



VESÍCULAS EXTRACELULARES PARA DIAGNÓSTICO DE PRÉ-ECLÂMPسيا

EXTRACELLULAR VESICLES FOR PRE-ECLAMPSIA DIAGNOSIS

Stoco, E. ¹, Gavinho, B. ¹

¹Centro Universitário Campos de Andrade, Curitiba, Brasil

e-mail: elismarastoco@hotmail.com

Resumo: Inúmeras patologias causam alterações fisiológicas e danos à saúde. É importante que se conheça a capacidade das interações existentes dentro do organismo, para promover diagnósticos que efetivamente auxiliem tratamentos. As vesículas extracelulares, importantes participantes da comunicação celular, são candidatas para a detecção molecular de doenças, assim como estudos de ordem clínica. As vesículas extracelulares são biomoléculas transportadoras de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, que influenciam o fenótipo de células receptoras e representam a interação celular como biomarcadores, contribuindo para a análise de fluidos biológicos e detecção de patologias. Dentre as maiores necessidades da pesquisa clínica, a interação materno-fetal constitui uma de suas maiores demandas. A detecção de eventos regulados por meio da placenta através das vesículas extracelulares é maior em casos que apresentam intercorrências como diabetes e pré-eclâmpsia, condições que diminuem a perfusão. O presente trabalho é uma revisão bibliográfica envolvendo a pesquisa translacional das vesículas extracelulares como forma de marcador para o auxílio de diagnóstico da patologia pré-eclâmpsia.

Palavras-chave: Pré-eclâmpsia; vesículas extracelulares; exossomos e placenta.

Abstract: Innumerable pathologies cause physiological changes and damage to health. It is important to comprehend the ability of interactions within the body to promote diagnostics that effectively aid treatments. Extracellular vesicles, important participants in cellular communication, are candidates for molecular detection of diseases, as well as clinical studies. Extracellular vesicles are protein, lipid and nucleic acid transport biomolecules that influence the receptor cell phenotype and represent cellular interaction as biomarkers, contributing to the analysis of biological fluids and detection of pathologies. Among the greatest needs of clinical research, maternal-fetal interaction is one of its greatest demands. The detection of events regulated through the placenta through extracellular vesicles is higher in cases with complications such as diabetes and preeclampsia, conditions that decrease perfusion. The present work is a review involving the translational research of extracellular vesicles as a marker to aid in the diagnosis of preeclampsia pathology.

Keywords: Pre-eclampsia; extracellular vesicles; exosomes and placenta.



1. INTRODUÇÃO

Um grande repertório de doenças pode comprometer o desenvolvimento fetal, sejam elas hereditárias ou decorrentes de alterações fisiológicas. A Organização Mundial da Saúde recomenda que mulheres e recém-nascidos passem por acompanhamentos que garantam qualidade de vida, tanto no período gestacional como pós-natal, a fim de monitorar o desenvolvimento do feto e garantir um período saudável para mãe e filho [1]. Tais cuidados, como a implantação de triagens para detecção de doenças, como o teste do pezinho e afins, podem promover saúde, diagnosticar e prevenir possíveis doenças, visto que os índices de mortalidade podem ser evitados como forma de potencializar a qualidade e garantia de vida [1]. A célula, com toda a sua complexidade, está envolvida na produção de moléculas que poderão representar marcadores para testes diagnósticos eficazes. Métodos aprimorados de diagnóstico serão possíveis apenas com biotecnologia aplicada à comunicação celular, como por exemplo na avaliação do líquido amniótico [2].

Como forma de minimizar anormalidades, a ciência está trazendo avanços que permitem desvendar patologias e associá-las a moléculas transportadas pelo organismo humano, que podemos considerar como uma máquina de interações capaz de desempenhar funções celulares básicas que definirão a homeostase de sua funcionalidade [3].

Uma das comunicações celulares mais pesquisadas nos últimos anos são as vesículas extracelulares, representadas através da figura 1. São biomoléculas liberadas fisiologicamente, ou por estresse, e podem influenciar o fenótipo de células receptoras, por transportarem biomoléculas ativas, como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos [4]. A presença e influência das vesículas extracelulares são descritas em vários modelos, como doenças infecciosas e doenças crônicas [5].

