

Márcio Alexandre da Costa e Silva

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Exossomas e outras vesículas extracelulares como biomarcadores” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, respetivamente, do Dr. Paulo Monteiro, da Doutora Cláudia Furtado e do Professor Doutor Luís Almeida e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Márcio Alexandre da Costa e Silva

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Exossomas e outras vesículas extracelulares como biomarcadores” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, respetivamente, do Dr. Paulo Monteiro, da Doutora Cláudia Furtado e do Professor Doutor Luís Almeida e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Márcio Alexandre da Costa e Silva, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2012150290, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Exossomas e outras vesículas extracelulares como biomarcadores” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 15 de setembro de 2017.

Márcio Alexandre da Costa e Silva

(Márcio Alexandre da Costa e Silva)

Agradecimentos

É com a maior alegria que expresso os meus sinceros agradecimentos:

Ao Dr. Paulo Monteiro e a toda a equipa da Farmácia São José, que pela hospitalidade, dedicação, amizade e confiança em mim depositada, me proporcionaram uma experiência de estágio extremamente enriquecedora.

À Doutora Cláudia Furtado e a toda a equipa da Direção de Avaliação de Tecnologias de Saúde do INFARMED, I. P, que pela sabedoria, partilha de conhecimentos e apoio incondicional, me concederam uma oportunidade única de aprendizagem.

Ao Professor Doutor Luís Almeida, pela simpatia, disponibilidade e orientação concedida na realização da minha monografia.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pela dedicação aos estudantes, pela exímia formação académica proporcionada e pelos notáveis valores transmitidos.

Aos colegas de estágio, pela boa disposição, companheirismo e experiências partilhadas.

Aos meus amigos, pela força e motivação transmitida e pelos momentos júbilos.

À minha mãe, ao meu pai, à minha irmã e a toda a restante família, que pelo carinho e presença incondicional, constituíram um pilar fundamental ao longo de todo o meu percurso académico.

Índice

Resumo	7
Abstract	8
Parte I - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária	9
Lista de Abreviaturas	10
1. Introdução	11
2. Análise SWOT	12
2.1. Pontos Fortes	12
2.1.1. Localização da Farmácia	12
2.1.2. Equipa técnica	12
2.1.3. Diversidade de tarefas	13
2.1.3.1. Atendimento ao público	13
2.1.3.2. Gestão de stocks	14
2.1.3.3. Conferência de receituário	15
2.1.3.4. Preparação de medicamentos manipulados	15
2.1.3.5. Gestão de encomendas	16
2.1.4. Robot e CashGuard	16
2.1.5. Dinamização ativa	17
2.1.6. Serviços diferenciados	17
2.2. Pontos Fracos	18
2.2.1. Vasta variedade de produtos no Mercado	18
2.2.2. Número elevado de estagiários	18
2.3. Oportunidades	19
2.3.1. Formação Contínua	19
2.3.2. Novo sistema de Receita Eletrónica	20
2.3.3. Adoção da Filosofia Kaizen	20
2.4. Ameaças	21
2.4.1. Constante alteração e atualização de preços	21
2.4.2. Conceito de Medicamentos Genéricos na sociedade	21
3. Caso Clínico	22
4. Conclusão	23
5. Bibliografia	24
6. Anexo - Ficha de Preparação de Manipulado	25

Parte II - Relatório de Estágio no INFARMED, I.P.	26
Lista de Abreviaturas	27
1. Introdução	28
2. INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P.....	29
3. Análise SWOT	30
3.1. Pontos Fortes	30
3.1.1. Acolhimento no Infarmed.....	30
3.1.2. Equipa da DATS	30
3.1.3. Plano de Integração	31
3.1.4. Atividades Desenvolvidas	31
3.1.5. Reuniões Farmacêuticas.....	32
3.2. Pontos Fracos	32
3.2.1. Conteúdos não previstos no MICF	32
3.2.2. Duração do Estágio.....	33
3.3. Oportunidades.....	33
3.3.1. Formação Contínua	33
3.3.2. Portal SIATS.....	34
3.4. Ameaças	34
3.4.1. Pressão e influência externa	34
4. Conclusão	35
5. Bibliografia	36
6. Anexo - Plano de Integração	37
Parte III - Monografia	40
Lista de Abreviaturas	41
1. Introdução	42
2. Classificação das Vesículas Extracelulares	43
3. Composição das Vesículas Extracelulares	44
4. Métodos de Isolamento de Vesículas Extracelulares	45
5. Métodos de Análise do conteúdo de Vesículas Extracelulares	46
6. Papel das Vesículas Extracelulares no Sistema Nervoso Central	47
7. Vesículas Extracelulares como Biomarcadores	48
7.1. Doenças do Prião	49
7.2. Doença de Alzheimer	50
7.3. Doença de Parkinson.....	51
7.4. Glioblastoma Multiforme	52
8. Conclusão	55
9. Bibliografia	56

Resumo

No âmbito da unidade curricular de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, o presente documento apresenta, sob a forma de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*), o relatório de estágio em Farmácia Comunitária, relativo ao estágio realizado na Farmácia São José, em Coimbra, com início a 9 de janeiro e término a 28 de abril de 2017, e o relatório de estágio na Direção de Avaliação de Tecnologias de Saúde do INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P., relativo ao estágio realizado no Infarmed, em Lisboa, com início a 2 de maio e término a 28 de julho de 2017. Este documento inclui ainda a monografia intitulada “Exossomas e outras vesículas extracelulares como biomarcadores”.

Exossomas e outras vesículas extracelulares são pequenas vesículas que são libertadas de vários tipos de células para o meio extracelular. Estas vesículas transportam diversas moléculas, incluindo proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, e desempenham um papel fundamental enquanto mediadores da comunicação intercelular. No sistema nervoso central (SNC), as vesículas extracelulares são libertadas por neurónios, oligodendrócitos, astrócitos e microglia, e têm sido implicadas em diversos processos fisiológicos. Por outro lado, estas vesículas têm sido associadas à progressão de doenças neurodegenerativas e de tumores cerebrais como o glioblastoma. Uma vez que exossomas e outras vesículas extracelulares estão presentes em diversos fluidos corporais, estas vesículas representam uma fonte promissora de biomarcadores com relevância na monitorização de progressão de doenças e eficácia de terapias.

Palavras-chave: vesículas extracelulares, exossomas, biomarcadores, doenças neurodegenerativas, glioblastoma.

Abstract

Within the scope of the course unit of Curricular Internship of the Integrated Master's degree in Pharmaceutical Sciences of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra, this document presents, in the form of a SWOT analysis (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*), the report of the Community Pharmacy Internship, performed at Farmácia São José, in Coimbra, from 9th of January to 28th of April 2017, and the report of the internship at the Health Technology Assessment Directorate of INFARMED - National Authority of Medicines and Health Products, I.P, performed at Infarmed, in Lisbon, from 2nd of May to 28th of July 2017. This document also includes the monograph entitled "Exosomes and other extracellular vesicles as biomarkers".

Exosomes and other extracellular vesicles are small vesicles that are released from various cell types into the extracellular space. These vesicles carry diverse molecules, including proteins, lipids and nucleic acids and play a key role as mediators of intercellular communication. In the central nervous system (CNS), extracellular vesicles are released by neurons, oligodendrocytes, astrocytes and microglia, and have been implicated in several physiological processes. On the other hand, these vesicles have been associated with the progression of neurodegenerative diseases and brain tumours such glioblastoma. As exosomes and other extracellular vesicles are present in several body fluids, these vesicles represent a promising source of biomarkers for monitoring disease progression and efficacy of therapies.

Keywords: extracellular vesicles, exosomes, biomarkers, neurodegenerative diseases, glioblastoma.

Parte I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas

CHUC - Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

DCI - Denominação Comum Internacional

FFUC - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

PNV - Programa Nacional de Vacinação

SNS - Serviço Nacional de Saúde

SPR - Sistema de Preços de Referência

SWOT - *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

I. Introdução

O Farmacêutico, enquanto agente de saúde pública e especialista do medicamento, desempenha um papel preponderante na promoção da saúde e bem-estar da população¹. Muitas das vezes, pela proximidade e facilidade de acesso às farmácias, o farmacêutico é o profissional de saúde a quem os cidadãos recorrem, numa primeira instância, com vista à resolução de questões de saúde.

O exercício da profissão farmacêutica em Farmácia Comunitária tem vindo a exigir do farmacêutico uma constante atualização dos seus conhecimentos e uma atitude pró-ativa no desenvolvimento de competências diferenciadoras, fundamentais para enfrentar os desafios emergentes da sociedade e para que seja continuamente prestado um serviço de qualidade aos utentes.

O Estágio Curricular em Farmácia Comunitária, inserido no plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), concede aos estudantes a oportunidade de consolidar e aprofundar os conhecimentos adquiridos ao longo da formação académica em contexto de prática profissional e contribui para a aquisição de novas competências, essenciais para o exercício da atividade farmacêutica.

O presente estágio decorreu na Farmácia São José, em Coimbra, com início a 9 de janeiro e término a 28 de abril de 2017, sob orientação do Dr. Paulo Monteiro, diretor técnico e proprietário da farmácia, e colaboração de toda a sua equipa técnica.

Elaborado sob a forma de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*), este relatório contempla uma abordagem aos pontos fortes e fracos do meu estágio, e às oportunidades e ameaças observadas no decorrer desta etapa.

2. Análise SWOT

2.1. Pontos Fortes

2.1.1. Localização da Farmácia

A Farmácia São José encontra-se situada na Avenida Calouste Gulbenkian, no centro comercial Mayflower, em Coimbra. Está, por isso, localizada numa zona privilegiada da cidade, nomeadamente pela proximidade ao Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), às inúmeras unidades de saúde sediadas na área envolvente e ao Pólo Universitário das Ciências da Saúde.

Para além de beneficiar de uma forte afluência de utentes ocasionais, a Farmácia São José, pela sua história e excelência do serviço prestado à comunidade, conta ainda com muitos utentes fidelizados. Para a farmácia, esta fidelização constitui uma notória mais-valia no que respeita à sua sustentabilidade e permite, ao mesmo tempo, um melhor e personalizado acompanhamento farmacoterapêutico dos seus utentes, algo que tive o prazer de experienciar ao longo desta etapa.

A heterogeneidade de utentes que visitam a farmácia, pelas diferentes faixas etárias e estratos socioeconómicos, assumiu-se como um dos pontos fortes deste estágio uma vez que me possibilitou o contacto com uma grande variedade de situações, que pela exigência de uma constante adaptação às distintas realidades, me facultaram valorosas competências enquanto pessoa e futuro profissional de saúde.

