

Potencialidades terapêuticas das microvesículas

Lúcia de Fátima de Sousa Pereira

Potencialidades terapêuticas das microvesículas

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade Ciências da Saúde

Porto 2013

Potencialidades terapêuticas das microvesículas

Lúcia de Fátima de Sousa Pereira

Potencialidades terapêuticas das microvesículas

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade Ciências da Saúde

Porto 2013

Potencialidades terapêuticas das microvesículas

Lúcia de Fátima de Sousa Pereira

Potencialidades terapêuticas das microvesículas

Assinatura:

(Lúcia de Fátima de Sousa Pereira)

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa
como parte dos requisitos para a obter o
Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora:

Professora Doutora Maria Gil Roseira Ribeiro

Universidade Fernando Pessoa

Porto 2013

Resumo

As microvesículas são um grupo heterogêneo de vesículas esféricas com um diâmetro de 100-1000 nm, formadas por brotamento/gemulação da membrana plasmática da célula. Os exossomas são estruturas mais homogêneas e mais pequenas (40-120 nm) do que as microvesículas. Ao contrário das microvesículas, que são abundantes na circulação sanguínea e derivam, essencialmente, de plaquetas, os exossomas são derivados do compartimento endo-lisossomal. Estas estruturas têm sido detetadas no sangue e em vários fluídos corporais (urina, secreções broncoalveolar, muco, saliva, bÍlis, ascite, fluido cérebrospinal e leite materno). A sua composição é heterogênea e depende do tipo de célula de origem. A composição diferenciada é um pré-requisito para a sua função potencial de biomarcador patofisiológico. De facto, a sua constituição específica em proteínas transmembranares, proteínas solúveis, mRNA e microRNA pode ser representativa de uma condição fisiológica normal ou patológica. Deste modo, um passo crítico para a utilização, no futuro, de microvesículas e endossomas como biomarcadores consistirá na identificação de correlações inequívocas entre os diferentes estados de progressão da doença e o respetivo padrão bioquímico. Adicionalmente, a sua deteção e caracterização de forma rápida, usando biossensores baseados em nanopartículas, deverá permitir a sua utilização como biomarcadores de doenças de etiologia muito diversa, tais como o cancro, doenças metabólicas e doenças neurodegenerativas na prática clínica. Para além do seu papel no domínio da prevenção, diagnóstico e monitorização da progressão da doença, também poderão desempenhar, no futuro, uma papel importante ao nível da terapia e da avaliação do sucesso terapêutico das doenças em que se encontrarem patofisiologicamente implicados.

Palavras-chave: Microvesícula, Exossoma, Biomarcador, Doença oncológica, Doença metabólica.

Abstract

The microvesicles are a heterogeneous group of spherical vesicles with a diameter of 100-1000 nm formed by budding of the plasma membrane of the cell. The exosomes are more homogeneous and smaller (40-120 nm) structures than the microvesicles. Unlike microvesicles, which are abundant in the blood circulation and derived primarily from platelets, exosomes are originated in the endolysosomal cell compartment. These structures have been detected in the blood and in various body fluids (urine, bronchoalveolar secretions, mucus, saliva, bile, ascyte, cerebrospinal fluid, and breast milk). Their composition is heterogeneous and depends on the cell type of origin. The unique composition is a prerequisite for its potential function as pathophysiological biomarker. In fact, its specific constitution in transmembrane proteins, soluble proteins, mRNA and microRNA may be representative of a normal physiological or pathological condition. Thus, a critical step for its application, in future, as biomarkers consists in the identification of unambiguous correlations between different states of disease progression and their biochemical pattern. Additionally, the possibility to quickly detect and characterize microvesicles and endosomes using specific biosensors, should allow their use in clinical practice as biomarkers of etiological diverse diseases such as cancer, metabolic diseases and neurodegenerative disorders. Beyond its role in the prevention, diagnosis and monitoring of disease progression, they may also play, in the future, an important role in the therapy itself or in monitoring therapeutic success in those diseases that they become physiopathologically implicated.

Key-words: Microvesicle, Exosome, Biomarker, Oncologic disease, Metabolic disease

Dedicatória

A todos que de alguma forma tornaram
este caminho mais fácil de ser percorrido.

Agradecimentos

Dedico este espaço limitado aos que, direta ou indiretamente, deram a sua contribuição para que esta tese de Mestrado pudesse ser realizada, a quem devo profundos agradecimentos pela forma que me aturaram pelo modo como sempre me apoiaram e acompanharam ao longo desta árdua e custosa caminhada. Desta forma, deixo algumas palavras, e um sentido sentimento de reconhecido agradecimento.

Aos meus pais que me educaram e pela forma como me inculcaram a alegria de viver, fazer tudo o melhor possível e a confiança necessária para realizar os meus sonhos.

Aos meus irmãos e sobrinho pelo apoio prestado e por estarem sempre a torcer por mim.

Ao meu namorado Nelson, um agradecimento especial pelo apoio e carinho diários, pelas palavras doces, pela transmissão de confiança e de força, em todos os momentos além das palavras de ânimo que imprimia sempre que achava necessário, sempre me incentivou, mesmo quando estava mais desanimada.

Aos Meus Amigos, aqueles que os são mesmo pelos intermináveis desabafos ao telemóvel e pela partilha dos bons (e menos bons) momentos. Sem esquecer a Mariana que foi impecável.

A minha orientadora, Professora Doutora Maria Gil Ribeiro a forma como orientou o meu trabalho, todo o apoio prestado foi muito útil, e pela simpatia que sempre me demonstrou.

Obrigada!

Índice

Resumo	4
Abstract.....	5
Dedicatória.....	6
Agradecimentos	7
Índice	8
Índice de figuras	9
Índice de tabelas	10
Abreviaturas e siglas.....	11
Capítulo I – Introdução.....	12
Capítulo II.....	13
1. Biomarcadores	13
2. Microvesículas e exossomas.....	16
3. Papel biológico de MVs / Exossomas	21
4. EMVs como biomarcadores de processos patológicos.....	24
5. Papel fisiopatológico dos EMVs na doença oncológica.....	26
6. EMVs como biomarcadores de doenças metabólicas.....	29
7. EMVs como biomarcadores de doenças neurodegenerativas.....	32
Capítulo III – Conclusões e perspectivas futuras	34
Referências Bibliográficas.....	36

Índice de figuras

Fig. 1 – Papel dos biomarcadores na patogênese de indivíduos em função do índice de bem-estar.	14
Fig. 2 – Correlação entre a previsão de risco de uma doença e o momento mais razoável para a sua prevenção	15
Fig. 3 - Fases da identificação de novos biomarcadores	16
Fig. 4 – Representação esquemática da composição das três classes principais de vesículas extracelulares	18
Fig. 5 – Mecanismos moleculares de libertação de exossomas	20
Fig. 6 – Hipótese atual para os diferentes modos de interação de EMVs libertados por células dadoras para o espaço extracelular de células aceitadoras alvo	22
Fig. 7 – Exossomas em interação com as células	23
Fig. 8 – O papel das microvesículas (MVs) no cancro.....	29

Índice de tabelas

Tabela 1 – Papel biomarcador de MVs presentes em fluídos biológicos..... 27

Abreviaturas e siglas

AD – Doença de Alzheimer

A β – β -amilóide

CE – Células Endoteliais

EMV – Exossoma e Microvesícula

FasL / Fas ou TRAIL / TRAIL- R – ligando Faz

mRNA – RNA mensageiro

miRNAs – Micros RNAs

MMPs – Metaloproteinases de matriz

MV – Microvesículas

MVB – Corpos Multivesiculares

NIH – *National Institute of Health*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PRPsc – Proteína Prionica

RNA – Ácido Ribonucleico

RNAi – RNA de Interferência

Capítulo I – Introdução

As células comunicam por processos de transferência de moléculas através da membrana plasmática, nomeadamente a secreção de vesículas membranares. Estas vesículas são secretadas pela maioria das células normais e podem ser encontradas na maioria dos fluídos corporais. Estas vesículas são, assim, componentes-chave na permuta de informação entre as células, exercendo os seus efeitos biológicos de uma forma pleiotrópica por ativação direta de recetores de superfície em células alvo, transferência da célula de origem para a célula recetora ou transferência de efetores, tais como oncogenes, fatores de transcrição ou partículas infecciosas.

Os exossomas são vesículas de 30-90 nm excretadas por uma variedade de células de mamíferos e isolados, normalmente, através de um gradiente de sacarose após ultracentrifugação. Os exossomas são enriquecidos em proteínas de choque térmico, proteínas membranares da família de tetraspaninas (TM4SF, *transmembrane 4 superfamily*), e componentes da maquinaria ESCRT (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*). Estudos recentes sugerem que as vesículas de membrana e, em particular, os exossomas desempenham um papel importante na transmissão de RNA entre as células, nomeadamente na transferência de micro-RNAs (miRNAs) reguladores que induzem o silenciamento genético nas células recetoras. Dado o seu envolvimento no transporte de informação entre as células, a identificação e caracterização destas vesículas fosfolipídicas extracelulares tem criado muita expectativa na comunidade farmacêutica. O facto de transportarem proteínas e ácidos nucleicos torna-os atrativos como biomarcadores preditivos e de diagnóstico, bem como agentes terapêuticos. No entanto, possuem uma diminuta capacidade para atravessar membranas biológicas, podendo desencadear respostas imunes. Por isso, a complexidade destes sistemas e a sua elevada probabilidade de causar efeitos secundários fora da célula alvo tem dificultado a sua utilização na prática clínica.

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo reunir a informação científica publicada sobre os exossomas e a sua importância emergente na prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças de etiologia muito diversa.

Capítulo II

1. Biomarcadores

Os biomarcadores, ou marcadores biológicos, representam características biológicas que podem ser informativas quanto ao risco de manifestação de uma doença e/ou à gravidade ou fase de progressão da doença (e subsequentemente permitir a estratificação dos doentes). De acordo com o NIH (*National Institute of Health*, EUA), um biomarcador representa uma característica que é medida de forma objetiva e que é avaliada como um indicador de processos biológicos normais ou patogênicos, ou de respostas farmacológicas a intervenções terapêuticas. Ainda segundo o NIH, um resultado clínico representa uma característica ou variável que reflete o estado clínico do doente e um marcador substituto representa um biomarcador que substitui o resultado clínico e que tem a potencialidade de prever o benefício ou malefício clínico (ou a falta destes) com base em evidências epidemiológicas, terapêuticas, fisiopatológicas, ou outras. (Biomarker Definitions Working Group, 2002; Frank e Hargreaves, 2003). Desta forma, os principais objetivos do uso de biomarcadores, resultados clínicos e marcadores substitutos são: melhorar a previsão, o diagnóstico e o prognóstico, em particular de doenças complexas multifatoriais comuns, e facilitar a descoberta de novos fármacos (Jorgensen, 2011; Müller, 2012a). Segundo a indústria farmacêutica, o biomarcador pode ser definido como uma característica mensurável que reflete o mecanismo de ação da molécula de acordo com os aspetos fisiopatológicos e farmacológicos específicos da doença (Lathia, 2002). De acordo com a EMA (*European Medicine Agency*), os resultados clínicos são análises ou medições distintas de características da doença observadas num estudo ou ensaio clínico sob o efeito de uma dada intervenção terapêutica. (Manolis et al., 2011) Deste ponto de vista, um biomarcador é um indicador de mudança e por isso os seus valores deverão flutuar em função do tempo e da condição biológica.