O presente trabalho constitui uma revisão bibliográfica sobre o potencial das vesículas extracelulares no diagnóstico da pré-eclâmpsia, caracterizando-as como biomarcadores indicativos de alterações celulares. Presentes na maioria dos fluidos biológicos, tais marcadores representariam uma relevância para diagnóstico e tratamento de doenças, uma vez que são liberados das células para seu meio externo e carregam diferentes moléculas, desempenhando forte comunicação celular. [3,6]

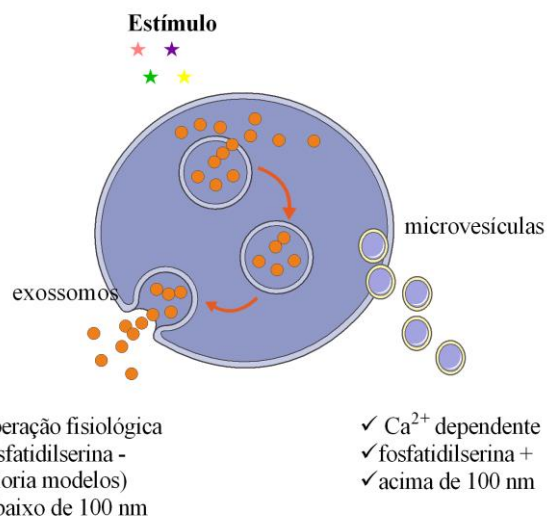


Figura 1. Vesículas extracelulares: biogênese e caracterização. Fonte: a autora.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo trata-se de uma revisão bibliográfica sobre as pesquisas e aplicações clínicas relacionadas à diagnósticos para a patologia pré-eclâmpsia com a utilização de vesículas extracelulares. Foram pesquisados artigos através dos descritores “pré-eclâmpsia”, “vesículas extracelulares”, “exossomos” e “placenta”. Um total de 42 artigos foram considerados para uso, pela relevância histórica e/ou científica.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1 PRÉ-ECLÂMPسيا

A pré-eclâmpsia caracteriza-se como uma doença multissistêmica que carrega agravantes como a hipertensão arterial e proteinúria, frequente após a vigésima semana gestacional [7]. Considerada uma das principais causas de morte materna em inúmeros países, acarreta riscos para a prematuridade e interfere no desenvolvimento fetal, como o baixo peso e índices de mortalidade neonatal aumentados. A pré-eclâmpsia pode ser identificada por alterações presentes em gestantes normotensas, o quadro de hipertensão associado a proteinúria ressalta a doença que pode se agravar, tornando-se generalizada e trazendo maiores comprometimentos como a eclâmpsia e outras síndromes mais graves [8].

A placenta é uma importante ponte entre o organismo da mãe e do feto. Representa o substrato anatômico que acomete a pré-eclâmpsia. Estudos



demonstram que mulheres portadoras da doença possuem alterações bioquímicas, imunológicas, histológicas e hemodinâmicas no processo de formação da placenta. O processo fisiopatológico deve ser investigado para minimizar danos e reduzir as taxas de mortalidade decorrentes desta patologia [8,9]. A pré-eclâmpsia afeta entre 2% a 8% das gestações, trazendo complicações capazes de causar a mortalidade materna e perinatal [10].

A patogênese da pré-eclâmpsia é iniciada no período do desenvolvimento do trofoblasto, um aglomerado celular característico da fase embrionária que são as células periféricas do blastocisto importantes no processo de fecundação e implantação do embrião. O trofoblasto é formado dias após a fertilização [11]. Tal patologia pode afetar vários órgãos, desencadeada através da placenta, onde as manifestações clínicas da pré-eclâmpsia são decorrentes de disfunções que alteram o fluxo sanguíneo materno e a regulação humoral do organismo [12].

Durante o período gestacional, ocorre a necessidade de modificações nas artérias espirais da mãe, pois estas serão responsáveis por fornecer o sangue necessário para a placenta e, sucessivamente ao feto. Em uma gravidez normal, as paredes arteriais são consideravelmente alargadas para que o espaço luminal esteja preparado para as necessidades de perfusão que o organismo necessitará [13]. Condições que diminuem o suprimento sanguíneo da placenta aumentam os riscos de pré-eclâmpsia [14].