2.1.2. Equipa técnica

A equipa da Farmácia São José é constituída por oito farmacêuticos e seis técnicos auxiliares de farmácia, dotados de uma vasta experiência, que deles faz profissionais de saúde capazes de proporcionar um serviço de excelência à sociedade.

A direção técnica é assumida pelo Dr. Paulo Monteiro, a quem reconheço uma paixão inata pela profissão, que pela sua forma de ser e estar, consegue liderar esta equipa de uma forma exímia, garantindo um ambiente de trabalho único e propício para satisfazer, com prazer e sabedoria, as necessidades dos utentes.

Numa equipa com esta dimensão, a organização e cooperação entre todos é fundamental, e neste sentido, a Farmácia São José aposta numa distribuição de tarefas por todos os membros da equipa técnica.

A oportunidade que tive em acompanhar o trabalho de cada um dos colaboradores, destes me terem transmitido confiança e se mostrarem constantemente disponíveis para me ajudar, conferiu-me o à vontade que necessitava para tirar o melhor proveito deste estágio.

A hospitalidade e a boa disposição dos colaboradores da Farmácia São José foram determinantes para a minha adaptação e para o sucesso desta etapa. Desde o início, senti que era parte integrante da equipa, tendo sido, em todos os momentos, apoiado e esclarecido com uma notável amabilidade.

Face ao exposto, a envolvimento de toda a equipa técnica no processo de aprendizagem e integração dos estagiários é, sem dúvida, um dos pontos mais fortes desta farmácia, já acostumada a acolher e bem formar muitos estudantes da FFUC.

2.1.3. Diversidade de tarefas

As diversas tarefas de *backoffice* levadas a cabo na farmácia são essenciais para a sua sustentabilidade e possibilitam que o ato da dispensa de medicamentos e outros produtos de saúde seja concebido nas condições desejadas.

Na Farmácia São José tive a oportunidade de realizar distintas funções de *backoffice*, a par do atendimento ao público, que me permitiram adquirir uma perceção global do modo de funcionamento de uma farmácia comunitária.

Pela confiança em mim depositada, e pela responsabilidade incutida na execução de cada uma destas funções, destaco este como mais um dos pontos fortes do estágio.

2.1.3.1. Atendimento ao público

O atendimento ao público assume-se como uma atividade de extrema responsabilidade pela importância que representa na saúde e bem-estar da população. Muitas das vezes, o farmacêutico é o profissional de saúde a quem os utentes recorrem numa primeira instância, pela proximidade e facilidade de acesso às farmácias e ao respetivo aconselhamento farmacêutico.

Na Farmácia São José, os estagiários são desde cedo incentivados a iniciarem a sua atividade no atendimento ao público. Numa primeira fase de adaptação, o acompanhamento permanente por parte dos colaboradores da farmácia revelou-se fundamental para a aquisição de uma maior destreza com o programa Sifarma2000®, para o aperfeiçoamento da interação com os utentes e para a consolidação de inúmeros conhecimentos.

O apoio incondicional da equipa técnica da Farmácia São José foi essencial pela confiança e segurança transmitidas, fulcrais para que o exercício da minha atividade decorresse nas melhores condições e para que os atendimentos fossem progressivamente desenvolvidos de uma forma mais autónoma.

O atendimento ao público constituiu uma das fontes mais ricas de aprendizagem pela oportunidade de interligação e aplicação dos conhecimentos adquiridos na formação académica. Ao longo deste percurso, foi notória a evolução sentida a nível do aconselhamento farmacêutico, pela constante interação com os utentes, pelas distintas realidades e casos experienciados, e pelos contínuos e valorosos ensinamentos transmitidos pelos colaboradores da Farmácia São José. A capacidade de comunicação consumou-se também como uma das principais competências desenvolvidas, pela constante necessidade de adaptação da linguagem aos utentes, essencial para assegurar que o aconselhamento prestado é compreendido corretamente e que é promovida a adesão à terapêutica e o uso responsável do medicamento.

De todas as atividades desenvolvidas na farmácia durante esta etapa, o atendimento ao público foi indubitavelmente a mais desafiante e, ao mesmo tempo, a mais gratificante pela satisfação dos utentes, que pelo reconhecimento do serviço prestado, me fizeram crescer a nível pessoal e enquanto futuro profissional de saúde.

2.1.3.2. Gestão de stocks

Pelo impacto que esta atividade tem no orçamento de uma farmácia, uma cuidada gestão de *stocks* é essencial para a sua sustentabilidade financeira. A este nível, uma boa gestão deve garantir que a farmácia disponha da quantidade adequada de produtos de forma a satisfazer a procura dos utentes.

Ao longo desta etapa na Farmácia São José, tive a oportunidade de participar em controlos periódicos de *stocks*, através da contagem física de produtos, com vista à deteção de possíveis *stocks* errados e à verificação de prazos de validade. Esta tarefa permitiu-me conhecer uma vasta variedade de produtos, que se veio a revelar de enorme utilidade no ato de atendimento ao público.

A oportunidade de acompanhar, de perto, o trabalho dos farmacêuticos, proporcionou-me um importante contacto com a vertente comercial e de gestão da farmácia, que me conferiu valorosos conhecimentos nesta área.

2.1.3.3. Conferência de receituário

A organização e a conferência de receituário assumem-se como tarefas de elevada responsabilidade pela importância que a receita médica representa.

Na Farmácia São José, as receitas são organizadas e conferidas diariamente pelos estagiários e, posteriormente, revistas por parte das farmacêuticas responsáveis, antes de serem enviadas para o Centro de Conferência de Faturas.

Esta atividade revelou-se fundamental na minha aprendizagem, não só pela familiarização com os diversos regimes de comparticipação, mas também pelas bases que me conferiu para que estivesse mais consciente e atento no momento da validação das receitas médicas no ato de atendimento ao público.

2.1.3.4. Preparação de medicamentos manipulados

Em Portugal, face aos avanços tecnológicos na área farmacêutica, a preparação de medicamentos manipulados nas farmácias tem vindo a decrescer significativamente. Apesar desta realidade, a Farmácia São José preza por manter a produção regular de manipulados de forma a corresponder às necessidades ainda existentes da população. Assim, o farmacêutico continua a assumir o seu papel preponderante na preparação de medicamentos manipulados em casos de ajuste de dose, de preparações ainda não disponíveis no mercado e em situações de patologias específicas.

No decorrer do estágio tive, por várias vezes, a oportunidade de acompanhar e participar na preparação de manipulados, sob a supervisão da farmacêutica responsável, onde me foi possível aplicar e consolidar conhecimentos adquiridos durante o percurso académico, nomeadamente das unidades curriculares de Farmácia Galénica e Tecnologia Farmacêutica. De entre os vários medicamentos manipulados preparados, destaco, a título de exemplo, a oportunidade de ter colaborado na preparação de uma pomada de enxofre precipitado, indicada para o tratamento da sarna (Anexo I - Ficha de Preparação de Manipulado).

A Farmácia São José possui também um *software*, designado por SoftGaleno[®], que promove uma gestão mais eficiente a nível dos medicamentos manipulados.

2.1.3.5. Gestão de encomendas

Na Farmácia São José, pelo avultado fluxo diário de encomendas, a sua gestão requer uma atenção permanente por parte dos seus colaboradores.

As encomendas diárias são realizadas com base na definição de *stocks* mínimos e máximos para determinados medicamentos e produtos de saúde, consoante o respetivo histórico de vendas. As encomendas instantâneas, para as quais os estagiários disponham de autonomia, asseguram que a farmácia consegue adquirir, junto dos armazenistas, produtos que não possui em *stock*, num dado momento, e assim atender às necessidades dos utentes no mais curto espaço de tempo. De referir ainda as encomendas de grande volume, negociadas diretamente com os laboratórios, e que facilitam, geralmente, o acesso a melhores condições de compra.

A participação na conferência de encomendas permitiu-me obter uma visão integrada das empresas de distribuição farmacêutica a atuar em território nacional e explorar as margens de lucro praticadas para os distintos produtos de saúde. Para além disso, munuiu-me de uma maior destreza na utilização do programa Sifarma 2000[®], que contempla informação essencial para uma boa gestão das encomendas.

2.1.4. Robot e CashGuard

Dada a sua dimensão, e de forma a corresponder à grande afluência de utentes, a Farmácia São José está equipada com um robot Rowa e um sistema CashGuard.

O robot representa um papel fundamental na automação e logística da farmácia. Para além da capacidade de armazenar um grande volume de medicamentos e de contribuir para uma otimização do espaço, esta avançada tecnologia permite um rigoroso controlo dos prazos de validade e assegura uma correta dispensa da medicação, minimizando a ocorrência de possíveis trocas de medicamentos no ato da sua cedência.

Como ponto forte deste estágio, de realçar a enorme vantagem que o robot confere durante o atendimento ao público, pelo facto de não haver necessidade de abandonar o balcão para recolher a medicação, e assim permitir despender mais tempo no aconselhamento farmacêutico aos utentes.

O sistema CashGuard oferece uma gestão eficiente do dinheiro resultante das vendas da farmácia e reforça a segurança nas transações efetuadas. Pela diminuição dos erros inerentes à devolução de trocos e do tempo despendido nestas ações, o CashGuard evidenciou-se como uma tecnologia de extrema utilidade.

2.1.5. Dinamização ativa

A Farmácia São José, movida pela proatividade e espírito inovador dos seus colaboradores, apresenta-se como uma farmácia extremamente dinâmica.

Através da promoção de campanhas alusivas a datas comemorativas, da permanente renovação da disposição dos produtos nas gôndolas e lineares, e da publicidade de passatempos e promoções na sua rede social, a Farmácia São José procura ativamente satisfazer aquelas que são as necessidades sazonais dos utentes.

Pelas estratégias de marketing implícitas na organização destas atividades, a participação nas mesmas constituiu uma mais-valia para a minha experiência.

2.1.6. Serviços diferenciados

Enquanto espaço de saúde, a Farmácia São José oferece aos seus utentes um vasto leque de serviços farmacêuticos diferenciados.

A farmácia dispõe de um gabinete de atendimento onde realiza a determinação de parâmetros bioquímicos e fisiológicos, a administração de injetáveis e vacinas não incluídas no Programa Nacional de Vacinação (PNV), sessões de cessação tabágica e consultas de revisão da medicação. Nas diversas ocasiões em que colaborei na prestação de alguns destes serviços, nomeadamente na medição da pressão arterial, desenvolvi inúmeras competências, bem como pude colocar em prática muitos conhecimentos adquiridos e, com isso, sensibilizar os utentes para hábitos e estilos de vida saudáveis e reforçar as medidas não farmacológicas que estes poderiam adotar.

