

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS  
CURSO DE FARMÁCIA

Kariana Savedra

**Microvesículas de células sanguíneas, endoteliais e da musculatura lisa, e sua  
participação nas etapas da aterosclerose: revisão de literatura**

Florianópolis  
2022

Kariana Savedra

**Microvesículas de células sanguíneas, endoteliais e da musculatura lisa, e sua participação nas etapas da aterosclerose: revisão de literatura**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Farmacêutico

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Ana Carolina Rabello de Moraes, Dra.

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Savedra, Kariana

Microvesículas de células sanguíneas, endoteliais e da musculatura lisa, e sua participação nas etapas da aterosclerose: revisão de literatura / Kariana Savedra ; orientadora, Ana Carolina Rabello de Moraes, 2022.

61 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Microvesículas. 3. Aterosclerose. 4. Trombo. I. Rabello de Moraes, Ana Carolina . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. III. Título.

Kariana Savedra

**Microvesículas de células sanguíneas, endoteliais e da musculatura lisa, e sua participação nas etapas da aterosclerose: revisão de literatura**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Farmacêutico” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia

Florianópolis, 15 de Março de 2022.

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Liliete Canes de Souza  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Ana Carolina Rabello de Moraes  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Iara Fabricia Kretzer  
Avaliadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Marcos José Machado  
Avaliador  
Universidade Federal de Santa Catarina

*Dedico esse trabalho a Deus, a minha família, aos meus amigos e colegas do curso.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente a Deus por todas as bênçãos que me concedeu, sendo possível superar inúmeros obstáculos encontrados nessa trajetória. Nele foram possíveis todas as coisas, desde as situações difíceis que me ensinaram e me amadureceram até as pessoas colocadas no meu caminho, que de alguma forma e em algum momento, contribuíram para essa conquista profissional e pessoal.

*“Ele é antes de todas as coisas, e nele tudo  
subsiste.”*

(Cl 1, 17)

## RESUMO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo, tendo como principal agravo a aterosclerose. Essa doença inflamatória crônica pode ser desencadeada por diversos fatores como maus hábitos de vida e alimentares, diversas doenças, entre outros. Entretanto, o que vários estudos das últimas duas décadas têm demonstrado é que existe outro fator importante contribuindo tanto positivamente, mas principalmente negativamente nas variadas etapas do processo aterosclerótico. Este fator são as microvesículas, estruturas oriundas de células circulantes, endoteliais e da musculatura lisa. Essas estruturas nanométricas são um tipo específico de vesículas liberadas a partir da membrana plasmática de células eucarióticas: quando essas são ativadas, sofrem apoptose ou outra ação que cause alterações morfológicas estruturais em sua membrana, permitindo a formação e liberação dessas vesículas. As microvesículas são estruturas formadas basicamente por bicamada fosfolipídica com exposição da fosfatidilserina (frequentemente), lipídios bioativos, proteínas internas e externas, remanescentes de RNA, além de conter marcadores específicos provenientes da sua célula de biogênese. Quando expostas ao meio extracelular, essas vesículas podem desempenhar diversas funções tanto em processos fisiológicos quanto fisiopatológicos. Na aterosclerose, podem participar do dano vascular, do desenvolvimento da inflamação, da calcificação vascular, da progressão do ateroma, da ruptura da placa e da formação do trombo. Como há uma relação entre a concentração das microvesículas e os distúrbios tromboembólicos, pressupõe-se que essas vesículas possam ser usadas como biomarcadores sinalizadores do desenvolvimento da aterosclerose, pois tais estruturas estão presentes em elevada concentração na circulação sanguínea de indivíduos com alto risco para as doenças cardiovasculares.

**Palavras-chave:** aterosclerose; biomarcadores; doenças cardiovasculares; microvesículas; trombo.

## **MICROVESICLES OF BLOOD, ENDOTHELIAL AND SMOOTH MUSCLE CELLS, AND THEIR PARTICIPATION IN THE STAGES OF ATHEROSCLEROSIS: LITERATURE REVIEW**

According to the World Health Organization, cardiovascular diseases are the leading cause of death in the world, with atherosclerosis as the main aggravation. This chronic inflammatory disease can be triggered by several factors such as poor living and eating habits, various diseases, among others. However, what several studies of the last two decades have shown is that there is another important factor contributing both positively, but mainly negatively, in the various stages of the atherosclerotic process. This factor is the microvesicles, structures originating from circulating cells, endothelial cells and smooth muscle. These nanometric structures are a specific type of vesicles released from the plasma membrane of eukaryotic cells: when they are activated, they undergo apoptosis or another action that causes structural morphological changes in their membrane, allowing the formation and release of these vesicles. Microvesicles are structures formed basically by a phospholipid bilayer with exposure of phosphatidylserine (often), bioactive lipids, internal and external proteins, RNA remnants, in addition to containing specific markers from their biogenesis cell. When exposed to the extracellular environment, these vesicles can play several roles in both physiological and pathophysiological processes. In atherosclerosis, they may participate in vascular damage, the development of inflammation, vascular calcification, atheroma progression, plaque rupture, and thrombus formation. As there is a relationship between the concentration of microvesicles and thromboembolic disorders, it is assumed that these vesicles can be used as biomarkers that signal the development of atherosclerosis, as these structures are present in high concentration in the bloodstream of individuals at high risk for the cardiovascular diseases.

**Keywords:** atherosclerosis; biomarkers; cardiovascular diseases; microvesicles; thrombus.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vesículas extracelulares e suas funções biológicas.....	20
Figura 2 - Intervalos de tamanhos das vesículas extracelulares (VEs).....	21
Figura 3 - Composição das microvesículas (MVs).....	25
Figura 4 - Estimulação celular e resposta da membrana plasmática.....	27
Figura 5 - Formação e mecanismos de interação de vesículas extracelulares e célula alvo.....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD	<i>Cluster</i> de diferenciação
CE	Células endoteliais
CF	Citometria de fluxo
CML	Célula da musculatura lisa
DCV	Doenças cardiovasculares
FNT- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
FT	Fator tecidual
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IL	Interleucina
kDa	Kilo Dalton
miRNA	Micro ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MVE	Microvesícula endotelial
MVEr	Microvesícula eritrocitária
MVL	Microvesícula linfocítica
MVM	Microvesícula monocítica/fagocítica
MVCML	Microvesícula células musculares lisas vasculares (MVCML)
MVN	Microvesícula neutrofílica
MVP	Microvesícula plaquetária
MPO	Mieloperoxidase
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
PE	Fosfatidiletanolamina
PS	Fosfatidilserina
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	16
<b>2.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	16
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	16
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	17
<b>4 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	18
<b>4.1 VESÍCULAS EXTRACELULARES (VÉS)</b> .....	18
<b>4.2 TIPOS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES (VÉS)</b> .....	21
<b>4.3 MICROVESÍCULAS (MVs)</b> .....	23
<b>4.3.1 Composição das microvesículas (MVs)</b> .....	24
<b>4.3.2 Formação das microvesículas (MVs)</b> .....	25
<b>4.3.3 Interação das microvesículas (MVs) com as células receptoras</b> .....	28
<b>4.3.4 Ação das microvesículas (MVs) envolvidas na aterosclerose</b> .....	29
<b>4.4 PRINCIPAIS MÉTODOS DE ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROVESÍCULAS CIRCULANTES</b> .....	41
<b>4.4.1 Isolamento</b> .....	42
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	47
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	48

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCVs) sejam desenvolvidas ou apenas agravadas pelo processo inflamatório crônico da aterosclerose, é a principal causa de morte no mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que haverá 17 milhões de mortes por ano no mundo devido a essas doenças, mas que pode haver uma redução de 25% desse número até 2025 se ações estratégicas preventivas, que abrangem 25 indicadores (como DCVs, hipertensão, diabetes, hábitos alimentares, consumo diário de sódio, de ácido graxo, sobrepeso, obesidade, inatividade física, tabagismo e consumo nocivo de álcool) e nove metas globais (redução do consumo e da prevalência dos indicadores citados acima, assim como acesso aos tratamentos medicamentosos para os devidos tratamentos) propostas para o enfrentamento de Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) forem tomadas (MALTA, da SILVA JUNIOR, 2013; OPAS/OMS BRASIL, 2017).

De acordo com dados do *Global Burden of Disease Study 2010* (Carga Global de Morbidade – GBD), desde meados do século XX até o ano de 2010, países com diferentes economias tiveram, no geral, redução nas suas taxas de mortalidade decorrentes de doenças consequentes da aterosclerose (acidente vascular cerebral (AVC) e doença isquêmica cardíaca (DIC), por exemplo) em adultos entre 35 e 74 anos (HERRINGTON *et al.*, 2016). Contudo, na última década, esse quadro vem se invertendo, principalmente em países de baixa e média renda, e essa mudança epidemiológica ocorreu por fatores modificáveis de doenças crônicas, sendo um desafio adicional para esses países que já enfrentam outros problemas relacionados à desnutrição e doenças infecciosas (BARQUERA *et al.*, 2015).

O custo mundial gerado pelas DCVs em 2010 foi em torno de \$863 bilhões de dólares, representando um gasto muito alto tanto para os sistemas de saúde quanto para a economia mundial (BARQUERA *et al.*, 2015), e o número global de mortes chegou a 31% em 2016 (OPAS/OMS BRASIL, 2017). No Brasil, em 2015, a prevalência das DCVs atingiu 34,3% da população adulta, com impacto além do aspecto econômico direto e indireto, pois contribuiu para a perda de atividade, perda de bem-estar e, conseqüentemente, o fornecimento de assistência, gerando um custo de R\$56,2 bilhões (\$17,3 bilhões de dólares), correspondendo a um total nacional de 5,5% das despesas com assistência à saúde (STEVENS *et al.*, 2017).

A aterosclerose é um processo inflamatório vascular crônico e silencioso que ocorre na camada íntima de artérias de médio e grande calibre, cujo mecanismo envolve dano às células

endoteliais (CEs), proliferação de células da musculatura lisa (CMLs), reações inflamatórias por células e mediadores, formação de ateromas e acúmulo de tecidos fibrosos, cálcio entre outras substâncias (LIBBY, RIDKER, HANSSON, 2011).

A aterosclerose provoca o enrijecimento e estreitamento do vaso, diminuindo o fluxo sanguíneo no lúmen, suprimindo a oxigenação e a nutrição tecidual, comprometendo, portanto, as funções fisiológicas de órgãos e tecidos afetados (ROSS, 1999; WANG, WANG, HU, 2016; XAVIER *et al.*, 2013).

A formação da aterosclerose é fortemente relacionada ao estilo de vida, maus hábitos alimentares, diabetes, hipertensão, obesidade, tabagismo e, principalmente, à hipercolesterolemia (GEOVANINI, 2018; OPAS/OMS BRASIL, 2017; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2017).

Contudo, um estudo realizado por Thompson *et al.* (2013) avaliou 137 múmias por tomografia computadorizada, e mostrou que a aterosclerose estava presente em diferentes períodos de tempo e localizações geográficas, bem como nas mais variadas culturas antigas, as quais apresentavam distintas dietas, heranças genéticas e estilos de vida, sugerindo que o fator causal da doença não está apenas relacionado ao estilo de vida, mas também a processos dependentes do envelhecimento humano e de outros processos fisiológicos (THOMPSON *et al.*, 2013).

Nas últimas décadas, estudos também associaram o desenvolvimento da aterosclerose à ação de microvesículas (MVs) derivadas de células sanguíneas, endoteliais e da musculatura lisa presentes na circulação (BURNOUF *et al.*, 2014; HOLVOET, HULSMANS, 2013; POON *et al.*, 2018; PONOMAREVA *et al.*, 2017; WANG, WANG, HU, 2016). Adicionalmente, também foi estabelecida a relação das MVs e das células progenitoras endoteliais (CPE) com o desequilíbrio entre dano e reparo endotelial, mostrando que quanto mais elevado o número de MVs circulantes, maior a progressão da aterosclerose (FRANÇA *et al.*, 2013).

As MVs são um tipo de vesícula extracelular (VE). As VEs, também conhecidas como vesículas de membrana (VMs), são microvesículas cuja vesiculação pode ser considerada uma forma de trogocitose (transferência de componentes da membrana e do citoplasma de uma célula para outra) (GYÖRGY *et al.*, 2011a; POON *et al.*, 2018; TÓKÉS-FÜZESI *et al.*, 2018).

As VEs, de um modo geral, formam-se devido às alterações morfológicas que ocorrem na célula durante a ativação celular ou processo de apoptose. Estas alterações resultam na liberação de estruturas membranares menores que são as VEs (FRANÇA *et al.*, 2014).

A nomenclatura e a classificação das VEs encontradas em circulação podem variar conforme sua biogênese, suas proteínas internas, seus marcadores membranares proteicos, seu tamanho e sua densidade. Muitas denominações já foram dadas e algumas ainda são utilizadas para nomear as VEs como microvesículas, ectossomos, derramamento de vesículas, nanopartículas, nanoesferas, exossomos, oncosomos, microculturas, entre outras (GYÖRGY *et al.*, 2011; RAPOSO, STORVOGEL, 2013; SHU *et al.*, 2019).

Apesar das MVs formarem-se por mecanismos fisiológicos, elas podem funcionar como um componente patogênico em diversas doenças (BURNOUF *et al.*, 2014; HOLVOET, HULSMANS, 2013; POON *et al.*, 2018; PONOMAREVA *et al.*, 2017; WANG, WANG, HU, 2016).

Na aterosclerose, essas MVs parecem atuar causando dano endotelial, propiciando a formação de coágulos e o desenvolvimento da inflamação, bem como promovendo eventos celulares e vasculares que levam à trombose local (HOLVOET, HULSMANS, 2013; PONOMAREVA *et al.*, 2017), sendo encontrados significativamente diferentes tipos de MVs com capacidade zimoplástica em ateromas (LI *et al.*, 2016). Adicionalmente, há evidências de que as MVs contribuem na formação da lesão primária da aterosclerose, na calcificação vascular, na progressão do ateroma e também, após a ruptura da placa, na formação do trombo (ANOUAR, DASKALOPOULOU, 2018).

A relação das MVs com os distúrbios tromboembólicos sugere que elas possam ser usadas como biomarcadores que sinalizam o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (BURNOUF *et al.*, 2014; HOLVOET, HULSMANS, 2013; POON *et al.*, 2018; WANG, WANG, HU, 2016). Estudos demonstraram que elas se apresentam em concentrações mais elevadas na circulação plasmática de indivíduos com alto risco para o desenvolvimento de DCV do que em indivíduos com baixo risco (EL-GAMAL *et al.*, 2019; FRANÇA *et al.*, 2014; PONOMAREVA *et al.*, 2017).

Apesar das MVs poderem ser originadas principalmente de células eucarióticas de diversos tipos celulares de mamíferos, elas foram predominantemente caracterizadas como provenientes de plaquetas (MVP), eritrócitos (MVER), leucócitos (MVL), neutrófilos (MVN), monócitos/macrófagos (MVM), eosinófilos (MVEo), basófilos (MVB), células endoteliais (MVE) e células da musculatura lisa (MVML). Nem todas as MVs estão diretamente relacionadas com o desenvolvimento das lesões ateroscleróticas, sendo as MVs derivadas de plaquetas (MVP), eritrócitos (MVER), leucócitos (MVL), monócitos (MVM), células endoteliais (MVE) e células da musculatura lisa (MVML) as mais reconhecidas pelo seu

papel nesse contexto (FRANÇA *et al.*, 2013; FRANÇA *et al.*, 2014). Por essa razão, o presente estudo é focado nessas MVs.

Tendo em vista o impacto das DCV na saúde da população e na economia mundial, a relação que as MVs têm demonstrado com o desenvolvimento da aterosclerose e a possibilidade de utilizar as MVs como um biomarcador para disfunção endotelial, afecções e DCVs (FRANÇA *et al.*, 2013; GYÖRGY *et al.*, 2011b; TKACH, THÉRY, 2016), o presente trabalho objetivou realizar uma revisão narrativa sobre a atividade das MVs circulantes oriundas de células sanguíneas, endoteliais e da musculatura lisa que estão envolvidas no processo aterosclerótico.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Desenvolver uma revisão narrativa sobre o envolvimento das microvesículas (MVs) de origem plaquetária, eritrocitária, monocitária, neutrofilica, linfocítica, endotelial e da musculatura lisa que circulam no plasma e atuam nos processos envolvidos na aterosclerose.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Descrever as principais características morfológicas, o processo de formação e a classificação das VEs e das MVs atuantes na aterosclerose;
- Discorrer sobre o papel das MVs nas etapas de formação, progressão e ruptura do ateroma;
- Elencar e descrever sucintamente as principais metodologias de isolamento e caracterização das MVs circulantes.

### 3 METODOLOGIA

O presente trabalho trata-se de uma pesquisa bibliográfica, baseada em informações descritas principalmente em artigos de revisões narrativas (podendo haver informações extraídas de revisões sistemáticas e de metanálises) publicados em revistas científicas cujos conteúdos estão indexados na base de dados MEDLINE, através da ferramenta de busca PubMed®.

Para a busca, foram utilizados dois ou mais descritores em inglês relacionados ao tema, empregando operadores booleanos para refinar as buscas da pesquisa. Foram selecionados artigos publicados preferencialmente entre os anos de 2000 a 2020, com enfoque nos anos de 2010 a 2020, tendo o propósito de obter informações atualizadas em torno do tema, que contribuam para alcançar os resultados almejados com esta pesquisa.

Adicionalmente, incluíram-se outras informações baseadas em páginas oficiais de órgãos governamentais (Ministério da Saúde do Brasil, por exemplo), de agências internacionais (OMS, por exemplo), podendo também haver informações extraídas de base de dados internacional relacionado às MVs (Vesiclepedia) e de *sites* relacionados à área da saúde em geral.

