

# Vesículas extracelulares: o que sabemos até agora

• **Heloísa Nelson Cavalcanti** Departamento de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN, Brasil • **Tiago João da Silva Filho** Departamento de Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande, PB, Brasil • **Lélia Maria Guedes Queiroz** Departamento de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN, Brasil

**RESUMO** | Com base em uma revisão de literatura, este estudo teve como objetivo abordar e esclarecer alguns conceitos referente às vesículas extracelulares (VE) e sua nomenclatura. Realizou-se uma busca por artigos científicos e revisões bibliográficas relativos às VE publicados de 2010 a 2021 em língua inglesa nas bases de dados eletrônicas Scielo, Lilacs e Medline/PubMed. Trinta e três artigos pertinentes ao tema foram selecionados para compor esse estudo. VE são partículas nano/micrométricas, delimitadas por uma membrana celular e produzidas por organismos vivos, que desempenham um papel importante na comunicação celular. Dentre as principais classes de VE, encontram-se os exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos. Contudo, essas vesículas compartilham algumas características comuns, dificultando sua caracterização. Embora diversos estudos tenham tentado isolar os diferentes tipos de VE, ainda não há métodos eficazes de purificação nem marcadores específicos. Com base na literatura atual, o presente artigo reforça a importância de uma descrição detalhada acerca dos métodos de isolamento e caracterização em estudos que se utilizam de VE. Além disso, de modo a tentar reduzir possíveis vieses e facilitar a comparação entre estudos, sugere também que se padronize o uso do termo “VE” em detrimento a termos mais específicos.

**DESCRITORES** | Vesículas Extracelulares; Exossomas; Comunicação Celular.

**ABSTRACT** | **Extracellular vesicles: what we know so far** • This study aimed to address and clarify some concepts about the extracellular vesicles (EVs) and their nomenclature based on a literature review. A literature review was performed using the Scielo, Lilacs and Medline/PubMed databases. Scientific research and literature review articles about VEs published from 2010 to 2021 in English language were verified. Thenceforth, 33 articles were selected to compose this study. EVs are nano to micro-metric-sized particles, delimited by cell membrane and released from living organisms, which play an important role on cell communication. The main types of EVs are exosomes, microvesicles and apoptotic bodies, which present overlapping features that may lead to confusion in their characterization. Studies have tried to isolate the different types of VEs, but there are neither effective methods of purification nor specific markers yet. Based on the current literature, the present study reinforces the importance of detailed description about methods of isolation and characterization in studies which use VEs and suggests maintaining the use of the term “EVs” instead of more specific terms, thus attempting to reduce possible biases and facilitate comparison between studies.

**DESCRIPTORS** | Extracellular Vesicles; Exosomes; Cell Communication.

**AUTOR CORRESPONDENTE** | • **Heloísa Nelson Cavalcanti** Departamento de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte • **Av. Sen. Salgado Filho, 1787** Natal, RN, Brasil • **59056-000** E-mail: [heloisa\\_nelson@hotmail.com](mailto:heloisa_nelson@hotmail.com)

• **Recebido** 16 Dez. 2020 • **Aceito** 24 Maio 2021

• **DOI:** <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2357-8041.cldr.2021.180055>

## INTRODUÇÃO

Uma característica essencial dos organismos multicelulares é a comunicação intercelular, que pode ser mediada tanto pelo contato direto entre células como pela transferência de moléculas secretadas. Nas últimas décadas, um outro mecanismo tem sido estudado, abrangendo a transferência intercelular por meio de vesículas extracelulares (VE).<sup>1</sup>

Os principais grupos, classes ou subtipos de VE estudados são os exossomos, as microvesículas (MV) e os corpos apoptóticos.<sup>2-3</sup> Esses grupos apresentam características estruturais que podem, por vezes, se sobrepor. Além disso, ainda não há marcadores específicos para cada grupo que sejam determinantes para sua caracterização ou para a padronização dos métodos de isolamento para cada tipo de VE específico, o que gera uma certa confusão na literatura.<sup>4-6</sup>

Dessa maneira, este estudo objetiva revisar a literatura e discutir a nomenclatura e as características que auxiliam na distinção entre esses subgrupos.