3.2 DEFINIÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

As vesículas extracelulares, também chamadas de vesículas secretoras de membrana, são consideradas importantes biomarcadores de funções fisiológicas, capazes de transportar diversos fluidos biológicos desde os mais simples e abrangentes no organismo até os mais complexos e determinantes, como ácidos nucleicos [15]. Genericamente, podemos definir vesículas extracelulares como partículas que são liberadas naturalmente pela célula, não sofrem replicação e são delimitadas pela composição da membrana celular, a bicamada lipídica [5]. A secreção das vesículas é um processo que ocorre em diferentes organismos, sendo eles compostos por células procariontes, eucariontes e organismos pluricelulares, capazes de liberá-las no ambiente extracelular [16]. Este processo difere de acordo com tipo de vesícula, origem, tamanho e secreção, de acordo com a tabela 1. São produzidas por

diferentes tipos de célula, e podem ser internalizadas por células receptoras de diferentes linhagens, isto é, uma célula hospedeira [17]. A análise das vesículas extracelulares pode ser obtida através do isolamento de materiais biológicos, como por exemplo líquido cefalorraquidiano, saliva, sangue, leite materno, líquido amniótico entre outros fluidos presentes no organismo, sendo que existem inúmeras características que diferem as classificações das vesículas [16]. Biomarcadores são extremamente relevantes para avaliar a funcionalidade celular, evento natural que regula toda a comunicação fisiológica [6].

Tabela 1. Classificação das vesículas extracelulares de acordo com tamanho e forma de secreção.

Exossomos	Microvesículas	Corpos Apoptóticos
De 30 a 150 nm	De 100 a 1000 nm	De 1000 a 5000 nm
Fusão da M.P. com corpo multivesicular	Liberadas por brotamento pela M.P.	Apoptose celular

3.3 EXOSSOMOS

Existem diferenças na origem, tamanho e características das vesículas extracelulares, dependendo da situação celular que as originam e normalmente são liberadas no meio extracelular como forma de vesículas lipoproteicas [18]. Os exossomos, menores partículas, são originados através da fundição entre a membrana plasmática e um corpo multivesicular, processo que resulta na sua liberação até o espaço extracelular.

3.4 MICROVESÍCULAS

As microvesículas são consideradas maiores quando comparados aos exossomos, diferem pelo tamanho (geralmente, maiores do que 100 nm) e eliminação, que ocorre diretamente da membrana plasmática. São liberadas por brotamento a partir da membrana plasmática [19], num processo dependente de cálcio, e que expõe a fosfatidilserina da face intra para a extracelular. Desta forma, são convenientemente marcadas com anexina-V para pesquisas de detecção [17].

3.5 CORPOS APOPTÓTICOS



Os corpos apoptóticos, possuem sua liberação durante o processo de apoptose celular, transformando-se em vesículas compostas de elementos celulares, onde são absorvidos por fagócitos que fazem o papel da eliminação destes fragmentos através na circulação fisiológica [20].

A complexidade celular está demonstrada nas mensagens transmitidas através das vesículas extracelulares, contendo mediações por lipídios, proteínas e seleções de ácidos nucleicos contidos no interior das vesículas que migram para fora da célula de origem, com a função de mediar a comunicação intercelular. O conteúdo das vesículas extracelulares é liberado por várias espécies, desde simples microrganismos até o complexo organismo humano [22].

3.6 MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

As aplicações das vesículas extracelulares provêm da tecnologia de pesquisa e análises isoladas que determinarão a utilização da amostra, seu rendimento e pureza em relação aos benefícios de aproveitamento, dentre eles diagnósticos promissores que poderão trazer avanços para a ciência e benefícios para tratamentos [23]. Os métodos utilizados para a preparação da amostra consistem no seu isolamento e posterior purificação para a análise, podem ser realizados de diferentes métodos com o objetivo de remover células e fragmentos delas providos, é considerado o método mais comum, padronizado para a retirada de interferentes através da centrifugação e ultracentrifugação com o intuito de precipitar vesículas extracelulares [24].