## 4 REVISÃO DA LITERATURA

### 4.1 Vesículas extracelulares (VEs)

VEs são estruturas pequenas com bicamada fosfolipídica, formadas a partir da membrana plasmática de diferentes tipos de células de mamíferos, tanto procarionte quanto, principalmente, eucarionte. Muitos autores não especificam de quais tipos celulares elas podem originar-se. Alguns apenas relatam que podem ocorrer em diversos ou em todos os tipos celulares, sendo liberados frequentemente de forma natural para o meio extracelular e incapazes de se multiplicar (GREENING, SIMPSON, 2018; SHAO *et al.*, 2018; THÉRY *et al.*, 2018; VAN DER POL *et al.*, 2012).

A determinação da origem e fenotipagem das VEs baseia-se, principalmente, na caracterização da sua membrana, principalmente na medição de lipídios e a composição proteica, o que pode dificultar determinar com exatidão a origem de todas as VEs, uma vez que muitas delas possuem a mesma composição proteica e lipídica (VAN DER POL *et al.*, 2012).

Em relação à composição proteica das VEs, é comum os diferentes tipos apresentar em anexina XI, V, VI, CD156c, proteínas ACE, EHD4, além de flotilina e proteína de choque térmico 70 kDa. Por outro lado, a composição lipídica inclui esfingomiéline, ceramida, colesterol, fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilserina (PS), podendo um ou outro desses lipídios (principalmente PS e PE) serem mais ou menos evidentes, dependendo do tipo de VE (ANOUAR, DASKALOPOULOU, 2018).

As VEs estão presentes abundantemente nos variados fluidos corpóreos como sangue total, sangue umbilical, urina, leite, saliva, líquido cefalorraquidiano, líquido ascítico, líquido pleural, líquido sinovial, bile e sêmen (ANGELILLO-SCHERRER, 2012; RAPOSO, STOORVOGEL, 2013), além do espaço intersticial de órgãos sólidos, nos tumores e até mesmo em ateromas (SHU *et al.*, 2019), e o seu tempo de meia-vida circulante está, no geral, em torno de 5 a 10 minutos, sendo posteriormente eliminadas por macrófagos presentes nos pulmões, fígado e baço (KUO *et al.*, 2017).

Como mencionado anteriormente, a vesiculação das VEs pode ser considerada uma forma de trocicitose, ou seja, uma forma de transferência de componentes da membrana e do citoplasma de uma célula para outra (GYÖRGY *et al.*, 2011a; TÓKÉS-FÜZESI *et al.*, 2018; POON *et al.*, 2018).

Diversas moléculas bioativas como eicosanoides, proteínas e ácidos nucléicos podem ser transportados entre células por meio das VEs, permitindo que as células receptoras que captam tais vesículas tenham suas vias de sinalização reprogramadas, seu fenótipo modificado e, conseqüentemente, uma modulação de determinadas funções e atividade dessas células-alvo (GREENING, SIMPSON, 2018; RECORD *et al.*, 2018).

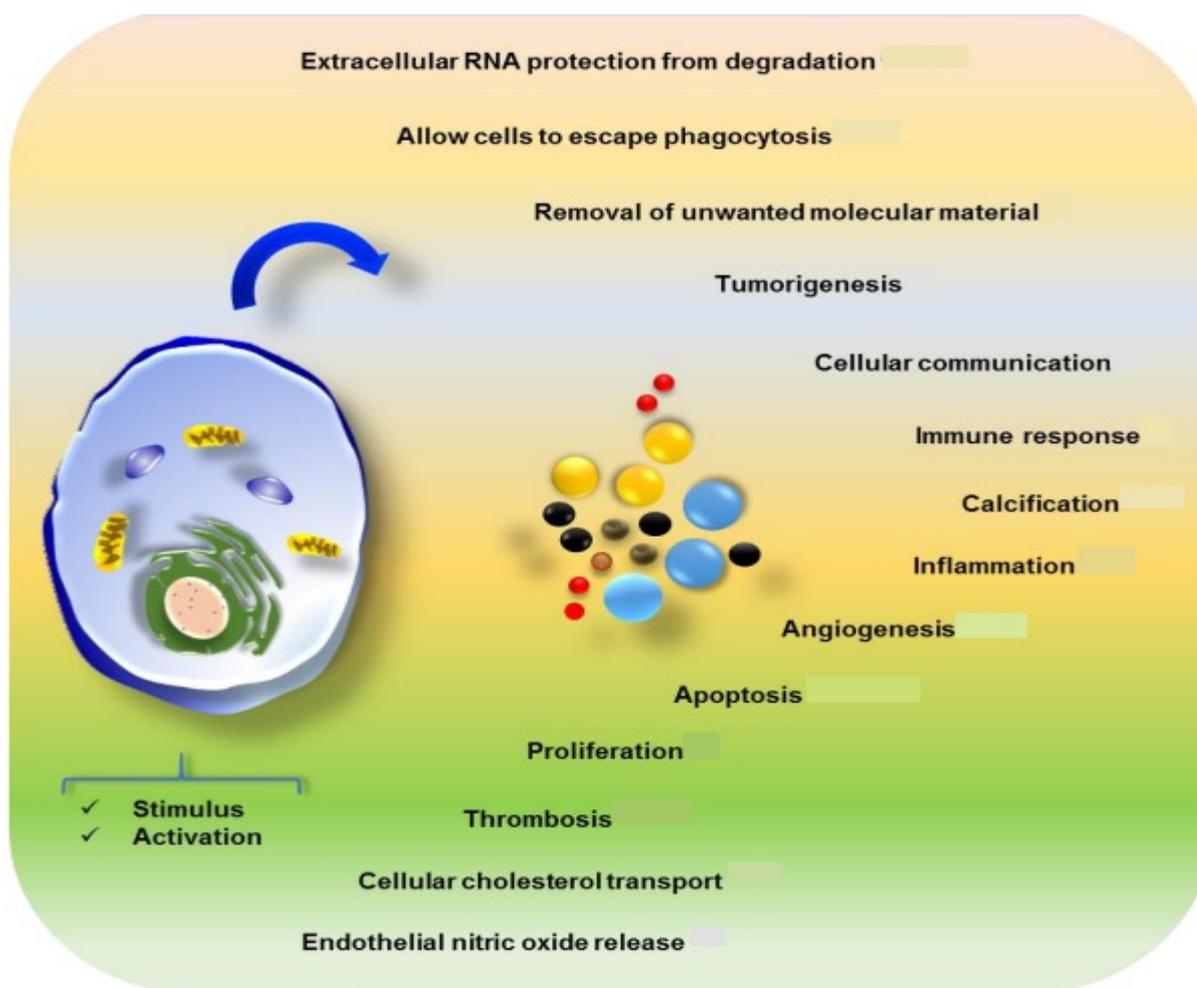
Os ácidos nucléicos que as VEs têm a capacidade de transportar e transferir às células receptoras são de diferentes espécies de ácido ribonucleico (RNA) como micro RNA (miRNA), RNA mensageiro (mRNA), RNA de transferência (tRNA), RNA ribossomal (rRNA) entre outros RNAs não codificantes, podendo oferecer proteção contra a ação da ribonuclease (RNase) (ANOUAR, DASKALOPOULOU, 2018).

As VEs participam de processos fisiológicos como diferenciação de células-tronco, ativação e inibição da coagulação, angiogênese, fisiologia placentária, regeneração tecidual, ativação neural, transferência de endocanabinóide, regulação do acúmulo de fármacos e substâncias residuais intracelulares, aumento do tempo de apresentação do antígeno aos nódulos linfáticos, promoção da diferenciação de células TCD4 em Treg (reguladoras) e sinalização e modulação de vias de ativação celulares (GREENING, SIMPSON, 2018, RECORD *et al.*, 2018; SHAO *et al.*, 2018; VAN DER POL *et al.*, 2012; YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015).

Devido à capacidade de gerar comunicação intercelular, as VEs podem ser analisadas como promissores biomarcadores circulantes, tanto para fins de diagnóstico quanto monitoramento de doenças, pois também participam de processos relacionados a diversas doenças como câncer, doenças neurodegenerativas, diabetes mellitus, DCVs, doenças autoimunes, imunodeficiência pela infecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), distúrbios tromboembólicos e processos imunológicos, entre outros (GREENING, SIMPSON, 2018; GYÖRGY *et al.*, 2011a; SHAO *et al.*, 2018; THÉRY *et al.*, 2006; YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015).

A Figura 1, adaptada de Anouar e Daskalopoulou (2018), apresenta, sucintamente, as funções biológicas das quais as VEs participam positiva ou negativamente (ANOUAR, DASKALOPOULOU, 2018).

Figura 1 – Vesículas extracelulares e suas funções biológicas



Fonte: ANOUAR, DASKALOPOULOU, 2018

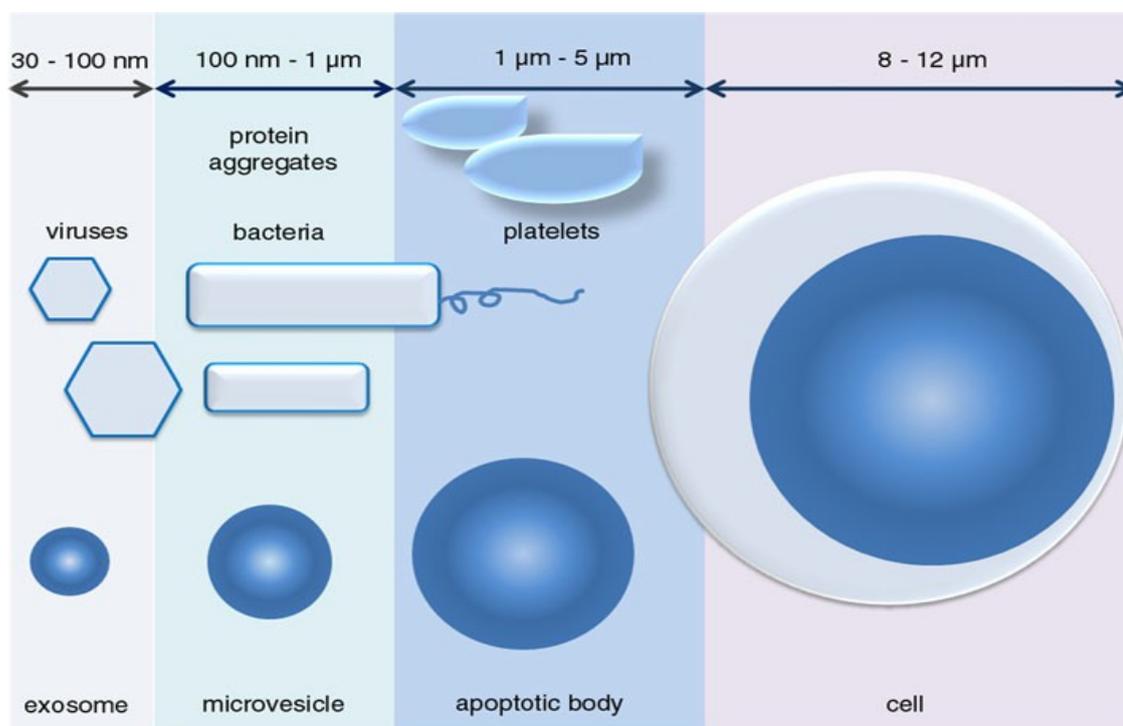
A formação das VEs ocorre em resposta a estímulos capazes de provocar alterações morfológicas na estrutura membranar das células, possibilitando o desenvolvimento e a excreção de vesículas para o meio extracelular (CHEN *et al.*, 2020; GREENING, SIMPSON, 2018). Dentre os estímulos que podem originar VEs, pode-se citar a ativação celular, o estresse oxidativo, o estresse de cisalhamento, a hipóxia (CHEN *et al.*, 2020), a ação de endotoxinas, de citocinas, do sistema complemento e, principalmente, o processo de apoptose, tão importante para a renovação celular quanto para a manutenção da homeostasia fisiológica (BURNOUF *et al.*, 2014; FRANÇA *et al.*, 2014; TÓKÉS-FÜZESI *et al.*, 2018; POON *et al.*, 2018; WESTWRMAN, POTER, 2016).

## 4.2 Tipos de vesículas extracelulares (VEs)

As VEs são estruturas heterogêneas que recebem variadas nomenclaturas e diferem entre si em aspectos como o tamanho, a densidade flutuante, sua via de biogênese, os componentes citoplasmáticos, os marcadores membranares proteicos e a composição lipídica (RAPOSO, STOORVOGEL, 2013; YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015), tendo em comum apenas o fato de que são estruturas menores que células e maiores que proteínas (SHAO *et al.*, 2018).

Embora a classificação das VEs esteja sob forte investigação e discussão, existem três subpopulações distintas que são comumente relatadas e reconhecidas: os exossomos, as MVs e os corpos apoptóticos (GYÖRGY *et al.*, 2011a; RAPOSO, STOORVOGEL, 2013; SHAO *et al.*, 2018). Essa classificação está principalmente relacionada com o tamanho e origem dessas VEs, contudo, reconhece-se que existem três populações maiores de VEs (Figura 2) (BURNOUF *et al.*, 2014; GYÖRGY *et al.*, 2011b).

Figura 2 – Intervalos de tamanhos das vesículas extracelulares (VEs)



Fonte: GYÖRGY *et al.*, 2011a

Os exossomos são estruturas de bicamada lipídica com densidade entre 1,09 a 1,13 g/mL (GREENING, SIMPSON, 2018) e que possuem um diâmetro entre 30 e 100 nm,

divergindo entre autores para 40 e 100 nm (BURNOUF *et al.*, 2014; COLOMBO *et al.*, 2014; GYÖRGY *et al.*, 2011b; JONES *et al.*, 2018).

Os exossomos são originados por meio de exocitose de corpos multivesiculares e que resultam do processamento intracelular e reciclagem (BURNOUF *et al.*, 2014; GYÖRGY *et al.*, 2011b). Mais detalhadamente, eles são formados por via endossomal a partir de membranas internas (MECKES, RAAB-TRAUB, 2011), originados por um processo de invaginação dos endossomos maturados (conhecidos como corpos multivesiculares – MVB) e posterior brotamento interno da membrana, formando vesículas intraluminais (ILVs) que podem se fundir e posteriormente serem degradadas pelos lisossomos (PREFIEGER, VITALE, 2018).

Durante esse processo, o MVB pode ser degradado ou ainda se fundir à membrana celular com posterior exocitose dessas vesículas (então exossomos) resultantes do processamento de reciclagem intracelular (COLOMBO *et al.*, 2014; GREENING, SIMPSON, 2018).

Essas estruturas possuem algumas proteínas específicas às quais nem todos os autores deixam claro quais são, porém, as mais frequentemente relatadas são complexos proteicos para transporte (ESCRTs, como Alix e TSG101), enzimas hidrolases (como GTPases, Rab e ARF6), proteínas de membrana (como tetraspaninas – TSPANs, CD9 – abundante nesse tipo de VE e propício biomarcador para tal, CD63, CD81 e CD82, integrinas, moléculas de adesão intercelular, receptores glutamatérgicos, flotilina, anexinas, proteínas de choque térmico 70 kDa e 90 kDa), além de lipídios (como colesterol, esfingomiéline, ceramida, fosfatidilserina e fosfatidilesfingomiéline) (ANOUAR, DASKALOPOULOU, 2018; THÉRY *et al.*, 2002; ZOMER *et al.*, 2010).

Os corpos apoptóticos, que são estruturas maiores, com diâmetro entre 1 e 5 µm e que também são originados por brotamento da membrana plasmática e fragmentação de células apoptóticas (BURNOUF *et al.*, 2014; GYÖRGY *et al.*, 2011b).

Essas vesículas possuem exposição de PS, assemelhando-se a plaquetas humanas ativadas ou apoptóticas, não somente nesse aspecto, mas também com relação ao diâmetro. Sua morfologia costuma ser mais heterogênea se comparado às outras VEs, e sua densidade está entre 1,16 a 1,28 g/mL (VAN DER POL *et al.*, 2012).

Devido à proporção dos corpos apoptóticos quando comparados a outros tipos de vesículas, podem apresentar diferente composição lipídica e proteica. Elas também são capazes de armazenar diferentes organelas inteiras (BLASER, AIKAWA, 2018).

Para a formação da VE é necessário que o citoesqueleto da célula sofra contração regulada por Rho-quinase ROCK1 e ROCK2 (induzidas por caspase 3), cujas proteínas são as mesmas responsáveis por realocar fragmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA) celular para o interior da vesícula (LEROYER, TEDGUI, BOULANGER, 2008).

As MVs ou micropartículas (MPs) possuem um tamanho entre 100 e 1000 nm, são oriundas do brotamento da membrana plasmática (BURNOUF *et al.*, 2014; GYÖRGY *et al.*, 2011b) e, por serem o enfoque da presente revisão narrativa, serão descritas em maiores detalhes nos próximos tópicos.

### 4.3 Microvesículas (MVs)

MVs ou micropartículas (MPs) são os termos mais comumente usados para se referir a essas VEs. Elas são estruturas originadas pelo brotamento da membrana plasmática que foram observadas pela primeira vez por Chargaffe e West (1946), quando os pesquisadores comprovaram a existência de algum fator precipitável no plasma livre que facilitava a geração de trombina e consequente formação de fibrina, mesmo havendo depleção de fatores de coagulação, formando um sedimentado em forma de *pellets* em decorrência da alta velocidade de centrifugação (CHARGAFF, WEST, 1946).

Entretanto, apenas em 1967, Peter Wolf, utilizando a microscopia eletrônica, demonstrou por meio de seus estudos que o plasma livre obtido por ultracentrifugações de amostras de sangue total apresentava um componente subcelular com propriedade coagulante. Ele denominou esse componente de “poeira de plaquetas” e o descreveu como pequenas vesículas, oriundas da membrana celular de plaquetas ativadas, que agiam de modo similar ao fator III de coagulação, também conhecido como fator tecidual (FT), sendo a presença do FT o responsável pela capacidade apresentada pelas vesículas de converterem protrombina em trombina (GRAF, RUF, 2018; WOLF, 1967).