Os biomarcadores são normalmente classificados em tipo 0 (medem a história natural de uma doença e correlacionam-se ao longo do tempo com indicadores clínicos, (Figura 1), tipo 1 (indicadores do efeito da atividade de fármacos) ou tipo 2 (marcadores substitutos, parâmetro laboratorial ou fisiológico que substitui o resultado que mede diretamente o estado de saúde/doença).

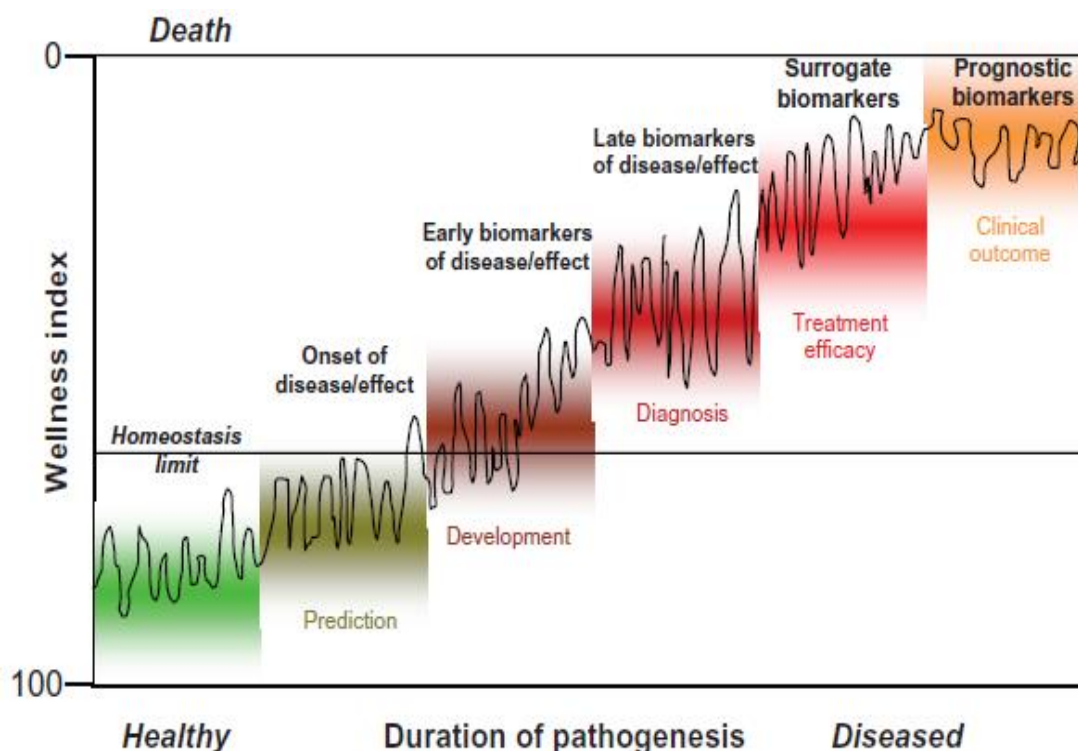


Fig. 1 – Papel dos biomarcadores na patogênese de indivíduos em função do índice de bem-estar. (Figura adaptada de Müller, 2012a)

No processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos modernos, nomeadamente biomarcadores, é necessário ter em conta algumas questões críticas, como por exemplo a transformação de forma adequada de dados em informação e, subsequentemente, em conhecimento e a integração desta informação na prática clínica. A expectativa geral é a de que os dados obtidos com biomarcadores forneçam informação preditiva credível quanto às alterações induzidas nos processos biológicos/fisiológicos após administração de fármacos e, desta forma, melhorem a capacidade de previsão e a tomada de decisões por parte de cientistas e outros agentes envolvidos no processo de descoberta de novos compostos farmacêuticos (Lee et al., 2011; Naylor, 2005).

Presentemente, há uma lacuna na informação produzida por biomarcadores genotípicos e biomarcadores fenotípicos (tradicionais), na medida em estes não estão,

geralmente, associados ao início da patogênese e às fases do desenvolvimento da doença onde a capacidade de intervenção preventiva é maior (Figura 2). Os biomarcadores que venham a preencher esta lacuna deverão circular no plasma e permitir a monitorização e subsequente control da patogênese e/ou etapas críticas patogênicas, a eficácia do medicamento, e ainda serem financeiramente suportáveis em estudos pré-clínicos e clínicos (Müller, 2012a).

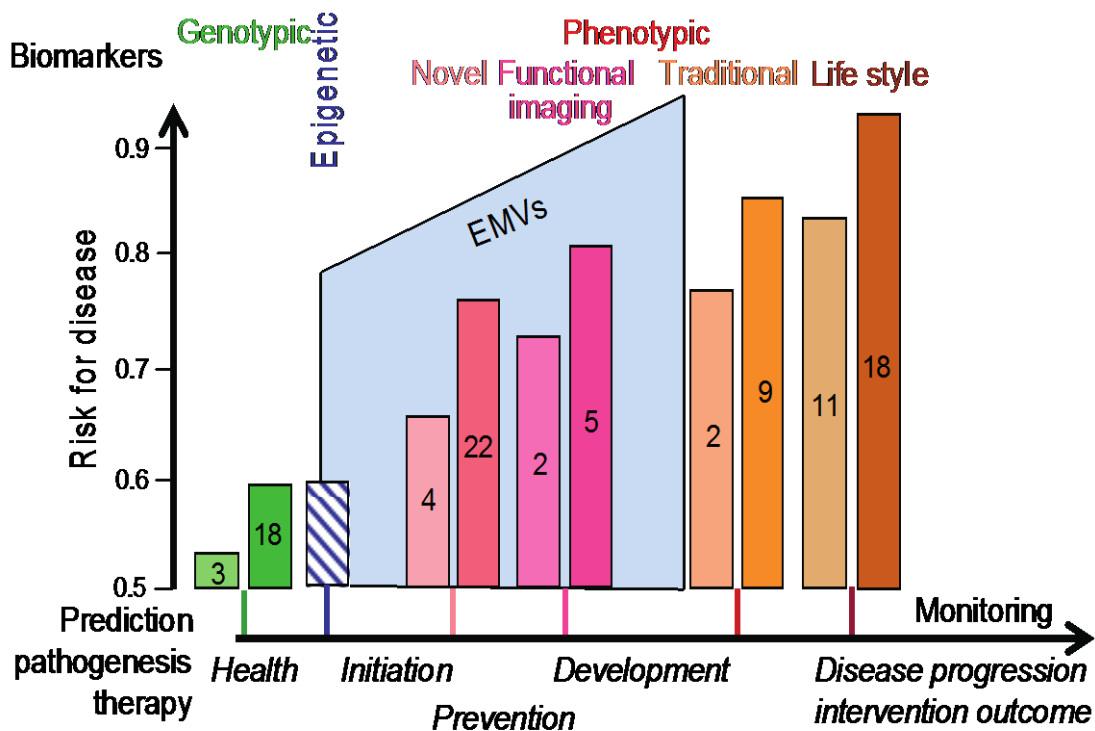


Fig. 2 – Correlação entre a previsão de risco de uma doença e o momento mais razoável para a sua prevenção. (Figura adaptada de Müller, 2012a) Os riscos de doença são apresentados para as diferentes etapas no decorrer da patogênese baseados em biomarcadores genéticos (verde), epigenéticos (azul com riscas), biomarcadores novos/funcionais (rosa) e biomarcadores tradicionais/estilo de vida (castanho) em comparação com (hipotéticas) assinaturas de biomarcadores EMVs (exossoma e microvesícula) (azul). Para cada tipo de biomarcador apresentado, os números de biomarcadores medidos e usados em conjunto é indicado no interior de cada barra.

No que diz respeito à descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, a eficácia de novos medicamentos tem sido avaliada de forma tradicional em ensaios clínicos

usando a morbidade e mortalidade como resultados. No entanto, ensaios clínicos deste género podem requerer cerca de 10 000-15000 sujeitos e até 5 anos de acompanhamento para demonstração e validação dos benefícios mais significativos. Neste âmbito, o recurso a biomarcadores poderá implicar estudos com menos indivíduos e efetuados num intervalo de tempo mais curto. As fases experimentais conducentes à identificação de biomarcadores são apresentadas na Figura 3 (Müller, 2012a).