## METODOLOGIA

Foi realizada uma busca nas bases Scielo, Lilacs e Medline/PubMed por artigos publicados em língua inglesa entre os anos de 2010 e 2021 utilizando as palavras-chaves *extracellular vesicles*, *exosomes*, *microvesicles* e *apoptotic bodies*, isoladamente ou em associação, unidos pelo operador booleano “AND”. Foram incluídos no estudo apenas artigos originais de pesquisa científica e revisão de literatura que discutiram ou analisaram as VE. Após análise, um total de 33 artigos foram considerados elegíveis para compor esta revisão de literatura.

## REVISÃO DE LITERATURA

A utilização do termo VE é feita, de maneira geral, para se referir a uma população heterogênea de partículas celulares encapsuladas por membrana, com tamanho nano ou micrométrico e secretadas abundantemente na circulação por diversas células, sendo mediadores fundamentais da comunicação

intercelular. Tais vesículas constituem uma gama diversificada de subtipos classificados pela Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV), com destaque para os exossomos, as MV e os corpos apoptóticos.<sup>7</sup>

As VE possuem como função principal a comunicação intercelular e são liberadas por diferentes tipos celulares, tanto no espaço intersticial quanto em fluidos corporais, podendo chegar a longas distâncias até serem capturadas por células receptoras. Elas atuam em diversos processos fisiológicos, como no reparo tecidual, na coagulação sanguínea e na manutenção das células tronco, bem como em processos patológicos, como em distúrbios imunológicos, doenças neurológicas, disseminação de oncoproteínas e propagação de agentes patogênicos, como o vírus do HIV-1.<sup>8-10</sup>

Tais vesículas conseguem manter o fenótipo da célula de origem e podem expressar moléculas de superfície de membrana e do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, assim como transportar antígenos e componentes citoplasmáticos.<sup>11</sup>

A caracterização dos exossomos, MV e corpos apoptóticos é feita a partir das diferenças em seus tamanhos, biogêneses, composições e funções (Tabela 1).<sup>12</sup>

**TABELA 1** | Comparação entre os diferentes tipos de VE

Tipo	EXOSSOMOS	MV	CORPOS APOPTÓTICOS
Tamanho (nm)	50-100	100-1000	1000-5000
Biogênese	Via endocítica (exocitose de endossomos multivesiculares)	Brotamento a partir da membrana plasmática	Brotamento a partir da membrana plasmática
Composição	Proteínas e ácidos nucleicos	Proteínas e ácidos nucleicos	Fragmentos nucleares e organelas citoplasmáticas
Função	Comunicação celular	Comunicação celular	Facilitar a fagocitose

VE: Vesículas extracelulares; MV: Microvesículas.

Fonte: Raposo e Stoorvogel,<sup>1</sup> Correa et al.,<sup>6</sup> Andaloussi et al.,<sup>9</sup> György et al.,<sup>13</sup> Casado-Díaz, Quesada-Gómez e Dorado,<sup>14</sup> Yáñez-Mó et al.<sup>15</sup>

Os exossomos são VE nanométricas que se sobrepõem ao tamanho dos vírus. São produzidos pela invaginação da membrana endossômica durante a maturação dos corpos multivesiculares e são liberados para fora da célula após a fusão desses corpos com a membrana plasmática. Eles são cercados por uma bicamada fosfolipídica e podem ser secretados ativamente por células *in vivo* e *in vitro*.<sup>1,6,13</sup>

Segundo Casado-Díaz, Quesada-Gómez e Dorado,<sup>14</sup> o envolvimento dos exossomos nos processos de comunicação intercelular foi observado não só entre células de um mesmo organismo, mas também entre células de diferentes organismos, sejam eles da mesma espécie ou de espécies diferentes. Diante disso, os exossomos passaram a ser considerados como ferramenta para o transporte e entrega de substâncias terapêuticas diretamente para células-alvo.