Em 1971, Crawford descreveu uma estrutura vesicular que possuía atividade de ATPase, e que seus lipídios possuíam capacidade de abrigar fração livre de serotonina do plasma (CRAWFORD, 1971). Posteriormente, estudos com microscopia eletrônica descobriram que essas vesículas eram diferentes das inicialmente descritas por Peter Wolf, pois essas provinham da membrana de hemácias senescentes e sua produção era estimulada por ativação celular ou apoptose (MURADOR, DEFFUNE, 2007; WESTWRMAN, POTER, 2016).

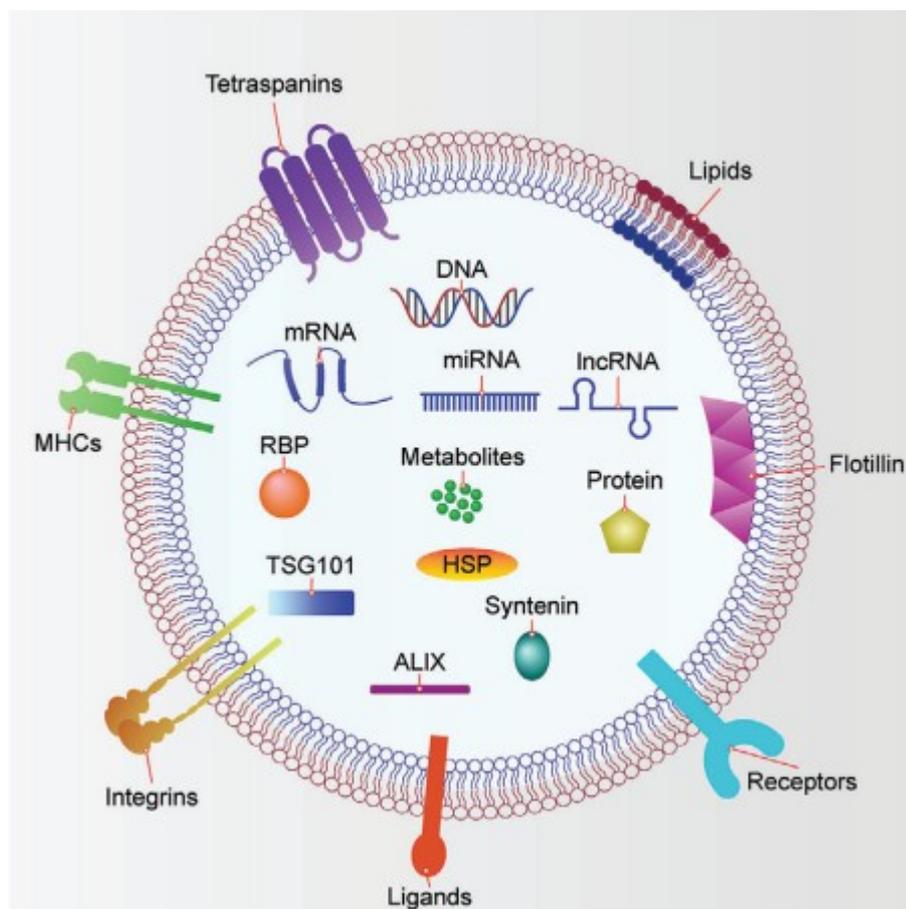
### 4.3.1 Composição das microvesículas (MVs)

As MVs são estruturas anucleadas que possuem diâmetro variável dentro da escala nanométrica, geralmente entre 100 nm e 1µm (THÉRY *et al.*, 2009). Entretanto, alguns autores descrevem variações dentro desses valores, como de 20 a 50 nm (WOLF, 1967), média de 180 nm (GYÖRGY *et al.*, 2011a), média de 80 nm (DRA-GOVIC *et al.*, 2011), de 200 a 800 nm (TURIÁK *et al.*, 2011), de 100 a 150 nm (GREENING, SIMPSON, 2018) e de 100 a 500 nm, podendo muitas vezes se sobrepor em tamanho aos exossomos (BLASER, AIKAWA, 2018).

As MVs normalmente apresentam-se em uma forma esférica, podendo lembrar uma xícara ou forma de brotos, mas também podem ser encontradas em forma tubular. Elas possuem bicamada fosfolipídica (com lipídios bioativos) com a presença marcante de PS expostas e cujos fosfolipídios são aniônicos e capazes de promover a formação de complexos proteicos pró-coagulantes capazes de gerar trombina (AMABILE *et al.*, 2010; BURNOUF *et al.*, 2014).

As MVs apresentam em sua estrutura muitos constituintes que também estão presentes em outras VEs e, também de forma similar, quaisquer estruturas existentes nas MVs, seja na membrana ou no citoplasma, variarão em sua quantidade e constituição conforme a célula de sua biogênese, podendo ser: proteínas citoplasmáticas, transmembranares ou lipoproteínas que servem como marcadores de superfície – *cluster* de diferenciação (CD); proteínas citosólicas ou intracelulares; metabólitos de baixo peso molecular como trifosfato de adenosina (ATP); enzimas; aminoácidos; e diferentes espécies de RNAs (Figura 3) (ANGELILLO-SCHERRER, 2012; CECCATTO, 2015; FRANÇA *et al.*, 2014; THÉRY *et al.*, 2018; TKACH *et al.*, 2018; TÓKÉS-FÜZESI *et al.*, 2018; WANG, LU, 2017; WESTWRMAN, POTER, 2016). Adicionalmente, as MVs podem apresentar ou não citoesqueleto (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013; YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015).

Figura 3 – Composição das microvesículas (MVs)



Fonte: TENG, FUSSENEGGER, 2020

Além das proteínas e lipídios em comum às demais VEs, as MVs em geral possuem uma composição proteica rica em metaloproteínas de matriz (por exemplo, MMP-2, 3, 9, 13), glicoproteínas e selectinas (por exemplo, CD62 e CD62P), integrinas, anexina A5, Apo AII, ARF6, CD45, proteína G acoplado ao receptor 150 (GPR150), e isoformas de proteína de choque térmico 90 kDa alfa membro de classe B1 (HSP90AB1) (ANOUAR, DASKALOPOULOU, 2018; BLASER, AIKAWA, 2018; RAPOSO; STORVOGEL, 2013; YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015).

#### 4.3.2 Formação das microvesículas (MVs)

O mecanismo molecular pelo qual ocorre a formação das MVs ainda não é totalmente compreendido, no entanto, acredita-se que todas as MVs tenham um mecanismo de formação em comum, apesar de suas diferentes células de origem. A teoria mais aceita atualmente é que elas são provenientes de alterações da estrutura celular que causam uma posterior exposição

da PS na superfície da bicamada lipídica membrana. Após a sua formação, geralmente, a sua liberação é decorrente de uma degradação do citoesqueleto que ocorre por uma proteólise dependente de cálcio (HUGEL *et al.*, 2005).

Os mecanismos desencadeantes das alterações estruturais e consequente exposição da PS são diversos e normalmente associados a apoptose e/ou a ativação celular, que podem ocorrer pela ação tanto de agonistas de estresse físicos quanto químicos (MARTINEZ *et al.*, 2004) como cisalhamento, estresse oxidativo, endotoxinas, citocinas e ação do complemento (BURNOUF *et al.*, 2014; FRANÇA *et al.*, 2014; TÓKÉS-FÜZESI *et al.*, 2018; POTER, 2016; POON *et al.*, 2018; WESTWRMAN, POTER, 2016).

A formação das MVs pode ser resumidamente descrita como uma atividade complexa com reorganização do citoesqueleto e perda da fisiologia assimétrica da bicamada fosfolipídica membrana. Alguns autores ainda sugerem que haja o envolvimento de componentes do citoesqueleto (por exemplo: actina e microtúbulos), das proteínas cinesinas e miosinas, e do complexo proteico *soluble NSF attachment receptor* (SNARE) (CAI *et al.*, 2007; SHU *et al.*, 2019).

Primordialmente, para a formação das MVs, é necessário que ocorra um aumento da concentração citosólica de íons cálcio ( $Ca^{2+}$ ), assim como que a ação de mecanismos dependentes de caspases desencadeiem uma assimetria na distribuição fosfolipídica da membrana plasmática, que levará a degradação do citoesqueleto pela ativação de proteases dependentes de  $Ca^{2+}$ , seguido de liberação da vesícula (CHOI *et al.*, 2014).

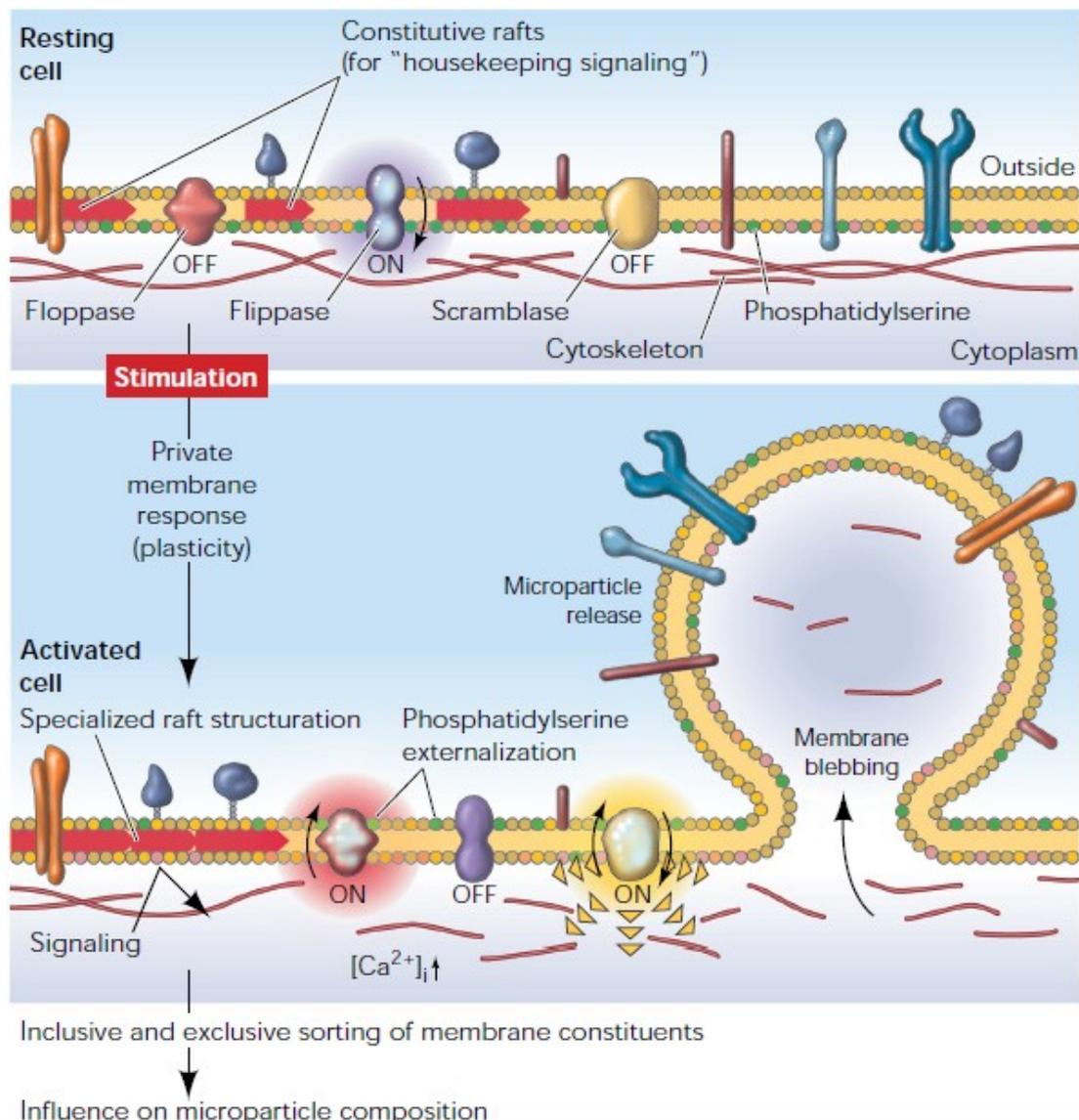
Logo, essa assimetria fosfolipídica leva a ação da protease gelsolina sobre os filamentos de citoesqueleto, o que acarreta na transferência de aminofosfolipídios e na ativação de scramblase e floppases no transporte de componentes citoplasmáticos e fosfolipídios. Além desses eventos, ocorre a clivagem da actina do citoesqueleto pela protease calpaína, que ocasiona a desestruturação e destruição das fibras do mesmo, induzindo a uma curvatura da membrana plasmática em direção ao meio extracelular e sua posterior fissão, permitindo a liberação direta da membrana plasmática em forma de MVs (HUGEL *et al.*, 2005; KRAJEWSKA-WLODARCZIK *et al.*, 2019; SALZER, 2002; SHET, 2008; WAGNER *et al.*, 1986).

Dessa forma, o processo de formação das MVs, no geral, é promovido por uma alteração no folheto externo da membrana após ativação celular, por meio de uma proteína de ligação ao esfingolipídeo (esfingomiéline), após hidrólise dessa membrana. Ao mesmo tempo, devido a ativação de scramblase e floppase, ocorre o deslocamento da PS e PE para o folheto

externo da membrana, através da ligação e intervenção do autoantígeno proteinase 3 (PR3), o que favorece e define as MVs (CHOI *et al.*, 2014; RECORD *et al.*, 2018).

Segundo Hugel *et al.* (2005), a formação das MVs é uma decorrência da estimulação celular seguida de uma reorganização geral e da “jangada de lipídios” (que faz parte de um processo de classificação de proteínas, onde se formam entre os folhetos da membrana domínios altamente enriquecidos com lipídios), exteriorizando a PS com PE e liberando MVs, numa composição em particular que dependerá de inclusões e exclusões controladas pelos constituintes em “jangada” (Figura 4) (HUGEL *et al.*, 2005).

Figura 4 – Estimulação celular e resposta da membrana plasmática



Fonte: HUGEL *et al.*, 2005

Desse modo, é possível afirmar que a formação de MVs ocorre principalmente em domínios ricos em lipídios (jangadas) dentro da membrana plasmática e que em frações distintas da membrana celular pode gerar diferentes populações de MVs (RECORD *et al.*, 2018).

Após a sua formação e externalização, geralmente, a liberação das MVs a partir da membrana plasmática ocorre por um processo conhecido como ectocitose, que pode ocorrer de forma espontânea ou induzida por estímulos que levam a uma perda da morfologia (ANGELILLO-SCHERRER, 2012).

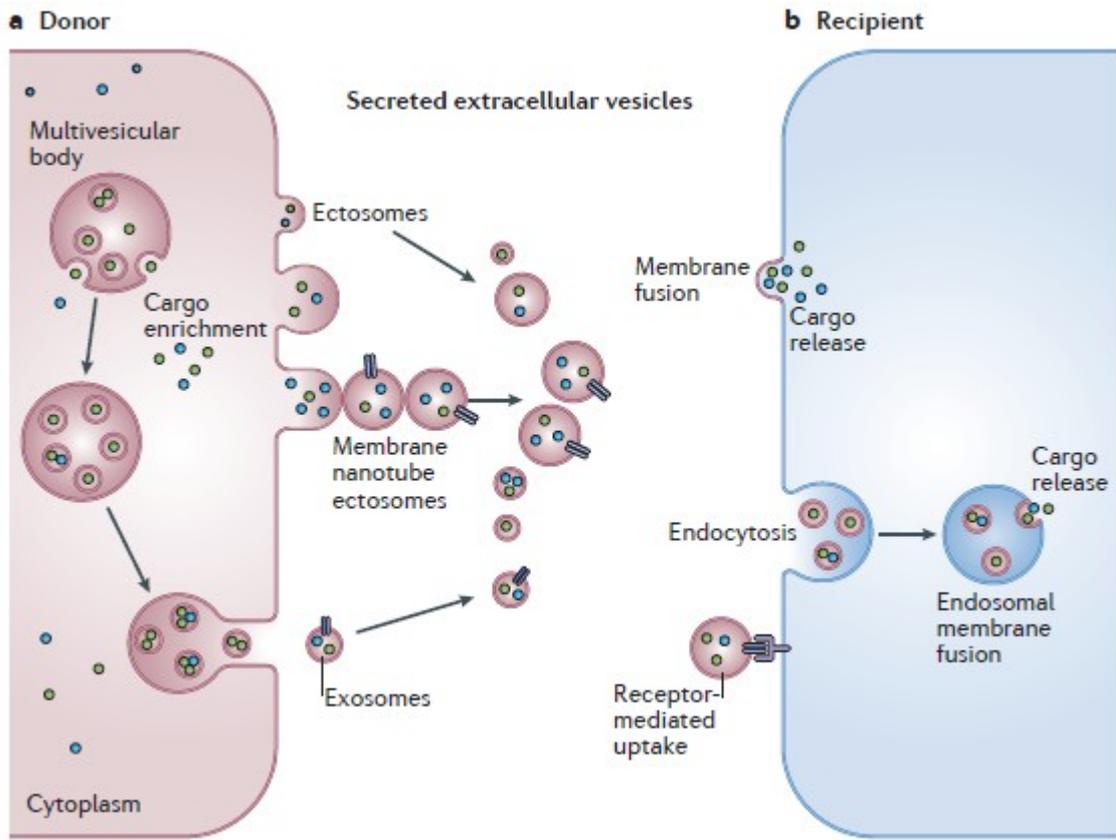
### 4.3.3 Interação das microvesículas (MVs) com as células receptoras

Acredita-se que a liberação de MVs tenha diversos propósitos, como, por exemplo, auxiliar a célula a eliminar constituintes indesejados e que podem levar a apoptose (caspase 3, por exemplo) ou, ainda, ao seu reconhecimento por fagócitos (BLUM, 2009).

