Queiroga Leite, Marcus Antônio Aposo-Nune, Fernanda Brandi Andrade, Sharon de Toledo Martins, Lysangela Ronalte Alves, Patrícia T. Bozza, Monique Ramos de Oliveira Trugilho, Eugênio Damaceno Hottz. **EM PREPARAÇÃO.**

\* co-primeira autoria

































































## 4 DISCUSSÃO

O isolamento de EVs é um passo de fundamental importância para viabilizar o estudo dessas estruturas, garantindo resultados autênticos acerca de suas propriedades físico-químicas e de suas funções biológicas. No entanto, a presença de contaminantes pode implicar no enviesamento de tais dados. Atualmente, os métodos de isolamento mais frequentemente empregados são os que o fazem através das propriedades físicas das EVs, como densidade e tamanho, ou com base nas suas propriedades químicas, como através de interações com proteínas de superfície (LI et al., 2019; ROYO et al., 2020). Para obtenção das EVs de diferentes biofluidos, como plasma, urina, saliva, podem ser empregadas diferentes técnicas como SC, SEC, ultracentrifugação, gradiente de densidade, filtração, imunocaptura, entre outras (BÖING et al., 2014; GARDINER et al., 2016b; KIM et al., 2021; PEDERSEN; KIERULF; NEURAUTER, 2017; SUN et al., 2018; YUANA et al., 2014). Amostras de plasma são fontes comumente empregadas no estudo de EVs devido a obtenção fácil e não invasiva (ROYO et al., 2020; THÉRY et al., 2018), e também as utilizadas em ambos os trabalhos abordados nessa dissertação. No entanto, o grande desafio em se trabalhar com EVs oriundas do plasma reside em obter vesículas puras, sem contaminação por proteínas plasmáticas e principalmente por lipoproteínas que aprestam funções biológicas que poderiam mascarar os dados obtidos sobre as EVs (MILLER; SHYY, 2017; RIDGER et al., 2017a; THÉRY et al., 2018). Por isso, dada a crescente potencialidade das EVs em aplicações clínicas e seus papéis únicos na comunicação intercelular, atuando tanto em condições fisiológicas e patológicas, reforça-se a imprescindível necessidade de padronização de métodos eficientes para isolamento e purificação das EVs, principalmente se tratando da contaminação por lipoproteínas (DOYLE; WANG, 2019; LIANGSUPREE; MULTIA; RIEKKOLA, 2021).

Nesta dissertação, apresentamos trabalhos que visam contribuir para a padronização de métodos para isolamento de EVs do plasma humano com foco principal na erradicação da contaminação por lipoproteínas das amostras. Em ambos os trabalhos abordados aqui (Capítulo I e II), demonstramos a eficiência do

processamento do plasma através da G-UC em separar VLDLs e LDLs da porção plasmática enriquecida em EVs, contudo, albumina e pequenas quantidades de HDL ainda permaneceram contaminantes. Já no segundo trabalho (Capítulo II) especificamente, utilizamos diferentes abordagens bioquímicas, imunológicas e proteômica para avaliar a eficiência da G-UC seguida pelo isolamento das EVs através de SC ou SEC na obtenção de vesículas livres de lipoproteínas. Além disso, realizamos uma quantificação e caracterização das populações de EVs recuperadas através dos métodos abordados e, iremos discutir também algumas vantagens e desvantagens de cada método utilizado.