No decorrer do estágio, tive ainda o prazer de estar envolvido na organização de um rastreio comunitário, onde foram avaliados parâmetros como o colesterol total, a glicémia, a pressão arterial e o índice de massa corporal. Pela formação que me foi facultada no âmbito do funcionamento dos aparelhos de medição e da análise dos respetivos resultados, pela autonomia que a equipa técnica conferiu aos estagiários para a realização do rastreio, e pela importância que estas iniciativas têm na promoção da saúde da sociedade, este consumou-se como mais um dos pontos fortes deste estágio.

A par dos serviços farmacêuticos prestados, a Farmácia São José dispõe ainda de consultas semanais de nutrição e de consultas de podologia.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Vasta variedade de produtos no Mercado

Apesar das notáveis competências adquiridas ao longo da formação académica, quando confrontado com a realidade profissional, deparei-me com algumas dificuldades no que respeita ao aconselhamento de determinados produtos, nomeadamente nas áreas de dermofarmácia e cosmética, suplementação alimentar e dispositivos médicos.

A Farmácia São José dispõe de um vasto leque de marcas de dermocosmética, o que lhe confere uma enorme vantagem pela oferta diferenciada que proporciona aos seus utentes. A grande diversidade de linhas e gamas dos produtos dermocosméticos revelou-se como um dos principais desafios deste estágio. Numa fase inicial, dado o pouco domínio que possuía das distintas marcas, e pelo constante lançamento de novos produtos, senti que não tinha a autonomia suficiente para o aconselhamento nesta área.

A marcada expansão de suplementos alimentares no mercado tem exigido uma constante atualização de conhecimentos por parte dos profissionais de saúde. Ainda que a abordagem desta temática ao longo do curso me tenha conferido fortes bases para a prática profissional, a carência de informação acerca de muitos destes produtos levou a que não me sentisse totalmente confortável aquando a sua recomendação.

Os dispositivos médicos contemplam um vasto conjunto de produtos de saúde e constituem uma grande componente de vendas na farmácia comunitária. Dado o carácter opcional desta unidade curricular, e pelo facto de não ter tido oportunidade de a frequentar, defrontei-me com algumas dificuldades ao nível do modo de utilização de determinados dispositivos médicos. Pela abundância e rotatividade destes produtos, e pela extrema relevância que esta área apresenta na atividade farmacêutica, defendo que esta unidade curricular deveria passar a assumir carácter obrigatório.

A equipa da Farmácia São José teve um papel fundamental neste âmbito, pelo apoio incondicional concedido e pelos conhecimentos partilhados ao longo desta etapa.

2.2.2. Número elevado de estagiários

A qualidade da formação ministrada aos estagiários, aliada à excecional localização na cidade de Coimbra, faz da Farmácia São José uma das farmácias mais requisitadas pelos estudantes para a realização dos seus estágios curriculares.

Contudo, o grande número de estagiários que a Farmácia São José recebe anualmente requer um notável esforço a nível logístico, tanto por parte da equipa técnica como dos estagiários, particularmente nos momentos de cruzamento de períodos de estágio. Ainda que esta situação não tenha tido qualquer impacto no decorrer da maior parte do estágio, nos momentos de maior afluência de estagiários, e nomeadamente a nível do atendimento ao público, acabou por se verificar uma dificuldade acrescida na gestão da ocupação dos balcões entre os estagiários.

Ainda assim, apesar de destacar o elevado número de estagiários como ponto fraco desta etapa, o companheirismo e a partilha de experiências entre todos revelou-se como um dos principais fatores responsáveis pelo sucesso deste estágio.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Formação Contínua

Os sucessivos avanços científicos e tecnológicos na área da saúde têm exigido dos profissionais de farmácia uma constante atualização dos seus conhecimentos.

Ao longo do estágio na Farmácia São José tive a oportunidade de assistir a inúmeras formações ministradas por delegados de informação médica, enquadradas nas áreas de dermocosmética, suplementação alimentar, higiene oral, puericultura e contraceção de emergência. Nestas ações de formação, a apresentação de uma vasta variedade de produtos, bem como a abordagem das suas principais características e vantagens, contribuiu para a aquisição de um conhecimento mais amplo do mercado e, assim, para um melhor aconselhamento destes produtos aos utentes.

Para além das formações realizadas na farmácia, participei ainda em outras iniciativas promovidas pela indústria farmacêutica, onde foram abordadas temáticas como o aconselhamento farmacêutico na gravidez e amamentação, a rinite alérgica, as infeções vaginais e a fisiopatologia do retorno venoso.

Esta valiosa oportunidade de formação contínua de que beneficiam os estagiários e os colaboradores da Farmácia São José torna-se essencial para que seja proporcionado, de forma permanente, um serviço de qualidade à população.

2.3.2. Novo sistema de Receita Eletrónica

A Nova Receita Eletrónica veio revolucionar a área da saúde em Portugal, com diversos benefícios para os médicos, farmacêuticos e sobretudo para os utentes².

O novo sistema de Receita Eletrónica vem simplificar a dispensa de medicação nas farmácias pela maior rapidez, eficácia e segurança do processo, e promove uma menor ocorrência de troca de medicamentos no ato da sua dispensa ao utente e um rigoroso controlo no que respeita à validade das receitas. Para os cidadãos, esta implementação traz também inúmeras vantagens, nomeadamente a possibilidade de poderem optar por aviar apenas parte dos produtos prescritos e aceder aos restantes em farmácias distintas².

A desmaterialização das receitas, para além de presumir um futuro mais sustentável para o ambiente², vem ainda diminuir significativamente o tempo dedicado pelos colaboradores da farmácia à conferência e validação do receituário.

Face a esta realidade, o contacto com a Nova Receita Eletrónica destacou-se como uma grande oportunidade do meu estágio na Farmácia São José uma vez que em breve as receitas em papel farão parte do passado e a política nacional aponta no sentido de privilegiar a utilização de meios eletrónicos em todos os serviços do Serviço Nacional de Saúde (SNS)³.

2.3.3. Adoção da Filosofia Kaizen

O Kaizen, com origem no Japão, visa a melhoria contínua de uma organização⁴.

No âmbito desta filosofia, recentemente adotada pela Farmácia São José, foram implementadas diversas medidas na farmácia, tais como a realização de reuniões de curta duração que pressupunham o envolvimento de todos os colaboradores, a identificação de gavetas e armários, e a afixação de um quadro no *backoffice* onde eram registadas as tarefas a realizar por cada elemento da equipa, os problemas a solucionar e os objetivos a alcançar. Nestas breves reuniões, essenciais para motivar a equipa e fomentar o espírito de grupo, eram definidos objetivos de trabalho, discutidas ideias para uma contínua melhoria do funcionamento da farmácia e explicadas as campanhas promocionais vigentes.

A experiência de estagiar numa farmácia com a filosofia Kaizen evidenciou-se como uma excelente oportunidade pela integração dos ideais que sustentam este modelo de gestão, pelo contacto com as medidas de melhoria implementadas e pelo impacto positivo que teve na dinâmica de trabalho da equipa da Farmácia São José.

2.4. Ameaças

2.4.1. Constante alteração e atualização de preços

Em Portugal, os preços dos medicamentos são regulados pelo INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.⁵

Em determinadas situações, as sucessivas alterações de preços dos medicamentos e as atualizações trimestrais do Sistema de Preços de Referência (SPR) podem constituir uma ameaça para a relação entre os profissionais de farmácia e os utentes. As constantes alterações de preços podem ser interpretadas como decorrentes da política de uma farmácia, o que pode gerar uma certa desconfiança por parte dos utentes que desconhecem o processo de regulação de preços dos medicamentos.

Para além disso, a introdução da Nova Receita Eletrónica veio disponibilizar uma informação adicional ao utente relativa ao custo máximo da medicação prescrita, se este não optar por um medicamento mais caro. Uma vez que este valor é atualizado trimestralmente no âmbito do SPR, na eventualidade do utente apresentar uma receita médica com uma validade que compreenda os meses destas atualizações, dá-se a possibilidade de que o valor máximo descrito na receita esteja desatualizado. Perante esta situação, no decorrer do estágio, tive a necessidade de esclarecer alguns utentes sobre esta questão.

Por tudo isto, destaco esta como uma ameaça externa à farmácia que considero poder ser facilmente ultrapassada através da educação do utente sobre esta temática.

2.4.2. Conceito de Medicamentos Genéricos na sociedade

Segundo o Decreto-Lei n.º 176/2006, de 30 de agosto, um medicamento genérico é definido como “medicamento com a mesma composição qualitativa e quantitativa em substâncias ativas, a mesma forma farmacêutica e cuja bioequivalência com o medicamento de referência haja sido demonstrada por estudos de biodisponibilidade apropriados”⁶.

A Lei n.º 11/2012, de 8 de março, instituiu a obrigatoriedade da prescrição de medicamentos por denominação comum internacional (DCI) da substância ativa. Esta medida veio conferir aos utentes o direito de optar entre os medicamentos de marca e os respetivos genéricos⁷. Neste sentido, no ato de dispensa da medicação, é dever dos profissionais de farmácia questionar os utentes sobre a sua preferência.

Contudo, no decorrer do estágio na Farmácia São José, foi possível constatar que ainda existe um certo desconhecimento do conceito de medicamento genérico por parte de

alguns utentes, que leva a que estes apresentem ainda alguma desconfiança em relação à segurança e eficácia deste tipo de medicamentos e continuem a optar pelos medicamentos de marca.

Perante esta ameaça, e de forma a colmatar este desconhecimento, é fundamental uma maior dedicação dos profissionais de saúde à educação do utente no que respeita aos medicamentos genéricos.

3. Caso Clínico

Um jovem com cerca de 20 anos dirigiu-se à Farmácia São José afirmando estar com congestão nasal e com dor de garganta há dois dias. Com o intuito de obter mais informação sobre o estado clínico do jovem, questionei-o se tinha sintomas de febre, se possuía alguma doença associada e se estava a fazer algum tipo de medicação. O jovem respondeu negativamente a todas as questões dirigidas, pelo que, perante os sintomas apresentados, aconselhei a toma de pastilhas Strepfen® Mel e Limão (flurbiprofeno) para o alívio da dor de garganta, respeitando a posologia de uma pastilha a cada 3 a 6 horas, conforme necessário, num máximo de 5 pastilhas por dia e durante um máximo de três dias⁸, e Lyomer®C Plus (solução hipertónica de água do mar) para lavar e descongestionar as fossas nasais, através da pulverização desta solução em cada narina, 2 a 3 vezes ao dia⁹. Para além disso, reforcei que o jovem deveria estar atento à evolução da sintomatologia e que se não melhorasse nos dias seguintes, se deveria dirigir ao médico a fim de averiguar a causa do seu estado.