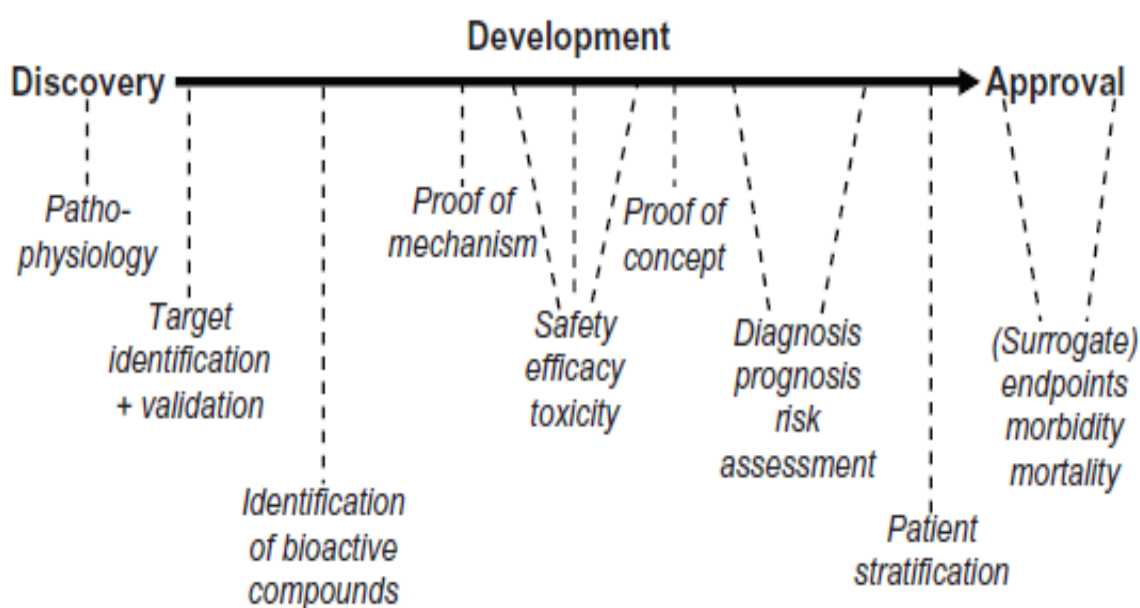


Fig. 3 - Fases da identificação de novos biomarcadores (Figura adaptada de Müller, 2012a)

2. Microvesículas e exossomas

Vesículas membranares de pequenas dimensões são libertadas da maioria das células animais (Cocucci et al., 2008; Piccin et al., 2007), tais como mastócitos (Laulagnier et al., 2004b), células dendríticas, linfócitos B (Laulagnier et al., 2004b), astrócitos, plaquetas, neurónios, células endoteliais e epiteliais (Hogan et al., 2009; Zhou et al., 2011). Essas vesículas de membrana podem ser divididas em subgrupos distintos com base na sua biogénese, propriedades biofísicas e funções: corpos

apoptóticos, microvesículas (MVs, também referidos como ectossomas, micropartículas ou exovesículas em função da sua origem celular), e exossomas ou vesículas de derramamento (EMVs).

As MVs são um grupo heterogêneo de vesículas esféricas com um diâmetro de cerca de 100-1000 nm, formadas por brotamento/gemulação e fissão da membrana plasmática da célula, e são enriquecidas em fosfatidilserina, integrinas, selectinas e CD40. Estas vesículas são indistintamente designadas por microvesículas, ectossomas, vesículas de derramamento, micropartículas, vesículas derivadas da membrana plasmática, ou mesmo exovesículas (Antwi-Baffour et al., 2010; Cocucci et al., 2009; Muralidharan-Chari et al., 2010; Obregon et al., 2006; Pilzer et al., 2005; Schara et al., 2009; Sekula et al., 2011; Shantsila et al., 2010; Shedden et al., 2003). MVs são abundantes na circulação onde são predominantemente derivadas de plaquetas (denominadas micropartículas), com pequenas quantidades de células originárias de outras células sanguíneas e células endoteliais (George et al., 1982; Caby et al., 2005).

Os exossomas são mais homogêneos e mais pequenos que as MVs, apresentam um diâmetro de cerca de 40-100 nm, e são libertados a partir de muitos tipos diferentes de células do corpo, tais como os glóbulos vermelhos, plaquetas, linfócitos, células dendríticas e células tumorais (Hendix *et al.*, 2010; Thery *et al.*, 2009). Ao contrário das MVs, os exossomas são derivados dos compartimentos internos endo-lisossomais de células. EMVs foram detetados no sistema circulatório (plasma) e em vários fluídos corporais, especialmente soro e plasma sanguíneo, urina, secreções broncoalveolar, muco, saliva, bÍlis, ascite, fluido cérebroespinal e leite materno (Admyre *et al.*, 2007; Caby *et al.*, 2005; Masyuk *et al.*, 2010; Palanisami *et al.*, 2010; Pisitkun *et al.*, 2004; Rupp *et al.*, 2011; Thery, 2011). A sua composição é heterogênea, uma vez que depende do tipo de célula a partir da qual são originários. A composição diferenciada de EMVs provenientes de diversos fluídos corporais é um pré-requisito para a sua potencialidade como biomarcadores de estados patológicos. Atualmente, os mecanismos moleculares relativos à biogênese de EMVs permanecem por esclarecer.

Para a caracterização da sua composição e função é importante distingui-los de outras vesículas membranares de maiores dimensões, nomeadamente os corpos apoptóticos que são libertados sob estÍmulos apoptóticos. As células que sofrem apoptose fracionam o seu conteúdo celular em corpos apoptóticos sub-celulares de

forma a prevenirem possíveis fugas de conteúdos tóxicos ou imonogênicos para a matriz extracelular (Doonan and Cotter, 2008). Os corpos apoptóticos representam um grupo heterogêneo de vesículas, com tamanhos que variam entre 50 nm e 5 µm (Cline et al., 2004; Hristov et al., 2004; Thery et al., 2009; Xie et al., 2009). Devido ao seu conteúdo celular específico e elevada densidade, podem ser distinguidos de outras duas populações de vesículas (MVs e exossomas), as quais apresentam uma maior sobreposição ao nível da sua composição (Figura 4). Para evitar confusão e promover a uniformização da nomenclatura, o termo microvesícula será usado neste texto para denominar esta população de vesículas.

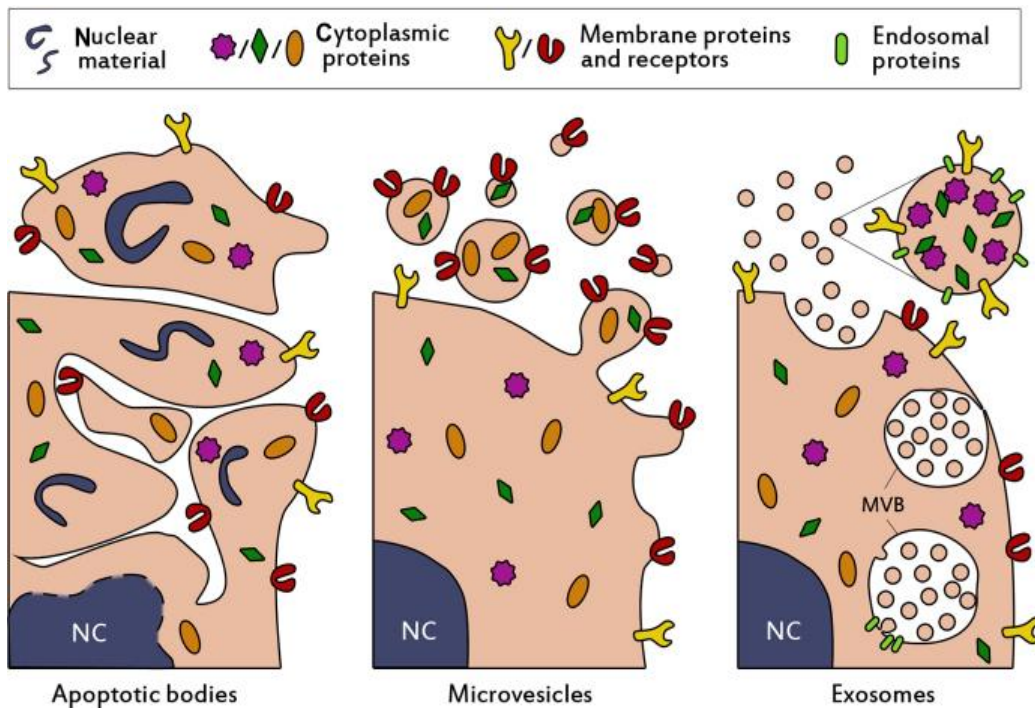


Fig. 4 – Representação esquemática da composição das três classes principais de vesículas extracelulares. (Figura adaptada de Kooijmans, 2012). Os corpos apoptóticos são formados quando as células entram em apoptose e podem ter conteúdo nuclear como histonas e DNA. As microvesículas são formadas por brotamento/gemulação e subsequente fissão da membrana plasmática. A incorporação seletiva de proteínas membranares e citossólicas ocorre durante a sua formação, resultando em vesículas que podem ser enriquecidas em proteínas e lípidos específicos típicos da célula de origem. No caso dos exossomas, que são originados por brotamento/gemulação da membrana limitante de estruturas endossômicas denominadas de corpos multivesiculares (MVBs), ocorre enriquecimento

seletivo do seu conteúdo ao longo da sua formação. A fusão de MVBs com a membrana plasmática resulta na libertação dos exossomas.

Tal como referido anteriormente, a principal diferença entre exossomas e microvesículas reside no seu processo de formação. O mecanismo de formação de MVs e endossomas está ilustrado na Figura 5. As microvesículas desenvolvem-se como botões na membrana plasmática e são depois libertadas para o exterior por um mecanismo dependente de cálcio e do citoesqueleto (Figura 5A). Por outro lado, a partir de membranas intracelulares, pode ocorrer a libertação de endossomas para o espaço luminal e a subsequente formação de corpos multivesiculares (MVB), os quais são, posteriormente, libertados para o espaço extracelular. (Figura 4B). Assim, enquanto que os exossomas crescem para o interior de endossomas, as microvesículas crescem para o exterior a partir da membrana plasmática. Na prática, a maioria dos estudos de MVs examina populações mistas contendo os dois tipos de vesículas; poucos estudos apresentam a distinção rigorosa entre os dois grupos.

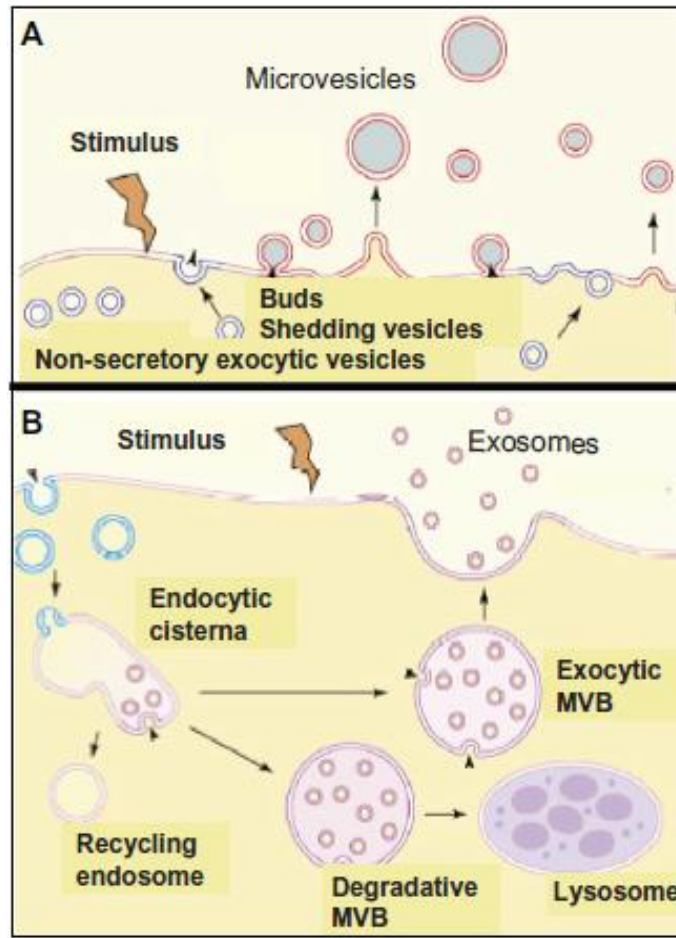


Fig. 5 – Mecanismos moleculares de libertação de exossomas. (Figura adaptada de Muller 2012a). (A) Envolve o desprendimento e posterior brotamento das áreas especializadas da membrana plasmática a partir das células dadoras. (B) Envolve a exocitose, ou seja, a fusão com a membrana plasmática, de corpos multivesiculares (MVBs exocíticos) que escapam à degradação por MVBs e lisossomas.