Atualmente, a G-UC é um método largamente empregado para o isolamento de lipoproteínas do plasma sanguíneo (POTTS et al., 1994; REDGRAVE; ROBERTS; WEST, 1975). Resultados de uma pesquisa recente conduzida pela ISEV apontam um crescimento do uso dessa metodologia também no isolamento de EVs (ROYO et al., 2020). Nesta dissertação, demonstramos a aplicabilidade de gradientes de densidade para depleção das lipoproteínas das amostras de plasma antes do isolamento das EVs. Nossos resultados confirmaram que G-UC foi eficiente na separação de lipoproteínas das frações de plasma que se mantiveram enriquecidas em EVs sem comprometimento aparente de sua concentração e origem celular. No entanto, albumina e HDL ainda permaneceram presentes como contaminantes. Esses resultados são semelhantes aos relatados por Yuana et al.(2014), que ao processarem amostras de plasma através da ultracentrifugação de um gradiente de KBr observaram que as EVs e HDLs permaneciam misturadas em algumas frações. Onódi et al.(2018) usando um gradiente de iodixanol para isolar EVs também observou contaminações por HDL e albumina nas frações ricas em EVs. Ademais, nossos resultados proteômicos demonstraram uma menor identificação de espectros da apolipoproteína ApoB-100, relativa a VLDL e LDL, corroborando a eficiência da G-UC em reduzir a contaminação por lipoproteínas das frações ricas em EVs. No entanto, ainda obtivemos espectros aumentados de albumina o que é consistente com pesquisas anteriores mostrando que as proteínas plasmáticas, incluindo a albumina, encontradas no proteoma de EVs após G-UC não estavam relacionadas a EVs (KALRA et al., 2013).

Outro método bastante empregado no isolamento de EVs é a SEC (ROYO et al., 2020; THÉRY et al., 2018). Ao utilizarmos a SEC para isolar as EVs de

amostras de plasma obtivemos EVs livres de HDL, porém persistentemente contaminadas por VLDs e LDLs, como comprovado por análises colorimétricas para colesterol e também pela detecção da apoB-100 por *western blot*. Além disso, a análise proteômica das frações individuais de SEC também confirmou a identificação significativa de espectros de massa referentes a apoB-100 e albumina entre frações enriquecidas com EVs. Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores (ASKELAND et al., 2020; BÖING et al., 2014; DE MENEZES-NETO et al., 2015; KARIMI et al., 2018). Dessa forma, é importante destacar que a contaminação por lipoproteínas deve ser levada em consideração quando a SEC for utilizada para isolar EVs. Dependendo do tipo de análise que se deseja realizar, principalmente em ensaios funcionais ou análises lipidômicas, passos adicionais a SEC devem ser considerados, pois ela não é capaz de eliminar completamente as lipoproteínas. Por fim, vale ainda ressaltar que, apesar de ter diluído bastante as amostras de EVs, a SEC preservou os perfis de origem celular e de ontologia gênica das EVs isoladas.

Dada a ausência de uma metodologia eficiente para extinguir os problemas de contaminação no isolamento das EVs, uma solução sugerida na literatura é a combinação de diferentes métodos (LIANGSUPREE; MULTIA; RIEKKOLA, 2021; ROYO et al., 2020). Por exemplo, como a SEC é capaz de isolar EVs livres de HDL porém contaminadas por LDL e VLDL, uma alternativa para o problema de contaminação seria efetuar uma imunodepleção de lipoproteínas do plasma antes da SEC. Mørk et al., utilizou anticorpos anti-ApoB conjugados a esferas magnéticas para remover lipoproteínas portadoras de ApoB (LDL, VLDL e quilomícrons) de suas amostras (MØRK et al., 2017). Como a G-UC testada nesse trabalho se mostrou eficiente em depletar VLDLs e LDLs do plasma, nosso grupo optou por testar a combinação da G-UC seguido pela SEC, uma vez que as EVs isoladas por cada técnica possuem contaminações diferentes e complementares. Nossos dados confirmaram que a combinação de G-UC e SEC foi capaz de eliminar a contaminação de lipoproteínas das EVs isoladas, especialmente a LDL, conhecida como o principal contaminante de EV na maioria dos métodos de isolamento (LIANGSUPREE; MULTIA; RIEKKOLA, 2021; SMALLEY et al., 2007; SÓDAR et al., 2016). Ao realizarmos o G-UC antes da SEC, fomos capazes de eliminar a contaminação por apoB-100 das amostras de EVs, conforme comprovado por *western blot* e análise proteômica. Nossa análise proteômica revelou também que a

combinação de G-UC com SEC ao invés de SC foi capaz de reduzir a contagem espectral de albumina nas amostras. Uma outra vantagem importante dessa combinação e que deve ser levada em consideração é que usando G-UC seguido de SEC é possível isolar diferentes classes de lipoproteínas plasmáticas, além de EVs livres de lipoproteínas, o que é de grande valia quando se trabalha com amostras clínicas. Outrossim, embora uma perda na quantidade final de vesículas recuperadas tenha sido observada, nossos dados mostram que essas populações de EVs obtidas após G-UC mais SEC são muito semelhantes as EVs isoladas apenas com SEC em relação a ontogenia gênica.