4. Conclusão

O Estágio Curricular em Farmácia Comunitária consumou-se como uma das etapas mais enriquecedoras do meu percurso acadêmico pela oportunidade de aplicação e consolidação de conhecimentos em contexto real de prática profissional e pela aquisição de notáveis competências essenciais ao desempenho da atividade farmacêutica.

O estágio na Farmácia São José constituiu uma experiência única de desenvolvimento profissional. O atendimento ao público, aliado às diversas tarefas realizadas em *backoffice*, proporcionou-me uma visão global da dinâmica de funcionamento de uma farmácia comunitária, para além de uma excelente perspectiva do papel preponderante que o farmacêutico assume na promoção da saúde e bem-estar da sociedade. Pelos desafios emergentes da profissão, o farmacêutico deve continuar a privilegiar a atualização das suas capacidades técnicas e científicas com vista à prestação de um serviço de qualidade à população e à sua valorização enquanto profissional de saúde.

O sucesso desta etapa teve como pilar fundamental toda a equipa da Farmácia São José, que pela confiança e valores transmitidos, pela constante partilha de conhecimentos e pelo apoio incondicional prestado ao longo desta experiência, me fizeram crescer enquanto pessoa e futuro profissional de saúde.

5. Bibliografia

1. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS – **Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos**. [Acedido a 3 de junho de 2017]. Disponível na Internet: <http://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/a-ordem-dos-farmaceuticos/regulamentos/>
2. **Nova Receita Eletrónica**. [Acedido a 10 de junho de 2017]. Disponível na Internet: <http://www.receitaeletronica.pt/#/>
3. SNS – SERVIÇOS PARTILHADOS DO MINISTÉRIO DA SAÚDE – **Receita sem Papel**. [Acedido a 10 de junho de 2017]. Disponível na Internet: <http://spms.min-saude.pt/product/receita-sem-papel/>
4. KAIZEN INSTITUTE – **O que é Kaizen?** [Acedido a 17 de junho de 2017]. Disponível na Internet: <https://pt.kaizen.com/quem-somos/significado-de-kaizen.html>
5. INFARMED, I.P. – **Regulamentação de preços**. [Acedido a 17 de junho de 2017] Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/avaliacao-de-tecnologias-de-saude/regulamentacao-preco>
6. MINISTÉRIO DA SAÚDE – **Decreto-Lei n.º 176/2006**. Diário da República, I.ª série - N.º 167 (30/08/2006) 6297-6383. [Acedido a 24 de junho de 2017]. Disponível na Internet: <https://www.sns.gov.pt/wp-content/uploads/2016/10/Decreto-Lei-n.%C2%BA-176-2006..pdf>
7. ASSEMBLEIA DA REPÚBLICA – **Lei n.º 11/2012**. Diário da República, I.ª série - N.º 49 (08/03/2012) 978-979. [Acedido a 24 de junho de 2017]. Disponível na Internet: www.portugal.gov.pt/media/612919/20120531_lei_farmacos.pdf
8. INFARMED, I.P. – **Resumo das Características do Medicamento STREPFEN 8,75 mg pastilhas**. [Acedido a 2 de setembro de 2017] Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=31887&tipo_doc=rcm
9. JABA RECORDATI – **Folheto Informativo - Lyomer® C Plus**. [Acedido a 2 de setembro de 2017] Disponível na Internet: www.jaba-recordati.pt/uploads/ficheiros_produtos/Lyomer_C_Plus_Spray_descongestao_nasal_FI.pdf

6. Anexo - Ficha de Preparação de Manipulado

Farmácia
São José

Pomada de Enxofre Precipitado (VASELINA SÓLIDA)

Ciente:

Forma Farmacêutica: POMADA

Data de Preparação: 20/03/2017

Prazo Validade : 16/09/2017

Nº Lote : 19.III.17

Registo Copiador : 1.273

Condições de Conservação : Em recipiente bem fechado e à temperatura ambiente.

Posologia:

Qtd. Total Medicamento : 1 X 50,00 g

Director Técnico : Dr. Paulo Monteiro

Operador : Dra. Marta Abreu

Médico:

Honorários:	4,89 €
Factor Multiplicativo:	3,00

Valor Net :	22,97 €
Valor IVA :	1,38 €
Valor Total:	24,35 €

Valor PVP
24,35 €

Matérias Primas	Usar	Nº Lote	Origem	Qtd. Usada	Unid	Preço Aq. s/ IVA	Factor Multiplic.	Preço Mat.prima
Vaselina Branca		160913-P-	Acofarma	47,00	g	0,01 €	1,90	0,80 €
Enxofre Precipitado		160983-N-	Acofarma	3,00	g	0,03 €	2,20	0,20 €
Subtotal								1,00 €

Preparação	
Verificar estado de limpeza e conservação do material e laboratório.	
Pesar e pulverizar o enxofre precipitado.	
Transferir para o recipiente unguator e adicionar a vaselina até perfazer a quantidade necessária.	
Misturar no unguator até obter uma mistura homogénea.	
Fechar e rotular a embalagem.	
Limpar e arrumar o material e laboratório.	
Aparelhagem	
Balança electrónica	
Unguator B	

Embalagem	Tipo	Nº Lote	Fornecedor	Capac	Qtd	Preço	Fact. Mult.	Valor Net
Unguator 50/70	EMBAL		Plural	50/70 m	1,00	1,67 €	1,20	2,00 €
Subtot								2,00 €

Ensaio	Especificação	Conforme	Utilizador	Assinatura
Cor	Amarelo	<input checked="" type="checkbox"/>	05	
Odor	Característico do Enxofre	<input checked="" type="checkbox"/>	05	
Aspecto	Homogéneo	<input checked="" type="checkbox"/>	05	
Quantidade	50 g +- 5%	<input checked="" type="checkbox"/>	05	

20/3/2017

(Data)

(Assinatura)

Parte II

Relatório de Estágio na Direção de Avaliação de Tecnologias de Saúde do Infarmed

Lista de Abreviaturas

AUE - Autorização de Utilização Excepcional

CATS - Comissão de Avaliação de Tecnologias de Saúde

CEE - Comunidade Económica Europeia

DATS - Direção de Avaliação de Tecnologias de Saúde

DRHFP - Direção de Recursos Humanos, Financeiros e Patrimoniais

FFUC - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

GAM - Gestão de Acessibilidade ao Medicamento

GiMED - Gestão de Informação de Medicamentos

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

SIATS - Sistema de Informação para a Avaliação das Tecnologias de Saúde

SiNATS - Sistema Nacional de Avaliação de Tecnologias de Saúde

SIGQ - Sistema Integrado de Gestão da Qualidade

SNS - Serviço Nacional de Saúde

SWOT - *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

I. Introdução

O Sistema Nacional de Avaliação de Tecnologias de Saúde (SiNATS), criado pelo Decreto-Lei n.º 97/2015, surge com o objetivo de maximizar os ganhos em saúde e a qualidade de vida dos cidadãos e de melhorar o desempenho do Serviço Nacional de Saúde (SNS) no que concerne à utilização das tecnologias de saúde¹.

A avaliação de tecnologias de saúde tem como principal objetivo o suporte das decisões de utilização e financiamento de medicamentos e dispositivos médicos no SNS. Em Portugal, esta avaliação é efetuada por peritos farmacêuticos, clínicos e económicos da Direção de Avaliação de Tecnologias de Saúde (DATS) e da Comissão de Avaliação de Tecnologias de Saúde (CATS) do INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P.¹ A avaliação do valor terapêutico acrescentado e da relação custo-efetividade destas tecnologias para efeitos de financiamento representa uma das principais missões da DATS² e assume-se de grande importância para a sustentabilidade do SNS.

O Estágio Curricular na DATS concede aos estudantes da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) a oportunidade de contactar com uma nova área de atuação farmacêutica e de adquirir distintas competências em contexto de prática profissional, essenciais para o exercício da atividade farmacêutica.

O presente estágio decorreu no Infarmed, em Lisboa, com início a 2 de maio e término a 28 de julho de 2017, sob orientação da Doutora Cláudia Furtado e colaboração de toda a equipa da DATS.

Elaborado sob a forma de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*), este relatório contempla uma abordagem aos pontos fortes e fracos do meu estágio na DATS, e às oportunidades e ameaças observadas no decorrer desta etapa.

2. INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P.

O Infarmed, criado em 1993 na sequência do processo de adesão à Comunidade Económica Europeia (CEE)³, é um instituto público integrado na administração indireta do Estado Português, com autonomia administrativa, financeira e património próprio, que exerce a sua atividade sob tutela do Ministro da Saúde⁴. Este instituto, com sede no Parque de Saúde de Lisboa, tem por missão “regular e supervisionar os sectores dos medicamentos de uso humano e dos produtos de saúde, segundo os mais elevados padrões de protecção da saúde pública, e garantir o acesso dos profissionais da saúde e dos cidadãos a medicamentos e produtos de saúde de qualidade, eficazes e seguros”⁴. O Infarmed é constituído por cinco órgãos e doze unidades orgânicas com funções de negócio e de suporte, conforme apresenta o organograma da instituição (Figura I).