Essa ligação entre a MV e a célula-alvo, permite que ambas se acoplem, desacople ou sofram fusão, com posterior internalização da MV (RAPOSO, STORVOGEL, 2013). As MVs atuam em diversos processos como inflamação, coagulação, sobrevivência celular, apoptose, angiogênese, remodelagem vascular e controle da função endotelial (ANGELILLO-SCHERRER, 2012; FILHO, KIMURA, 2006; FRANÇA *et al.*, 2014; KRAJEWSKA-WLODARCZIK *et al.*, 2019; TÖKÉS-FÜZESI *et al.*, 2018; VAN NIEL, D'ANGELO, RAPOSO, 2018; WESTWRMAN, POTER, 2016; YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015).

A interação das MVs com as células é aleatória, podendo ocorrer por endocitose ou fusão membranar. Em alguns casos, a interação pode ser direcionada, nesses casos, para que as MVs possam interagir com as células-alvo, elas possuem componentes biologicamente ativos em sua superfície, cuja ligação é direcionada a receptores específicos nas células adjacentes (como é o caso da PS que se liga aos receptores PS Tim1 e Tim4 da célula receptora) (Figura 5). A interação das MVs pode ocorrer em curtas distâncias, ou seja, com células-alvo próximas à sua célula de biogênese, ou ainda com células-alvo de tecidos distantes que são alcançados pelas MVs por meio da sua circulação pelo sangue ou outros fluidos corporais (SZEMPRUCH *et al.*, 2016). Caso as MVs não interajam com nenhuma célula-alvo, elas são eliminadas do organismo por degradação (RECORD *et al.*, 2018).

Figura 5 – Formação e mecanismos de interação de vesículas extracelulares e célula-alvo



Fonte: SZEMPRUCH et al., 2016

Independentemente do mecanismo empregado, como consequência da internalização da MV pela célula-alvo, há transferência do seu conteúdo bioativo para dentro da célula, o que modifica o fenótipo e altera o funcionamento fisiológico da mesma. Em alguns casos, os constituintes da MV podem ficar armazenados no endossomo da célula receptora, tendo uma ação tardia (EL-GAMAL *et al.*, 2019; RAPOSO, STORVOGEL, 2013; THÉRY, TKACH, 2016).

#### 4.3.4 Ação das microvesículas (MVs) envolvidas na aterosclerose

Nos últimos anos, descobriu-se que as MVs têm forte impacto no dano endotelial, na ativação plaquetária e no estado de hipercoagulabilidade, fatores que estão relacionados diretamente ao risco cardiovascular, principalmente na aterogênese e na trombose (SHANTSILA, KAMPHUISEN, LIP, 2010). Abaixo serão listadas e descritas as MVs mais frequentemente relacionadas a esses processos.

## – MICROVESÍCULAS ERITROCITÁRIAS (MVER)

A produção de microvesículas eritrocitária (MVER) ocorre ao longo do ciclo da vida dos eritrócitos devido ao processo de auto-oxidação recorrente das hemoglobinas que leva à oxidação da face citosólica da banda-3, uma proteína transmembranar, o que causa a fosforilação da tirosina da proteína, o que resulta na dissociação da banda-3 do citoesqueleto e facilitação da vesiculação (LI *et al.*, 2016).

O armazenamento de sangue também pode causar a produção de MVERs devido ao esgotamento dos recursos de ATP, o que diminui a atividade das bombas de cálcio e promove influxo do cálcio intracelular. Isso altera a atividade de enzimas membranares diretamente envolvidas na manutenção da assimetria dos fosfolipídios e que são dependentes de cálcio, como flippases, floppases e escramblases. Tal alteração expõem fosfolipídios aniônicos, principalmente PS, no folheto externo da membrana, causando a formação e liberação das MVER (KUO *et al.*, 2017).

As MVER apresentam, em sua maioria, de 100 a 300 nm e o seu marcador de superfície característico é o CD235a. Elas também expressam com frequência CD47, CD59a e receptor Fas (CD95) (LI *et al.*, 2016). As MVER geralmente são compostas por fosfolipídios e colesterol e são ricas em hemoglobina e glicosilfosfatidilinositol (GPI) oriundo de proteínas transmembranares. Elas também possuem proteínas como sinexina, sorcina, estomatina e glicoforina, fator de aceleração de decaimento (DAF) e acetilcolina esterase (LOW, ZILVERSMIT, 1980; SADALLAH, EKEN, SCHIFFERLI, 2011; WESTWRMAN, POTER, 2016). Nesse tipo específico de MV, também são observados caspases 3 e 8 (LI *et al.*, 2016).

As MVER inibem citocinas pró-inflamatórias de macrófagos expostos aos lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos ou ao glucano zymosan A (LOW, ZILVERSMIT, 1980; SADALLAH, EKEN, SCHIFFERLI, 2011; WESTWRMAN, POTER, 2016).

Em relação ao seu papel na aterosclerose e outras DCVs, as MVER parecem regular em parte o processo aterosclerótico através da atuação no estresse oxidativo e nas atividades inflamatórias. Aparentemente, elas são efetoras da ativação e lesão das células endoteliais, capazes de promover a adesão celular de monócitos à parede vascular, exercer atividade pró-coagulante com promoção e formação de trombos, e desregular a função endotelial ao comprometer a vasodilatação. Desta forma, a presença dessas MVs contribui para a progressão do ateroma, possivelmente devido à transferência de miRNAs, mas principalmente pelo aumento da formação de trombina *in vivo*, seja através da via intrínseca ou extrínseca (EL-GAMAL *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2016; POON *et al.*, 2018).

Para Li et al. (2016), a adesão celular que ocorre no processo de formação da aterosclerose é influenciada pela presença da PS presente nas MVEr e a hipercoagulação gerada por essa MV pode ocorrer tanto pela intervenção em mecanismos pró-trombóticos quanto pela inibição dos anticoagulantes. As MVEr induzem a produção de trombina por meio do fator XII ativado (FXIIa) que ativará o fator XI (FXIa) e iniciará via intrínseca da coagulação. Alternativamente, a PS se liga ao fator VIIa (FVIIa) e o TF e dá início à via extrínseca da coagulação. A ativação de qualquer uma das vias da coagulação causará a ativação da protrombina e consequente produção de fibrina (LI *et al.*, 2016).

A PS também contribui para o aumento da coagulação ao se ligar diretamente à protrombina, gerando trombina, ou ainda auxiliando na liberação do receptor da proteína C endotelial (EPCR), oriundo de células endoteliais, que, quando presente no plasma, pode aumentar o risco de coagulação (LI *et al.*, 2016).

Paradoxalmente, alguns autores relataram que as MVEr apresentam uma ação anticoagulante e que esta aparenta apresentar algum equilíbrio com a atividade pró-coagulante. A ação anticoagulante estaria relacionada à proteína C, um anticoagulante natural, presente na membrana dessas MVs e a sua interação com o plasminogênio, resultando em uma atividade fibrinolítica (KOSHIAR, SUKHAREVA, LAVRENTIEVA, 2014; LEVIN *et al.*, 2015).

Por sua vez, segundo sugere Blum (2009), há possibilidade de haver uma função anticoagulante devido a uma correlação inversa entre a capacidade pró-trombótica dessas MVs e as concentrações de complexos antitrombóticos no plasma circulante, pois, a geração de uma pequena quantidade de trombina seria responsável por ativar a proteína C (BLUM, 2009).

#### – MICROVESÍCULAS PLAQUETÁRIAS (MVPs)

Ainda que todas as células tenham a capacidade de produzir e liberar MVs, sabe-se que as de origem plaquetária (MVPs) são as que estão presentes em maior percentual detectável no plasma de indivíduos saudáveis, sendo que pode haver aumento considerável de suas concentrações em algumas condições como gravidez, após atividade física intensa, obesidade e tabagismo. Essas MVs são importantes tanto para a homeostasia quanto para a trombose (FRANÇA *et al.*, 2014; PONOMAREVA *et al.*, 2017; WANG, WANG, HU, 2016) e, ainda que elas sejam produzidas de forma contínua, sua geração pode ser acelerada quando existe ativação plaquetária (SHANTSILA, KAMPHUISEN, LIP, 2010).

As MVPs foram primeiramente caracterizadas por Wolf em 1967 como partículas coagulantes que não eram plaquetas intactas, mas “poeira” de plaquetas com capacidade de gerar trombina (FRANÇA *et al.*, 2014; PONOMAREVA *et al.*, 2017; WANG, WANG, HU, 2016).

O principal marcador de superfície das MVPs é o CD41a, também conhecido como glicoproteína GPIIb (FRANÇA *et al.*, 2014; KRAJEWSKA-WLODARCZIK *et al.*, 2019; MARTÍNEZ, TESSE, ZOBARI, ANDRIANTSITOHAINA, 2004; ROSÍNSKA *et al.*, 2019; SILVA, HORTA, PINTO, 2009). As MVPs também podem expressar outros marcadores como a GPIb (CD42b), a GPIIIa (CD61), a GPIa (CD49b), o fator de von Willebrand (FvW), a P-selectina (CD62P), a trombospondina e os receptores de quimiocina. Para Shantsila, Kamphuisen e Lip (2010), a natureza do estímulo pelo qual as MVPs foram originadas e o estado funcional das plaquetas é refletido em sua composição lipídica e proteica. Por exemplo, MVPs formadas a partir de plaquetas ativadas ou que estejam sob estímulo físico intenso têm uma capacidade pró-coagulante até 100 vezes maior do que uma plaqueta ativada. Outro fator que parece afetar o padrão dos constituintes dessas MVs é o seu tamanho (SHANTSILA, KAMPHUISEN, LIP, 2010).

As MVPs possuem atividade pró-inflamatória e pró-coagulante, promovem adesão celular de plaquetas, leucócitos e monócitos às CEs em locais em que há lesão do vaso, induzem monócitos e CEs a liberarem citocinas pró-inflamatórias, promovem ativação de plaquetas e CEs, além de estimular a proliferação e migração de células musculares lisas. Elas também promovem angiogênese devido à ativação das CEs (BURNOUF *et al.*, 2014; FRANÇA *et al.*, 2014; HOLVOET, HULSMANS, 2013; KRAJEWSKA-WLODARCZIK *et al.*, 2019; MARTÍNEZ *et al.*, 2004; PONOMAREVA *et al.*, 2017; ROSÍNSKA *et al.*, 2019; SHANTSILA, KAMPHUISEN, LIP, 2010; SILVA, HORTA, PINTO, 2009).

Dessa forma, as MVPs têm papel fundamental na aterosclerose, agindo principalmente na formação aterotrombótica nas artérias carótidas, tendo como protagonista a ação pró-coagulante gerada pela exposição da PS (HAFIANE, DASKALOPOULOU, 2018; WANG, WANG, HU, 2016).

Além dos mecanismos já citados pelos quais a PS pode ativar a coagulação, nas MVPs, os fosfolípidios oxidados podem também ativar o receptor do fator ativador de plaquetas (PAF). Esse contribuirá na produção do ácido lisofosfatídico, que é um mediador pró-inflamatório (LEROYER, TEDGUI, BOULANGER, 2008).

As MVPs também podem propiciar o desenvolvimento do ateroma ou até mesmo a formação de um trombo por meio da sua adesão ao endotélio que é mediada pela GPIIb/IIIa

presente na membrana de algumas MVPs. A adesão dessas MVs em locais com lesão causa o recrutamento e ativação de plaquetas, aumenta a adesão de leucócitos ao local e induz a proliferação de células musculares lisas e a produção de citosinas pró-inflamatórias (IL-1 e IL-6, por exemplo) (BLUM, 2009).

Outra contribuição dessas MVs na formação de ateromas é pela transferência de quimiocina RANTES para as CEs, o que propicia o recrutamento de monócitos pelo endotélio (LEROYER, TEDGUI, BOULANGER, 2008). Adicionalmente, as MVPs também participam da regulação das MVs derivadas de células endoteliais (MVEs), induzem apoptose das células progenitoras endoteliais e de macrófagos pela transferência de caspase 3, induzem a expressão de proteínas de adesão em monócitos (ICAM-1) e CEs (P-selectina e E-selectina) e ativam monócitos, CEs e neutrófilos, o que amplia a lesão tecidual (SHANTSILA, KAMPHUISEN, LIP, 2010).

Apesar do seu papel na aterosclerose, as MVPs também parecem contribuir para a revascularização em isquemias miocárdicas, fornecendo vasoproteção (ANOUAR, DASKALOPOULOU, 2018).

#### – MICROVESÍCULAS LEUCOCITÁRIAS

As MVs originadas a partir das células leucocitárias como neutrófilos monócitos/macrófagos e linfócitos, costumam expressar em comum o marcador CD45+, podendo ser muito útil como biomarcadores de eventos cardiovasculares, devido à grande quantidade dessas MVs presentes em circulação. Essas MVs participam nas diferentes etapas da aterosclerose, pois possuem lipídios bioativos que atuam tanto positivamente quanto negativamente na homeostase, seja regulando os inibidores da coagulação ou a resposta inflamatória pela ação do FT (ANGELILLO-SCHERRER, 2012).

Essas MVs podem agir sobre o endotélio melhorando a função endotelial ou recrutando células inflamatórias até a parede vascular, contribuem para a formação de neovascularização em ateromas instáveis e, quando há ruptura da placa, ativam plaquetas participando da coagulação (ANGELILLO-SCHERRER, 2012).

De um modo geral, tanto as proteínas constituintes, quanto a composição lipídica e concentração plasmática dessas MVs podem ser observadas no estado subclínico da aterosclerose, sendo a transferência de FT à membrana plaquetária ou ainda ativando-as por fosforilação de proteína quinase serina/treonina (AKT) e interação P-selectina, iniciando assim a atividade pró-coagulante e conseqüentemente formando coágulos. Elas também

estimulam a formação de FT das células endoteliais e interferem na vasodilatação dependente do endotélio (LEROYER, TEDGUI, BOULANGER, 2008; MARTÍNEZ, *et al.*, 2004; SHANTSILA, KAMPHUISEN, LIP, 2010).

#### – MICROVESÍCULAS NEUTROFÍLICAS (MVNs)

As microvesículas neutrofílicas (MVNs) são liberadas quando a célula está ativada, apresentando diâmetro entre 50 a 200 nm e seu principal marcador de superfície é o CD66b, podendo exibir também CD15 e CD64 (ANGELILLO-SCHERRER, 2012). Essas MVs participam de diferentes atividades na aterosclerose, como na disfunção endotelial, na inflamação vascular, na ruptura do ateroma e finalmente na formação de trombo, devido à capacidade citotóxica dos componentes oriundos desse tipo celular (CHISTIAKOV, BOBRY SHEV, OREKHOV, 2015).

Os neutrófilos podem liberar dois subgrupos distintos de MVs (pré-aderente e pós-aderente) tendo ambos os grupos 223 proteínas em comum. As pós-aderentes estimulam a pré-adesão, coagulação e inflamação sobre as CEs, pois além de expressarem em sua superfície receptores antígeno de histocompatibilidade humana (HLA) de classe 1, também expressam a proteinase mieloperoxidase que, quando associadas às espécies reativas de oxigênio (ROS), inativa o fator anti-aterogênico endotelial – o óxido nítrico (NO) - promovendo adesão ao endotélio e assim modulando a resposta inflamatória. A mesma proteinase causa danos ao endotélio, podendo romper o ateroma (CHISTIAKOV, BOBRY SHEV, OREKHOV, 2015).

Essas MVNs também produzem leucotrieno B4 (LTB4) que aumenta a expressão de elastase, auxiliando na ativação e adesão de neutrófilos ao endotélio através da ativação da c-Jun N-terminal quinase (JNK1) (CHISTIAKOV, BOBRY SHEV, OREKHOV, 2015).

As MVNs possuem selectinas, integrinas, reguladores do complemento em sua superfície, receptores Fc exclusivos das células parentais, além de induzir a liberação de quimiocina (CCL2) e interleucina pró-inflamatória (IL-6) de CEs que pode contribuir diretamente para o processo inflamatório do endotélio. Essas MPs têm a capacidade de degradar a matriz extracelular pela ação das enzimas metaloproteinase – 9 (MMP-9), serina-protease elastase e proteinase 3 (CHISTIAKOV, BOBRY SHEV, OREKHOV, 2015; SHANTSILA, KAMPHUISEN, LIP, 2010).

As MVNs fixam componentes C3 e C4, ativando a via clássica do complemento, podendo se ligar ao receptor do complemento 1 de eritrócitos, comprometendo

essas células, e suas L-selectina agem na adesão. Essas MVs ativam plaquetas por meio da ligação com o antígeno do macrófago-1 (integrina Mac-1), aumentando a expressão da P-selectina que acumula FT, levando a deposição de fibrina, formando trombos. Além disso, o complexo de Mac-1 e MVNs quando interage com metaloproteinases (2 e 5), plasminogênio ou uroquinase, agem também na fibrinólise e ruptura da placa (ANGELILLO-SCHERRER, 2012).

A atividade anti-inflamatória dessas MVs pode ocorrer quando estão numa concentração razoável, regulando positivamente o FT. Essa regulação pode funcionar como cicatrizante nas lesões vasculares pela ação dos macrófagos, ao transportar anexina A1 impedindo a interação entre as CEs com o neutrófilo. Elas também estão envolvidas na cicatrização epitelial tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e influenciam na maturação das células dendríticas no local da lesão (ANGELILLO-SCHERRER, 2012; CHATFIELD, THIEBLEMONT, WITKO-SARSAT, 2018; CHISTIAKOV, BOBRY SHEV, OREKHOV, 2015; FINKIELSZTEIN, MASCARENHAS, BUTIN-ISRAELENSE, 2018; GASSER, SCHIFFERLI, 2004; SADALLAH, EKEN, SCHIFFERLI, 2011).