Em conjunto com a literatura, nossos resultados demonstram que os métodos testados isoladamente apresentaram vantagens e desvantagens (Tabela 2). Contudo nenhum método sozinho foi completamente eficaz em eliminar por completo as contaminações por proteínas plasmáticas e lipoproteínas das amostras de EVs do plasma. A G-UC apesar de ter sido eficiente em separar VLDLs e LDLs em frações isoladas, persistiu apresentando uma contaminação expressiva por HDLs nas frações de plasma enriquecidas com EVs. A SEC, por sua vez, foi capaz de isolar as EVs das HDLs e proteínas plasmáticas de maneira eficiente, mas manteve uma contaminação considerável por colesterol, principalmente das LDLs. Dado que lipoproteínas possuem espectros de densidade e diâmetro que se sobrepõem ao das EVs, como exposto na Figura 4, as contaminações observadas em cada método não foram de tudo inesperadas. Além do mais, a G-UC requer um elevado tempo de montagem e processamento, de dispor do equipamento adequado (ultracentrífuga, tubos específicos), e é também essencial que seja realizada uma diálise das amostras obtidas após isolamento das EVs devido as altas concentrações de sais utilizadas nas fases do gradiente. Já a SEC, apesar de ser uma técnica relativamente simples, oferece também limitações devido ao emprego de um grande volume de PBS para manter o fluxo do plasma pela coluna, de modo que as amostras recuperadas se encontram bastante diluídas. Quanto a combinação de métodos, apesar de ela parecer uma solução adequada para o problema de contaminação das EVs, ainda é preciso levar em consideração as limitações e desvantagens de cada técnica (Tabela 2). Ao combinarmos G-UC e SEC observamos perdas na quantidade final de EVs recuperadas, o que pode ser um fator de suma importância dependendo da quantidade de amostra disponível, e o

processamento das amostras requer ainda mais tempo e trabalho. Além disso, uma vez que a literatura sugere que a centrifugação pode causar agregação das EVs e afetar a integridade das membranas de vesículas, pretendemos realizar também uma análise por microscopia eletrônica das EVs obtidas após a combinação dos dois métodos, similarmente a realizada por Linares et al (2015) (HARGETT; BAUER, 2013; WEBBER; CLAYTON, 2013b; YUANA; BERTINA; OSANTO, 2011).

**Tabela 2:** Vantagens e desvantagens do uso da cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) e da combinação da ultracentrifugação de gradiente (G-UC) com centrifugação seriada (G-UC + SC) ou SEC (G-UC + SEC), no isolamento de vesículas extracelulares (EVs).

Métodos	Vantagens	Desvantagens
SEC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tempo;</li> <li>• EVs livres de HDLs</li> <li>• Elimina contaminação por proteínas plasmáticas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amostras muito diluídas;</li> <li>• Contaminação por VLDLs e LDLs nas frações contendo EVs.</li> </ul>
G-UC + SC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• EVs livres de VLDLs e LDLs;</li> <li>• Isolamento concomitante de lipoproteínas (VLDLs e LDLs);</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tempo;</li> <li>• EVs contaminadas por HDL e proteínas plasmáticas.</li> </ul>
G-UC + SEC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Isolamento concomitante de lipoproteínas (VLDLs e LDLs);</li> <li>• EVs livres de contaminação por lipoproteínas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amostras muito diluídas;</li> <li>• Tempo;</li> <li>• Trabalhoso.</li> </ul>

Fonte: autoral.