A ultracentrifugação por gradiente de densidade (DGUC) é considerada como um eficaz método para purificar e separar microfragmentos, como organelas e lipoproteínas [25]. Tal técnica é reconhecida pela alta qualidade na preparação de vesículas extracelulares para análises de funcionamento e estruturas que forneçam informações confiáveis, realizada com pequena quantidade de amostra e não recomendada para VE de altos volumes de biofluidos, entretanto, outra técnica denominada ultracentrifugação (UC), possui relatos de membros da ISEV (International Society for Extracellular Vesicles) como sendo o método mais utilizado em 81% dos isolamento de VE, apesar de possuir desvantagens como contaminação da amostra isolada ao apresentar proteínas e lipoproteínas, a primeira centrifugação

em baixa velocidade deve sedimentar as células eliminando interferentes e após este processo o sobrenadante é centrifugado com velocidades mais altas com o objetivo de sedimentar vesículas maiores [26,27]. A associação da ultracentrifugação com gradiente de densidade é comumente utilizada para eliminar contaminantes presentes na preparação das vesículas, apenas a ultracentrifugação é um processo crítico que deve ser repetido para lavar e purificar a amostra [23].

Existem outras técnicas para isolar VE, desenvolvidas com base em ultrafiltração e cromatografia de exclusão de tamanho (SEC), ambas podem ser combinadas e utilizadas para purificar vesículas extracelulares baseadas em seu tamanho [28]. Para a eliminação de contaminantes como proteínas e lipoproteínas, a utilização do método cromatográfico para isolamento de vesículas apresentou-se eficaz, com precisão no material analisado [29]. Já a ultrafiltração, envolve um processo de purificação rápida de vesículas extracelulares através da utilização de membranas com tamanho de poro exclusivo, podendo ser determinadas conforme o tamanho das VE a sofrerem o método de purificação [30]. As técnicas de purificação de vesículas extracelulares estão representadas na figura 2.

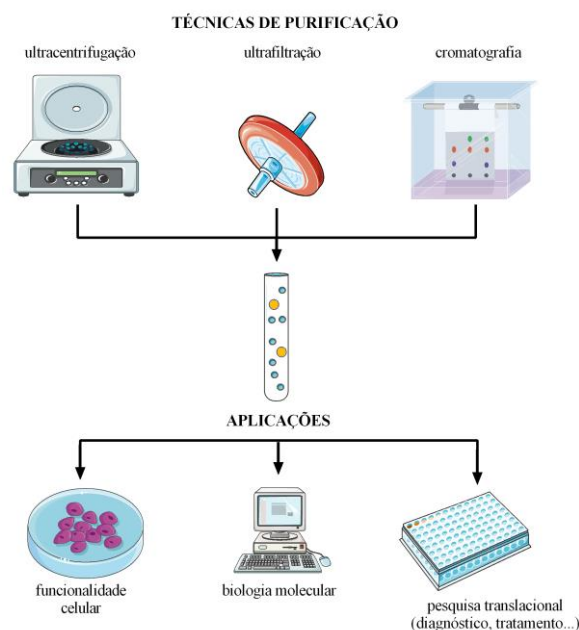


Figura 2. Métodos de purificação de Vesículas extracelulares, e suas aplicações nas ciências clínicas.



3.7 EMPREGO DE VEs COMO DIAGNÓSTICO ALTERNATIVO PARA PATOLOGIAS

As vesículas extracelulares possuem papel homeostático celular fundamental capaz de representar a função deste complexo mecanismo presente em seres vivos e atuando na modulação da situação fisiológica de células receptoras, servindo como veículo de comunicação entre células [31]. Consideradas como um promissor biomarcador devido sua capacidade de carregar proteínas específicas e ácidos nucleicos que podem estar associados a determinadas patologias, promovendo auxílio em diagnósticos com o intuito de fornecer terapias que favoreçam cada caso [32].

Na doença de Alzheimer, é possível avaliar a secreção de várias moléculas por vesículas extracelulares. A patologia ocasiona um declínio de memória, é neurodegenerativa progressiva crônica, e tais biomarcadores refletem a função neuronal e neurotransmissão presente entre as células existentes no sistema nervoso [33]. Em estudos com o uso de biomarcadores sanguíneos para a doença de Alzheimer, denominados exossomos neurais, através da preparação realizada pela precipitação de exossomos e também anticorpos que direcionam a especificidade da função neural, sugerem-se diagnósticos de alta precisão para tal patologia, entretanto, deve-se estabelecer métodos de isolamento ideais para cada tipo de fluido biológico, para que contaminações sejam minimizadas, evitando a presença de materiais não vesiculares para a análise da amostra, e também o acúmulo de exossomos na preparação, para eliminar interferentes e possibilitar um diagnóstico com maior precisão [34,35].