Outra característica interessante, citada por Chistiakov, Bobryshev e Orekhov (2015), é o fato de essas MVs inibem a angiogênese através da regulação dos receptores endoteliais do fator de crescimento endotelial vascular tipo 2 (VEGF-2) e da quinase ERK1/2, que regulam o receptor CD36 (anti-angiogênico) (CHISTIAKOV, BOBRY SHEV, OREKHOV, 2015).

#### – MICROVESÍCULAS MONOCÍTICAS/FAGOCÍTICAS (MVMs)

As MVs derivadas de monócitos/macrófagos (MVMs) possuem um diâmetro entre 30 e 300 nm (BLASER, AIKAWA, 2081), e caracterizados pela expressão dos marcadores CD11a, CD14, CD15 e CD18 (ANGELILLO-SCHERRER, 2012).

Conforme descrito por Saudes et al. (2015), diferentes tipos de monócitos atuam nas variadas etapas da aterosclerose, podendo ser distinguidos através de seus marcadores em monócitos (CD14 ++ CD16 -), monócitos intermediários (CD14 ++ CD16 +) e monócitos não clássicos (CD14 + CD16 ++), sendo as MVs dos monócitos não clássicos encontradas em concentrações plasmáticas maiores quando comparada as outras (SAUDES *et al.*, 2015).

As MVMs têm importante atividade pró-coagulante, pró-inflamatória e pró-apoptótica, sendo encontradas abundantemente nos ateromas. Elas promovem disfunção endotelial por meio da interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), e promovem recrutamento de células inflamatórias

através de transferência da molécula de adesão celular – 1 (ICAM-1) para células endoteliais, com ativação do fator de transcrição kappa B (NF- $\kappa$ B), aumentando a adesão monocítica, ativação do proliferador de peroxissomo agonista do receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), entre outros (FRANÇA *et al.*, 2014; HOLVOET, HULSMANS, 2013).

O grupo das MVMs é o segundo maior grupo de MVs altamente trombogênicos devido ao FT que, quando liga a plaquetas ativadas, leva a formação de fibrina. Essa MVs também prejudica a integridade das CEs, aumentando a trombogenicidade endotelial, por reduzir a expressão do inibidor da via do FT (TFPI), um anticoagulante natural, e a trombomodulina (TM) (SHANTSILA, KAMPHUISEN, LIP, 2010). Tanto monócitos quanto macrófagos enriquecidos com colesterol não esterificado (UC) são capazes de liberar MVs extremamente pró-coagulantes (ANOUAR, DASKALOPOULOU, 2018; HOLVOET, HULSMANS, 2013).

Em contrapartida, essas MVs expressam o receptor para proteína C da célula endotelial, o que promove a ativação da proteína C anticoagulante pelo complexo trombina-trombomodulina. Quando estimuladas por endotoxinas, elas também podem expressar TFPI (FRANÇA *et al.*, 2014; HOLVOET, HULSMANS, 2013).

As MVMs possuem em seu interior imunoglobulinas M (IgM) encapsuladas, permitindo essas MVs participarem não apenas de processos inflamatórios, mas principalmente como mensageiros, modulando respostas imunes. Além disso, as MVMs que expressam CD40 ativam as CEs e estimulam não somente a neovascularização no interior do ateroma e promovem a ativação de linfócitos, mas também desestabilizam a placa e aceleram a progressão da mesma (ANOUAR, DASKALOPOULOU, 2018; SHANTSILA, KAMPHUISEN, LIP, 2010).

As MVMs também são mineralizantes que colaboram para formação e nucleação de cristais de cálcio e fosfato (semelhante à hidroxiapatita) no interior dos ateromas. Essa MVs pode formar complexos com as microcalcificações, deixando a placa suscetível à ruptura devido à força de atrito sobre a membrana fibrosa da placa (BLASER, AIKAWA, 2018; DURHAM *et al.*, 2018; NAKAHARA *et al.*, 2017).

As MVMs têm ação pró-oxidante, pois agem como carreadores de mieloperoxidase contribuindo para a disfunção endotelial vascular devido à diminuição da biodisponibilidade de NO, o que modula a resposta inflamatória endotelial. Elas também parecem realizar a transferência de caspase 1 e liberar citocina pró-inflamatória – a IL-1 $\beta$  – promovendo uma sinalização de morte celular para as CMLs, CEs e fibroblastos (ANGELILLO-SCHERRER, 2012; EISERICH *et al.*, 2002; KOU *et al.*, 2019, LEROYER *et al.*, 2008).

### – MICROVESÍCULAS LINFOCÍTICAS (MVLs)

As microvesículas linfocíticas (MVLs) apresentam-se em elevadas concentrações na circulação e seus marcadores de superfície dependem do tipo celular que a originou, por exemplo, o marcador CD3 é encontrado nas MVs provenientes de linfócitos T e o marcador CD19 nas MVs derivadas de linfócitos B, porém outros marcadores podem ser identificados nas MVs de ambas origens (CD2, CD4, CD8, DE20) (ANGELILLO-SCHERRER, 2012).

Segundo sugere um estudo de Saudes et al. (2013), as células linfocíticas parecem ser preditoras da aterogênese, formando as lesões ateroscleróticas, podendo as MVs CD45+/CD3+ ser abundantemente encontrados não apenas em circulação, mas também nos ateromas (SAUDES *et al.*, 2013).

Conforme estudo de De Palma et al.(2016), sobre a atividade de FT de linfócitos ativado, há um número expressivo de células T internamente a placas instáveis quando comparado as placas estáveis, e as MVs liberadas de células não estimuladas parecem não expressar o FT, e as MVs de células estimuladas e que expressavam o FT eram em maior parte CD3+ (DE PALMA *et al.*, 2016).

As MVLs originárias de linfócitos T contribuem para o processo inflamatório por induzirem a produção do fator de necrose tumoral (FNT- $\alpha$ ) e a interleucina IL-1 $\beta$  de monócitos (SHANTSILA, KAMPHUISEN, LIP, 2010).

Contudo, essas MVLs podem promover a reparação de lesão endotelial, assim como contribuir para a angiogênese, induzir a regulação positiva e a produção de NO, promover a degranulação de monócitos, além de interagir com células musculares lisas através da via da proteína ligante de Fas-Fas e ativar o complexo NF- $\kappa$ B, assim como atuar na expressão da enzima ciclo-oxigenase-2 (COX2) (ANGELILLO-SCHERRER, 2012).

### – MICROVESÍCULAS ENDOTELIAIS (MVEs)

As microvesículas endoteliais (MVEs) apresentam um diâmetro entre 0,05 e 1,0  $\mu$ m e, imunofenotipicamente, elas se caracterizam por expressar CD31. Essas MVs apresentam atividade pró-coagulante e pró-inflamatória, atuando no recrutamento de leucócitos, na adesão celular de monócitos ao endotélio, na ativação de neutrófilos, na promoção de angiogênese (MARTÍNEZ *et al.*, 2005), no controle da permeabilidade vascular e na expressão de

glicoproteína de membrana endogлина (ENG) durante a inflamação (ANOUAR, DASKALOPOULOU, 2018; EL-GAMAL *et al.*, 2019; TIAN *et al.*, 2016).

Outros marcadores podem ser utilizados para detectar as MVEs como endogлина (CD105), caderina de endotélio (CD144), CD146, interleucina IL-1 (CD54), E-selectina (CD62e), molécula de adesão vascular VCAM-1 (CD105), FT e, ainda, o marcador apoptótico anexina V (SHANTSILA, KAMPHUISEN, LIP, 2010).

A aterosclerose tem como principal percussor desencadeante a lesão endotelial e considera-se que a presença de MVEs no plasma reflete a lesão celular nesse tecido, podendo essas MVs serem usadas como biomarcador da disfunção endotelial. Outro fator em que essas MVs parecem indicar é a diminuição da síntese de NO pelas células endoteliais (LEROYER, TEDGUI, BOULANGER, 2008). Adicionalmente, parece que a sua redução na circulação também pode ser utilizada como um indicativo do restabelecimento da função do endotélio (SHANTSILA, KAMPHUISEN, LIP, 2010).

As MVEs têm capacidade de adquirir uma forma de capilar devido à presença das enzimas integrinas MPO-2 e 9, e também de promover angiogênese por meio da ativação das quinases ERK1/2 através da ligação do miR-126-3p e proteína transdutora de sinal e ativadora da transcrição (STAT) ao receptor EC (ANOUAR, DASKALOPOULOU, 2018).

Apesar das MVEs terem uma produção estimulada por mediadores inflamatórios *in vitro*, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais ocorre a formação dessas MVs *in vivo*, entretanto, o estresse de cisalhamento da circulação sobre os vasos parece estar relacionado e é por isso que se acredita que as MVEs podem retratar o grau de disfunção endotelial. Além dessas MVEs também parecem serem geradas pela indução de diferentes agonistas, como o inibidor do ativador de plasminogênio do tipo 1 (RIDGER *et al.*, 2017).

As MVEs apresentam constituição heterogênea e, por isso, desempenham funções distintas no processo aterosclerótico, como exemplo quando a célula endotelial libera MVs que expressam moléculas de adesão acaba por atrair células inflamatórias, assim como as MVs provenientes de CEs apoptóticas podem promover a angiogênese (SHANTSILA, KAMPHUISEN, LIP, 2010). Aparentemente, a sua atividade pró-coagulante ocorre quando essas MVs estão ligadas aos monócitos, expressando e ativando o FT, ou ainda através da regulação de mRNA e da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) da célula-alvo (RIDGER *et al.*, 2017).

As MVEs que são formadas por estimulação do inibidor do ativador de plasminogênio do tipo 1 podem desencadear uma agregação plaquetária via FvW (SHANTSILA, KAMPHUISEN, LIP, 2010).

Essas MVs apresentam um papel importante na função vascular e têm também efeito pleiotrópico (fenômeno genético onde um único gene possui múltiplos efeitos sobre o fenótipo), pois o miRNAs dessas MVs regulam a inflamação vascular por modularem vias de sinalização celular e modificar a expressão gênica nessas células, inibindo a via transcripcional e a expressão proteica do NF- $\kappa$ B (ANOUAR, DASKALOPOULOU, 2018).

Diversos fatores biológicos que dizem respeito à vascularização e hemostasia estão envolvidos na formação *in vitro* dessas MVs, como TNF- $\alpha$ , LPS, estrogênios, trombina, camptotecina, ROS, inibidores do ativador do plasminogênio, toxinas urêmicas, proteína C reativa, além de NO endógeno e lipídios oxidados (RIDGER *et al.*, 2017).

Quando presentes no ateroma, as MVEs providas da proteína co-estimulatória CD40L estimulam a proliferação de células endoteliais, aumentando a quantidade dessas MVEs e, conseqüentemente, promovendo a angiogênese que favorece uma hemorragia no interior da placa (RIDGE *et al.*, 2017).

Devido as suas funções, a presença abundante dessas MVs em circulação e os antígenos presentes em sua superfície, podem indicar inflamação de células endoteliais, uma atividade pró-trombótica ou mesmo uma apoptose endotelial, contribuindo para inflamação vascular crônica, como a aterosclerose, sendo, por isso, considerado um forte candidato a biomarcador para DCVs em geral (ANOUAR, DASKALOPOULOU, 2018; RIDGER *et al.*, 2017; SHANTSILA, KAMPHUISEN, LIP, 2010).

De forma contrária, as MVEs também têm ação vasoprotetora e anticoagulante, quando transferem tramboxano A2 e miRNA-126 às paredes dos vasos, reduzindo a apoptose celular com a ação da proteína C ativada, e participando da dissolução do coágulo por catalisar a conversão do plasminogênio em plasmina (RIDGER *et al.*, 2017).

#### – MICROVESÍCULAS DAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES (MVCMLs)

As MVs derivadas de células musculares lisas vasculares (MVCML) possuem um diâmetro entre 50 e 1000 nm, são ricas em colesterol e diacilglicerol, proteínas e miRNA. Essas MVs também apresentam em sua superfície o FT, responsável pela sua atividade pró-trombótica em placas ateroscleróticas (NAKAHARA *et al.*, 2017; TEDGUI, MALLAT, 2000).

As células musculares lisas, oriundas da túnica média, são células contráteis que sob estímulo de estresse mineral podem sofrer alterações fenotípicas e produzir colágeno que

forma uma capa fibrosa, esse evento, combinado com a clivagem de elastina, propicia a calcificação vascular medial ou, ainda, essas alterações podem levar a um aumento da proliferação celular e capacidade de secreção de MVs por essas células (DISTHABANCHONG, SRISUWARN, 2019).

Assim como as suas células de origem, MVCMLs também provocam dano ao endotélio por provocarem diminuição da produção de NO pelas células endoteliais vasculares (LEROYER, TEDGUI, BOULANGER, 2008; MARTÍNEZ *et al.*, 2005).

Sabe-se que, pelo menos, dois terços da placa aterosclerótica possuem MVs extremamente pró-coagulante, incluindo as MVCML (AMABILE *et al.*, 2010) que encontram-se principalmente ao longo das fibras elásticas, em regiões acelulares do ateroma (NAKAHARA *et al.*, 2017).

As MVCMLs nos ateromas atuam formando complexo com microcalcificação vascular, levando os tecidos vizinhos a uma diferenciação celular patológica (BLASER, AIKAWA, 2018). Essa formação de calcificação vascular também pode contribuir como uma barreira, estabilizante da placa por controlar a propagação da inflamação (DISTHABANCHONG, SRISUWARN, 2019).

As células musculares lisas vasculares da camada média arterial têm capacidade de se diferenciar fenotipicamente em células osteogênicas ou condogênicas, além de formarem a capa fibrosa colágena (para estabilizar a placa), liberam MVCMLs que ao mesmo tempo desestabilizam a placa e que, na ausência de inibidores como proteína Gla de matriz MGP e glicoproteína fetuína-A, e aumento da concentração de cálcio, contribuem para a formação de calcificação na camada média vascular, no núcleo necrótico dos ateromas, aumentando a concentração de cálcio e fosfato livres, levando a formação de cristalização e principalmente servindo como sítio de armazenamento desses cristais de cálcio e fosfato (como hidroxiapatita) (DISTHABANCHONG, SRISUWARN, 2019; DURHAM *et al.*, 2018; JINNOUCHI *et al.*, 2020; NAKAHARA *et al.*, 2017).

Algumas espécies de miRNA (miRNA-30, miRNA-125-b, miRNA-143, miRNA-145 e miRNA-155) presentes nas MVCMLs modulam a expressão de algumas proteínas (Smad1, Runx2, fosfatase alcalina ALP ou TNAP, e Osterix) que alteram a sinalização da proteína quinase MAPK assim como o metabolismo do cálcio atuante da calcificação vascular. Além disso, essas MVs possuem proteínas de ligação de colágeno (ALP, proteína ligante de proteoglicano, anexinas, ligantes de ácido hialurônico) que antes da calcificação (principalmente na presença de hipóxia), interagem com componentes da matriz extracelular,

desencadeando uma resposta fibrótica, seguido de acúmulo de colágeno (BLASER, AIKAWA, 2018).

Segundo Disthabanchong e Srisuwarn (2019), outro fator que está relacionado à calcificação vascular são alterações de miRNA sérico (principalmente miRNA-125b, mas também miRNA-143, miRNA-145 e miRNA-223) que seriam responsáveis por regular a diferenciação das células musculares lisas vasculares para células osteoblastos. Além de esses miRNA serem usados como biomarcadores de calcificação vascular, eles possuem uma relação inversa com o grau da calcificação e ao mesmo tempo prevenindo a progressão da mesma (DISTHABANCHONG, SRISUWARN, 2019).

Para Durham et al. (2018), as MVs isoladas de artérias ateroscleróticas são mais eficientes em acumular cálcio quando comparadas a de artérias saudáveis, e não somente a deficiência dos inibidores de cálcio contribui para o armazenamento dos cristais, mas também a expressão de complexos de PS e anexina A6 (DURHAM *et al.*, 2018).

Segundo descreve Blaser e Aikawa (2018), há uma relação inversa entre a concentração de colágeno intraplaca e o tamanho das microcalcificações vasculares, e essa calcificação das MVs ocorre tanto pela exposição da PS quanto pelo complexo formado PS a proteína S100 de ligação ao cálcio A9 (PSV-S100A9). Desse modo, o fato dessas MVs serem ricas em anexinas e principalmente PS, confere uma maior capacidade de mineralização, cujas metaloproteinases presentes nas MVs seriam as responsáveis pela remodelação da matriz extracelular assim como carregando eletricamente a fibras colágenas, propiciando a nucleação mineral intravesicular (BLASER, AIKAWA, 2018).

Sugestão comum entre os autores, é que essas MVs que são responsáveis pela mineralização de cálcio e fosfato intraplaca, assim como a nucleação desses cristais, formam microcalcificações que potencializam a ruptura dos ateromas, devido ao estresse de cisalhamento que elas exercem sobre a capa fibrosa da placa (BLASER, AIKAWA, 2018; DURHAM *et al.*, 2018; NAKAHARA *et al.*, 2017).

#### **4.4 Principais métodos de isolamento e caracterização de microvesículas circulantes**

A ideia de poder utilizar as MVs circulantes como novos biomarcadores plasmáticos para DCVs surgiu como entendimento de como essas atuam em diferentes distúrbios, mais especificamente, na aterosclerose (HOEFER *et al.*, 2015).

Os protocolos de detecção e isolamentos das MVs não estão totalmente definidos e mais estudos na área são necessários, entretanto, compreende-se que elas podem ser

facilmente identificadas não apenas pela presença de PS externalizada, mas, principalmente, por seus marcadores membranares específicos, oriundos de suas células parentais (FRANÇA *et al.*, 2014).