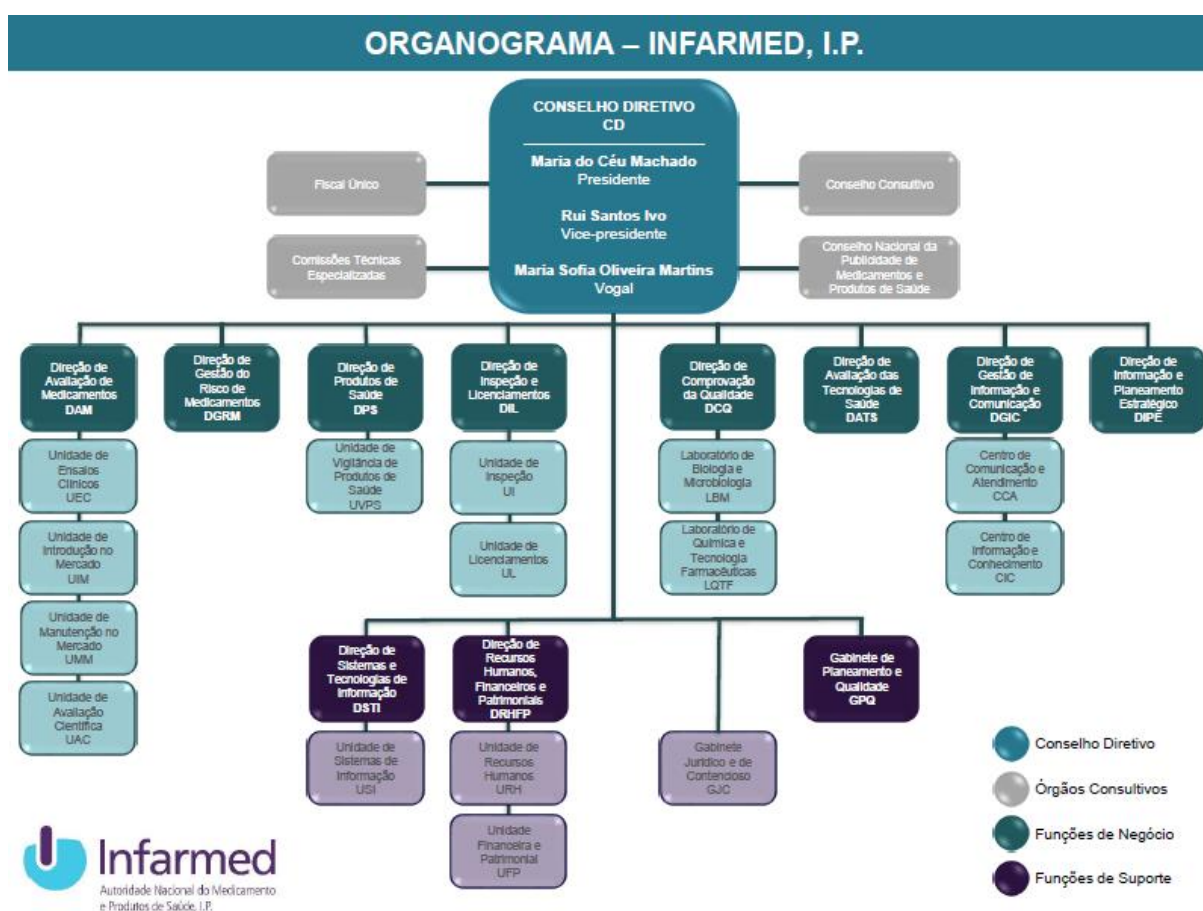


Figura I - Organograma do INFARMED, I.P.

Disponível em <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/estrutura-e-organizacao> [Acedido a 1 de julho de 2017]

3. Análise SWOT

3.1. Pontos Fortes

3.1.1. Acolhimento no Infarmed

O acolhimento dos estagiários no Infarmed revelou-se como um dos pontos fortes deste estágio. Aquando a chegada às instalações do Infarmed, os estagiários tiveram o prazer de serem recebidos pelo Dr. José Viana, em representação da Direção de Recursos Humanos, Financeiros e Patrimoniais (DRHFP), que nos proporcionou uma formação inicial de grande relevância, em que nos transmitiu informações pertinentes sobre o estágio e nos facultou uma apresentação geral sobre o Infarmed. Para além disso, foi ainda atribuído a cada estagiário um *e-mail* institucional, um número mecanográfico e um Manual de Acolhimento. Terminada a formação de acolhimento, o Dr. José Viana encarregou-se de encaminhar cada um dos estagiários até ao seu orientador de estágio.

Na DATS, fomos recebidos pela Doutora Cláudia Furtado, diretora desta direção, que nos proporcionou uma breve introdução ao estágio e nos apresentou à equipa da DATS.

Neste departamento foi atribuído um computador de trabalho a cada estagiário, assim como foi facultado o acesso à rede informática do Infarmed, à plataforma do Sistema Integrado de Gestão da Qualidade (SIGQ), à plataforma de Gestão de Informação de Medicamentos (GiMED) e ao portal do Sistema de Informação para a Avaliação das Tecnologias de Saúde (SIATS).

3.1.2. Equipa da DATS

O sucesso da minha integração no Infarmed teve como pilar fundamental o bom ambiente de trabalho vivido na DATS. Esta equipa apresenta-se, na sua essência, como uma equipa jovem, dinâmica e multidisciplinar, de um profissionalismo exemplar e com notáveis competências a nível da avaliação das tecnologias de saúde.

A equipa da DATS foi responsável pela supervisão do meu estágio e proporcionou um acompanhamento contínuo ao longo de todo o meu percurso no Infarmed. Foi notória a disponibilidade demonstrada pelos colaboradores no esclarecimento de dúvidas que foram surgindo no decorrer das distintas atividades desenvolvidas, assim como a constante partilha de conhecimentos, que contribuiu, de forma preponderante, para a minha aprendizagem.

3.1.3. Plano de Integração

A oportunidade de usufruir de um plano de integração na DATS revelou-se como um dos pontos fortes desta experiência de estágio.

Este plano contemplou um vasto leque de sessões de formação, lecionadas por vários profissionais deste departamento, que visaram promover um enquadramento base sobre as diversas atividades desenvolvidas na DATS. Estas formações decorreram durante todo o período de estágio e abordaram temas como o sistema de avaliação de tecnologias de saúde, a avaliação farmacoterapêutica, a formação de preço de medicamentos, a revisão anual de preços, a revisão excecional de preços, a avaliação económica de medicamentos, a elaboração e monitorização de contratos, a avaliação de dispositivos médicos, a plataforma do SIATS e o portal da Hepatite C (Anexo I - Plano de Integração).

Neste contexto, a participação e dedicação dos colaboradores da DATS no meu plano de integração foram essenciais para a aquisição de novas competências e para o sucesso deste estágio.

3.1.4. Atividades Desenvolvidas

Ao longo do meu estágio na DATS tive a oportunidade de desempenhar inúmeras tarefas farmacêuticas sob a supervisão dos colaboradores deste departamento.

De entre as várias tarefas desenvolvidas, a validação farmacêutica de pedidos de comparticipação de medicamentos genéricos para uso humano em ambulatório e de pedidos de avaliação prévia de medicamentos genéricos para uso humano em meio hospitalar, foi a atividade à qual dediquei mais tempo no decorrer desta experiência. A avaliação farmacêutica nesta tarefa consistia no preenchimento de uma *checklist* que era posteriormente encaminhada para a equipa de economistas da DATS, para que pudesse ser levada a cabo a avaliação económica do respetivo medicamento. Neste contexto, pude também colaborar na elaboração de um relatório de avaliação de um pedido de comparticipação de um medicamento para uso humano.

Para além destas funções, desenvolvi ainda outras atividades como a análise da dimensão de embalagens de medicamentos e a análise de pedidos de exclusão ou de transferência de comparticipação de medicamentos.

A oportunidade de ter desempenhado uma grande variedade de funções na DATS constituiu um dos pontos fortes desta etapa.

3.1.5. Reuniões Farmacêuticas

A participação nas reuniões promovidas pela equipa de farmacêuticos da DATS assumiu-se de grande importância para a minha experiência de estágio.

Nestas reuniões, de frequência semanal, eram abordadas temáticas relacionadas com a atividade farmacêutica da DATS e discutidos diversos processos com vista à harmonização da avaliação farmacêutica entre os diferentes profissionais do departamento. Para além de contribuírem para a promoção do espírito de equipa, estas sessões permitiam ainda a discussão de propostas de melhoria dos procedimentos e instruções de trabalho das distintas atividades da DATS.

Pela natureza e relevância dos assuntos tratados nestas reuniões, estas representaram uma verdadeira oportunidade de aprendizagem.

3.2. Pontos Fracos

3.2.1. Conteúdos não previstos no MICF

A atividade da DATS engloba diversas áreas de atuação no âmbito da avaliação das tecnologias de saúde, nas quais os farmacêuticos desempenham um papel preponderante. Apesar dos notáveis conhecimentos adquiridos ao longo da formação académica, o estágio na DATS incidiu sobre alguns conteúdos não previstos no plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF).

O desconhecimento do funcionamento de atividades relacionadas com a avaliação farmacêutica de medicamentos, assim como da legislação vigente nesta área e das distintas plataformas de trabalho, como o SIATS e o GiMED, exigiu um maior esforço da minha parte na adaptação ao estágio. Não obstante, de realçar o contributo conferido por unidades curriculares como as de Farmacologia e de Comunicação e Marketing Farmacêutico que se revelaram como uma excelente base para a aprendizagem nesta área.

Ainda assim, apesar de destacar conteúdos não previstos no plano de estudos do MICF como um ponto fraco desta etapa, esta consumou-se como uma ótima oportunidade para a assimilação de novos conhecimentos, tendo o plano de integração de estagiários na DATS, aliado ao apoio incondicional de todos os colaboradores, contribuído para o sucesso da minha adaptação às funções desenvolvidas neste departamento.

3.2.2. Duração do Estágio

A duração do estágio no Infarmed revelou-se como um fator limitante desta experiência dada a grande diversidade de atividades levadas a cabo na DATS e à vasta componente legislativa em que estas se baseiam.

No decorrer desta etapa tive a oportunidade de desempenhar diversas tarefas na área da avaliação farmacêutica que me conferiram notáveis aptidões para a futura prática profissional. No entanto, a curta duração do estágio, tendo em conta a dinâmica de funcionamento deste departamento, não possibilitou o aprofundamento de conhecimentos em determinadas tarefas.

Contudo, esta experiência permitiu a aquisição de inúmeras competências profissionais e o alcance de uma visão global das atividades desenvolvidas na DATS.

3.3. Oportunidades

3.3.1. Formação Contínua

Numa área em constante evolução como a avaliação das tecnologias de saúde, a formação profissional revela um papel fundamental na atualização de conhecimentos e na aquisição de novas competências.

No decurso do estágio na DATS tive a oportunidade de assistir a diversas formações enquadradas em áreas como a farmacoeconomia, o VIH/SIDA e o acesso à inovação em saúde, que me permitiram adquirir novos conhecimentos e uma visão mais completa sobre o sistema de avaliação de tecnologias de saúde em Portugal.

Os profissionais da DATS beneficiam ainda da oportunidade de participar em eventos internacionais que lhes proporcionam uma importante perspetiva do contexto de avaliação de medicamentos e de dispositivos médicos noutros países.

Com isto, a oportunidade de formação contínua de que usufruem os estagiários e os colaboradores do Infarmed evidencia-se como uma mais-valia pela constante atualização de conhecimentos e pelo aperfeiçoamento profissional.