Em teoria, os exossomas e microvesículas distinguem-se pela sua origem, mas na prática tal distinção raramente é possível. Consequentemente, torna-se necessário caracterizar e separar as duas populações com base em características fenotípicas, tais como tamanho, morfologia e composição de proteínas e lípidos.

Relativamente à composição lipídica, os exossomos possuem altos níveis de esfingomiélinas e colesterol, independentemente da fonte celular (Subra et al., 2007). No entanto, no caso da fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, existem diferenças assinaláveis na composição dos exossomas dependendo da fonte celular, em particular

quanto à natureza do ácido gordo saturado (Laulagnier et al., 2004a). O enriquecimento da membrana em colesterol confere rigidez à estrutura membranar e, conseqüentemente, um elevado nível de estabilidade aos exossomas. De facto, resultados de estudos in vivo sugerem que os exossomas permanecem perfeitamente funcionais nos compartimentos periféricos (Luketic et al., 2007). Para além disso, domínios lipídicos semelhantes parecem estar presentes nas membranas de diferentes exossomas, muito provavelmente devido ao teor elevado em colesterol e esfingomielinas e sua associação em *lipid rafts* (De Gassart et al., 2003).

A tecnologia atualmente disponível para a análise de EMVs baseia-se na análise da sua composição bioquímica recorrendo a uma abordagem transcriptómica, proteómica e lipidómica, na determinação do tamanho, massa e morfologia, na caracterização da sua origem celular e na análise por citometria de fluxo (Cheruvanky et al., 2007; Conde-Vancells et al., 2010; Freyssinet, 2003; Gonzales et al., 2009; Hugel et al., 2005; Miranda et al., 2010; Moon et al., 2011; Morel et al., 2004, Orozco and Lewis, 2010; They et al., 2002, Van der Pol et al., 2010). No futuro, será importante aumentar o poder discriminatório de EMVs com vista à análise de padrões multidimensionais que reflitam a composição global de uma determinada espécie de EMV. Este elevado grau de definição do EMV pode ser conseguida com a metodologia nanoparticle tracking, a qual já é atualmente utilizada para a análise de macromoléculas complexas, pequenas vesículas, superfícies celulares e microorganismos (Anslyn e Rotello, 2010; Miranda et al., 2010; Müller, 2011; Müller, 2012b; Müller, 2012c; Dragovic, 2011).

3. Papel biológico de MVs / Exossomas

Tal como referido anteriormente, as células comunicam por processos de transferência através da membrana, incluindo a secreção de vesículas de membrana, que ocorre na maioria das células normais e que podem ser detetadas na maioria dos fluídos corporais (Simons and Raposo, 2009). Essas vesículas são componentes-chave na transferência de informação entre as células, exercendo os seus efeitos biológicos de uma forma pleiotrópica através de: ativação direta de recetores de superfície celular em

células alvo, transferência de receptores da célula de origem para a célula recetora, e transferência de efetores, tais como oncogenes, fatores de transcrição ou de partículas infecciosas (Camussi et al., 2011).

Na Figura 6 é ilustrado o mecanismo molecular que deverá estar envolvido na transferência de EMVs do meio extracelular para as células recetora. (Figura 6).

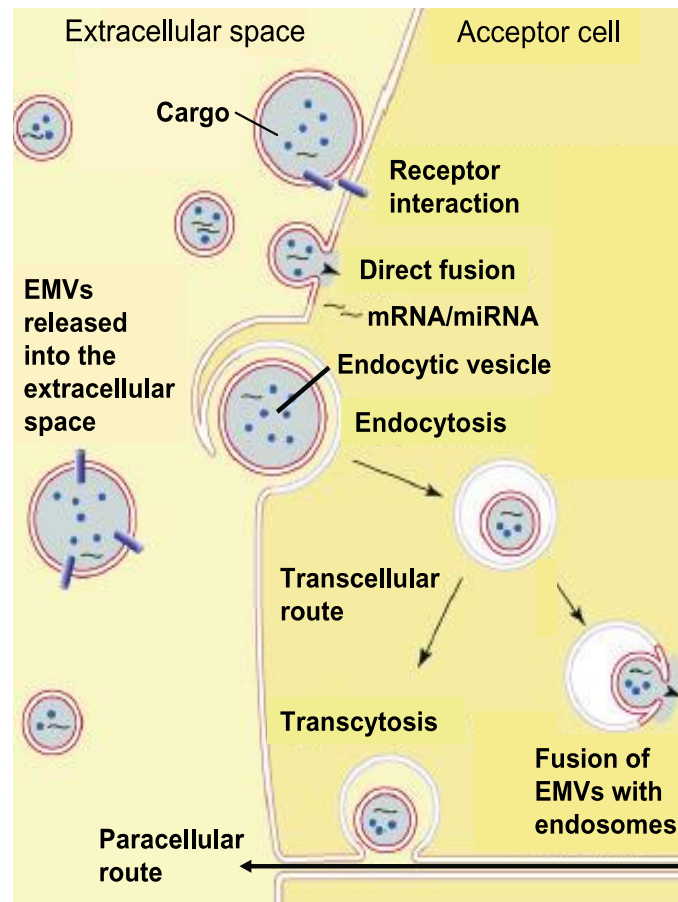


Fig. 6 – Hipótese atual para os diferentes modos de interação de EMVs libertados por células dadoras para o espaço extracelular de células aceitadoras alvo (Figura adaptada de Müller, 2012a). Este mecanismo pode envolver interação com o recetor, fusão direta ou endocitose. Após fusão da membrana vesicular endocítica com a membrana EMV, os componentes do EMV são transferidos para o citoplasma da célula aceitadora. Em alternativa, em células epiteliais e endoteliais polarizadas, a vesícula endocítica pode sofrer transcitose e fundir-se com a membrana basolateral. Este caminho transcelular define a via de transporte de EMVs libertados de células de tecidos para o fluído corporal.

Os exossomas podem interagir com as células através de, pelo menos, dois mecanismos: interação ligando – receptor (isto é, os ligandos e recetores de morte: FasL / Fas ou TRAIL / TRAIL- R) e fusão do exossoma com a membrana da célula alvo e subsequente absorção do conteúdo do exossoma pela célula recetora (Figuras 7A e 7B) (Fais, 2012).

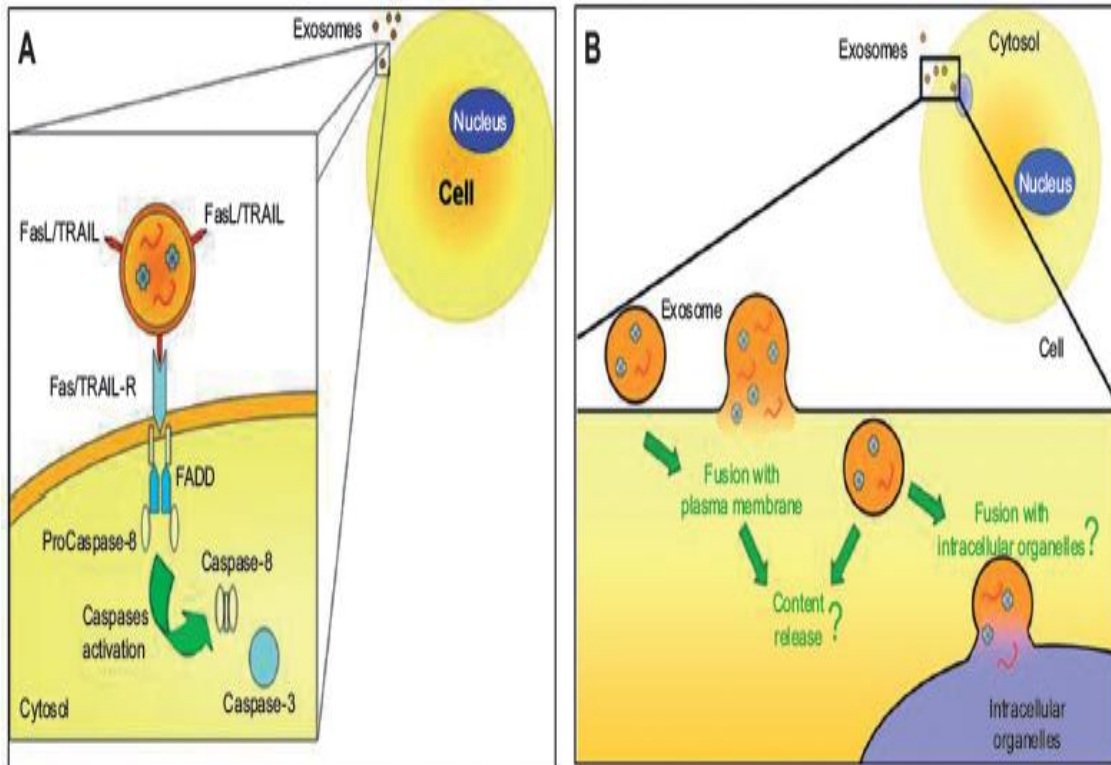


Fig. 7 – Exossomas em interação com as células. (Figura adaptada de Fais, 2012). (A) Interação ligando-receptor; (B) Fusão do exossoma com a membrana da célula alvo e subsequente absorção do conteúdo exossomal pela célula.

Por exemplo, MVs derivadas de plaquetas são capazes de interagir com recetores expressos nas plaquetas e macrófagos, proporcionando uma superfície para a montagem de fatores de coagulação (Polgar et al., 2005). Da mesma forma, as MVs ativam diretamente células endoteliais através de lípidos bioativos (Barry et al., 1997). Além disso, muitos estudos recentes sugerem que as vesículas de membrana e, em particular, os exossomas, desempenham um papel crucial na transmissão de RNA entre as células

(Aliotta et al., 2010; Baj-Krzyworzeka et al., 2006; Collino et al., 2010; Deregibus et al., 2007; Ratajczak et al., 2006; Skog et al., 2008; Valadi et al., 2007), nomeadamente micro-RNAs (miRNAs) reguladores que induzem o silenciamento genético em células recetoras.