Utilizadas como auxílio em diagnósticos através de fluidos corporais, as VE são fortes indicadores no acompanhamento do câncer, liberadas abundantemente em células afetadas com estabilidade capaz de preservar proteínas e ácidos nucleicos que possuem relação com o desenvolvimento da doença, são biomarcadores que podem favorecer biópsias líquidas para tal patologia [36]. Um exemplo que demonstra a utilidade dos indicadores durante o câncer é a liberação de microvesículas e exossomos nas células tumorais de glioblastoma, localizadas na região cerebral, contendo RNA e proteínas nesta secreção, processo celular que leva a absorção das microvesículas por células hospedeiras saudáveis [37].

3.8 INTERAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES ENTRE O ORGANISMO MATERNO E FETAL

A comunicação fisiológica existente entre o organismo materno e fetal é um evento repleto de interações que possuem o objetivo de controlar o metabolismo materno para as alterações e mudanças decorrentes da geração de um feto e desenvolvimento deste novo organismo. A placenta é considerada a principal ligação entre os dois organismos, é um órgão que apresenta interações entre a circulação sanguínea e regulação do feto por meio da mãe, como a troca de nutrientes, sangue e oxigênio, ela libera inúmeras moléculas que ao decorrer da gravidez desempenham o papel de fornecer nutrição ao feto, realizar as trocas gasosas, proporcionar a retirada de resíduos, diferenciação e produção de células para a regulação dos sistemas do feto em desenvolvimento [38]. Estudos mostram que a placenta humana é capaz de liberar moléculas para suprir as necessidades fetais no período gestacional, podendo estabelecer comunicação com a fisiologia materna através de vesículas extracelulares, onde o aumento na liberação das mesmas tem sido acompanhado em gestações saudáveis e com intercorrências [39,40].

Os exossomos, que são uma categoria das vesículas, já foram identificados no plasma materno no período de seis semanas de geração fetal, estes quando liberados pelas células da placenta possuem características para serem regulados através da concentração de glicose e tensão de oxigênio, também com a capacidade de estimular a liberação de moléculas importantes por meio de células endoteliais, como as citocinas, que são capazes de modular a resposta fisiológica de diversas células [41]. Tais vesículas apresentam marcadores como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos que são liberados na circulação materna e interagem com a mesma. Através desta comunicação, o sistema fisiológico materno é modulado para as adaptações necessárias ao organismo no período de mudanças decorrentes da gravidez [40].

A liberação das vesículas extracelulares placentárias, como forma de exossomos e também microvesículas, ocorre em condições normais e patológicas, foram identificadas na circulação materna através da gestação, onde houve a constatação do seu aumento de liberação em situações de gestações que apresentavam complicações, tais como diabetes gestacional, pré-eclâmpsia e também alterações de características



moduladas pelo microambiente celular como hipóxia e índices de glicose aumentados [41].

Um exemplo de representação baseada nas VEs durante a gestação é a análise do líquido amniótico e sangue materno, de acordo com a figura 3, onde os biomarcadores presentes podem contribuir positivamente na avaliação de riscos clínicos existentes em ambos os organismos [42]. O fluido amniótico é obtido através de uma coleta invasiva denominada amniocentese, onde o conteúdo presente no material isolado e pesquisa de exossomos poderá demonstrar a concentração celular fetal em relação à materna e seu conteúdo, tal como material genético e proteínas [42].

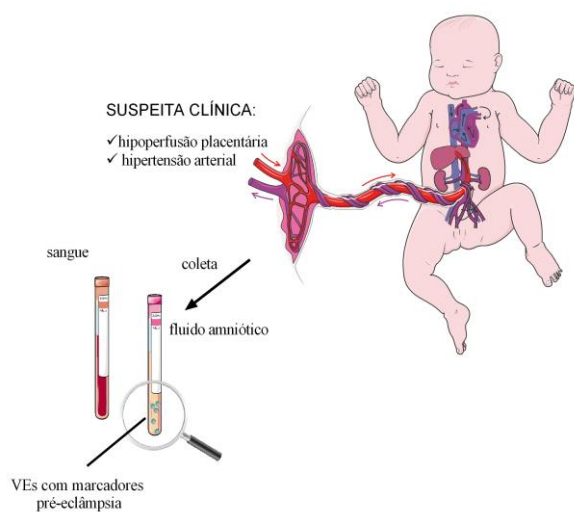


Figura 3. Potencial de VEs como biomarcadores pré-eclâmpsia: pesquisa em amostras clínicas.