3.3.2. Portal SIATS

O novo portal SIATS foi desenvolvido na sequência da implementação do SiNATS em Portugal. Este portal veio substituir a plataforma GAM (Gestão de Acessibilidade ao Medicamento) e integra a submissão de pedidos de preço, de comparticipação e de avaliação prévia de medicamentos, e a gestão de notificações de cessação de comercialização e de ruturas de *stock* de medicamentos.⁵ De realçar que o SIATS inclui ainda uma nova funcionalidade de notificação de início de comercialização de medicamentos⁵ e incorpora um novo módulo de submissão de pedidos de AUE (Autorização de Utilização Excepcional) de medicamentos.⁶

A experiência de trabalhar com o SIATS no decorrer do estágio na DATS revelou-se uma valerosa oportunidade pela aprendizagem do modo de funcionamento desta plataforma, pelo contacto com as novas funcionalidades implementadas e pela importância que esta representa para a sustentabilidade do SiNATS.

3.4. Ameaças

3.4.1. Pressão e influência externa

A DATS desempenha um papel fundamental na decisão de financiamento de medicamentos e dispositivos médicos e no acesso à inovação na área da saúde.

Neste contexto, a DATS está sujeita a pressões e influências externas por parte dos stakeholders deste setor. De entre o vasto leque de stakeholders destacam-se nomeadamente o Ministério da Saúde, pela determinação de objetivos a serem cumpridos pela DATS, e a Indústria Farmacêutica, pelo interesse na celeridade dos processos de financiamento de medicamentos e dispositivos médicos.

Desta forma, a pressão e a influência externa exercida sobre a DATS, pelas rigorosas metas a atingir e pela relevância das atividades desenvolvidas neste departamento, constituem um desafio constante para os seus colaboradores.

4. Conclusão

O estágio curricular no Infarmed consumou-se como uma das experiências mais enriquecedoras do meu percurso académico. O contacto com uma nova área de atuação farmacêutica e a aquisição de uma visão global das distintas atividades desenvolvidas na DATS constituíram uma oportunidade única de aprendizagem.

A existência de um Plano de Integração, aliada à dedicação e partilha de conhecimentos por parte de todos os colaboradores da DATS, contribuiu para o sucesso da minha adaptação ao estágio, bem como para o desenvolvimento de inúmeras competências no âmbito das tecnologias de saúde. Para além disso, a oportunidade de ter desempenhado um vasto leque de atividades proporcionou-me uma excelente perspetiva do funcionamento do sistema de avaliação de tecnologias de saúde em Portugal e da sua importância para a sustentabilidade do SNS.

Pelas notáveis competências pessoais e profissionais adquiridas ao longo desta etapa, o estágio na DATS revelou-se um sucesso na minha formação académica e uma grande mais-valia para o meu futuro profissional.

5. Bibliografia

1. INFARMED, I.P. – **Avaliação de tecnologias de saúde**. [Acedido a 1 de julho de 2017]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/avaliacao-tecnologias-de-saude>
2. INFARMED, I.P. – **Plano de Atividades 2016**. [Acedido a 1 de julho de 2017]. Disponível na Internet: http://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/documentacao_e_informacao/documentos-institucionais
3. DA SILVA, J.A. – Vinte e Cinco Anos de Evolução do INFARMED, IP: Os Atuais Desafios. **Revista Portuguesa de Farmacoterapia**. 9:2 (2017) 45-49.
4. MINISTÉRIO DA SAÚDE – **Decreto-Lei n.º 46/2012**. Diário da República, 1.ª série - N.º 40 (24/02/2012) 884-890. [Acedido a 8 de julho de 2017]. Disponível na Internet: http://www.infarmed.pt/documents/15786/1065790/007_Dec-Lei_46_2012_IALT.pdf
5. INFARMED, I.P. – **Sistema de Informação para a Avaliação das Tecnologias de Saúde - SIATS**. Circular Informativa N.º 034/CD/100.20.200 (22/03/2017). [Acedido a 8 de julho de 2017]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/>
6. INFARMED, I.P. – **Autorização de Utilização Excecional (AUE)**. [Acedido a 8 de julho de 2017] Disponível na Internet: http://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/autorizacao-de-introducao-no-mercado/autorizacao_de_utilizacao_especial

6. Anexo - Plano de Integração

Plano de Integração

Registo da formação inicial - Transversal à direção e Específica da função (*on-job*)

Nome: Márcio Alexandre da Costa Silva

Função a desenvolver:

Estágio

Início de funções: 02/05/2017

Duração da formação:

3 meses (duração do estágio)

Responsável pelo acompanhamento:

Beatriz Macedo

Formação transversal

Natureza transversal - aplica-se a todos os trabalhadores que ingressem na DATS

Tema	Agendamento		Registo da formação
	Formador	Data/hora prevista	Data efetiva/ rubrica
DATS			
<ul style="list-style-type: none"> Competências Distribuição da equipa <i>(matriz de competências/organoograma)</i>	-	-	-
Processos			
Introdução geral ao sistema de avaliação de tecnologias de saúde	MLC	05/05/2017	
Avaliação farmacoterapêutica Medicamentos genéricos (ambulatório e hospitalar) Medicamentos não genéricos (ambulatório e hospitalar)	CFC	05-05-2017 9h às 12h	
Preços Formação de Preços (genéricos e não genéricos) Revisão Anual de Preços (ambulatório e hospitalar) Revisão Excepcional de Preços	FF	31-05-2017 14H30 às 16H30	
Avaliação económica Medicamentos genéricos (ambulatório e hospitalar) Medicamentos não genéricos (ambulatório e hospitalar)	GJ (gen amb) LIG (gen hosp) SC (não gen)	Gen: 01-06 (9h às 12h); não gen: 06-06 (9h às 11h)	
Contratos Elaboração / Monitorização	CT	07-06-2017 14h às 16h	
Dispositivos médicos Avaliação de contexto tecnológico (ambulatório e hospitalar) Avaliação clínica (ambulatório e hospitalar) Avaliação económica (ambulatório e hospitalar)	MA	09-06-2017 9h30 às 11h30	
Grupos de Trabalho (Eunethta / Medev / PPRI)	-	-	

Tema	Agendamento		Registo da formação
	Formador	Data/hora prevista	Data efetiva/ rubrica
SIGQ - Sistema Integrado de Gestão da Qualidade			
<ul style="list-style-type: none"> ● Política da Qualidade do Infarmed ● Plataforma SIGQ ● Registos <ul style="list-style-type: none"> ◦ Ações/Reclamações/Não conformidades ◦ Reclamações ◦ Não conformidades 	-	-	
Aspetos organizacionais			
<ul style="list-style-type: none"> ● Organização das pastas de rede ● Organização dos proxies ● Organização das bases de dados ● Sisqual/pedidos de economato/easyvista 	-	-	

Formação específica

Natureza específica da função (*on-job*)

Tema	Agendamento		Registo da formação
	Formador	Data/hora prevista	Data efetiva/ rubrica
SIATS: - Objetivos e apresentação da plataforma - Portal Hepatite C	CT	08/06/2017	

Avaliação da eficácia da formação

Selecionar uma cruz (x) no campo correspondente

Componentes a avaliar	Insuficiente	Suficiente	Excede as expectativas
• Adequabilidade deste plano de formação na integração de novos elementos <i>(avaliação a efetuar pelo colaborador)</i>			
• Adequabilidade deste plano de formação na integração de novos elementos <i>(avaliação a efetuar pelo diretor)</i>			
• Integração do colaborador na atividade da Direção <i>(avaliação a efetuar pelo diretor)</i>			
• Sugestões de melhoria (colaborador e/ou diretor)			

Avaliador (data e assinatura): _____

Avaliado (data e assinatura): _____

Parte III

Monografia intitulada “Exossomas e outras vesículas extracelulares como biomarcadores”

Lista de Abreviaturas

ALIX - *ALG2-interacting protein X*
APNG - *alkylpurine-DNA-N-glycosylase*
BHE - Barreira hematoencefálica
DCJ - Doença de Creutzfeldt-Jakob
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
EGFR - *epidermal growth factor receptor*
EGFRvIII - *epidermal growth factor receptor variant III*
ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática
GBM - Glioblastoma Multiforme
IDHI - *isocitrate dehydrogenase I*
iMER - *immuno-magnetic exosome RNA*
LICAM - *L1 cell adhesion molecule protein*
LAMP-1 - *lysosome-associated membrane protein-1*
LCR - Líquido cefalorraquidiano
LRRK2 - *leucine-rich repeat serine/threonine kinase 2*
MGMT - *O6-methylguanine DNA methyltransferase*
miRNAs - microRNAs
mRNA - RNA mensageiro
PCR - *polymerase chain reaction*
PrP^C - Proteína do príão
PrP^{SC} - Isoforma anormal da proteína do príão
RNA - Ácido Ribonucleico
RT-PCR - *reverse transcription polymerase chain reaction*
SGSS - Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker
SNC - Sistema Nervoso Central
TSG101 - *tumour susceptibility gene 101 protein*

I. Introdução

As vesículas extracelulares constituem uma família heterogênea de partículas que são segregadas para o meio extracelular por uma grande variedade de células. Inicialmente associadas a um mecanismo de eliminação de resíduos celulares, estas vesículas têm revelado um papel fundamental na comunicação intercelular (MAAS *et al.*, 2017).

As vesículas extracelulares possuem a capacidade de transferir material genético e outras moléculas entre diferentes células e de conferir estabilidade e proteção ao conteúdo transportado. O conteúdo molecular das vesículas extracelulares parece ainda refletir o estado fisiopatológico das células de origem (MAAS *et al.*, 2017), pelo que estas vesículas, presentes em fluidos corporais como o sangue, o líquido cefalorraquidiano (LCR) e a urina, podem representar uma importante fonte de informação para o diagnóstico de diversas doenças (THOMPSON *et al.*, 2016).

A nível do sistema nervoso central (SNC), as vesículas extracelulares têm sido associadas a diversas doenças neurodegenerativas, como as doenças do Prião, a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson, e a tumores cerebrais como o glioblastoma (MAAS *et al.*, 2017). Com vista a explorar a potencialidade destas vesículas enquanto biomarcadores em doenças do SNC, a comunidade científica tem vindo a desenvolver inúmeros estudos nesta área de investigação emergente.

Neste trabalho são abordados os principais aspetos da natureza das vesículas extracelulares, bem como métodos de isolamento e de análise do conteúdo molecular, e destacado o papel destas vesículas em distintas doenças do SNC, tendo em vista a avaliação do seu potencial enquanto biomarcadores no diagnóstico e avaliação da eficácia do tratamento destas patologias.