## 5 CONCLUSÃO

Concluimos com esta dissertação que EVs obtidas após G-UC podem ser separadas de VLDLs e de LDLs, mas permanecem contaminadas por HDLs; enquanto EVs isoladas a partir de SEC são separadas de forma eficiente de HDLs, mas permanecem contaminadas por colesterol proveniente de VLDLs e LDLs. Contudo, ao utilizarmos G-UC seguida por SEC, obtivemos um protocolo capaz de eliminar a contaminação por lipoproteínas com alta eficiência, garantindo EVs de alta pureza sem comprometer sua origem celular ou perfil de vias biológicas identificadas por proteômica. Por fim, embora a combinação dos métodos possa parecer muito trabalhosa, a contaminação por lipoproteínas é uma questão importante para algumas abordagens experimentais, incluindo ensaios funcionais e análises lipidômicas, tornando importante levar em consideração métodos para obter EVs livres de lipoproteínas.

## REFERÊNCIAS

- ABID HUSSEIN, M. N. et al. Cell-derived microparticles contain caspase 3 in vitro and in vivo. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, n. 5, p. 888–896, maio 2005.
- ABID HUSSEIN, M. N. et al. Inhibition of microparticle release triggers endothelial cell apoptosis and detachment. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 98, n. 5, p. 1096–1107, nov. 2007.
- AFONSO, C. B.; SPICKETT, C. M. **Lipoproteins as targets and markers of lipoxidation** *Redox Biology*, 2019. Disponível em: <<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2213231718310152?token=24AA4C3FC602383BCCD822AB008F70C96BE6D4151785B11DCB8E3D7493163A81584E92EEF7170307FD31FD2BFEC8267C&originRegion=us-east-1&originCreation=20220218133807>>. Acesso em: 18 fev. 2022
- AHOTUPA, M. Oxidized lipoprotein lipids and atherosclerosis. **Free Radical Research**, v. 51, n. 4, p. 439–447, 2017.
- AHSAN, A. et al. Phosphocreatine protects endothelial cells from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by modulating the PI3K/Akt/eNOS pathway. **Apoptosis**, v. 20, n. 12, p. 1563–1576, 1 dez. 2015.
- ALBERTINI, R.; MORATTI, R.; DE LUCA, G. Oxidation of low-density lipoprotein in atherosclerosis from basic biochemistry to clinical studies. **Current molecular medicine**, v. 2, n. 6, p. 579–92, set. 2002.
- ASKELAND, A. et al. Mass-spectrometry based proteome comparison of extracellular vesicle isolation methods: Comparison of ME-kit, size-exclusion chromatography, and high-speed centrifugation. **Biomedicines**, v. 8, n. 8, p. 246, 25 jul. 2020.
- BARRÈS, C. et al. Galectin-5 is bound onto the surface of rat reticulocyte exosomes and modulates vesicle uptake by macrophages. **Blood**, v. 115, n. 3, p. 696–705, 21 jan. 2010.
- BOILARD, E. et al. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. **Science (New York, N.Y.)**, v. 327, n. 5965, p. 580–3, 29 jan. 2010.
- BÖING, A. N. et al. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, n. 1, 2014.
- BURGER, D. et al. Microparticles: Biomarkers and beyond. **Clinical Science**, v. 124, n. 7, p. 423–441, 2013.
- BUZAS, E. I. The roles of extracellular vesicles in the immune system. **Nature reviews. Immunology**, 4 ago. 2022.
- CAMONT, L. et al. Small, dense high-density lipoprotein-3 particles are enriched in negatively charged phospholipids: Relevance to cellular cholesterol efflux, antioxidative, antithrombotic, anti-inflammatory, and antiapoptotic functionalities. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 33, n. 12, p. 2715–2723,

dez. 2013.

CAMUS, S. M. et al. Circulating cell membrane microparticles transfer heme to endothelial cells and trigger vasoocclusions in sickle cell disease. **Blood**, v. 125, n. 24, p. 3805–3814, 11 jun. 2015.

CHEN, Y.; LI, G.; LIU, M. Microvesicles as Emerging Biomarkers and Therapeutic Targets in Cardiometabolic Diseases. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, v. 16, p. 50–62, 2018.

CHRISTIANSON, H. C. et al. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 43, p. 17380–17385, 22 out. 2013.