A maioria das células liberta MVs e exossomas que podem permanecer na proximidade das células de origem ou integrar fluídos biológicos, o que permite a troca de informações a longa distância.

4. EMVs como biomarcadores de processos patológicos

Uma variedade de células liberta vesículas de membrana que se fundem com as células vizinhas, transferindo assim o conteúdo da membrana e citoplasma de uma célula para a outra. Quando derivadas de tumores ou células infetadas, as vesículas de membrana contêm componentes normais e anormais, por exemplo, oncoproteínas ou partículas infecciosas, respetivamente. Através da fusão das partículas com as células saudáveis, os agentes originadores de doenças podem ser espalhados localmente. Presentemente, as funções fisiológicas e patológicas das MVs ainda não são compreendidas na sua globalidade. No entanto, em virtude das suas características, estas vesículas multifacetadas são cada vez mais exploradas como uma fonte primordial de potenciais biomarcadores para uma ampla gama de distúrbios diferentes, uma vez que são facilmente obtidas a partir de fluídos biológicos, e muito provavelmente contêm uma composição única em proteínas e RNA e que reflete a célula de origem e, subsequentemente, o seu estado de saúde ou de doença.

De facto, vários estudos suportam a noção de que os EMVs podem ser utilizados como biomarcadores preditivos, de elevada probabilidade, de várias condições patológicas. Esta noção é fundamentada nas seguintes observações: na constituição dos EMVs podem estar presentes biomarcadores genotípicos, biomarcadores de citocinas, proteínas sinalizadoras, recetores, transportadores e enzimas; desempenham função na transferência de informação intercelular (mRNAs, miRNAs, proteínas e fosfolípidos) em diversos processos patogénicos; exibem sensibilidade a estímulos ambientais, os

quais poderão desencadear a sua libertação das células dadoras de tecidos e órgãos para a circulação; a sua presença no plasma possibilita o desenvolvimento de metodologias analíticas simples em amostras biológicas de grande acessibilidade (fluídos corporais), não necessitando do recurso a metodologias invasivas para a recolha dessa amostra; são identificáveis e isoláveis com base em propriedades típicas intrínsecas e bem definidas, tais como o conteúdo em fosfatidilserina, tamanho e coeficiente de sedimentação; podem ser específicos no que diz respeito à expressão de padrões específicos marcadores (*cell-lineage markers*); e podem ser libertados numa fase inicial da doença (Muller, 2012a).

Tendo como base as especificidades estruturais e funcionais dos EMVs, parece razoável assumir que esta sua função biomarcadora deverá ser caracterizada por um valor preditivo maior (comparado com o de biomarcadores genotípicos) e mais precocemente aferível (quando comparados com biomarcadores fenotípicos) ao longo das diferentes fases da doença, desde a fase de iniciação até ao desenvolvimento, diagnóstico, progressão e resultado final.

Para além do sangue, a urina é uma fonte de EMVs provavelmente originários de células epiteliais. Os EMVs urinários, a maioria dos quais parecem ser exossomas, possuem a vantagem de poderem ser obtidos a partir de uma colheita simples e não invasiva (Cheruvanky *et al.*, 2007; Miranda *et al.*, 2010). A investigação sobre a sua composição recorrendo a uma abordagem proteómica mostrou a presença, em EMVs urinários, e não em EMVs de outras origens, da aquaporina-2 (Conde-Vancells *et al.*, 2010; Gonzales *et al.*, 2009). Desta forma, EMVs positivos para a aquaporina podem ser úteis como biomarcadores da disfunção renal.

O potencial terapêutico de vesículas de membrana foi também recentemente explorado no campo da medicina regenerativa. Um número crescente de estudos sugere que MVs e exossomas secretados por células estaminais mesenquimais, células estaminais hematopóéticas do progenitor, e células estromais multipotentes possuem propriedades citoprotectoras mediadas pela inibição da apoptose ou pela estimulação da proliferação de células residentes e da neovascularização (Lai *et al.*, 2010; Ratajczak *et al.*, 2012).

Tal como referido anteriormente, as microvesículas são vesículas membranares (~1 µm de diâmetro) libertadas pela superfície da célula para a vizinhança e para a circulação sanguínea em resposta a ação de fatores químicos ou físicos, muitas vezes indutores de apoptose celular. Estas micropartículas, detetáveis no sangue sob condições fisiológicas normais, apresentam uma sobreexpressão em casos de cancro, inflamação, doença cardiovascular, diabetes e pré-eclâmpsia (Simak e Gelderman, 2006; Piccin et al., 2007). Estes e outros resultados sugerem, assim, um novo mecanismo de transmissão intercelular que poderá ser importante na patogénese de doenças, incluindo o desenvolvimento de tumores, infeções virais, doenças neurológicas e doenças metabólicas. Algum destes aspetos serão abordados nas próximas secções do presente trabalho.

5. Papel fisiopatológico dos EMVs na doença oncológica

A libertação de MVs de células cancerosas, derivadas de pacientes com doença de Hodgkin já tinha sido observada nos anos de 1970 (Friend et al., 1978). Desde então, um esforço considerável tem sido feito para utilizar MVs como marcadores de diagnóstico e/ou de prognóstico. Vários estudos sugerem que as MVs podem ser encontradas nas secreções de células malignas e detetados no soro e na urina de pacientes com cancro (Mitchell et al., 2009).

A estratégia de utilização de MVs como biomarcadores podem ser dividida em três grupos de acordo com os metabolitos testados: (i) Quantidade de MVs, (ii) Composição em proteínas de MVs, e (iii) Composição em miRNA ou RNAm de MVs (Tabela 1). Uma vez que o método baseado em PCR (*polymerase chain reaction*) quantitativo é altamente sensível e específico, o diagnóstico baseado na deteção de miRNA em amostras de soro representa uma abordagem sensível e potencialmente interessante para a deteção da doença oncológica na fase inicial.

Tabela 1 – Papel biomarcador de MVs presentes em fluídos biológicos.

	Tipo de amostra	Marcador	Doença
Quantidade de MVs	Plasma	Nível PMPs	Cancro gástrico
	Soro	Nível PMPs	Cancro prostata
	Plasma	SNX25, BTG1, PEDF, <i>thrombospondin 2</i> , etc.	Cancro nos ovários, cancro no peito, cancro no pulmão
	Ascite	Fetúina-A	Lesão renal aguda
	Soro	Fator tecidual, MUC1	Cancro da mama e cancro pancreático
	Soro	CD24, EpCAM	Cancro nos ovários
	Soro	EPS8L2, <i>mucin 4</i>	Cancro na bexiga
	Soro	CD63, <i>caveolin-1</i>	Melanoma
	Soro	Fator tecidual	Cancro geral
	Soro	Várias proteínas	Cancro colorectal
Expressa miRNA ou Mrna	Soro	CD24, EpCAM	Cancro da mama
		EGFRvIII, perfil miRNA específico	Giloblastoma
	Soro	MAGE-1,HER-2/neu	Cancro gástrico

Tabela adaptada de Ohno *et al.*, 2012; BTG1, *B-cell translocation gene 1 protein*; EGFR, *Epidermal growth factor receptor*; EpCAM, *epithelial cell adhesion molecule*; EPS8L2, *Epidermal growth factor receptor*; HER-2/neu, *Member of the epidermal growth factor receptor family*; MAGE-1, *Tumor-specific antigen*; MUC1, *Mucin 1*; PEDF, *Pigmented epithelium-derived factor*; PMP, *Platelet-derived microparticles*; SNX25, *Sortin nexin 25*.

Vários estudos sugerem que os níveis de MVs derivados de plaquetas circulantes podem correlacionam-se com o prognóstico de alguns tipos de cancro (Helley *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2003). A análise proteómica de MVs urinários permitiu a identificação de 8 proteínas que são potenciais biomarcadores de cancro da bexiga (Smalley *et al.*, 2008). A composição de proteínas das MVs pode, por estes motivos, ser útil para a deteção precoce de vários tipos de cancro. Inclusivamente, estudos recentes indicam que MVs de doentes com cancro apresentam padrões específicos de mRNA e miRNA.

Em muitos casos, os efeitos imunológicos de MVs dependem da presença de ligandos de superfície celular e recetores, de forma a refletir a relação entre a célula produtora de MVs e a célula imune. No que diz respeito à investigação do cancro, Al-Nedawi e colaboradores, em 2008, mostraram que o recetor EGFRvIII oncogénico é transferido por MVs derivadas de células tumorais. Este foi o primeiro estudo que revelou que a atividade oncogénica pode ser transferida entre as células por meio da fusão de MVs. As MVs têm muitas características em comum com os vírus como, por exemplo, a composição em lípidos e proteínas, uma vez que os retrovírus e MVs utilizam a mesma via de tráfico intracelular. Desta forma, a investigação em MVs encontra-se mais avançada na área dos tumores com origem retroviral.

Vários estudos têm demonstrado que MVs de plaquetas, células endoteliais e de tumores expressam moléculas de adesão que possuem fatores de crescimento e metaloproteinases (MMP), as quais são requisitos essenciais para a angiogénese (Figura 8). Adicionalmente, os tumores humanos libertam microvesículas que transportam moléculas imunologicamente bioativas e que, conseqüentemente, podem originar a imunossupressão. As microvesículas libertadas por tumores modificam a função mielóide das células, ao alterar a diferenciação de monócitos em células dendríticas e promover a geração de um subconjunto de células mielóides imunossupressoras (Valenti et al., 2006). Este mecanismo foi observado no caso de microvesículas libertadas pelo melanoma humano e por células do carcinoma colorretal, em que a imunossupressão favorece o crescimento do tumor (Valenti et al., 2007).