#### 4.4.1 Isolamento

O isolamento das MVs pode ser realizado por centrifugação diferencial em força centrífuga de 10.000 g. Esse método separará as vesículas por diferença de forma, tamanho e densidade. Embora seja comumente utilizado, pode causar agregação de vesículas e sofrer contaminações, podendo ser necessário uma filtração forçada para sua completa separação, o que pode acarretar na fragmentação de MVs e dificultar a sua diferenciação dos exossomos (CHIRIACÒ *et al.*, 2018; GYÖRGY *et al.*, 2011a).

A centrifugação diferencial associada a uma filtração com uso de gel separador através de cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) é a melhor forma de detecção e isolamento das MVEs, além de fornecer maior purificação e recuperação de VEs, entretanto, requer equipamentos específicos com longo tempo de duração (CHIRIACÒ *et al.*, 2018; GYÖRGY *et al.*, 2011b).

A precipitação à base de polímero, que age reduzindo a solubilidade das MVs e, portanto, facilitando o seu isolamento também é um método que pode ser utilizado para o isolamento de MVs. Apesar de ser um método de baixo custo, alto rendimento e de fácil execução, ele tem como desvantagem sofrer interferência por contaminantes (CHIRIACÒ *et al.*, 2018).

Outro método utilizado é o baseado na técnica de captura de imunoafinidade, o qual utiliza esferas magnéticas conjugadas com anticorpos específicos contra proteínas membranares das MVs. Esse método pode ser associado à citometria de fluxo, ao PCR e ao *western blotting*, a fim de aperfeiçoar a caracterização das vesículas. Como aspectos positivos do método, pode-se citar a possibilidade de utilizar pequenos volumes de amostra, mesmo amostras polidispersas, as ótimas especificidade e sensibilidade, o alto nível de pureza e a capacidade de isolar diferentes subtipos de MVs. Talvez, os aspectos negativos sejam seu alto custo, baixo rendimento e a possibilidade de reatividade cruzada de anticorpos (CHIRIACÒ *et al.*, 2018).

#### 4.4.2 Caracterização

Alguns métodos de microscopia óptica podem ser utilizados para observar qualitativamente as MVs em geral como microscopia eletrônica de transmissão com criofixação (cryo-TEM) e de varredura (SEM). Ainda, outras técnicas com microscopia de alta resolução, baseadas em fluorescência, como microscopia da prostração da emissão estimulada (STED), de localização fotoativado (PALM) ou microscopia de força atômica (AFM) combinada ou não à classificação celular ativada por fluorescência (FACS). Uma das vantagens desses métodos é que todos permitem a visualização de vesículas menores que 200 nm (GIEBEL, HELMBRECHT, 2017; SZATANEK *et al.*, 2017).

As MVs também podem ser identificadas por outras técnicas, como análise de rastreamento de nanopartícula (NTA), sensor de pulso resistivo sintonizável (RPS), fracionamento de fluxo de campo (FFF), ensaios imunológicos (ELISA) e baseados em pró-coagulantes (apenas para determinação da atividade pró-coagulante), exploração proteômica (associados à digestão com tripsina e marcação), eletroforese bidimensional em gel (2-DE), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ressonância magnética nuclear (NMR), espectrometria de massa (EM) não direcionada e direcionada, e citometria de fluxo (CF) (BURNOUF *et al.*, 2014; GIEBEL, HELMBRECHT, 2017; HOEFER *et al.*, 2015; HOLVOET, HULSMANS, 2013; POON *et al.*, 2018; SALZER, 2014; SZATANEK *et al.*, 2017; WANG, WANG, HU, 2016).

Na metodologia de AFM, é possível caracterizar as MVs, analisando a imagem tridimensional da topologia e o tamanho de vesículas, entretanto o resultado pode ser influenciado pelo método de preparação da amostra (GIEBEL, HELMBRECHT, 2017).

A metodologia de RPS determina o tamanho médio e concentração de vesículas em suspensão (entre 100 nm e 100  $\mu$ m). Esse método pode ter um tempo de análise mais lento em comparação a outros métodos, pois o poro da membrana utilizada é facilmente comprometido com as amostras biológicas (GIEBEL, HELMBRECHT, 2017).

O método de FFF, além de separar os componentes de amostras polidispersas, determina o tamanho das MVs através de fluxo cruzado sobre as vesículas, sendo a técnica por atrito no campo de fluxo FFF (também FFFF ou F4) a mais utilizada devido sua reprodutibilidade e ao fato de que utiliza uma quantidade reduzida de amostra, a amostra é previamente diluída em 100 a 1000 vezes e apenas 20  $\mu$ L a 2 mL são analisados (GIEBEL, HELMBRECHT, 2017).

Outras metodologias de microscópica que podem ser utilizadas são as baseadas no espalhamento da luz, as quais incluem a microscopia eletrônica de difusão dinâmica da luz (DLS), que é rápida e eficiente (SZATANEK *et al.*, 2017).

O método de análise de DLS, ainda que limitado em comparação a outros métodos, detecta o movimento browniano e o tamanho de partículas entre 1 nm e 6 µm em amostras de volume entre 20 a 50 µL. O melhor sistema são os instrumentos heteródinos (análise da luz retroespalhada), entretanto, em amostras polidispersas (como sangue ou plasma), os resultados podem não ser tão satisfatórios quando comparados a amostras monodispersas (GIEBEL, HELMBRECHT, 2017).

O método de NTA, ainda que possa sofrer influência por contaminantes nanoparticulados, assim como para DLS, é um dos melhores métodos para caracterização de MVs, pois permite análise de baixas concentrações do analito (com limite de detecção de tamanho entre 30 a 50 nm) e também registra o movimento browniano de pequenas MVs (10 e 1000 nm). Uma das vantagens dessa técnica é que, através de algoritmos específicos para cada tamanho de vesícula, é possível determinar medida absoluta (superficial ou total) da concentração e da distribuição média do tamanho das MVs contidas na amostra. Essa técnica pode ser integrada à medição do potencial zeta, que permite identificar a carga superficial das vesículas (GIEBEL, HELMBRECHT, 2017).

Um dos métodos mais utilizados para a identificação das MVs é a CF. No entanto, este método detecta apenas MVs de tamanho superior ou igual a 200 nm e pode sofrer interferência quando há presença de complexos imunológicos. As melhores fontes celulares para o isolamento e caracterização das MVs por este método são os eritrócitos, as plaquetas e as CEs, podendo ser identificadas por seus marcadores de superfície específicos. A CF também permite a identificação das MVs pela sua ligação à anexina V, uma proteína que tem alta afinidade à fosfatidilserina exposta por células apoptóticas e MVs (GYÖRGY *et al.*, 2011a; GYÖRGY *et al.*, 2011b; SANTILLI *et al.*, 2016; SIBOV *et al.*, 2012).

O método de CF detecta partículas com limite de tamanho entre 300 a 500 nm e, para que seja possível a detecção de vesículas menores, são necessárias configurações mecânicas especiais ou, ainda, integrar técnicas imunológicas com fluorescência em que as MVs são agregadas através de seus epítomos e, posteriormente, esses agregados maiores são detectados por CF (GIEBEL, HELMBRECHT, 2017; MENCK *et al.*, 2017; SZATANEK *et al.*, 2017).

Assim como para as demais técnicas de caracterização das MVs, a fase pré-analítica é crucial para se obter resultados fidedignos de quantificação de MVs por CF, pois, por exemplo, um grande intervalo de tempo entre a punção venosa e a análise pode comprometer a quantificação das MVs uma vez que o armazenamento prolongado da amostra pode estimular a liberação de MVs (SANTILLI *et al.*, 2016).

Tanto a sensibilidade da CF quanto a padronização da técnica têm melhorado nos últimos anos, principalmente para a identificação de algumas subpopulações de MVs, como MVEs e MVs leucocitárias. Isso se deu devido ao interesse que existem nessas MVs, uma vez que se encontram fortemente relacionadas com o surgimento de eventos cardiovasculares futuros. Embora ainda não se tenha valores seguros de MVs para fins de diagnóstico, sabe-se que a quantidade de MVEs circulantes que expressam de CD31 é inversamente proporcional à vasodilatação endotelial, indicando, portanto, disfunção endotelial, lesão vascular em geral e instabilidade do ateroma. Outros marcadores dessas MVs, como CD144 e CD62E, também indicam condições cardiovasculares (HOEFER *et al.*, 2015).

Há muitos interferentes nessa metodologia, como o ruído do equipamento e a baixa sensibilidade da detecção da dispersão da luz. Algumas técnicas podem aperfeiçoar esse método, como a associação de impedância ao CF. Em tal método, a citometria de fluxo policromático (PFC) é acoplado a um detector de dispersão da luz, onde o volume de eletrólitos da vesícula que são deslocados na zona de detecção aumenta a impedância, gerando pulso proporcional ao volume da vesícula, podendo detectar MVs menores que 300 nm (GIEBEL, HELMBRECHT, 2017; SANTILLI *et al.*, 2016; SZATANEK *et al.*, 2017).

Uma boa estratégia para aperfeiçoamento das análises de FC é o uso de anticoagulante a base de quelantes para amostras de sangue, evitando a agregação das MVs (BURGER, OLEYNIK, 2017; SANTILLI *et al.*, 2016). Outra estratégia que também pode ser empregada para aumentara sensibilidade é intensificar a luz do laser ou, ainda, submeter o fluido a filtragem de 0,05  $\mu\text{m}$  (GIEBEL, HELMBRECHT, 2017).

De acordo com estudo de Hoefler *et al.* (2015), além da CF, várias outras tecnologias proteômicas podem ser utilizadas para comparar proteínas de diferentes espécimes biológicas, e vários métodos podem ser utilizados tanto para a detecção e isolamento quanto para quantificação das MVs. Também métodos metabolômicos podem ser úteis para demonstrar a mecânica molecular das MVs na aterosclerose. Outra metodologia utilizada é a lipidômica, que pode estar avaliando os lipídios como um todo, representando fases da aterosclerose (HOEFER *et al.*, 2015).

Embora não se tenha estabelecido um nível fisiologicamente seguro dessas estruturas, ainda há uma grande dificuldade em sua detecção devido à variedade metodológica aplicável nos variados estudos, que não possui uma padronização e difere entre laboratórios, sendo este um grande obstáculo para fins de diagnóstico clínico, pois dificulta a comparação entre os estudos, assim como ainda há dificuldade em diferenciar morfológicamente os exossomos das

MVs (RAPOSO, STORVOGEL, 2013; FRANÇA *et al.*, 2014; WANG, WANG, HU, 2016; KRAJEWSKA-WLODARCZIK *et al.*, 2019).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Visto o impacto socioeconômico das DCVs, que têm como principal agravo a aterosclerose, é de grande importância o conhecimento em torno das ações das MVs, uma vez que elas participam das diferentes etapas do processo aterosclerótico.

Embora o que diz respeito às MVs seja um assunto melhor explorado há pouco mais de três décadas, foram encontrados inúmeros artigos que tratam sobre a relação dessas vesículas com diversas doenças. Dentre os artigos de interesse selecionados para a presente pesquisa, a maior parte deles tratou sobre essas vesículas de um modo mais generalizado, tendo um número menos expressivo de artigos que tratavam especificamente sobre MVs na aterosclerose. Ao longo do estudo, percebeu-se que as MVs eram muito mais complexas do que o esperado e que elas apresentavam constituição e estrutura que dependiam de diferentes fatores envolvidos no momento da formação das MVs.

Ainda que muitas informações tenham sido contempladas no presente trabalho sobre as principais características morfológicas e o processo de formação das MVs atuantes na aterosclerose, em relação às informações sobre os métodos de isolamento e caracterização delas, não foi possível fazer um maior aprofundamento do assunto, dada a dificuldade em se obter essas informações. Alguns dos problemas encontrados foram divergências entre os autores quanto aos melhores métodos e ausência de padronização interlaboratorial, o que impossibilitaria a obtenção de resultados mais comparáveis. Grande parte do problema de padronização está relacionada ao tamanho das MVs, que pode sobrepor-se facilmente nos intervalos de tamanho de outro tipo vesicular (exossomos).

Mesmo sabendo atualmente que as MVs participam simultaneamente nas diferentes etapas da aterosclerose, ainda é pouco compreendido os mecanismos utilizados por essas vesículas, dessa forma, estudos biomoleculares mais aprofundados que visem melhorar o entendimento desses mecanismos e que empreguem tecnologias baseadas em Big Data e Inteligência Artificial (mais especificamente aprendizado de máquina) são necessários.

## REFERÊNCIAS

AMABILE, Nicolas; RAUTOU, Pierre-Emmanuel; TEDGUI, Alain; BOULANGER, Chantal M.. Microparticles: Key Protagonists in Cardiovascular Disorders. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, 36, 907–916, 2010; doi:10.1055/s-0030-1267044

ANGELILLO-SCHERRER, Anne. Leukocyte-Derived Microparticles in Vascular Homeostasis. **Circulation Research**, 110, 2, 356-69, 2012; doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.233403

ANOUAR, Hafiane; DASKALOPOULOU, Stella S.. Extracellular Vesicles Characteristics and Emerging Roles in Atherosclerotic Cardiovascular Disease. **Metabolism Clinical and Experimental**, 1-32, 2018; doi:10.1016/j.metabol.2018.04.008

ARDOIN, S. P.; SHANAHAN, J. C.; PISETSKY, D. S.. The Role of Microparticles in Inflammation and Thrombosis. **Scandinavian Journal of Immunology**, 66, 159–165, 2007; doi:10.1111/j.1365-3083.2007.01984.x

BARQUERA, Simon; TOBIAS, Andrea Pedroza; MEDINA Catalina; BARRERA, Lucia Hernandez; DOMINGO, Kirsten Bibbins; LOZANO, Rafael; MORAN, Andrew E. Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. **Archives of Medical Research**, 46, 5, 328-38, 2015; doi:10.1016 / j.arcmed.2015.06.006.

BLASER, Mark C.; AIKAWA, Elena. Roles and Regulation of Extracellular Vesicles in Cardiovascular Mineral Metabolism. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, 5, 187, 2018; doi:10.3389/fcvm.2018.00187

BLUM, Arnon. The Possible Role of Red Blood Cell Microvesicles in Atherosclerosis. **European Journal of Internal Medicine**, 20, 101–105, 2009; doi:10.1016/j.ejim.2008.06.00

BONAVENTURA, Aldo; MONTECUCCO, Fabrizio; DALLEGRI, Franco; CARBONE, Federico; LÜSCHER, Thomas F.; CAMICI, Giovanni G.; LIBERALE, Luca. Novel Findings in Neutrophil Biology and Their Impact on Cardiovascular Disease. **Behalf of the European Society of Cardiology**, 2019; doi:10.1093/cvr/cvz084/5421166

BRISSET, Anne-Cécile; TERRISSE, Anne-Dominique; DUPOUY, Dominique; TELLIER, Lise; PECH, Stéphane; NAVARRO, Chantal; SIÉ, Pierre. Shedding of Active Tissue Factor by Aortic Smooth Muscle Cells (Smcs) Undergoing Apoptosis. **Thrombosis and Haemostasis**, 90, 3, 511-8, 2003; doi:10.1160/TH02-12-0291

BURGER, Dylan; OLEJNIK, Paul. Isolation and Characterization of Circulating Microparticles by Flow Cytometry. Springer Science+BusinessMedia.Hypertension: Methods and Protocols, **Methods in Molecular Biology**, 1527, 271-280, 2017; doi:10.1007/978-1-4939-6625-7

BURNOUF, Thierry; GOUBRAN, Hadi Alphonse; CHOU, Ming-Li; DEVOS, David; RADOSEVIC, Mirjana. Platelet Microparticles: Detection and Assessment of their Paradoxical Functional Roles in Disease and Regenerative Medicine. **Blood Reviews**, 28, 4, 155-66, 2014; doi:10.1016 / j.blre.2014.04.002

BUTTARI, Brigitta; PROFUMO, Elisabetta; RIGANÒ, Rachele. Crosstalk between Red Blood Cells and the Immune System and Its Impact on Atherosclerosis. **BioMed Research International**, 8, 616834, 2015; doi:10.1155/2015/616834

CAI, Huaqing; REINISCH, Karin; FERRO-NOVICK, Susan. Coats, Tethers, Rabs, and Snares Work Together to Mediate the Intracellular Destination of a Transport Vesicle. **Developmental Cell**, 12, 5, 671-682, 2007; doi:10.1016 / j.devcel.2007.04.005

CECCATTO, Vânia Marilande; **Biologia Molecular**. Expressão Gênica, Fortaleza/CE; 4, 8, 90, 2015. Disponível em: <[https://educapes.capes.gov.br/bitstream/capes/431618/2/Livro\\_Biologia%20Molecular.pdf](https://educapes.capes.gov.br/bitstream/capes/431618/2/Livro_Biologia%20Molecular.pdf)>. Acesso em: 01 fev. 2020

CHARGAFF, Erwin; WEST, Randolph; **The Biological Significance of the Thromboplastic Protein of Blood**. The Journal of Biological Chemistry, 166:189-197, 1946. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/9d90/070078e89502dc36979acf7a4a00c9432b59.pdf>>. Acesso em: 31 jan. 2020

CHATFIELD, Simon M.; THIEBLEMONT, Nathalie; WITKO-SARSAT, Véronique. Expanding Neutrophil Horizons: New Concepts in Inflammation. **Journal of Innate Immun**, 10, 422–431, 2018; doi:10.1159/000493101

CHEN, Ya-Ting; YUAN, Hao-Xiang; OU, Zhi-Jun; OU, Jing-Song. Microparticles (Exosomes) and Atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, 22, 6, 23, 2020; doi:10.1007 / s11883-020-00841-z