CORDAZZO, C. et al. Rapid shedding of proinflammatory microparticles by human mononuclear cells exposed to cigarette smoke is dependent on Ca<sup>2+</sup> mobilization. **Inflammation Research**, v. 63, n. 7, p. 539–547, 2014.

DATE, K.; ETTELAIE, C.; MARAVEYAS, A. Tissue factor-bearing microparticles and inflammation: a potential mechanism for the development of venous thromboembolism in cancer. **Journal of thrombosis and haemostasis : JTH**, v. 15, n. 12, p. 2289–2299, 2017.

DE MENEZES-NETO, A. et al. Size-exclusion chromatography as a stand-alone methodology identifies novel markers in mass spectrometry analyses of plasma-derived vesicles from healthy individuals. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, n. 1, 2015.

DE TORO, J. et al. Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: New insights for diagnosis and therapeutic applications. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. MAY, p. 203, 2015.

DOYLE, L.; WANG, M. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. **Cells**, v. 8, n. 7, p. 727, 15 jul. 2019.

ERENCE, B. A.; KASTELEIN, J. J. P.; CATAPANO, A. L. **Lipids and lipoproteins in 2020** **JAMA - Journal of the American Medical Association** American Medical Association, , 11 ago. 2020.

FLEMING, A. et al. **The carrying pigeons of the cell: Exosomes and their role in infectious diseases caused by human pathogens** **Pathogens and Disease** Blackwell Publishing Ltd, , 2014.

GARDINER, C. et al. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3078, n. 5, 2016a.

GARDINER, C. et al. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: Results of a worldwide survey. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 5, n. 1, 2016b.

GARNIER, Y. et al. Differences of microparticle patterns between sickle cell anemia and hemoglobin SC patients. **PloS one**, v. 12, n. 5, p. e0177397, 2017.

- GIANNESSEI, F. et al. **The role of extracellular vesicles as allies of HIV, HCV and SARS viruses***Viruses*, , 1 maio 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32456011/>>. Acesso em: 23 jun. 2022
- GOMES, F. G. et al. Breast-cancer extracellular vesicles induce platelet activation and aggregation by tissue factor-independent and -dependent mechanisms. **Thrombosis Research**, v. 159, p. 24–32, 1 nov. 2017.
- HARGETT, L. A.; BAUER, N. N. On the origin of microparticles : From “ platelet dust ” to mediators of intercellular communication. **Pulmonary Circulation**, v. 3, n. 2, 2013.
- HASSANPOUR, M. et al. **The role of extracellular vesicles in COVID-19 virus infection***Infection, Genetics and Evolution*Elsevier, , 1 nov. 2020. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC7293471/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32456011/)>. Acesso em: 11 ago. 2022
- HERRMANN, I. K.; WOOD, M. J. A.; FUHRMANN, G. **Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform***Nature Nanotechnology*Nature Publishing Group, , 1 jul. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41565-021-00931-2>>. Acesso em: 10 ago. 2022
- HOSHINO, A. et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. **Nature**, v. 527, n. 7578, p. 329–335, 28 out. 2015.
- HOTTZ, E. D. et al. Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. **Blood**, v. 122, n. 20, p. 3405–3414, 2013.
- JANSEN, F. et al. High glucose condition increases NADPH oxidase activity in endothelial microparticles that promote vascular inflammation. **Cardiovascular research**, v. 98, n. 1, p. 94–106, 1 abr. 2013.
- KADDOUR, H.; TRANQUILLE, M.; OKEOMA, C. M. The past, the present, and the future of the size exclusion chromatography in extracellular vesicles separation. **Viruses**, v. 13, n. 11, 1 nov. 2021.
- KALANI, A. et al. Curcumin-loaded embryonic stem cell exosomes restored neurovascular unit following ischemia-reperfusion injury. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 79, p. 360–369, 1 out. 2016.
- KALLURI, R.; LEBLEU, V. S. **The biology, function, and biomedical applications of exosomes***Science*American Association for the Advancement of Science, , 7 fev. 2020.
- KALRA, H. et al. Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma. **Proteomics**, v. 13, n. 22, p. 3354–3364, nov. 2013.
- KALRA, H.; DRUMMEN, G. P. C.; MATHIVANAN, S. **Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing***International Journal of Molecular Sciences*Int J Mol Sci, , 6 fev. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26861301/>>. Acesso em: 10 ago. 2022
- KAPETANOVIC, R.; BOKIL, N. J.; SWEET, M. J. Innate immune perturbations, accumulating DAMPs and inflammasome dysregulation: A ticking time bomb in ageing. **Ageing research reviews**, v. 24, n. Pt A, p. 40–53, nov. 2015.
- KARIMI, N. et al. Detailed analysis of the plasma extracellular vesicle proteome after