As MV, também denominadas ectossomos ou micropartículas, constituem uma população heterogênea de vesículas originadas a partir da evaginação e fissão da membrana plasmática celular ou a partir de brotamento.<sup>1,15</sup>

A liberação de MV é induzida pela ativação de receptores purinérgicos com Adenosina Trifosfato (ATP) e lipopolissacarídeos ou pelo fluxo de cálcio intracelular.<sup>13</sup> A redistribuição de lipídios em células vivas pode ser facilitada pelas translocases, como a fosfatidilserina, que induz o brotamento da membrana e a geração de MV, além de possibilitarem o movimento de fosfolipídios através da membrana plasmática.<sup>1,6,13</sup> Ademais, outras alterações no endossoma e na membrana plasmática podem estar envolvidas na produção de MV, como a superexpressão do fator 6 de ARF de ligação à GTP (fator de ribosilação do ADP 6), a formação do complexo VPS ATPase Ligase E3 e a interação do gene de susceptibilidade a tumores 101 (TSG101) com a proteína 1 que contém o domínio da travina (ARRDC1).<sup>6,9</sup>

Tais modificações produzem contrações no arranjo do citoesqueleto, e a interação com

fosfolipases resultam no lançamento de MV para o meio extracelular. A composição da membrana das MV, por serem altamente enriquecidas em fosfatidilserina, é mais semelhante à da célula-mãe quando comparada com a composição da membrana de exossomos.<sup>6,9</sup>

Os corpos apoptóticos são um grupo de vesículas de tamanho variável, sendo maiores em comparação aos outros tipos de VE. São liberados nas fases finais da apoptose, a partir de dobramentos ou de evaginações na membrana plasmática da célula, para evitar o extravasamento do conteúdo tóxico intracelular para a matriz extracelular.<sup>2</sup>

Os corpos apoptóticos apresentam a fosfatidilserina externalizada e possuem uma variedade de conteúdos celulares, que incluem DNA, RNA e histonas. Podem incorporar vesículas menores, contendo fragmentos do núcleo e organelas, o que, provavelmente, distingue essas partículas de outros tipos de VE.<sup>2,6</sup> Dentre as funções dos corpos apoptóticos, pode destacar-se a transferência horizontal tanto de oncogenes como de DNA e a apresentação de epítomos de células T para células fagocíticas.<sup>13</sup>

As VE podem ser obtidas para estudo a partir de fluidos extracelulares, ou seja, a partir de meio de cultura de células condicionado ou dos diversos fluidos corporais, como saliva, urina e suor. Diversas metodologias diferentes são utilizadas para isolá-las, como a ultracentrifugação, a ultrafiltração, a precipitação, a cromatografia por excisão de tamanho e as tecnologias microfluídicas.<sup>5,14,16-19</sup> A Tabela 2 reúne as principais vantagens e desvantagens dos principais métodos de isolamento estudados.

A ultracentrifugação consiste na aplicação de uma força centrífuga de 100.000 xg a uma mistura heterogênea contendo VE. Os constituintes da mistura são sedimentados sequencialmente, de acordo com sua densidade e tamanho, com as partículas maiores e mais densas, que sedimentam primeiro. É um processo de múltiplas etapas em que são feitas centrifugações da amostra a velocidades

crescentes de 300 a 2000 xg para remover células e fragmentos celulares. Em seguida, é realizada uma centrifugação a uma velocidade maior (10.000 xg)

para sedimentar VE maiores e restos de debris celulares e, finalmente, a ultracentrifugação a 100.000 xg para isolar exossomos.<sup>14,17-18</sup>