2. Classificação das Vesículas Extracelulares

As diferentes classes de vesículas extracelulares possuem diversas características em comum. Estas vesículas são delimitadas por uma bicamada lipídica e transportam no seu interior uma vasta variedade de moléculas, incluindo proteínas, ácidos nucleicos e lípidos. Apesar de não existir um consenso a nível da comunidade científica no que respeita à sua nomenclatura, estas vesículas são frequentemente classificadas com base no seu mecanismo de biogénese e divididas em três grandes classes: exossomas, microvesículas e corpos apoptóticos, conforme se apresenta na Tabela 1 (VADER *et al.*, 2014; YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015).

Os exossomas são formados por invaginação de membranas endossomais, com consequente produção de corpos multivesiculares com vesículas intraluminais no seu interior. A libertação dos exossomas para o espaço extracelular ocorre quando estes corpos multivesiculares fundem com a membrana plasmática da célula libertando as vesículas intraluminais, agora designadas de exossomas (Figura 1). Os exossomas têm um diâmetro compreendido entre 40 e 150 nm e apresentam uma forma esférica quando observados por crio-microscopia eletrónica (RAPOSO *et al.*, 2013).

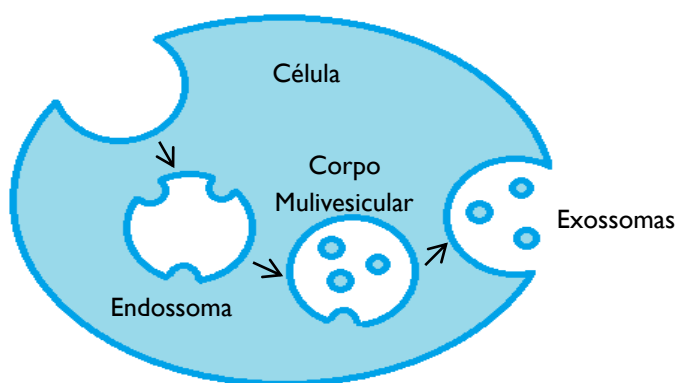


Figura 1- Representação da biogénese de exossomas. Adaptado de CANDELARIO e STEINDLER, 2014.

As microvesículas são formadas por protrusão da membrana plasmática e são libertadas diretamente para o meio extracelular por fissão da membrana de origem. O diâmetro das microvesículas varia entre 100 e 1000 nm (MINCIACCHI *et al.*, 2015).

Os corpos apoptóticos têm origem na protrusão e segmentação da membrana plasmática de células em apoptose e compreendem um grupo heterogéneo de vesículas de diâmetro entre 50 e 5000 nm que podem conter produtos de degradação celular como histonas e DNA (VADER *et al.*, 2014).

Tabela I - Características dos diferentes tipos de vesículas extracelulares.

Vesículas Extracelulares	Diâmetro	Origem
Exossomas	40 - 150 nm	Invaginação de membranas endossomais com produção de corpos multivesiculares
Microvesículas	100 - 1000 nm	Protrusão da membrana plasmática
Corpos Apoptóticos	50 - 5000 nm	Protrusão e segmentação da membrana de células em apoptose

3. Composição das Vesículas Extracelulares

A composição molecular das vesículas extracelulares abrange um vasto reportório de proteínas, lípidos e material genético, conforme se apresenta na Tabela 2, e depende das células de origem e do seu estado fisiopatológico (MAAS *et al.*, 2017). Neste contexto, através da colaboração da comunidade científica, os resultados de inúmeros estudos sobre o conteúdo destas vesículas são continuamente atualizados em bases de dados acessíveis ao público, como a Exocarta (KEERTHIKUMAR *et al.*, 2016), a Vesiclepedia (KARLA *et al.*, 2012) e a EVpedia (KIM *et al.*, 2015).

De entre o vasto e complexo conteúdo proteico das vesículas extracelulares, proteínas como a *tumour susceptibility gene 101 protein* (TSG101), a *ALG2-interacting protein X* (ALIX) e as tetraspaninas (CD9, CD63 e CD81), têm sido identificadas como marcadores proteicos dos exossomas, ainda que não sejam totalmente específicas destes (ANDALOUSSI *et al.*, 2013; KOWAL *et al.*, 2016).

A nível do conteúdo lipídico das membranas dos exossomas, estas têm sido descritas como especialmente enriquecidas em colesterol, fosfatidilserina, esfingomiéline e glicoesfingolípídeos (LLORENTE *et al.*, 2013; RECORD *et al.*, 2014).

No que concerne ao material genético que pode ser transportado por vesículas extracelulares, este inclui DNA, RNA mensageiro (mRNA) e RNA não codificante, tal como os microRNAs (miRNAs) (BECKER *et al.*, 2016).

Tabela 2 - Composição molecular de vesículas extracelulares.

Proteínas	Lípidos	Ácidos Nucleicos
TSG101, ALIX, CD9, CD63, CD81	colesterol, glicoesfingolipídeos fosfatidilserina, esfingomiéline	DNA, mRNA, miRNAs

TSG101 (*tumour susceptibility gene 101 protein*); ALIX (*ALG2-interacting protein X*); CD9, CD63, CD81 (tetraspaninas); mRNA (RNA mensageiro); miRNAs (microRNAs).

4. Métodos de Isolamento de Vesículas Extracelulares

O notável crescimento da investigação na área das vesículas extracelulares tem conduzido ao desenvolvimento de uma grande panóplia de métodos para o isolamento de exossomas e de outras vesículas de fluidos corporais e de culturas celulares (GARDINER *et al.*, 2016). Estas vesículas têm sido isoladas de diversos fluidos biológicos, tais como plasma, soro, LCR, urina, saliva, secreções nasais, humor aquoso, leite materno, bÍlis, sémen, líquido amniótico, fluido ascítico, efusões pleurais, líquido sinovial e lavados broncoalveolares (WITWER *et al.*, 2013).

Os métodos utilizados pela comunidade científica para o isolamento destas vesículas incluem técnicas como a centrifugação, a filtração, a cromatografia, a precipitação polimérica e o isolamento por imunoafinidade. A centrifugação diferencial representa um dos métodos mais utilizados para o isolamento de exossomas e baseia-se numa sequência de etapas de centrifugação a diferentes velocidades de rotação, incluindo ultracentrifugação. As técnicas de separação de vesículas extracelulares baseadas na exclusão por tamanho envolvem a passagem destas vesículas por barreiras físicas tais como colunas cromatográficas ou filtros. No que concerne aos métodos de isolamento por imunoafinidade, a presença de proteínas características na superfície das vesículas extracelulares permite que estas sejam captadas por anticorpos específicos dessas proteínas. Estes anticorpos estão associados a esferas ou outras matrizes e são posteriormente separados por centrifugação a baixas velocidades ou por técnicas magnéticas. A técnica de precipitação polimérica baseia-se na incubação de fluidos biológicos com reagentes poliméricos, como o ExoQuick da System Biosciences, e na posterior centrifugação a baixas velocidades de forma a induzir a precipitação de vesículas extracelulares. A combinação de métodos distintos é ainda uma das estratégias aplicadas com vista a uma maior eficácia no isolamento destas vesículas (WITWER *et al.*, 2013).

Os dispositivos microfluídicos representam ainda uma tecnologia promissora e emergente no que respeita ao isolamento de exossomas, uma vez que exploram as propriedades físicas e bioquímicas dos exossomas em microescala e permitem um rápido e eficiente isolamento destas vesículas (LI *et al.*, 2017). Esta tecnologia apresenta ainda a possibilidade de combinar o isolamento e a análise de exossomas num só dispositivo, o que revela um grande potencial para o uso desta metodologia a nível da prática clínica (THIND e WILSON, 2016).

Neste contexto, Kanwar *et al.* desenvolveram um dispositivo microfluídico, designado por ExoChip, que permite o isolamento e quantificação de exossomas diretamente de amostras de soro. Através deste dispositivo, os exossomas são capturados por anticorpos anti-CD63 e subsequentemente corados com uma tinta fluorescente que possibilita a sua quantificação. Foi ainda demonstrada a capacidade deste dispositivo isolar exossomas com cadeias de RNA intactas, o que viabiliza a posterior análise molecular destas vesículas, revelando o enorme potencial desta aplicação na descoberta de novos biomarcadores (KANWAR *et al.*, 2014).

5. Métodos de Análise do conteúdo de Vesículas Extracelulares

Os métodos de análise do conteúdo molecular de vesículas extracelulares abrangem uma vasta diversidade de técnicas. A análise proteómica de exossomas inclui técnicas como os ensaios de imunoadsorção enzimática (ELISA), o Western Blot e a espectrometria de massa (LI *et al.*, 2017). A nível do estudo do material genético presente nestas vesículas, a *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) e os microarrays são dois métodos frequentemente utilizados na análise de miRNAs exossomais. A *next-generation sequencing* representa ainda um método promissor na análise de perfis de expressão de miRNAs e uma vez que não requer a utilização de primers ou sondas, possibilita a deteção de novos miRNAs (THIND e WILSON, 2016). Para além destes métodos, têm ainda sido desenvolvidos dispositivos microfluídicos capazes de analisar proteínas e ácidos nucleicos exossomais (HE *et al.*, 2014; SHAO *et al.*, 2015). Shao *et al.* desenvolveram uma plataforma microfluídica para a análise de mRNA exossomal, designada por *immuno-magnetic exosome RNA* (iMER). Este chip microfluídico tem a capacidade de captar exossomas derivados de glioblastoma através de microesferas magnéticas com anticorpos anti-EGFR e permite, na mesma plataforma, a lise destes exossomas, o isolamento do RNA exossomal e a subsequente análise por PCR em tempo real (SHAO *et al.*, 2015).

Tabela 3 - Técnicas de isolamento e métodos de análise do conteúdo de vesículas extracelulares.

Técnicas de Isolamento	Métodos de Análise
Centrifugação Exclusão por tamanho Precipitação Captura por Imunoafinidade Microfluídicas	ELISA Western Blot Espectrometria de massa RT-PCR Microarrays Next-generation sequencing

ELISA (ensaio de imunoadsorção enzimática); RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*).

6. Papel das Vesículas Extracelulares no Sistema Nervoso Central

A nível do SNC, as vesículas extracelulares estão envolvidas na comunicação entre as diferentes células neurais, incluindo neurónios e células da glia, e contribuem para uma grande diversidade de funções neurobiológicas, como a participação no normal desenvolvimento do sistema nervoso, a promoção da sobrevivência neuronal e a modulação da atividade sináptica. Estas vesículas, incluindo exossomas, podem ser libertadas pela maioria das células do SNC, tais como neurónios, astrócitos, oligodendrócitos e microglia (BUDNIK *et al.*, 2016; ZAPPULLI *et al.*, 2016).