4 CONCLUSÃO

Um investimento significativo na pesquisa translacional enfatiza tecnologias para a detecção precoce de doenças. Neste contexto, formas de comunicação celular mais aprimoradas, como as vesículas extracelulares, tem características importantes para compor uma forma alternativa de diagnóstico. A demanda é maior nos casos de doenças crônicas, como diabetes. A interação materno-fetal é um fenômeno bastante complexo, e possui potencial para determinadas patologias, como a pré-eclâmpsia. Vesículas extracelulares, junto com suas proteínas transmembranas e conteúdo, podem corresponder a métodos apurados de detecção de anormalidades na comunicação materno-fetal.

5 REFERÊNCIAS

- [1] WHO recommendations for prevention and treatment of pre-eclampsia and eclampsia. Geneva: World Health Organization; 2011. [Acesso em 15 de março de 2019]. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44703/1/9789241548335_eng.pdf
- [2] Ebert B.; Rai AJ. Isolation and Characterization of Amniotic Fluid-Derived Extracellular Vesicles for Biomarker Discovery. Levy B. Prenatal Diagnosis. Methods in Molecular Biology, vol 1885. Humana Press: New York; 2019.
- [3] Maas SLN.; Breakefield XO.; Weaver AM. Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. Trends in Cell Biology. 27:3; 172–188. Elsevier; 2017.
- [4] Cruz L.; Perfil de miRNAs intracelulares e liberados via vesículas extracelulares na diferenciação neural de células-tronco pluripotentes. Tese de Doutorado Universidade de São Paulo: São Paulo; 2017.
- [5] Théry C.; Witwer KW; Aikawa E, Alcaraz MJ; Anderson JD; Andriantsitohaina R; Antoniou A; 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. France; 2018.
- [6] McBride JD.; Rodriguez-Menocal L.; Badiavas EV. Extracellular Vesicles as Biomarkers and Therapeutics in Dermatology: A Focus on Exosomes. Journal of Investigative Dermatology. Elsevier; 2017.
- [7] Duckitt K.; Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. BMJ (Clinical Research Ed.) 330:565; 2005.
- [8] Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Am J Obstet Gynecol. 2000;183(1):S1-S22.
- [9] Roberts JM.; Hubel CA.; The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. Placenta; 2009;30 Suppl A:S32-7.
- [10] Steegers EA.; Duvekot JJ.; Pijnenborg R. Pre-eclampsia. The Lancet; 2010. 376: 631–44.



- [11] Furuya M.; Ishida J.; Aoki I.; Fukamizu A. Pathophysiology of placentation abnormalities in pregnancy-induced hypertension. *Vasc Health Risk Manag*; 2008; 4(6):1301–1313.
- [12] Browne JC.; Veall N. The maternal placental blood flow in normotensive and hypertensive women. *J Obstet Gynaecol Br Emp*; 1953.
- [13] Brosens IA.; Robertson WB.; Dixon HG. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. Wynn R, ed. *Obstetrics and Gynecology Annual*; 1979.
- [14] Roberts J., Cooper D. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *The Lancet*, 357(9249), 53–56; 2001.
- [15] Lötvall J.; Hill AF., Hochberg F.; Búzás EI.; Dolores Di Vizio.; Gardiner C.; et al. A position statement from the International Society for Extracellular Vesicles, *Journal of Extracellular Vesicles*; 2014.
- [16] Colombo M.; Raposo G.; Théry C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*; 2014.
- [17] Gavinho B.; Rossi IV, EvansOsses I, Inal J, Ramirez MI. A new landscape of host–protozoa interactions involving the extracellular vesicles world. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil; 2018.
- [18] Meldolesi J. Exosomes and ectosomes in intercellular communication. *Curr. Biol*; 2018.
- [19] Gyorgy B.; Szabo TG.; Pasztoi M.; Pal Z.; Misjak P.; Aradi B.; et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci*; 2011, 68, 2667–2688.
- [20] Riazifar M.; Pone EJ.; Lotvall J.; Zhao W. Stem cell extracellular vesicles: extended messages of regeneration. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 2017.
- [21] Monguió-Tortajada M., Gálvez-Montón C., Bayes-Genis A.; et al. Célula. Extracellular vesicle isolation methods: rising impact of size-exclusion chromatography; *Mol. Life Sci*; 2019.
- [22] Keerthikumar S.; Gangoda L.; Gho Y.S.; Mathivanan S. Bioinformatics tools for extracellular vesicles research. *Methods Mol. Biol*; 2017.
- [23] Raimondo S., Giavaresi G., Lorico A., Alessandro R. Extracellular Vesicles as Biological Shuttles for Targeted Therapies. *International Journal of Molecular Sciences*; 2019.
- [24] They C.; Amigorena S.; Raposo G.; Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol*; 2006.
- [25] Havel RJ.; Eder HA.; Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest.*;1955.
- [26] Van Deun J.; Mestdagh P.; Sormunen R., Cocquyt V.; Vermaelen K.; Vandensompele J.; et al. The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. *J Extracell Vesicles*; 2014.
- [27] Gardiner C.; Di Vizio D.; Sahoo S.; They C.; Witwer KW.; Wauben M.; et al. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *J Extracell Vesicles*; 2016.
- [28] Lobb R.; Moller A. Size exclusion chromatography: A simple and reliable method for exosome purification. *Methods Mol. Biol*; 2017, 105–110.
- [29] Gamez-Valero A.; Monguio-Tortajada M.; Carreras-Planella L.; Franquesa M.; Beyer K.; Borrás F.E. Size-exclusion chromatography-based isolation minimally alters extracellular vesicles characteristics compared to precipitating agents. *Sci. Rep.* 2016.
- [30] Xu R.; Simpson R.J.; Greening D.W. A protocol for isolation and proteomic characterization of distinct extracellular vesicle subtypes by sequential centrifugal ultrafiltration. *Methods Mol. Biol*; 2017, 91–116.
- [31] Iraci N.; Leonardi T.; Gessler F.; Vega B.; Pluchino S. Focus on extracellular vesicles: Physiological role and signalling properties of extracellular membrane vesicles. *Int. J. Mol.*