**TABELA 2** | Vantagens e desvantagens dos diferentes métodos de isolamento de VE

MÉTODO DE ISOLAMENTO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
ULTRACENTRIFUGAÇÃO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pureza moderada;</li> <li>• Obtenção de grande quantidade de VE;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto consumo de tempo;</li> <li>• Necessidade de equipamento específico; <ul style="list-style-type: none"> <li>• Risco de danos às VE;</li> </ul> </li> <li>• É dependente da variável humana;</li> </ul>
ULTRAFILTRAÇÃO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mais rápido;</li> <li>• Não necessita de equipamentos de alto custo;</li> <li>• Boa portabilidade.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baixo nível de pureza;</li> <li>• Obtenção de menor quantidade de VE;</li> <li>• Presença de contaminantes proteicos;</li> <li>• VE podem ser mantidas aprisionadas à membrana.</li> </ul>
PRECIPITAÇÃO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Técnica de fácil realização;</li> <li>• Alto rendimento;</li> <li>• Mais rápida.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nível de pureza extremamente baixo;</li> <li>• Fabricantes dos kits comerciais não reportam detalhadamente os componentes químicos presentes na solução.</li> </ul>
CROMATOGRAFIA POR EXCISÃO DE TAMANHO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Técnica de rápida execução;</li> <li>• Pureza moderada a alta;</li> <li>• Bom rendimento;</li> <li>• Manutenção da funcionalidade das VE;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Podem ser requeridas etapas adicionais de concentração de VE antes e/ou depois.</li> </ul>
TECNOLOGIAS MICROFLUIDICAS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Necessita de pouco volume da amostra para a coleta de VE;</li> <li>• Técnica rápida, simples e de baixo custo;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Técnica menos sensível.</li> </ul>

VE: Vesículas extracelulares.

Fonte: Lötvall et al.,<sup>5</sup> Casado-Díaz, Quesada-Gómez e Dorado,<sup>14</sup> Shukla et al.,<sup>16</sup> Kurian et al.,<sup>17</sup> Bister et al.,<sup>18</sup> Théry et al.<sup>19</sup>

A ultrafiltração é um método de isolamento baseado no tamanho de partículas através de filtros em membrana. Uma membrana com poros de 0,22 µm de diâmetro é utilizada para coleta de exossomos do material filtrado. Antes dessa etapa de filtração, as células, debris e vesículas maiores devem ser removidas do fluido enriquecido em exossomo por etapas de centrifugação ou pela passagem em membranas contendo poros maiores de 0,8 µm de diâmetro.<sup>17,20</sup>

A precipitação consiste em uma técnica que altera a solubilidade dos exossomos em um solvente para precipitá-los da solução enriquecida em VE através de polímeros de exclusão de água. Esses polímeros, particularmente o polietilenoglicol com peso molecular de 8 kDa, atraem moléculas de água entre si e, dessa forma, força moléculas insolúveis em aula para fora da solução. Após um curto tempo de incubação, a mistura da solução com o líquido

enriquecido em exossomos é centrifugada e o *pellet* contendo exossomos precipitados é coletado.<sup>17,20</sup>

A cromatografia por excisão de tamanho é uma outra tecnologia baseada na separação de moléculas pelo tamanho. Uma solução enriquecida em VE é passada por uma coluna de contas contendo vários poros. Moléculas individuais podem passar pelos poros nas esferas poliméricas dependendo do seu tamanho, uma vez que moléculas com raios menores são capazes de passar pelos poros e migram através dos túneis da coluna e, portanto, eluindo mais tarde da coluna. Exossomos, que têm raios hidrodinâmicos maiores, não conseguem entrar nos poros e, portanto, passam pela coluna mais rápido, podendo, assim, serem isolados.<sup>17,19,20</sup>

As tecnologias microfluídicas fornecem métodos rápidos e altamente eficientes para o isolamento e detecção de exossomos em um único chip. Essas

tecnologias manipulam pequenas quantidades de fluidos através de canais com dimensões micrométricas usando forças capilares. Diferentes métodos de isolamento de exossomos são empregados, todos com base no tamanho e utilizando nano filtros, matrizes nanométricas ou nanofios.<sup>17,19,21</sup>

Apesar dos diversos métodos disponíveis, ainda não há um consenso sobre qual desses métodos seria o “padrão ouro” para isolar ou purificar VE.<sup>5</sup>

De maneira geral, os termos exossomo e MV têm sido utilizados de maneira indiscriminada ao longo dos anos. Devido às dificuldades na distinção entre os exossomos e as MV, têm-se considerado as MV como um composto que contém ambos os tipos de vesículas, principalmente por ainda não haver um completo entendimento de sua biogênese e de sua identificação em razão das inconsistências em seu isolamento durante o processo de purificação.<sup>22</sup>