CHIRIACÒ, Maria Serena; BIANCO, Monica; NIGRO, Annamaria; PRIMICERI, Elisabetta; FERRARA, Francesco; ROMANO, Alessandro; QUATTRINI, Angelo; FURLAN, Roberto; ARIMA, Valentina; MARUCCIO, Giuseppe. Lab-on-Chip for Exosomes and Microvesicles Detection and Characterization. **Sensors**, 18, 3175, 2018; doi:10.3390/s18103175

CHISTIYAKOV, Dimitry A.; BOBRYSHV, Yuri V.; OREKHOV, Alexander N.. Neutrophil's Weapons in Atherosclerosis. **Experimental and Molecular Pathology**, Accepted Manuscript, 2015; doi:10.1016/j.yexmp.2015.11.011

CHOI, Dong-Sic; KIM, Dae-Kyum; KIM, Yoon-Keun; GHO, Yong Song. Proteomics of Extracellular Vesicles: Exosomes and Ectosomes. **Mass Spectrometry Reviews**, 2013; doi:10.1002/mas.21420

CIMMINO, Giovanni; CIRILLO, Plinio. Tissue Factor: Newer Concepts in Thrombosis and Its Role Beyond Thrombosis and Hemostasis. **Cardiovascular Diagnosis and Therapy**, 8, 5, 581-593, 2018; doi:10.21037/cdt.2018.10.14

COLOMBO, Marina; RAPOSO, Graça; THÉRY, Clotilde. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. **The Annual Review of Cell and Developmental Biology**, 30, 255-89, 2014; doi:10.1146 / annurev-cellbio-101512-122326

CRAWFORD, N.. The Presence of Contractile Proteins in Platelet Microparticles Isolated from Human and Animal Platelet-free Plasma. **British Journal of Hematology**, 21, 1, 53-69, 1971; doi:10.1111 / j.1365-2141.1971.tb03416.x

DE PALMA, Raffaele; CIRILLO, Plinio; CICCARELLI, Giovanni; BARRA, Giusi; CONTE, Stefano; PELLEGRINO, Grazia; PASQUALE, Giuseppe; NASSA, Giovanni; PACIFICO, Francesco; LEONARDI, Antonio; INSABATO, Luigi; CALÌ, Gaetano; GOLINO, Paolo; CIMMINO, Giovanni. Expression of Functional Tissue Factor in Activated T-Lymphocytes in Vitro and in Vivo: A Possible Contribution of Immunity to Thrombosis? **International Journal of Cardiology**, 218, 188-195, 2016; doi:10.1016/j.ijcard.2016.04.177

DISTHABANCHONG, Sinee; SRISUWARN, Praopilad. Mechanisms of Vascular Calcification in Kidney Disease. **Advances in Chronic Kidney Disease**, 26, 417-426, 2019; doi:10.1053/j.ackd.2019.08.014

DRAGOVIC, Rebecca A.; GARDINER, Christopher; BROOKS, Alexandra S.; TANNETTA, Dionne S.; FERGUSON, David J. P.; HOLE, Patrick; CARR, Bob; REDMAN, Christopher, W.G. Redman; ADRIAN, L. Harris; DOBSON, Peter J.; HARRISON, Paul; SARGENT, Ian L.. Sizing and Phenotyping of Cellular Vesicles Using Nanoparticle Tracking Analysis. **Nanotechnology, Biology and Medicine**, 7, 6, 780-788, 2011; doi:10.1016 / j.nano.2011.04.003

DURHAM, Andrew, L.; SPEER, Mei Y.; SCATENA, Marta; GIACHELLI, Cecilia M.; SHANAHAN, Catherine M.. Role of Smooth Muscle Cells in Vascular Calcification:

Implications in Atherosclerosis and Arterial Stiffness. **Cardiovascular Research**, 114, 590–600, 2018; doi:10.1093/cvr/cvy010

EISERICH, J. P., BALDUS, S., BRENNAN, M. L., MA, W., ZHANG, C., TOUSSON, A., CASTRO, L., LUSIS, A. J., NAUSEEF, W. M., WHITE, C. R. & FREEMAN, B. A.. Myeloperoxidase, a Leukocyte-derived Vascular NO Oxidase. **Science**, 296, 5577, 2391-2394, 2002; doi:10.1126/science.1106830

ELGAMAL, Heba; PARRAY, Aijaz S.; MIR, Fayaz A.; SHUAIB, Ashfaq; AGOUNI, Abdelali. Circulating Microparticles as Biomarkers of Stroke: a Focus on the Value of Endothelial and Platelet Derived Microparticles. **Journal of Cellular Physiology**, 234, 10, 16739-16754, 2019; doi:10.1002 / jcp.28499

EMBRAPA. **Eletroforese Bidimensional e Análise de Proteomas**. Comunicado Técnico 136, 3, 2005; Brasília/DF. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/187102/1/cot136.pdf>>. Acesso em: 15 fev. 2020

FILHO, Júlio C. M. Ricarte; KIMURA, Edna Teruko. MicroRNAs: Novel Class of Gene regulators Involved in Endocrine Function and Cancer. Scielo; **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, 50, 6, 2006; doi:10.1590/S0004-27302006000600018

FINKIELSZTEIN, Ariel; MASCARENHAS, Lorraine; BUTIN-ISRAELENSE, Veronika; SUMAGIN, Ronen. Isolation and Characterization of Neutrophil-derived Microparticles for Functional Studies. **Journal of Visualized Experiments**, 133, 56949, 2018; doi:10.3791 / 56949

FRANÇA, Carolina Nunes; IZAR, Maria Cristina de Oliveira; do AMARAL, Jonatas Bussador; FONSECA, Francisco Antonio Helfenstein. Micropartículas e Células progenitoras: Novos marcadores da Disfunção Endotelial. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, 23, 4, 33-39, 2013

FRANÇA, Carolina Nunes; IZAR, Maria Cristina de Oliveira; AMARAL, Jônatas Bussador do; TEGANI, Daniela Melo; FONSECA, Francisco Antonio Helfenstein. Micropartículas como Possíveis Biomarcadores da Doença Cardiovascular. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**, 2014; doi:10.5935/abc.20140210

GASSER, Olivier; SCHIFFERLI, Jürg A.. Activated Polymorphonuclear Neutrophils Disseminate Anti-Inflammatory Microparticles by Ectocytosis. **Blood**, 104, 8, 2004; doi:10.1182/blood-2004-01-0361

GEOVANINI, Glaucylara Reis; LIBBY, Peter. Atherosclerosis and Inflammation: Overview and Updates. **Clinical Science**, 132, 1243-1252, 2018; doi:10.1042/CS20180306

GIEBEL, Bernd; HELMBRECHT, Clemens. Methods to Analyze EVs. **Methods in Molecular Biology**, 1545, 2017; doi:10.1007/978-1-4939-6728-5\_1

GOLDBERG, Anna Carla; RIZZO, Luiz Vicente. MHC Structure and Function – Antigenpresentation. Part1. **Hospital Israelita Albert Einstein**, São Paulo, SP, Brasil. 2014; doi:10.1590/S1679-45082015RB3122

GRAF, Claudine; RUF, Wolfram; Tissue Factor as a Mediator of Coagulation and Signaling in Cancer and Chronic Inflammation. **Thrombosis Research**, 164, 143 – 147. 2018; doi:10.1016 / j.thromres.2018.01.023

GREENING, David W.; SIMPSON, Richard J.. Understanding Extracellular Vesicle Diversity – Current Status. **Expert Review Proteomics**, 15, 11, 887-910, 2018; doi:10.1080 / 14789450.2018.1537788.

GRUPO BRASILEIRO DE NEUROIMUNOLOGIA. **Grupo de diferenciação – CD** (do inglês: cluster of differentiation), 2014. Disponível em: <<http://neuroimunologia.com.br/glossary/grupo-de-diferenciacao-cd-do-ingles-cluster-of-differentiation/>>. Acesso em: 15 jan. 2020.

GYÖRGY, Bence; SZABÓ, Tamás G.; PÁSZTÓI, Mária; PÁL, Zsuzsanna; MISJÁK, Petra; ARADI, Borbála; LÁSZLÓ, Valéria; PÁLLINGER, Éva; PAP, Erna; KITTEL, Ágnes; NAGY, György; FALUS, András; BUZÁS, Edit I.. Membrane Vesicles, Current State-of-The-Art: Emerging Role of Extracellular Vesicles. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 68, 2667–2688, 2011; doi:10.1007/s00018-011-0689-3 a

GYÖRGY, B; MÓDOS, K; PÁLLINGER, E; PÁLÓCZI, K; PÁSZTÓI, M; MISJÁK, P; DELI, M A; SIPOS, A; SZALAI, A; VOSZKA, I; POLGÁR, A; TÓTH, K; CSETE, M; NAGY, G; GAY, S; FALUS, A; KITTEL, A; BUZÁS, E I. Detection and Isolation of Cell-Derived Microparticles are Compromised by Protein Complexes Due to Shared Biophysical Parameters. **Blood**, 117, 4, e39, 2011; doi:10.1182/blood-2010-09-307595 b

HERRINGTON, William; LACEY, Ben; SHERLIKER, Paul; ARMITAGE, Jane; LEWINGTON, Sarah. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. **Circulation Research**, 118, 4, 535-46, 2016; doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.307611

HOEFER, Imo E.; STEFFENS, Sabine; ALA-KORPELA, Mika; BAČEK, Magnus; BADIMON, Lina; BOCHATON-PIALLAT, Marie-Luce; BOULANGER, Chantal M.; CALIGIURI, Giuseppina; DIMMELER, Stefanie; EGIDO, Jesus; EVANS, Paul C.; GUZIK, Tomasz; KWAK, Brenda R.; LANDMESSER, Ulf; MAYR, Manuel; MONACO, Claudia; PASTERKAMP, Gerard; TUNˆO'N, Jose; WEBER, Christian. Novel Methodologies for Biomarker Discovery in Atherosclerosis. **European Heart Journal**, 2015; doi:10.1093/eurheartj/ehv236

HOLVOET, Paul; HULSMANS, Maarten. MicroRNA-Containing Microvesicles Regulating Inflammation in Association with Atherosclerotic Disease. European Society of Cardiology. **Cardiovascular Research**, 100, 7–18, 2013; doi:10.1093/cvr/cvt161

HOSPITAL ISRAELITA ALBERT EINSTEIN. **Aterosclerose**; 2016. Disponível em: <<https://www.einstein.br/especialidades/cardiologia/doencas-sintomas/aterosclerose>>. Acesso em: 12 fev. 2020

HOYER, Friedrich Felix; Meike GIESEN, Kristin; FRANC, Carolina Nunes; LUˆTJOHANN, Dieter; NICKENIG ,Georg; WERNER, Nikos. Monocytic Microparticles Promote Atherogenesis by Modulating Inflammatory Cells in Mice. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 16, 11, 2777-2788, 2012; doi:10.1111/j.1582-4934.2012.01595.x

HUANG, Chenyuan; NEUPANE, Yub Raj; LIM, Xiong Chang; SHEKHANI, Rawan; CZARNY, Bertrand; WACKER, Matthias G.; PASTORIN, Giorgia; WANG, Jiong-Wei. Extracellular Vesicles in Cardiovascular Disease. **Advances in Clinical Chemistry**, 1, 1-49, 2020; doi:10.1016/bs.acc.2020.08.006

HUGEL, Bénédicte; MARTÍNEZ, M. Carmen; KUNZELMANN, Corinne; FREYSSINET, Jean-Marie. Membrane Microparticles: Two Sides of the Coin. **Physiology**, 20, 22–27, 2005; doi:10.1152/physiol.00029.2004

JIA, Li-Xin; ZHANG, Wen-Mei; LI, Tao-Tao; LIU, Yan; PIAO, Chun-Mei; MA, You-Cai; LU, Yu; WANG, Yuan; LIU, Ting-Ting; QI, Yong-Fen; DU, Jie. ER Stress Dependent Microparticles Derived from Smooth Muscle Cells Promote Endothelial Dysfunction During Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection. **Clinical Science** (London, England, 1979), 131, 12, 1287-1299, 2017; doi:10.1042/CS20170252

JINNOUCHI, Hiroyuki; SATO, Yu; SAKAMOTO, Atsushi; CORNELISSEN, Anne; MORI, Masayuki; KAWAKAMI, Rika; GADHOKE, Neel V.; KOLODIE, Frank D.; VIRMANI, Renu; FINN, Alope V.. Calcium Deposition Within Coronary Atherosclerotic Lesion: Implications for Plaque Stability. **Atherosclerosis**, 306, 2020, 85–95, 2020; doi:10.1016/j.cmg.2017.03.005

JONES, Leandra; BELL Courtnee R.; BIBB, Kartz E.; GU, Linlin; COATS, Mamie T.; MATTHEWS, Qiana L.. Pathogens and Their Effect on Exosome Biogenesis and Composition. **Biomedicines**, 6, 3, 79, 2018; doi:10.3390 / biomedicines6030079

KOSHIAR, Ruzica Livaja; SOMAJO, Sofia; NORSTROM, Eva; DAHLBACK, Björn. Erythrocyte-Derived Microparticles Supporting Activated Protein C-Mediated Regulation of Blood Coagulation. **PloS One**, 9, 8, e104200, 2014; doi:10.1371/journal.pone.0104200

KUO, Winston Patrick; TIGGES, John C.; TOXAVIDIS, Vasilis; GHIRAN, Ionita. Red Blood Cells: A Source of Extracellular Vesicles. **Methods in Molecular Biology**, 1660: 15-22, 2017; doi:10.1007 / 978-1-4939-7253-1\_2

KOU, Yan; ZOU, Lili; LIU, Ruipeng; ZHAO, Xinyi; WANG, Ying; ZHANG, Cong; DONG, Zengxiang; KOU, Junjie; BI, Yayan; FU, Lu; SHI, Jialan. Intravascular Cells and Circulating Microparticles Induce Procoagulant Activity Via Exposure to Phosphatidylserine in Heart Failure. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, 48,187–194, 2019; doi:10.1007/s11239-019-01889-8

KRAJEWSKA-WLODARCZYK, Magdalena; OWCZARCZYK-SACZONEK, Gnieszka; ZUBER, Zbigniew; WOJTKIEWICZ, Maja; WOJTKIEWICZ, Joanna. Role of Microparticles in the Pathogenesis of Inflammatory Joint Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, 20, 5453, 2019; doi:10.3390/ijms20215453

KRAL, Julia Barbara; SCHROTTMAIER, Waltraud Cornelia; SALZMANN, Manuel; ASSINGER, Alice. Platelet Interaction with Innate Immune Cells. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, 43, 78–88, 2016; doi:10.1159/000444807

LEROYER, Aurélie S.; RAUTOU, Pierre-Emmanuel; SILVESTRE, Jean-Sébastien; CASTIER, Yves; LESÈCHE, Guy; DEVUE, Cécile; DURIEZ, Micheline; BRANDES, Ralf P.; LUTGENS, Esther; TEDGUI, Alain; BOULANGER, Chantal M. CD40 Ligand Microparticles From Human Atherosclerotic Plaques Stimulate Endothelial Proliferation and Angiogenesis a Potential Mechanism for Intraplaque Neovascularization. **Journal of the American College of Cardiology**, Elsevier, 52, 16, 2008; doi:10.1016/j.jacc.2008.07.032

LEROYER, A. S.; TEDGUI, A.; BOULANGER, C. M. Role of Microparticles in Atherothrombosis. **Journal of Internal Medicine**, 263, 528–537, 2008; doi:10.1111/j.1365-2796.2008.01957.x

LEVIN, Grigory; SUKHAREVA, Ekaterina; LAVRENTIEVA, Athina. Impact of Microparticles Derived from Erythrocytes on Fibrinolysis. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, 2015; doi:10.1007/s11239-015-1299-y

LI, Kai-Yin; ZHENG, Lei; WANG, Qian; HU, Yan-Wei. Characteristics of Erythrocyte-Derived Microvesicles and its Relation with Atherosclerosis. **Atherosclerosis**, 1-5, 2016; doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.10.043

LOW, Martin G; ZILVERSMIT, Donald B. Role of Phosphatidylinositol in Attachment of Alkaline Phosphatase to Membranes. **Biochemistry**; 19, 17, 3913-3918, 1980; doi:10.1021/bi00558a004

MALTA, Deborah Carvalho; da SILVA JUNIOR, Jarbas Barbosa. **O Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Brasil e a Definição das Metas Globais para o Enfrentamento dessas Doenças até 2025: Uma Revisão**. Epidemiologia Serv. Saúde. Brasília; 22, 1, 151-164, 2013; doi:10.5123/S1679-49742013000100016

MARTÍNEZ, M. Carmen; TESSE, Angela; ZOBARI, Fatiha; ANDRIANTSITOHAINA, Ramarason. Shed Membrane Microparticles from Circulating and Vascular Cells in Regulating Vascular Function. **American Journal Physiology Heart and Circulatory Physiology**; 288, 3, H1004-9, 2005; doi:10.1152/ajpheart.00842.2004

MECKES, David G.; RAAB-TRAUB, Nancy. Microvesicles and Viral Infection. **Journal of Virology**, 85, 24, 12844–12854, 2011; doi:10.1128 / JVI.05853-11

MENA, Sarah E.; DE BEER, Martin P.; MCCORMICK, Joseph; HABIBI, Nahal; LAHANNA, Joerg; BURNS, Mark A..Variable-Height Channels for Microparticle Characterization and Display. **The Royal Society of Chemistry**, Accepted Manuscript, 2020; doi:10.1039/x0xx00000x

MENCK, Kerstin; BLECKMANN, Annalen; SCHULZ, Matthias; RIES, Lena; BINDER, Claudia. Isolation and Characterization of Microvesicles from Peripheral Blood. **Journal of Visualized Experiments**, 119, e55057, 1, 7, 2017; doi:10.3791/55057

MURADOR, Priscila; DEFFUNE, Elenice. Structural Aspects of the Erythrocyte Membrane. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 29, 2, 2007; doi:10.1590/S1516-84842007000200016