Sci. 2016.

[32] Lee S.; Mankhong S.; Kang JH. Extracellular Vesicle as a Source of Alzheimer's Biomarkers: Opportunities and Challenges *Int J Mol Sci*; 2019.

[33] Rajendran L.; Bali J.; Barr MM.; Court FA.; Krämer-Albers E.; Picou F.; et al. Emerging Roles of Extracellular Vesicles in the Nervous System. *J. Neurosci*; 2014, 34, 15482–15489.

[34] Fiandaca M.S.; Kapogiannis D.; Mapstone M.; Boxer A.; Eitan E.; Schwartz, J.B.; et al. Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study. *Alzheimer's Dement*; 2015, 11, 600–607.

[35] Lobb R.J.; Becker M.; Wen S.W.; Wong CSF.; Wiegman AP.; Leimgruber A.; Möller A. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J. Extracell. Vesicles*; 2015.

[36] Nawaz M.; Camussi G.; Valadi H.; Nazarenko I.; Ekstrom K.; Wang X.; Principe S.; et al. The emerging role of extracellular vesicles as biomarkers for urogenital cancers. *Nature Reviews Urology*, 688 – 701; 2014.

[37] Skog J.; Würdinger T.; Rijn SV.; Meijer DH.; Gainche L.; Breakefield XO.; et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.*; 2008;10(12):1470–1476.

[38] Burton GJ.; Jauniaux E. What is the placenta? *Am. J. obstetrics Gynecol.* 213 (4 Suppl); 2015. S6.e1, S6-8.

[39] Salomon C.; Torres MJ.; Kobayashi M.; Scholz-Romero K.; Sobrevia L.; Dobierzewska A.; et al. A gestational profile of placental exosomes in maternal plasma and their effects on endothelial cell migration; 2014.

[40] Tannetta D.; I. Masliukaite.; Vatish M.; Redman C.; Sargent I. Update of syncytiotrophoblast derived extracellular vesicles in normal pregnancy and preeclampsia. *J. reprod. Immunol*; 2016.

[41] Sarker S.; Scholz-Romero K.; Pérez A.; Ilanos A.; Mitchell MD., Arroz GE.; et al. Placenta-

derived exosomes continuously increase in maternal circulation over the first trimester of pregnancy, *J. Transl. Med.* 12; 2014.

[42] Kamath-Rayne BD.; Smith HC.; Muglia LJ. Amniotic fluid: the use of highdimensional biology to understand fetal wellbeing. *Reprod Sci*; 2014.