Com a falta de consenso quanto aos marcadores bioquímicos que caracterizam os diferentes tipos de VE e sua classificação, a ISEV resolveu declarar na seção “Informações mínimas para Estudos de Vesículas Extracelulares 2018”<sup>19</sup> que, quanto à nomenclatura, é preferível o uso do termo genérico “VE”, sendo recomendada uma definição cuidadosa quando houver utilização de outros termos.<sup>14,19</sup>

É crescente o interesse na utilização de VE como fonte de biomarcadores, porém a compreensão acerca de seus mecanismos específicos, biogênese, heterogeneidade e subtipos ainda permanece rudimentar.<sup>16</sup>

## DISCUSSÃO

Diversos parâmetros têm sido utilizados na tentativa de caracterizar os subgrupos de VE, como o tamanho, composição e mecanismos de formação e liberação dessas vesículas.

Alguns autores consideram exossomos como sendo VE de membrana com 30 a 150 ou 50 a 150 nm de diâmetro,<sup>22,23</sup> outros consideram como exossomos apenas as VE que estão no intervalo entre

30 ou 50 e 100 nm,<sup>13,25</sup> além dos que consideram como exossomos quaisquer vesículas menores que 150 nm e que são enriquecidas por derivados endossomais.<sup>26</sup> Atualmente, não há um diâmetro exato que caracterize esse tipo de VE, porém, há um consenso geral bem estabelecido de que os exossomos são vesículas nanométricas.

Os tamanhos das MV citados em estudos variam entre 100 e 1000 nm de diâmetro,<sup>13,22,27,28</sup> e entre 50 nm e 1000 nm.<sup>25,29</sup> É importante ressaltar que o termo “microvesícula” também tem sido utilizado por vários autores para nomear quaisquer estruturas liberadas por células, em vez de apenas para vesículas de membrana.<sup>13</sup>

Em relação aos corpos apoptóticos, alguns estudos consideram que as vesículas desse grupo variam de 1 a 5 µm,<sup>13,28</sup> enquanto outros autores defendem que elas possam variar de 50 nm até 5 µm.<sup>6</sup> Esse tipo de vesícula tende a ser menos citada em estudos que envolvem VE em comparação aos exossomos e às MV.

Apesar de muitos estudos utilizarem o tamanho das partículas isoladas para justificar o uso de nomenclaturas mais específicas para os diferentes subgrupos de VEs,<sup>3-5,8,16,21,22,25,29</sup> tem sido observado que esses tamanhos podem se sobrepor, podendo comprometer a acurácia dos dados em relação à pureza das amostras coletadas.

O termo “exossomo” é a palavra, erroneamente, mais usada para designar qualquer tipo de VE.<sup>7</sup> Porém, exossomos são um grupo específico de VE nanométricas e endossomais<sup>8,19</sup> cuja secreção para o meio extracelular requer a fusão dos corpos multivesiculares com a membrana plasmática.<sup>13,15,24</sup> Ademais, essas vesículas são enriquecidas de marcadores específicos, como CD63, CD81 e CD9.<sup>30</sup> Para Bobrie, Colombo, Raposo e Théry<sup>29</sup> o termo exossomo, proposto para as EV de origem endossômica, teve um aumento na popularidade, com um número crescente de artigos escolhendo esse termo para designar VE. Ele é frequentemente

utilizado de maneira menos restritiva que a definição original. Apesar de ser observado na literatura mais recente uma preocupação com o uso correto da nomenclatura dos subtipos de VE, estudos que utilizam o termo exossomo de forma genérica para designar amostras não purificadas de VE continuam sendo publicados.

Diversos estudos demonstraram descrições complexas sobre os métodos de isolamento e caracterização das vesículas que seguem os princípios postulados posteriormente por Lötvalld et al.,<sup>5</sup> chamando a atenção para a importância da diferenciação desses grupos. No entanto, os autores continuaram a chamar o conteúdo de suas amostras utilizadas para pesquisa como exossomos.<sup>31,32</sup> De maneira semelhante, Huang et al.,<sup>26</sup> apesar de comentarem a importância da caracterização das microvesículas em amostras que contenham VE diversas, utilizando o termo menos específico para nomear as vesículas utilizadas em seus experimentos.