NAKAHARA, Takehiro; DWECK, Marc R.; NARULA, Navneet; PISAPIA, David; NARULA, Jagat; STRAUSS, William H.. Coronary Artery Calcification from Mechanism to Molecular Imaging. **JACC: Cardiovascular Imaging**, 10, 582-593, 2017; doi:10.1016/j.jcmg.2017.03.005

OPAS/OMS BRASIL; **Organização Pan-Americana da Saúde/ Organização Mundial da Saúde Brasil**. Doenças Cardiovasculares, 2017. Disponível em: <[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=1096](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=1096)>. Acesso em: 15 fev. 2020

PFRIEGER, Frank W.; VITALE, Nicolas. Cholesterol and the Journey of Extracellular Vesicles. **Journal of Lipid Research**, 59, 12, 2255-2261, 2018; doi:10.1194 / jlr.R084210

PONOMAREVA, A. A., NEVZOROVA, T. A., MORDAKHANOVA, E. R., ANDRIANOVA, I. A., RAUOVA, L., LITVINOV, R. I., WEISEL, J. W. Intracellular Origin and Ultrastructure of Platelet-Derived Microparticles. **Journal of Thrombosis Haemostasis**, 15, 1655–67, 2017; doi:10.1111/jth.13745

POON, Ivan K. H.; BAXTER, Amy A.; HULETT, Mark D.; PAONE, Stephanie. Endothelial Cell Apoptosis and the Role of Endothelial Cell-Derived Extracellular Vesicles in the Progression of Atherosclerosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 76, 6, 1093-1106, 2018; doi:10.1007 / s00018-018-2983-9

RAPOSO, Graça; STOORVOGEL, Willem. Extracellular Vesicles: Exosomes, Microvesicles, and Friends. *The Journal of Cell Biology*. **The Rockefeller University Press**, 200, 4, 373–383, 2013; doi:10.1083/jcb.201211138

RAUTOU, Pierre-Emmanuel; VION, Anne-Cle´mence; AMABILE, Nicolas; CHIRONI, Gilles; SIMON, Alain; TEDGUI, Alain; BOULANGER, Chantal M.. Microparticles, Vascular Function, and Atherothrombosis. **Circulation Research**, 109, 593-606, 2011; doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.233163

RECORD, Michel; SILVENTE-POIROT, Sandrine; POIROT, Marc; WAKELAM, Michael J.O.. Extracellular Vesicles: Lipids as Key Components of their Biogenesis and Functions. **Journal of Lipid Research**, 59, 8, 1316-1324, 2018; doi:10.1194 / jlr.e086173

RIDGER, Victoria C.; BOULANGER, Chantal M.; ANGELILLO-SCHERRER, Anne; BADIMON, Lina; BLANC-BRUDE, Olivier; BOCHATON-PIALLAT, Marie-Luce; BOILARD, Eric; BUZAS, Edit I.; CAPORALI, Andreas; DIGNAT-GEORGE, Françoise; EVANS, Paul C.; LACROIX, Romaric; LUTGENS, Esther; KETELHUTH, Daniel F. J.; NIEUWLAND, Rienk; TOTI, Florence; TUÑON, Jose; WEBER, Christian; HOEFER, Imo E.. Microvesicles in Vascular Homeostasis and Diseases. **Thrombosis and Haemostasis**, 117, 1296–1316, 2017; doi:10.1160/TH16-12-0943

ROSS, Russell. Atherosclerosis--an Inflammatory Disease. **The New England Journal of Medicine**, 340, 2, 115-26, 1999; doi:10.1056/NEJM199901143400207

ROSIŃSKA, Justyna; AMBROSIUS, Wojciech; MACIEJEWSKA, Joanna; NAROŻNY, Robert; KOZUBSKI, Wojciech; Maria LUKASIK. Association of Platelet-Derived Microvesicles and their Phenotypes with Carotid Atherosclerosis and Recurrent Vascular Events in Patients After Ischemic Stroke. **Thrombosis Research**, 176, 18–26, 2019; doi:10.1016/j.thromres.2019.01.014

SADALLAH, Salima; EKEN, Ceylan; SCHIFFERLI, Jürg, Alfred.. Ectosomes as Modulators of Inflammation and Immunity. **Clinical and Experimental Immunology**, 163, 1, 26-32, 2011; doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04271.x

SALZER, Ulrich, HINTERDORFER, Peter; HUNGER, Ursula; BORKEN, Cordula; PROHASKA, Rainer; Ca<sup>++</sup> Dependent Vesicle Release from Erythrocytes Involves Stomatin-Specific Lipid Rafts, Synexin (Annexin VII), and Sorcin. **Blood**, 99, 7, 2569–2577, 2002; doi:10.1182/blood.V99.7.2569

SANTILLI, Francesca; MARCHISIO, Marco; LANUTI, Paola; BOCCATONDA, Andrea; MISCIA, Sebastiano; DAVÌ, Giovanni. Microparticles as New Markers of Cardiovascular Risk in Diabetes and Beyond. **Thrombosis and Haemostasis**, 116, 220–234, 2016; doi:10.1160/TH16-03-0176

SAUDES, Rosa; PADRÓ, Teresa; ALONSO, Rodrigo; LÓPEZ-MIRANDA, José; MATA, Pedro; BADIMON, Lina. Circulating Cd45+/Cd3+ Lymphocyte-Derived Microparticles Map Lipid-Rich Atherosclerotic Plaques in Fh Patients. *Platelets and Blood Cells*. **Thrombosis and Haemostasis**, 111, 1, 2014; doi:10.1160/TH13-07-0612

SAUDES, Rosa; PADRÓ, Teresa; ALONSO, Rodrigo; MATA, Pedro; BADIMON, Lina. High Levels of Tsp1+/Cd142+ Platelet-Derived Microparticles Characterise Young Patients with High Cardiovascular Risk and Subclinical Atherosclerosis. *Atherosclerosis and Ischaemic Disease*. **Thrombosis and Haemostasis**, 114: 1310–1321, 2015; doi:10.1160/TH15-04-0325

SCHECTER, Alison D;SPIRN, Benjamin; ROSSIKHINA, Maria; GIESEN, Peter L.A.; BOGDANOV, Vladimir; FALLON, John T.; FISHER, Edward A.;SCHNAPP, Lynn M.; NEMERSON, Yale; TAUBMAN, Mark B.. Release of Active Tissue Factor by Human Arterial Smooth Muscle Cells. **Circulation Research**, 87, 2:126-32, 2000; doi:10.1161/01.res.87.2.126

SHANTSILA, E.; KAMPHUISEN, P. W.; LIP, G. Y. H.. Circulating Microparticles in Cardiovascular Disease: Implications for Atherogenesis and Atherothrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 8, 2358–68, 2010; doi:10.1111/j.1538-7836.2010.04007.x

SHAO, Huilin; IM, Hyungsoon; CASTRO, Cesar M.; BREAKEFIELD, Xandra; WEISSLEDER, Ralph; LEE, Hakho. New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles. **Chemical Reviews**, 118, 4, 1917-1950, 2018; doi:10.1021 / acs.chemrev.7b00534.

SHET, Arun S.. Characterizing blood microparticles: Technical aspects and challenges. **Vascular Health and Risk Management**, 4, 4, 769–774, 2008; doi:10.2147/VHRM.S955

SHU, Zeyu; TAN, Jin; MIAO, Yuyang; ZHANG, Qiang. The Role of Microvesicles Containing Micrnas in Vascular Endothelial Dysfunction. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 23, 12, 7933-7945, 2019; doi:10.1111 / jcmm.14716

SIBOV, Tatiana Taís; MIYAKI, Liza Aya Mabuchi; MAMANI, Javier Bustamante; MARTI, Luciana Cavalheiro; SARDINHA, Luiz Roberto; PAVON, Lorena Favaro; OLIVEIRA, Daniela Mara de; CARDENAS, Walter Humberto; GAMARRA, Lionel Fernel. **Evaluation of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Labeling with Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Coated with Dextran and Complexed with Poly-L-Lysine**. Scielo. Hospital Israelita Albert Einstein, 10, 2, 180-8, 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/pdf/eins/v10n2/pt\\_a11v10n2.pdf](http://www.scielo.br/pdf/eins/v10n2/pt_a11v10n2.pdf)>. Acesso em: 04 fev. 2020.

SILVA, Bárbara V.; HORTA; Bruno A. C.; PINTO, Ricardo Bicca de Alencastro; ANGELO, C. Kinase Protein: Structural Features and Chemical Inhibitors. **Química Nova**, 32, 2, 453-462, 2009; doi:10.1590/S0100-40422009000200032

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose**. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 109, 2, 1, 1-76, 2017. Disponível em: <<http://www.bibliotecasbpc.org.br/index.php?P=4&C=0.2>>. Acesso em: 15 fev. 2020

STEVENS, Bryce; PEZZULLO, Lynne; VERDIAN, Lara; TOMLINSON, Josh; GEORGE, Alice; BACAL, Fernando. The Economic Burden of Heart Conditions in Brazil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 111, 1, 2018; doi:10.5935/abc.20180104

SZATANEK, Rafał; BAJ-KRZYWORZEKA, Monika; ZIMOCH, Jakub; LEKKA, Małgorzata; SIEDLAR, Maciej; BARAN, Jarek. The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. **International Journal of Molecular Sciences**, 18, 1153, 2017; doi:10.3390/ijms18061153

SZEMPRUCH, Anthony J.; DENNISON, Lauren; KIEFT, Rud; HARRINGTON, John M.; HAJDUK, Stephen L.. Sending a Message: Extracellular Vesicles of Pathogenic Protozoan Parasites. **Nature Reviews Microbiology**, 14, 11, 669-675, 2016; doi:10.1038 / nrmicro.2016.110

TEDGUI, Alain; MALLAT, Ziad. Another Source of Tissue Factor–Containing Microparticles in Atherothrombosis? **Circulation Research**, 87, 2, 81-2, 2000; doi:10.1161/01.res.87.2.81.

TENG, Fei; FUSSENEGGER, Martin. Shedding Light on Extracellular Vesicle Biogenesis and Bioengineering. **Advanced Science**, 8, 1, 2003505, 2020; doi:10.1002 / advs.202003505

TKACH, Mercedes; THÉRY, Clotilde. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. **Cell**, 164, 6, 1226-1232, 2016; doi:10.1016/j.cell.2016.01.043

THÅLIN, Charlotte; HISADA, Yohei; MACKMAN, Staffan; Nigel; WALLÉN, Håkan. Neutrophil Extracellular Traps Villains and Targets in Arterial, Venous, and Cancer-Associated Thrombosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 39, 00–00, 2019;doi:10.1161/ATVBAHA.119.312463

THÉRY, Clotilde; ZITVOGEL, Laurence; AMIGORENA, Sebastian. Exosomes: composition, biogenesis and function. **Nature Reviews Immunology**, 2, 8, 569, 2002; doi:10.1038 / nri855

THÉRY, Clotilde; AMIGORENA, Sebastian; RAPOSO; Graça, CLAYTON, Aled. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. **Current Protocols in Cell Biology**, 3, 3, 22, 2006; doi:10.1002/0471143030.cb0322s30

THÉRY, Clotilde; 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 Misev 2014 Guidelines. **Journal Extracell Vesicles**, 7, 1, 1535750, 2018; doi:10.1080 / 20013078.2018.1535750

THOMPSON, Randall C; ALLAM, Randall C; LOMBARDI, Guido P; WANN, L Samuel; SUTHERLAND, M Linda; SUTHERLAND, James D; SOLIMAN, Muhammad Al-Tohamy; FROHLICH, Bruno; MININBERG, David T; MONGE, Janet M; VALLODOLID, Clide M; COX, Samantha L; EL-MAKSOUUD, Gomaa Abd; BADR, Ibrahim; MIYAMOTO, Michael I; El-Din, Abd el-Halim Nur; NARULA, Jagat; FINCH, Caleb E; THOMAS, Gregory S. Atherosclerosis Across 4000 Years of Human History: the Horus Study of Four Ancient Populations. **The Lancet**, 381, 9873, 1211-1222, 2013; doi:10.1016/S0140-6736(13)60598-X

TIAN, J.; LV, H.-T.; AN, X.-J.; LING, N.; XU F.. **Endothelial Microparticles Induce Vascular Endothelial Cell Injury in Children with Kawasaki Disease**. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 20, 9, 1814-1818, 2016. Disponível em: <<https://www.europeanreview.org/wp/wp-content/uploads/1814-1818.pdf>>. Acesso em: 16 fev. 2020

TÖKÉS-FÜZESI, Margit; RUZSICS István; RIDEG Orsolya; KUSTÁN, Fart; KOVÁCS Gábor L; MOLNÁR Tihamér. Role of Monocyte-Derived Microparticles, Endothelial Cells and Platelets in COPD Exacerbation. **International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, 13, 3749-3757, 2018; doi:10.2147/COPD.S175607

TKACH, Mercedes; THÉRY; Clotilde. Communication by Extracellular Vesicles: Where we are and Where we Need to Go. **Cell**, 164, 6, 1226-1232, 2016; doi:10.1016/j.cell.2016.01.043

TRICARICO, Christopher; CLANCY, James; D'SOUZA-SCHOREY, Crislyn. Biology and Biogenesis of Shed Microvesicles. **Small GTPases**, 8, 4, 220-232, 2017; doi:10.1080 / 21541248.2016.1215283

TURIÁK, Lilla; MISJÁK, Petra; SZABÓ, Tamás G.; ARADI, Borbála; PÁLÓCZI, Krisztina; OZOHANICS, Oliver; DRAHOS, László; KITTEL, Ágnes; FALUS, András; BUZÁSB, Edit I.; VÉKEY, Károly. Proteomic Characterization of Thymocyte-Derived Microvesicles and Apoptotic Bodies in Balb/C Mice. **Journal of Proteomics**, 74 (10), 2025–2033, 2011; doi:10.1016 / j.jprot.2011.05.023

VALENCIA, Karmele; LECANDA, Fernando. Microvesicles: Isolation, Characterization for In Vitro and In Vivo Procedures. **Methods in Molecular Biology**, 14, 1372, 2016; doi:10.1007/978-1-4939-3148-4

VAN DER POL, Edwin; BÖING, Anita N.; HARRISON, Paul; STURK, Auguste; NIEUWLAND, Rienk. Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. **Pharmacological Reviews**, 64, 3, 676–705, 2012; doi:10.1124 / pr.112.005983

WAGNER, G. M.; CHIU, D T; YEE, M. C.; LUBIN, B. H.. **Red Cell Vesiculation – a Common Membrane Physiologic Event**. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 108, 4: 315-24, 1986. Disponível em: <[https://www.translationalres.com/article/0022-2143\(86\)90170-8/fulltext](https://www.translationalres.com/article/0022-2143(86)90170-8/fulltext)>. Acesso em: 15 jan. 2020

WANG, Qiyu, LU, Quan. Plasma Membrane-derived Extracellular Microvesicles Mediate Noncanonical Intercellular Notch Signaling. **Nature Communications**, 8, 709, 2017; doi:10.1038/s41467-017-00767-2

WANG, Zhi-Ting; WANG, Zi; HU, Yan-Wei. Possible Roles of Platelet-Derived Microparticles in Atherosclerosis. Elsevier. **Journal Atherosclerosis**, 248, 10-16, 2016; doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.004

WESTWRMAN, Maxwell; POTER, John B. Red blood cell-derived microparticles: An overview. *SciELO. Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 59, 134-139, 2016; doi:10.1016/j.bcmd.2016.04.003

WHEWAY, Julie; LATHAM, SharissaL.; COMBES, Valery; GRAU, Georges E. R.. Endothelial Microparticles Interact with and Support the Proliferation of T Cells. *The Journal of Immunology*, 193, 7, 3378, 2014; doi:10.4049/jimmunol.1303431

WOLF, Peter. The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *British Journal of Hematology*, 13, 269, 1967; doi:10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x

XAVIER H. T., IZAR M. C., FARIA NETO J. R., ASSAD M. H., ROCHA V. Z., SPOSITO A. C., FONSECA F. A., DOS SANTOS J. E., SANTOS R. D., BERTOLAMI M. C., FALUDI A. A., MARTINEZ T. L. R., DIAMENT J., GUIMARÃES A., FORTI N. A., MORIGUCHI E., CHAGAS A. C. P., COELHO O. R., RAMIRES J. A. F.; Sociedade Brasileira de Cardiologia. V **Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose**. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2013. Disponível em: <<http://www.ahfcolesterol.org/images/Vdiretriz.pdf>>. Acesso em: 06 set. 2020

XU, Rong; GREENING, David W.; ZHU, Hong-Jian; TAKAHASHI, Nobuhiro; SIMPSON, Richard J.. Extracellular Vesicle Isolation and Characterization: Toward Clinical Application. *The Journal of Clinical Investigation*, 126, 4, 1152–1162, 2016; doi:10.1172/JCI81129.

YÁÑEZ-MÓ, María; et al.. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracell Vesicles*, 4, 27066, 2015; doi:10.3402 / jev.v4.27066

YUNOKI, Kei; NARUKO, Takahiro; SUGIOKA, Kenichi; INABA, Mayumi; ITOH, Akira; HAZE, Kazuo; YOSHIYAMA, Minoru; UEDA, Makiko. Thrombus Aspiration Therapy and Coronary Thrombus Components in Patients with Acute ST-Elevation Myocardial Infarction. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 20, 000-000, 2013; doi:10.5551 / jat.17608

ZOMER, Anoeck; VENDRIG, Tineke; HOPMANS, Erik S; EIJDHOVEN, Monique van; MIDDELDORP, Jaap M; PEGTEL, D Michiel. Exosomes: fit to deliver small RNA. *Communicative & integrative biology*, 3, 5, 447-450, 2010; doi:10.4161 / cib.3.5.12339