separation from lipoproteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 15, p. 2873–2886, 1 ago. 2018.

KHOSRAVI, M.; HOSSEINI-FARD, R.; NAJAFI, M. Circulating low density lipoprotein (LDL). **Hormone molecular biology and clinical investigation**, v. 35, n. 2, 31 jul. 2018.

KIM, K. et al. Cyclic tangential flow filtration system for isolation of extracellular vesicles. **APL Bioengineering**, v. 5, n. 1, 1 mar. 2021.

KONOSHENKO, M. Y. et al. **Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends** **BioMed Research International** Hindawi Limited, , 2018.

KREIMER, S. et al. Mass-spectrometry-based molecular characterization of extracellular vesicles: Lipidomics and proteomics. **Journal of Proteome Research**, v. 14, n. 6, p. 2367–2384, 2015.

KUGIYAMA, K. et al. Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins. **Nature**, v. 344, n. 6262, p. 160–162, 1990.

LAZAR, S.; GOLDFINGER, L. E. **Platelets and extracellular vesicles and their cross talk with cancer** **Blood** American Society of Hematology, , 10 jun. 2021.

Disponível em:

<<https://ashpublications.org/blood/article/137/23/3192/475897/Platelets-and-extracellular-vesicles-and-their>>. Acesso em: 23 jun. 2022

LEROYER, A. S. et al. CD40 ligand+ microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis a potential mechanism for intraplaque neovascularization. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 52, n. 16, p. 1302–11, 14 out. 2008.

LI, C. J. et al. Novel proteolytic microvesicles released from human macrophages after exposure to tobacco smoke. **American Journal of Pathology**, v. 182, n. 5, p. 1552–1562, maio 2013.

LI, J. et al. An Update on Isolation Methods for Proteomic Studies of Extracellular Vesicles in Biofluids. **Molecules**, v. 24, n. 3516, p. 1–20, 2019.

LIANGSUPREE, T.; MULTIA, E.; RIEKKOLA, M. L. Modern isolation and separation techniques for extracellular vesicles. **Journal of Chromatography A**, v. 1636, 11 jan. 2021.

LINDENBERGH, M. F. S.; STOORVOGEL, W. **Antigen Presentation by Extracellular Vesicles from Professional Antigen-Presenting Cells** **Annual Review of Immunology** Annual Reviews Inc., , 26 abr. 2018.

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

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25536934/>>.

Acesso em: 24 ago. 2022

MAHLEY, R. W. et al. Plasma lipoproteins apolipoprotein structure. **Journal of Lipid Research**, v. 25, 1984.