Os métodos de isolamento de VE foram aperfeiçoados ao longo do tempo, tornando o procedimento mais fácil e possibilitando obter maior rendimento e amostras mais purificadas. No entanto, mesmo com o notável avanço tecnológico, esses métodos de isolamento representam desafios, como a eficiência limitada, a coprecipitação de moléculas diversas e os danos à estrutura vesicular.<sup>17</sup> No entanto, na literatura pertinente, ainda não foi estabelecido um método de isolamento que efetivamente seja capaz de isolar e purificar algum dos subtipos específicos de VE.

Lötvalld et al.<sup>5</sup> afirmam que o material isolado para esse tipo de estudo geralmente contém uma mistura de VE. Mais recentemente, os estudos tendem a utilizar o termo mais geral (VE) para as amostras contendo vesículas utilizadas em seus ensaios laboratoriais em vez de adotarem termos específicos para os subgrupos.<sup>8,13-14,16,19,23,33</sup> Segundo Andaloussi et al.,<sup>9</sup> os termos “exossomo” e “microvesícula” foram usados por conta de um entendimento ainda

incompleto da biogênese da VE, inconsistências nos protocolos de purificação e falta de uma completa caracterização dessas vesículas.

## CONCLUSÃO

Diante do observado na revisão da literatura, há limitações nos processos de isolamento e caracterização das amostras que contêm vesículas liberadas por células que não permitem uma categorização em subgrupos de forma acurada. Além disso, o presente trabalho sugere a manutenção do uso do termo VE em vez da adoção de termos mais específicos na tentativa de reduzir possíveis vieses e de facilitar a comparação entre os estudos.

## REFERÊNCIAS

1. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013;200(4):373-83. doi: 10.1083/jcb.201211138
2. Beyer C, Pisetsky DS. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6(1):21-9. doi: 10.1038/nrrheum.2009.229
3. Pant S, Hilton H, Burczynski ME. The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochem Pharmacol.* 2011;83(11):1484-94. doi: 10.1016/j.bcp.2011.12.037
4. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics.* 2010;73(10):1907-20. doi: 10.1016/j.jprot.2010.06.006
5. Lötvalld J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2014;3:26913. doi: 10.3402/jev.v3.26913
6. Correa R, Caballero Z, De León LF, Spadafora C. Extracellular vesicles could carry an evolutionary footprint in interkingdom communication. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:76. doi: 10.3389/fcimb.2020.00076
7. Liu Y, Fan J, Xu T, Ahmadinejad N, Kenneth H, Lin SH, et al. Extracellular vesicle tetraspanin-8 level predicts distant metastasis in non-small cell lung cancer after concurrent chemoradiation. *Sci Adv.* 2020;6(11):eaaz6162. doi: 10.1126/sciadv.aaz6162