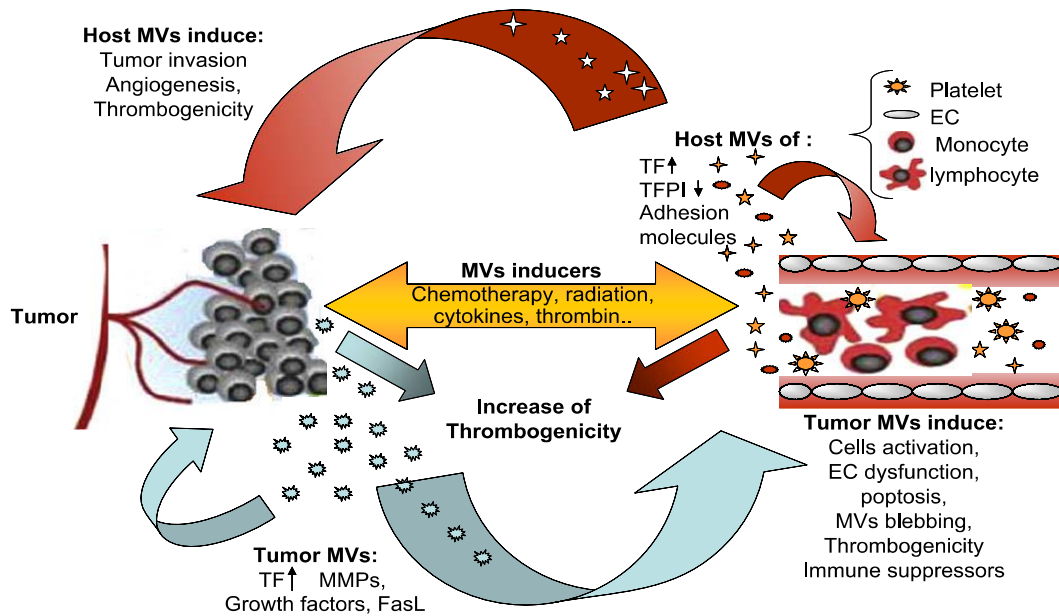


Fig. 8 – O papel das microvesículas (MVs) no cancro (Figura adaptada de Aharon and Brenner, 2009). Exposição da célula a quimioterapia, radiação, citocinas e trombina resulta na liberação de MVs de células tumorais, e das células hospedeiras. MVs tumorais expressam níveis elevados de fator tecidual (TF, ou CD142), fatores de crescimento, metaloproteínas de matriz (MMPs) e ligando Fas (FasL), com efeitos autócrinos e parácrinos. Microvesículas de tumor induzem disfunção em células endoteliais (CE), apoptose de linfócitos e CE, o que resulta no aumento de trombogenicidade, imunossupressão, e liberação de MVs a partir de uma variedade de células incluindo plaquetas, CEs, monócitos e linfócitos. Essas MVs possuem proteínas de coagulação e de adesão, bem como fatores de crescimento, que suportam as células tumorais e apoiam a angiogênese.

6. EMVs como biomarcadores de doenças metabólicas

No âmbito da investigação sobre os mecanismos patogénicos da diabetes mellitus tipo II, a existência de biomarcadores desta doença tem sido intensivamente analisada. Esta doença metabólica tem sido relacionada com a acumulação anormal de triacilglicerídeos, a qual é potenciada pela ingestão em excesso de compostos de elevado teor energético e gasto insuficiente de energia. Este síndrome metabólico, caracteriza-se pela resistência à insulina devido a uma redução considerável no número de células β pancreáticas funcionais, conduzindo ao aumento do nível de glicose

circulante e subsequentemente a obesidade (Doria *et al.*, 2008; Samuel e Shulman 2012; Staiger *et al.*, 2009).

Os níveis de EMVs são correlacionados positivamente com diabetes tipo-II e obesidade e, em particular, acompanham ou induzem o desenvolvimento de complicações associadas a estas duas doenças. Esta observação é fundamentada pela identificação de diferenças quantitativas de EMVs em diversos modelos de doenças em animais; detecção de alterações em níveis de EMVs que ocorrem imediatamente antes do aparecimento de sintomas de aterosclerose e diabetes; modulação diferencial do padrão EMVs no decurso do tratamento farmacológico. E, de facto, estudos recentes sugerem que a libertação de EMVs de grandes adipócitos dadores e/ou a sua fusão com pequenos adipócitos recetores dentro de depósitos de tecido adiposo pode ser usada como uma ferramenta biomarcadora para a previsão do estado lipogénico/adipogénico desse tecido adiposo e, no caso de EMVs libertados desses depósitos para a circulação, de todo o organismo (Younus, 2011). Estudos epidemiológicos demonstraram, ainda, que o nível de um conjunto de adipocinas pró-inflamatórias tais como interleucina-1/6 (IL-1/6), factor- α de necrose tumoral (TNF α), adiponectina, ferritina, e proteína C-reativa (CRP) se correlacionam positivamente com o grau de resistência à insulina bem como com o excesso de massa do tecido adiposo (Duncan *et al.*, 2003, Pradhan *et al.*, 2001). Estas alterações têm sido, por isso, considerados biomarcadores preditivos para a diabetes mellitus tipo II (Buijsse, 2011; Lango, 2008; Van Hoek *et al.*, 2008). O potencial de miRNA associado a EMVs como marcadores de diabetes mellitus tipo II pode ser indiretamente inferido pelos múltiplos papéis do miRNA na regulação do metabolismo de lípidos e da glucose.

Atualmente, a previsão do desenvolvimento de uma doença metabólica, numa fase anterior ao seu diagnóstico (tipicamente 5 a 10 anos para diabetes mellitus tipo II), assim como o diagnóstico e prognóstico definitivos, são baseados na determinação do nível de parâmetros típicos, segundo procedimentos simples e em amostras biológicas facilmente acessíveis, geralmente o soro, tais como metabolitos de hidratos de carbono e lípidos (glucose, triacilglicerol, colesterol, e lipoproteínas), pequenas moléculas intermediárias do metabolismo (2-hidroxiacetato) e pequenos metabolitos (creatinina), assim como proteínas (hemoglobina glicosilada HbA_{1c}) (Colagiuri, 2012; Lipska *et al.*, 2011, Lyons *et al.*, 2012; Herder, 2011; Rhee and Gerszten, 2012). Na prática clínica, a

quantificação destes biomarcadores, conhecidos por biomarcadores tradicionais, permitem prever, em conjunto, a diabetes mellitus tipo-II com uma probabilidade de cerca de 0.65-0.75 (em que 0.5 representa a probabilidade inicial). Adicionalmente, a análise conjunta com a informação relativa a parâmetros corporais (IMC, ratio cintura/anca, sexo) assim como ao estado de saúde e estilo de vida dos sujeitos em estudo (pressão sanguínea, hábito tabagista, prática regular de exercício físico, dieta alimentar) pode aumentar a probabilidade de prever a doença para cerca de 0.85-0.90 (Schulze, 2009).

As evidências experimentais atualmente disponíveis apontam fortemente para a potencialidade da utilização de EMVs como biomarcadores, em particular os que são libertados para o plasma e urina, como biomarcadores específicos para a patogénese de diabetes mellitus tipo II (Müller, 2010; Nathan, 2009). Neste domínio, será importante a deteção e caracterização de EMVs originários de tecidos relevantes para a doença e libertados para fluidos corporais acessíveis, e cujo nível se encontre aumentado na fase assintomática pré-diabética (Müller, 2010; Nathan *et al.*, 2009). Potenciais candidatos para células/tecidos dadores de EMVs são os ilhéus pancreáticos, em particular células- β , o músculo esquelético, o tecido adiposo, células musculares lisas, as células endoteliais vasculares e os macrófagos. O desafio no futuro será a identificação do padrão de EMVs que é específico das células/tecidos envolvidos na patogénese da diabetes mellitus tipo II e/ou que refletem as fases evolutivas da doença.

Até agora a obesidade tem sido estudada do ponto de vista termo-energético, tendo em conta o desequilíbrio entre o gasto e consumo de energia que é determinado por relações complexas entre mutações genéticas e estilo de vida. Relativamente à associação de mutações genéticas com a obesidade é de esperar consideráveis desenvolvimentos nos próximos anos. Recentemente, foram identificados defeitos genéticos associados à obesidade, entre os quais se incluem as mutações no gene da leptina, no recetor da melanocortina-4, na enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol e no PPAR gama (*Peroxisome proliferator-activated receptor*), um fator de transcrição (Hugel 2005, Freyssinet 2003, Morel 2004 and Thery 2002). Esta informação acresce à noção de que a nutrição materna ou estilo de vida perinatal pode alterar a programação de desenvolvimento do feto (Heerwagen et al., 2010). Em contraste, o papel de ambientes adversos (nutrição, atividade física, stress celular,

farmacoterapia) no decorrer do crescimento pós-nascimento e vida adulta, na modificação de padrões epigenéticos, continua a ser matéria de debate. De facto, o possível envolvimento de mecanismos epigenéticos tem começado a captar a atenção dos cientistas. Assim sendo, alterações no padrão de metilação de histonas resultantes de vários fatores ambientais e da dieta podem justificar um aumento do nível da adipogénese e diferenciação de adipócitos, explicando a diferente suscetibilidade de indivíduos geneticamente semelhantes ao desenvolvimento de obesidade (Campion *et al.*, 2009; Cho *et al.*, 2009; Ge, 2012; Heerwagen *et al.*, 2010, Musri *et al.*, 2009; Musri *et al.*, 2010; Pereira, 2012; Stöger, 2008). O avanço do conhecimento nestes domínios também poderá ajudar a prevenir e/ou controlar a obesidade associada à diabetes mellitus tipo II.

7. EMVs como biomarcadores de doenças neurodegenerativas

A proteína priónica é um patogénio não-viral infeccioso que causa a doença de Kuru e a doença de Creutzfeldt-Jakob em humanos, tremor epizoótico em ovinos e encefalopatia espongiforme bovina em bovinos (Harris 1999; Prusiner *et al.*, 1998; Harris 1999). A proteína priónica PrP^{sc} (caracterizada por um enrolamento anormal) catalisa a conversão de proteína priónica normal (PrP^c) para PrP^{sc}, e a sua acumulação no sistema nervoso central origina o aparecimento da doença. No entanto, os mecanismos subjacentes à transferência de PrP^{sc} a partir do trato gastrointestinal para o cérebro por meio de intermediários de células imunes não foram ainda elucidados. Fevrier, em 2004, sugeriu que os exossomas associados a PrP^{sc} são segregados a partir de células infetadas e podem contribuir para a propagação do prião.

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurológica associada à perda progressiva de memória e das capacidades cognitivas resultante do excesso de neurodegeneração (Mattson, 2004). A principal causa da DA é a acumulação de β -amilóide (A β), existem dados que apontam para o facto dos exossomas associados a A β estarem envolvidos na sua acumulação (Rajendran, 2006). De facto, os avanços observados ao nível de RNAi abriram novos caminhos para o tratamento de várias doenças, em particular as doenças neurodegenerativas como, por exemplo, a DA para a

qual os tratamentos convencionais ainda não apresentam o grau de eficácia pretendido. Sendo veículos de entrega de material genético naturais e imunologicamente inertes se derivados de fontes adequadas, MVS/exossomas representam entidades bem adaptadas para a entrega de RNAi. Deste modo, exossomas carregados com siRNA terapêutico podem ser um meio adequado e eficaz para promover a resposta de RNAi no cérebro, sem quaisquer efeitos colaterais adversos. Em última análise, o cumprimento deste potencial depende do desenvolvimento das nanotecnologias adequadas para a produção e direcionamento deste tipo de exossomas.