- MARAR, C.; STARICH, B.; WIRTZ, D. **Extracellular vesicles in immunomodulation and tumor progression***Nature Immunology* Nat Immunol, , 1 maio 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33753940/>>. Acesso em: 10 ago. 2022
- MILLER, Y. I.; SHYY, J. Y. J. Context-Dependent Role of Oxidized Lipids and Lipoproteins in Inflammation. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 28, n. 2, p. 143–152, 2017.
- MOBARREZ, F. et al. Electronic cigarettes containing nicotine increase endothelial and platelet derived extracellular vesicles in healthy volunteers. **Atherosclerosis**, v. 301, p. 93–100, 1 maio 2020.
- MØRK, M. et al. Prospects and limitations of antibody-mediated clearing of lipoproteins from blood plasma prior to nanoparticle tracking analysis of extracellular vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 6, n. 1, 4 abr. 2017.
- MULCAHY, L. A.; PINK, R. C.; CARTER, D. R. F. **Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake***Journal of Extracellular Vesicles* Taylor & Francis, , 2014. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3402/jev.v3.24641>>. Acesso em: 11 ago. 2022
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- NIU, C. et al. Macrophage foam cell-derived extracellular vesicles promote vascular smooth muscle cell migration and adhesion. **Journal of the American Heart Association**, v. 5, n. 10, 1 out. 2016.
- O'BRIEN, K. et al. **RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications***Nature Reviews Molecular Cell Biology* Nature Publishing Group, , 26 maio 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41580-020-0251-y>>. Acesso em: 2 jun. 2022
- ONÓDI, Z. et al. Isolation of high-purity extracellular vesicles by the combination of iodixanol density gradient ultracentrifugation and bind-elute chromatography from blood plasma. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. OCT, p. 1479, 23 out. 2018.
- PALLET, N. et al. A comprehensive characterization of membrane vesicles released by autophagic human endothelial cells. **Proteomics**, v. 13, n. 7, p. 1108–1120, abr. 2013.
- PEDERSEN, K. W.; KIERULF, B.; NEURAUTER, A. Specific and Generic Isolation of Extracellular Vesicles with Magnetic Beads. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1660, p. 65–87, 2017.
- PEINADO, H. et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. **Nature Medicine**, v. 18, n. 6, p. 883–891, 2012.
- PIRILLO, A.; NORATA, G. D.; CATAPANO, A. L. **LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis***Mediators of Inflammation*, 2013.
- POTTS, J. L. et al. Separation of lipoprotein fractions by ultracentrifugation: investigation of analytical recovery with sequential flotation and density gradient procedures. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v.

230, n. 2, p. 215–220, 31 out. 1994.

PUHM, F. et al. Mitochondria Are a Subset of Extracellular Vesicles Released by Activated Monocytes and Induce Type I IFN and TNF Responses in Endothelial Cells. **Circulation research**, v. 125, n. 1, p. 43–52, 21 jun. 2019.

PUHM, F.; FLAMAND, L.; BOILARD, E. **Platelet extracellular vesicles in COVID-19: Potential markers and makers** *Journal of Leukocyte Biology* *J Leukoc Biol*, , 1 jan. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34730839/>>. Acesso em: 24 ago. 2022

PUNYADEE, N. et al. Microparticles Provide a Novel Biomarker To Predict Severe Clinical Outcomes of Dengue Virus Infection. **Journal of Virology**, v. 89, n. 3, p. 1587–1607, 1 fev. 2015.

QI, H. et al. **Extracellular Vesicles as Natural Delivery Carriers Regulate Oxidative Stress Under Pathological Conditions** *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* *Front Bioeng Biotechnol*, , 7 set. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34557480/>>. Acesso em: 23 jun. 2022

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

RATAJCZAK, J. et al. **Membrane-derived microvesicles: Important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication** *Leukemia* *Nature Publishing Group*, , 2006.

REDGRAVE, T. G.; ROBERTS, D. C. K.; WEST, C. E. Separation of plasma lipoproteins by density-gradient ultracentrifugation. **Analytical biochemistry**, v. 65, n. 1–2, p. 42–49, 12 maio 1975.

RIDGER, V. C. et al. Microvesicles in vascular homeostasis and diseases position paper of the european society of cardiology (ESC) working group on atherosclerosis and vascular biology. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 117, n. 7, p. 1296–1316, 2017a.

RIDGER, V. C. et al. Microvesicles in vascular homeostasis and diseases position paper of the european society of cardiology (ESC) working group on atherosclerosis and vascular biology. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 117, n. 7, p. 1296–1316, 2017b.

RIDGER, V. C.; BOULANGER, C. M.; ANGELILLO-SCHERRER, A. Microvesicles in vascular homeostasis and diseases. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 117, p. 1296–1316, 2017.

ROBBINS, P. D.; MORELLI, A. E. **Regulation of immune responses by extracellular vesicles** *Nature Reviews Immunology*, mar. 2014.

ROYO, F. et al. Methods for Separation and Characterization of Extracellular Vesicles: Results of a Worldwide Survey Performed by the ISEV Rigor and Standardization Subcommittee. **Cells**, v. 9, n. 9, 25 ago. 2020.