8. Gonda DD, Akers JC, Kim R, Kalkanis SN, Hochberg FH, Chen CC, et al. Neuro-oncologic applications of exosomes, microvesicles, and other nano-sized extracellular particles. *Neurosurgery*. 2012;72(4):501-10. doi: 10.1227/NEU.0b013e3182846e63
9. Andaloussi SEL, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJA. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(5):347-57. doi: 10.1038/nrd3978
10. Ogorevc E, Kralj-Iglic V, Veranic V. The role of extracellular vesicles in phenotypic cancer transformation. *Radiol Oncol*. 2013;47(3):197-205. doi: 10.2478/raon-2013-0037
11. Wiklander OPB, Nordin JZ, O'Loughlin A, Gustafsson Y, Corso G, Mäger I, et al. Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:26316. doi: 10.3402/jev.v4.26316
12. Yuan L, Li JY. Exosomes in Parkinson's disease: current perspectives and future challenges. *ACS Chem Neurosci*. 2019;10(2):964-72. doi: 10.1021/acchemneuro.8b00469
13. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Mészáros P, Aradi B, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(16):2667-88. doi: 10.1007/s00018-011-0689-3
14. Casado-Díaz A, Quesada-Gómez JM, Dorado G. Extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells (MSC) in regenerative medicine: applications in skin wound healing. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8(146):1-19. doi: 10.3389/fbioe.2020.00146
15. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:27066. doi: 10.3402/jev.v4.27066
16. Shukla L, Yuan Y, Shayan R, Greening DW, Karnezis T. Fat therapeutics: the clinical capacity of adipose-derived stem cells and exosomes for human disease and tissue regeneration. *Front Pharmacol*. 2020;11:158. doi: 10.3389/fphar.2020.00158
17. Kurian TK, Banik S, Gopal D, Chakrabarti S, Mazumder N. Elucidating methods for isolation and quantification of exosomes: a review. *Mol Biotechnol*. 2021;63(4):249-66. doi: 10.1007/s12033-021-00300-3
18. Bister N, Pistono C, Huremagic B, Jolkkonen J, Giugno R, Malm T. Hypoxia and extracellular vesicles: a review on methods, vesicular cargo and functions. *J Extracell Vesicles*. 2020;10(1):e12002. doi: 10.1002/jev2.12002
19. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018; 7(1): 1-47. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.
20. Liangsupree T, Multia E, Riekkola ML. Modern isolation and separation techniques for extracellular vesicles. *J Chromatogr A*. 2021;1636:461773. doi: 10.1016/j.chroma.2020.461773
21. Principe S, Hui ABY, Bruce J, Sinha A, Liu FF, Kislinger T. Tumor-derived exosomes and microvesicles in head and neck cancer: implications for tumor biology and biomarker discovery. *Proteomics*. 2013;13(10-11):1608-23. doi: 10.1002/pmic.201200533
22. Borges FT, Reis LA, Schor N. Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Braz J Med Biol Res*. 2013;46(10):824-30. doi: 10.1590/1414-431X2013296
23. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:255-89. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326
24. Benito-Martin A, Di Giannatale A, Ceder S, Peinado H. The new deal: a potential role for secreted vesicles in innate immunity and tumor progression. *Front Immunol*. 2015;6(66):66-79. doi: 10.3389/fimmu.2015.00066
25. Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, Al Saffar H, Anand S, Zhao K, et al. ExoCarta: a web-based compendium of exosomal cargo. *J Mol Biol*. 2016;428(4):688-92. doi: 10.1016/j.jmb.2015.09.019
26. Huang B, Huang LF, Zhao L, Zeng Z, Wang X, Cao D, et al. Microvesicles (MIVs) secreted from adipose-derived stem cells (ADSCs) contain multiple microRNAs and promote the migration and invasion of endothelial cells. *Genes Dis*. 2019;7(2):225-34. doi: 10.1016/j.gendis.2019.04.005
27. Ren S, Chen J, Duscher D, Liu Y, Guo G, Kang Y, et al. Microvesicles from human adipose stem cells promote wound healing by optimizing cellular functions via AKT and ERK signaling pathways. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):47. doi: 10.1186/s13287-019-1152-x
28. Tran TH, Mattheolabakis G, Aldawsari H, Amiji M. Exosomes as nanocarriers for immunotherapy of cancer and Inflammatory diseases. *Clin Immunol*. 2015;160(1):46-58. doi: 10.1016/j.clim.2015.03.021

29. Bobrie A, Colombo M, Raposo G, Théry C. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic*. 2011;12(12):1659-68. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01225.x
30. Ludwig AK, Giebel B. Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(1):11-5. doi: 10.1016/j.biocel.2011.10.005
31. Zhu W, Huang L, Li Y, Zhang X, Gu J, Yan Y, et al. Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth in vivo. *Cancer Lett*. 2011;315(1):28-37. doi: 10.1016/j.canlet.2011.10.002
32. Kowal J, Mercedes T, Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol*. 2014;29:116-25. doi: 10.1016/j.ceb.2014.05.004
33. Sehrawat TS, Arab JP, Liu M, Amrollahi P, Wan M, Fan J et al. Circulating extracellular vesicles carrying sphingolipid cargo for the diagnosis and dynamic risk profiling of alcoholic hepatitis. *Hepatology*. 2021;73(2):571-85. doi: 10.1002/HEP.31256