Capítulo III – Conclusões e perspectivas futuras

Exossomas e microvesículas estão envolvidos numa grande variedade de processos fisiológicos. Como estes sistemas são portadores de informação genética e proteômica, é provável que desempenham um papel importante na comunicação intercelular. A função fisiológica de EMVs é provavelmente a sinalização intercelular através de interações específicas com as células alvo e a transferência de informação biológica sob a forma de proteínas solúveis, mRNAs, miRNAs e fosfolípidos. Desta forma, os EMVs podem participar em processos patogénicos, tais como o desenvolvimento de doenças oncológicas, metabólicas, ou neurodegenerativas. Detalhes sobre o padrão molecular de espécies distintas de EMVs podem permitir a identificação da sua origem celular e contribuir para a elucidação de novos alvos para fármacos. Um número cada vez maior de evidências experimentais apontam para a possibilidade dos EMVs poderem oferecer informação preditiva importante para o diagnóstico e prognóstico dessas doenças. Deste ponto de vista, a possibilidade de deteção de EMVs em fluídos corporais torna-os bastante atrativos. A sua quantidade, origem celular, composição e função parecem depender e correlacionar-se com fases individuais da doença.

Outra linha de investigação está relacionada com EMVs derivados de células estaminais. Vários estudos demonstram que este tipo de EMVs pode ser explorado em medicina regenerativa para reparar tecidos danificados. Um estudo recente de Chen e colaboradores (2011) sugere que células tronco mesenquimais derivadas células embrionárias humanas representam uma fonte robusta e reprodutível para a produção de exossomas terapêuticos utilizados em medicina regenerativa. Logo, estas células podem ser úteis para a produção em grande escala de exossomas orientados para o uso na entrega de RNAi, ou de outras espécies moleculares.

No entanto, o papel fisiológico das MVs ainda não é completamente conhecido. Mais estudos serão necessários para ajudar a caracterizar e classificar as MVs. Estas vesículas não só representam alvos clínicos promissores, como também potenciais sistemas de transporte e distribuição de fármacos. Possuem igualmente um grande potencial como biomarcadores de diagnóstico e de prognóstico de doenças de diferente

etiologia, algumas das quais são mundialmente muito frequentes. A introdução de mecanismos de detecção que possibilitem a identificação de padrões de EMVs, caracterização e monitorização de EMVs no plasma (e noutros fluídos corporais), relevantes para a patogénese de doenças deverá, por isso, ser intensificada no futuro. É ainda esperado que a investigação neste âmbito contribua para a melhoria da medicina preditiva, da atividade de diagnóstico e de prognóstico, e ainda para a identificação de novas abordagens terapêuticas. Finalmente, deve salientar-se que um dos principais desafios no futuro será efetuar o rastreio completo dos perfis proteicos e de RNA de exossomas humanos e avaliar a sua toxicidade e perfil de imunogenicidade, antes de transferir estas nanovesículas em vetores de entrega de RNAi clinicamente viáveis, nomeadamente para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

Referências Bibliográficas

Admyre C, Johansson S.M, Qazi K.R, Filen J.J, Lahesmaa R, Norman M, Neve E.P, Scheynius A, Gabrielsson S. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk, *J. Immunol.* 179 (2007) 1969–1978.

Aharon A, Brenner B. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 22 (2009) 61–69.

Aliotta J.M, Pereira M, Jonhson K.W, De Paz N, Dooner M.S, Puente N, Ayala C, Brilliant K, Berz D, Lee D, Ramratnam B, McMillan P.N, Hixson D.C, Josic D, Quesenberry P.J. Microvesicle entry into marrow cells mediates tissue-specific changes in mRNA and induction of transcription, *Exp. Hematol.* 38 (2010) 233-245.

Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells, *Nat Cell Biol.* 10 (2008) 619-624.

Anslyn EV, Rotello VM. Chemosensory models: approaches and applications of differential sensing. *Curr Opin Chem Biol.* (2010); 14: 683–684.

Antwi-Baffour S, Kholia S, Aryee YK, et al. Human plasma membrane-derived vesicles inhibit the phagocytosis of apoptotic cells – possible role in SLE. *Biochem Biophys Res Commun.* (2010); 398 (2): 278–283.

Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Weglarczyk K, Baran J, Urbanowicz B, Branski P, Ratajczak M.Z, Zembala M. Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes, *Câncer Immunol. Immunother.* 55 (2006) 808-818.

Barry O.P, Pratico D, Lawson J.A, FitzGerald G.A. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles, *J. Clin. Invest.* 99 (1997) 2118-2127.

Biomarker definitions working groups. Biomarkers and Surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* (2002); 69: 89-95.

Buijsse B, Simmons RK, Griffin SJ, Schulze MB. Risk assessment tools for identifying individuals at risk of developing type 2 diabetes. *Epidemiol Rev.* (2011); 33:46–62.

Caby M.P, Lankar D, Vinceudeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma, *Int. Immunol.* 17 (2005) 879-887.

Camussi G, Deregibus M.C, Bruno S, Grange C, Fonsato V, Tetta C, Exosome/microvesicles-mediated epigenetic reprogramming of cells, *Am. Res* 1 (2011) 98-110.

Campion J, Milagro FI, Martinez JA. Individuality and epigenetics in obesity. *Obesity Rev.* (2009); 10:383–392.

Chen T.S, Arslan F., Yin Y, Tan S.S, Lai R.C, Choo A.B, Padmanabhan J, Lee C.N, De Kleijn D.P, Lim S.K. Enabling a robust scalable manufacturing process for therapeutic exosomes through oncogenic immortalization of humanESC-derived MSCs, *J. Transl. Med.* 9 (2011) 47.

Cheruvanky A, Zhou H, Pisitkun T, et al. Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator. *Am J Physiol Renal Physiol.* (2007); 292 (5) : F1657–F1661.

Cho Y-W, Hong SH, Jin Q, et al. Histone methylation regulator PTIP is required for PPAR γ and C/EBP α expression and adipogenesis. *Cell Metab.* (2009); 10:27–39.

Cline AM, Radic MZ. Apoptosis, subcellular particles, and autoimmunity. *Clin Immunol.* (2004); 112 (2): 175–182.

Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* (2008); 19:43–51.

Colagiuri S. Optimal management of type 2 diabetes: the evidence. *Diabetes Obes Metab.* (2012); 14(Suppl 1): 3–8.

Collino F, Deregibus M.C, Bruno S, Sterpone L, Aghemo G, Viltono L, Tetta C, Camussi G. Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs, *PloS One* 5 (2010) e 11803.

Conde-Vancells J, Rodriguez-Suarez E, Gonzalez E. Candidate biomarkers in exosome-like vesicles purified from rat and mouse urine samples. *Proteomics Clin Appl.* (2010); 4: 416–425.

De Gassart A., Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* 102 (2003) 4336-4344.

Deregibus M.C, Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, Biancone L, Bruno S, Bussolate B, Camussi G. Endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA, *Blood* 110 (2007) 2440-2448.

Doonan F, Cotter TG. Morphological assessment of apoptosis. *Methods*. (2008); 44 (3): 200–204.

Doria A, Patti ME, Kahn CR. The emerging genetic architecture of type 2 diabetes. *Cell Metab*. (2008); 8: 186–200.

Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using nanoparticle tracking analysis. *Nanomedicine NBM*. (2011); 7: 780–788.

Duncan BB, Schmidt MI, Pankow JS, et al. Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes*. (2003); 52: 1799–1805.

Fais S, Logozzi M, Lugini L, Federici C, Azzarito T, Zarovni N, Chiesi A; Exosomes: the ideal nanovectors for biodelivery; (2012); 394(1): 1–15.

Fevrier B. Cells release prions in association with exosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci*. 101 (2004) 9683-9688.

Friend C, Marovitz W, Henie G, Tsuei D, Hirschhorn K, et al., Observations on cell lines derived from a patient with Hodgkin's disease, *Cancer res*. 38 (1978) 2581-2591.

Frank R, Hargreaves R. Clinical biomarkers in drug discovery and development. *Nature Drug Discov*. (2003); 2: 566-580.

Freyssinet JM. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost*. (2003); 1: 1655–1662.

Ge K. Epigenetic regulation of adipogenesis by histone methylation. *Biochim Biophys Acta*. (2012); 1819 (7): 727–732.

George J.N, Thoi L.L, McManus L.M, Reimann T.A. Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum, *Blood* 60 (1982) 834–840.

Gonzales PA, Pisitkun T, Hoffert JD, et al. Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. *J Am Soc Nephrol*. (2009); 20(2):363–379.

Harris D.A. Cellular biology of prion diseases, *Clin. Microbiol. Rev*. 12 (1999) 429-444

Heerwagen MJR, Miller MR, Barbour LA, Friedman JE. Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. (2010); 299: R711–R722.

Helley D, Banu E, Bouziane A, Banu A, Scotte F, Fischer A.M, et al., Platelet microparticles: a potential predictive factor of survival in hormone-refractory prostate

cancer patients treated with docetaxel-based chemotherapy, *Eur. Urol.* 56 (2009) 479-485.

Hendix A, Westbroek W, Bracke M, Wever OD, An ex(o)citing machinery for invasive tumor growth, *Cancer Res.* 70 (2010) 4793–4798.

Herder C, Karakas M, Koenig W. Biomarkers for the prediction of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Clin Pharmacol Ther.* (2011); 90: 52–66.

Hogan MC, Manganelli L, Woolard JR, et al. Characterization of PKD protein-positive exosome-like vesicles. *J Am Soc Nephrol.* (2009); 20: 278–288.

Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood.* (2004); 104 (9): 2761–2766.

Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet J-M. Membrane microparticles: Two sides of the coin. *Physiology.* (2005); 20:22–27.

Jorgensen JT, A challenging drug development process in the area of personalized medicine. *Drug Discov Today.* (2011); 16: 891-897.

Kooijmans S.A.A, et al. Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems. (2012):7 1525–1541

Kim H.K. Song K.S. Park Y.S, Kang Y.H, Lee Y.J, Lee K.R et al., Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor, *Eur. J. Cancer* 39 (2003) 184-191.

Lai R.C, Arslan F, Lee M.M, Sze N.S, Choo A, Chen T.S, Salto-Tellez M., Timmers L, Lee C.N, El Oakley R.M, Pasterkamp G, De Kleijn D.P, Lim S.K, Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury, *Stem Cell Cell Res.* 4 (2010) 214-222.