SAMAN, S. et al. Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 6, p. 3842–3849, 3 fev. 2012.

- SHAH, R.; PATEL, T.; FREEDMAN, J. E. Circulating Extracellular Vesicles in Human Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 10, p. 958–966, 6 set. 2018.
- SMALLEY, D. M. et al. Proteomic discovery of 21 proteins expressed in human plasma-derived but not platelet-derived microparticles. **Thromb Haemost**, v. 97, p. 67–80, 2007.
- SÓDAR, B. W. et al. Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection. **Nature Publishing Group**, n. March, p. 1–12, 2016.
- SUN, Y. et al. Comparative Proteomic Analysis of Exosomes and Microvesicles in Human Saliva for Lung Cancer. **Journal of Proteome Research**, v. 17, n. 3, p. 1101–1107, 2 mar. 2018.
- THÉRY, C. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of extracellular vesicles**, v. 7, n. 1, 1 jan. 2018.
- TJADEN, K. et al. Low density lipoprotein interferes with intracellular signaling of monocytes resulting in impaired chemotaxis and enhanced chemokinesis. **International Journal of Cardiology**, v. 255, p. 160–165, 15 mar. 2018.
- VAJEN, T. et al. Platelet extracellular vesicles induce a pro-inflammatory smooth muscle cell phenotype. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 6, n. 1, p. 1322454, 2017.
- VAN NIEL, G.; D'ANGELO, G.; RAPOSO, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 4, p. 213–228, 2018.
- WEBBER, J.; CLAYTON, A. How pure are your vesicles? **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 2, n. 1, 2013a.
- WEBBER, J.; CLAYTON, A. How pure are your vesicles? **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 2, n. 1, 2013b.
- WIECKOWSKI, E. U. et al. Tumor-Derived Microvesicles Promote Regulatory T Cell Expansion and Induce Apoptosis in Tumor-Reactive Activated CD8 + T Lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 6, p. 3720–3730, 15 set. 2009.
- WOLF, P. The nature and significance of platelet products in human plasma. **British journal of haematology**, v. 13, n. 3, p. 269–288, 1967.
- XIAO, Y. et al. **Role of extracellular vesicles in neurodegenerative diseases** *Progress in Neurobiology* Elsevier Ltd, , 1 jun. 2021.
- XU, R. et al. **Extracellular vesicle isolation and characterization: Toward clinical application** *Journal of Clinical Investigation* J Clin Invest, , 1 abr. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27035807/>>. Acesso em: 3 jun. 2022
- XU, R. et al. **Extracellular vesicles in cancer — implications for future improvements in cancer care** *Nature Reviews Clinical Oncology* Nature Publishing Group, , 1 out. 2018.

YÁÑEZ-MÓ, M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of Extracellular Vesicles**, 2015.

YANG, C. et al. Low density lipoprotein receptor mediates anti-VEGF effect of lymphocyte T-derived microparticles in lewis lung carcinoma cells. **Cancer Biology and Therapy**, v. 10, n. 5, p. 448–456, 1 set. 2010.

YANG, J. et al. Extracellular vesicles: Potential impact on cardiovascular diseases. In: **Advances in Clinical Chemistry**. [s.l.] Academic Press Inc., 2021. v. 105p. 49–100.

YUANA, Y. et al. Co-isolation of extracellular vesicles and high-density lipoproteins using density gradient ultracentrifugation. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, n. 1, 2014.

YUANA, Y.; BERTINA, R. M.; OSANTO, S. Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 105, n. 3, p. 396–408, 2011.

ZHANG, P.; YEO, J. C.; LIM, C. T. Advances in Technologies for Purification and Enrichment of Extracellular Vesicles. **SLAS Technology**, v. 24, n. 5, p. 477–488, 2019.

ZIFKOS, K.; DUBOIS, C.; SCHÄFER, K. **Extracellular vesicles and thrombosis: Update on the clinical and experimental evidence** **International Journal of Molecular Sciences** Int J Mol Sci, , 1 set. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34502228/>>. Acesso em: 5 jul. 2022