Lango H; UK Type 2 Diabetes Genetics Consortium, Palmer CN, et al. Assessing the combined impact of 18 common genetic variants of modest effect sizes on type 2 diabetes risk. *Diabetes.* (2008); 57: 3129–3135.

Lathia CD. Biomarkers and surrogate endpoints: How and when they might impact drug development. *Disease Markers.* (2002); 18: 83-90.

Laulagnier K, Grand D, Dujardin A, Hamdi S, Vincent- Schneider H, Lankar D, Salles J.P, Bonnerot C, Perret B and Record, M. (2004a). PLD2 is enriched on exosomes and its activity is correlated to the release of exosomes. *FEBS Lett.* 572, 11–14.

Laulagnier K, Motta C, Hamdi S, et al. Mast cell- and dendritic cell- derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem J.* (2004b); 380: 161–171.

Lee JM, Han JJ, Altwerger G, Kohn EC. Proteomics and biomarkers in clinical trials for drug development. *J Proteomics.* (2011); 74: 2632–2641.

Lipska KJ, Kosiborod M. Hypoglycemia and adverse outcomes: marker or mediator. *Rec Cardiovasc Med.* (2011); 12: 132–135.

Luketic L, Delanghe J, Sobol P.T, Yang P, Frotten, E, Mossman K.L, Gauldie J, Bramson J, and Wan Y. (2007). Antigen presentation by exosomes released from peptide- pulsed dendritic cells is not suppressed by the presence of active CTL. *J. Immunol.* 179, 5024–5032.

Lyons TJ, Basu A. Biomarkers in diabetes: hemoglobin A1c, vascular and tissue markers. *Transl Res.* (2012); 159: 303–312.

Manolis E, Vamvakas S, Isaac M. New pathways for qualification of novel methodologies in the European Medicines Agency. *Proteomics Clin Appl.* (2011); 5: 248-255.

Masyuk AI, Huang BQ, Ward C, et al. Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* (2010); 299: G990–G999.

Mattson M.P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease, *Nature* 430 (2004) 631-639.

Miranda KC, Bond DT, McKee M, et al. Nucleic acids within urinary exosomes/microvesicles are potential biomarkers for renal disease. *Kidney Int.* (2010); 78:191–199.

Miranda OR, Creran B, Rotello VM. Array-based sensing with nanoparticles: 'chemical noses' for sensing biomolecules and cell surfaces. *Curr Opin Chem Biol.* (2010); 14:728–736.

Mitchell P.J, Staffurth J, Court J, Mason M.D, Tabi Z et al., Can urinary exosomes act as treatment response markers in prostate cancer? *J. Transl. Med.* 7 (2009) 4.

Moon PG, You S, Lee JE, Hwang D, Baek MC. Urinary exosomes and proteomics. *Mass Spectrom Rev.* (2011); 30: 1185–1202.

Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol.* (2004); 11:156–164.

Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci.* (2010); 123(Pt 10):1603–1611.

Musri MM, Carmona MC, Hanzu FA, Kaliman P, Gomis R, Parrizas M. Histone demethylase LSD1 regulates adipogenesis. *J Biol Chem.* (2010); 285:30034–30041.

Musri MM, Gomis R, Parrizas M. A chromatin perspective of adipogenesis. *Organogenesis.* (2009); 6:15–23.

Müller G, Wied S, Dearey E-A, Wetekam E-M, Biemer-Daub G. Lipid storage in large and small rat adipocytes by vesicle-associated glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins results and problems in cell differentiation. In: Richter W, Beisiegel U, Joost G, Meyerhof J, editors. *Sensory and Metabolic Control of Energy Balance.* Berlin: Springer Press. (2010); 52: 27–34.

Müller G. Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy (2012a); 5 247–282

Müller G. (Glycosylphosphatidylinositol-based) protein chips and biosensors for biopharmaceutical process analytics. *J Bioprocess Biotech.* (2012b); 2: 115. doi: 10.4172/2155-9821.1000115.

Müller G. Glycosylphosphatidylinositol-anchored protein chips for patient-tailored multi-parameter proteomics. *J Biochip Tissue Chip.* (2011); S3:001. doi:10.4172/2153-0777.S3-001.

Müller G. Personalized strategies for the diagnosis and therapy of type II diabetes and obesity. *Immun Endoc Metab Agents Med Chem.* (2012c); 12: 80-109.

Nathan DM, Buse JB, Davidsom MB, et al. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: A consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: A consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care.* (2009); 32: 193–203.

Naylor S. Systems biology, information, disease and drug discovery. *Drug Discovery World.* (2005); 6:23–33.

Obregon C, Rothen-Rutishauser B, Gitahi SK, Gehr P, Nicod LP. Exovesicles from human activated dendritic cells fuse with resting dendritic cells, allowing them to present alloantigens. *Am J Pathol.* (2006); 169 (6): 2127–2136.

Ohno S et al., Roles of exosomes and microvesicles in disease pathogenesis, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.019>

Orozco AF, Lewis DE. Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma. *Cytometry*. (2010); 77: 502–514.

Palanisami V, Sharma S, Deshpande A, Zhou H, Gimzewski J, Wong D.T, Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes, *PLoS One* 5 (2010) e 8577.

Pereira-Lancha LO, Campos-Ferraz PL, Lancha AH Jr. Obesity: considerations about etiology, metabolism, and the use of experimental models. *Diab Metab Syn Obesity: Targets Ther.* (2012); 5: 75–87.

Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev.* (2007); 21: 157–171.

Pilzer D, Gasser O, Moskovich O, Schifferli JA, Fishelson Z. Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer. *Springer Semin Immunopathol.* (2005); 27 (3): 375–387.

Pisitkun T, Shen R.F, Knepper M.A. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 13368–13373.

Polgar J, Matuskova J, Wagner D.D. The P-selection, tissue factor, coagulation triad, *J. Thromb Haemost.* 3 (2005) 1590-1596.

Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA.* (2001); 286: 327–334.

Prusiner S.B, Scott M.R, DeArmond S.J, Cohen F.E. Prion protein biology, *Cell* 93 (1998) 337–348.

Rajendran L. Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (2006) 11172–11177.

Ratajczak M.Z, Kucia M, Jadczyk T, Greco N.J, Wojakowski W, Tendera M, Ratajczak M. Pivotal role of paracrine effects in stem cell therapies in regenerative medicine: can we translate stem cell-secreted paracrine factors and microvesicles into better therapeutic strategies? *Leukemia* 26 (2012) 1166-1173.

Ratajczak J, Wysoczynski M, Jonawska-Wieczorek F, Ratajczak M.Z. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication, *Leukemia* 20 (2006) 1487-1495.

Rhee EP, Gerszten RE. Metabolomics and cardiovascular biomarker discovery. *Clin Chem.* (2012); 58: 139–147.

Rupp AK, Rupp C, Keller S, et al. Loss of EpCAM expression in breast cancer derived serum exosomes: role of proteolytic cleavage. *Gynecol Oncol.* (2011); 122:437–446.

Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell.* (2012); 148: 852–871.

Schara K, Jansa V, Sustar V, Dolinar D, Pavlic J.I, Lokar M, Kralj-Iglic V, Veranic P, Iglic A. Mechanisms for the formation of membranous nanostructures in cell-to-cell communication, *Cell. Mol. Biol. Lett.* 14 (2009) 636–656.

Schulze MB, Weikert C, Pischon T, et al. Use of multiple metabolic and genetic markers to improve the prediction of type 2 diabetes: the EPIC-Potsdam study. *Diab Care.* (2009); 32: 2116–2119.

Sekula M, Janawa G, Stankiewicz E, Stepien E. Endothelial microparticle formation in moderate concentrations of homocysteine and methionine in vitro. *Cell Mol Biol Lett.* (2011); 16(1): 69–78.

Simak J, Gelderman MP. Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfus Med Rev* (2006); 20: 1–26.

Simons M, Raposo G, Exosomes-vesicular carriers for intercellular communication, *Curr. Opin. Cell Biol.* 21 (2009) 575-581.

Shantsila E, Kamphuisen PW, Lip GY. Circulating microparticles in cardiovascular disease: implications for atherogenesis and atherothrombosis. *J Thromb Haemost.* (2010); 8 (11): 2358–2368.

Shedden K, Xie XT, Chandaroy P, Chang YT, Rosania GR. Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Res.* (2003); 63 (15): 4331–4337.

Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer D.H, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry Jr W.T, Carter B.S, Krichevsky A.M, Breakefield X.O. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers, *Nat. Cell Biol.* 10 (2008) 1470-1476.

Smalley D.M, Sheman N.E, Nelson K, Theodorescu D Isolation and identification of potential urinary microparticle biomarkers of bladder cancer, *J. Proteome Res.* 7 (2008) 2088-2096.

Staiger H, Machicao F, Fritsche A, Häring HU. Pathomechanisms of type 2 diabetes genes. *Endocr Rev.* (2009); 30: 557–585.

Stöger R. Epigenetics and obesity. *Pharmacogenomics*. (2008); 9: 1851–1860.

Subra C, Laulagnier K, Perret B and Record M. (2007). Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie* 89. 205–212.

Thery C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immuneresponses, *Nat. Rev. Immunol.* 9 (2009) 581–593.

Thery C. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biol Rep.* (2011); 3: 15.

Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol.* (2002); 2: 569–579.

Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee J.J, Lotvall J.O, Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells, *Nat. Cell Biol.* 9 (2007) 654-659.

Valenti R, Huber V, Filipazzi P, et al. Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor- β -mediated suppressive activity on T lymphocytes. *Cancer Res* (2006); 66: 9290–8.

Valenti R, Huber V, Iero M, et al. Tumor-released microvesicles as vehicles of immunosuppression. *Cancer Res* (2007); 67: 2912–5.

Van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, Otto C, van Leeuwen TG, Nieuwland R. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost.* (2010); 8: 2596–2607.

Van Hoek M, Dehghan A, Witteman JC, et al. Predicting type 2 diabetes based on polymorphisms from genome-wide association studies: a population-based study. *Diabetes.* (2008); 57: 3122–3128

Xie Y, Bai O, Yuan J, et al. Tumor apoptotic bodies inhibit CTL responses and antitumor immunity via membrane-bound transforming growth factor- β 1 inducing CD8⁺ T-cell anergy and CD4⁺ Tr1 cell responses. *Cancer Res.* (2009); 69 (19): 7756–7766.

Younus S, Rodgers G. Biomarkers associated with cardiometabolic risk in obesity. *Am Heart Hosp J.* (2011); 9: E28–E32.

Zhou R, O'Hara SP, Chen XM. MicroRNA regulation of innate immune responses in epithelial cells. *Cell Mol Immunol.* (2011); 8: 371–379.