Os oligodendrócitos, células responsáveis pela mielinização das células neuronais do cérebro, libertam exossomas que são internalizados por neurónios, e que têm sido associados a um aumento de tolerância a condições de *stress*, com consequente aumento da viabilidade neuronal (FRÜHBEIS *et al.*, 2013). Vesículas extracelulares derivadas de células da microglia, envolvidas na defesa e reparação do tecido nervoso cerebral, têm também revelado funções como a regulação da excitabilidade neuronal, a iniciação de respostas agudas inflamatórias e a mediação de respostas imunes (BUDNIK *et al.*, 2016). Os astrócitos, células constitutivas da barreira hematoencefálica (BHE), através da libertação de vesículas extracelulares, têm demonstrado exercer funções a nível da neuroinflamação (BUDNIK *et al.*, 2016), e evidenciado um envolvimento na neuroproteção pela sobrevivência de neurónios quando sujeitos a condições de elevada atividade neuronal e *stress* oxidativo (WANG *et al.*, 2011). Da mesma forma que as células da glia exercem um papel fundamental a nível do SNC através da libertação destas vesículas, os neurónios têm também sido associados a um vasto leque de atividades fisiológicas, incluindo a regulação da plasticidade neuronal (GOLDIE *et al.*, 2014) e a eliminação de conexões sinápticas inativas (BAHRINI *et al.*, 2015).

Para além do papel primordial nos processos fisiológicos do SNC, as vesículas extracelulares contribuem também para a patogénese de diversas doenças neurodegenerativas e para a progressão de tumores cerebrais, como o glioblastoma (ZAPPULLI *et al.*, 2016).

As doenças neurodegenerativas são caracterizadas pela deposição de agregados proteicos em determinadas zonas do cérebro, e incluem patologias como as doenças do Prião, a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson. As vesículas extracelulares têm sido implicadas na formação de agregados amilóides e na disseminação destas proteínas tóxicas pelo cérebro, favorecendo a neurodegenerescência (ZAPPULLI *et al.*, 2016). No que respeita ao envolvimento na progressão de tumores cerebrais, as vesículas segregadas pelas células tumorais de glioblastoma têm sido implicadas na proliferação tumoral, invasão celular, angiogénese, e supressão da resposta imune (RAJENDRAN *et al.*, 2014). Dada a evidência do envolvimento de vesículas extracelulares na patogénese de diversas doenças ligadas ao SNC, como sejam as doenças neurodegenerativas e os tumores cerebrais, os exossomas e outras vesículas extracelulares têm um enorme potencial como biomarcadores de diagnóstico destas patologias (RAJENDRAN *et al.*, 2014).

7. Vesículas Extracelulares como Biomarcadores

Os biomarcadores são indicadores quantificáveis de uma condição biológica, e incluem proteínas, material genético e metabolitos, que podem refletir o estado de saúde ou de doença de um indivíduo (BOUKOURIS e MATHIVANAN, 2015). Em 1998, um grupo de trabalho especializado convocado pelo National Institutes of Health (NIH), definiu biomarcadores, ou marcadores biológicos, como uma característica que é medida e avaliada objetivamente como um indicador de processos biológicos normais, de processos patogénicos, ou de respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica. De entre as várias aplicações dos biomarcadores, estes podem ser usados como ferramentas de diagnóstico, de prognóstico, e de monitorização da progressão de doenças e de respostas a tratamentos (BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP, 2001).

As vesículas extracelulares representam uma notável fonte de biomarcadores não-invasivos e estão presentes em todos os fluidos corporais (BUDNIK *et al.*, 2016). Para além disso, o conteúdo transportado por estas vesículas no interior da bicamada lipídica, incluindo proteínas e material genético, está protegido da ação de enzimas extracelulares, como as proteases e as RNases (CANDELARIO e STEINDLER, 2014).

7.1. Doenças do Prião

As doenças do Prião constituem um grupo de doenças neurodegenerativas, transmissíveis e fatais, caracterizadas pela degeneração e vacuolização espongiiforme do tecido cerebral, que afetam tanto humanos como animais. Nos humanos, incluem doenças como a Doença de Creutzfeldt-Jakob (DCJ) e a Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (SGSS), e podem ter etiologia esporádica, familiar ou infecciosa (BELLINGHAM *et al.*, 2015).

Os priões são agentes infecciosos cujo componente maioritário é uma isoforma anormal da proteína do prião (PrP^C), designada por PrP^{Sc}, que possui a capacidade de transmitir a doença e de induzir a conversão de outras proteínas PrP^C em PrP^{Sc}. A proteína PrP^C, codificada pelo gene PNRP, apresenta elevados níveis de expressão a nível do SNC e do cérebro, ainda que seja expressa em todos os tecidos do organismo (COLEMAN e HILL, 2015). De entre os vários mecanismos propostos para a transmissão intercelular da PrP^{Sc}, como o contacto direto célula-célula e o movimento direto de agregados entre células via nanotubos túnel (*tunnelling nanotubes*), a propagação de proteínas do prião mediada por vesículas extracelulares tem sido sugerida como um dos mecanismos predominantes na transmissão destas doenças (THOMPSON *et al.*, 2016). Vella *et al.* demonstraram que exossomas derivados de uma linha celular neuronal infetada por priões eram capazes de induzir a propagação da infeção em células provenientes de diferentes tecidos (VELLA *et al.*, 2007). Ambas as proteínas envolvidas nas doenças do Prião (PrP^C e PrP^{Sc}) têm sido identificadas em exossomas provenientes de vários tipos de células e de fluidos como o sangue e o LCR (COLEMAN e HILL, 2015).

Num estudo desenvolvido por Bellingham *et al.*, exossomas libertados por neurónios infetados pelo prião revelaram uma expressão distinta de miRNAs exossomais. O perfil de expressão dos miRNAs exossomais estudado demonstrou uma elevada expressão de miRNAs como let-7b, let-7i, miR-128a, miR-21, miR-222, miR-29b, miR-342-3p e miR-424, e uma baixa expressão de miR-146, quando comparado com células neuronais não infetadas. Através dos resultados obtidos, o perfil específico de miRNAs contidos em exossomas derivados de células infetadas pelo prião podem constituir uma mais-valia enquanto biomarcadores no diagnóstico de doenças do Prião (BELLINGHAM *et al.*, 2012).

7.2. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa associada a uma progressiva disfunção cognitiva, que se assume como a forma mais comum de demência na população. A doença é caracterizada pela deposição cerebral de péptidos β -amilóides extracelulares na forma de placas amilóides e pela presença de agregados intracelulares de proteína tau hiperfosforilada que formam emaranhados neurofibrilares (HU *et al.*, 2016; EITAN *et al.*, 2016).

O envolvimento de vesículas extracelulares na biologia da doença de Alzheimer tem sido evidenciado por diversos estudos levados a cabo nesta área (THOMPSON *et al.*, 2016). Rajendran *et al.* demonstraram que uma pequena fração de péptidos β -amilóides pode ser incorporada em corpos multivesiculares que, por fusão com a membrana celular, segregam estes péptidos β -amilóides em exossomas para o meio extracelular, e observaram ainda a acumulação de proteínas exossomais em placas amilóides de tecido cerebral de doentes de Alzheimer, sugerindo um papel potencial destas vesículas na propagação da doença (RAJENDRAN *et al.*, 2006). Por outro lado, os exossomas têm também sido implicados na promoção da clearance de péptidos β -amilóides extracelulares por células da microglia (YUYAMA *et al.*, 2012). No que respeita aos mecanismos de propagação da proteína tau, Asai *et al.* demonstraram que exossomas libertados por células da microglia facilitam a disseminação da proteína tau entre neurónios, e que a inibição da síntese destes exossomas reduz de forma significativa a propagação da tau (ASAI *et al.*, 2015).

Níveis elevados de proteína tau fosforilada associada a exossomas foram detetados em amostras de LCR de doentes numa fase inicial da doença de Alzheimer, quando comparados a um grupo controlo sem a demência (SAMAN *et al.*, 2012). Fiandaca *et al.* demonstraram ainda um aumento significativo dos níveis de β -amilóide 1-42 e de proteínas tau em exossomas provenientes de amostras de sangue de doentes com Alzheimer, relativamente a um grupo controlo (FIANDACA *et al.*, 2015). Um estudo realizado por Goetzl *et al.* demonstrou que várias proteínas lisossomais associadas a exossomas, como a catepsina D e a *lysosome-associated membrane protein-1* (LAMP-1), apresentam níveis plasmáticos aumentados em doentes na fase pré-clínica da doença de Alzheimer (GOETZL *et al.*, 2015). No que respeita à literatura relacionada com miRNAs derivados de vesículas extracelulares como biomarcadores de doenças neurodegenerativas, diversos miRNAs exossomais, como o miRNA-193b e o miR-342-3p, têm sido identificados como potenciais biomarcadores da doença de Alzheimer (THOMPSON *et al.*, 2016).

7.3. Doença de Parkinson

A doença de Parkinson, clinicamente caracterizada por hipocinesia, rigidez muscular e tremor de repouso, apresenta-se como a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente na população. A doença está associada a uma degeneração dos neurónios dopaminérgicos na substância nigra e à presença de inclusões intraneuronais, designadas por corpos de Lewy, maioritariamente constituídas por agregados de α -sinucleína (POEWE *et al.*, 2017).

Assim como noutras doenças neurodegenerativas, os exossomas têm sido implicados na propagação destes agregados proteicos, sugerindo um envolvimento destas vesículas na doença de Parkinson (THOMPSON *et al.*, 2016). Emmanouilidou *et al.* demonstraram que a proteína α -sinucleína pode ser segregada em exossomas (EMMANOUILIDOU *et al.*, 2010), tendo sido ainda evidenciado que o processo de agregação de α -sinucleína pode ser acelerado por estas vesículas (GREY *et al.*, 2015).

Um estudo desenvolvido por Shi *et al.* revelou níveis significativamente elevados na concentração plasmática de α -sinucleína exossomal em doentes de Parkinson relativamente a controlos saudáveis. Neste estudo foram isolados exossomas presumivelmente derivados do CNS e que expressavam a *L1 cell adhesion molecule protein* (LICAM) (SHI *et al.*, 2014). Mutações no gene da proteína *leucine-rich repeat serine/threonine kinase 2* (LRRK2) têm sido também associadas à doença de Parkinson, tendo Fraser *et al.* reportado níveis elevados de Ser(P)-I292 LRRK2 em exossomas isolados de urina de doentes de Parkinson, quando comparados com controlos saudáveis (FRASER *et al.*, 2016). Uma análise proteómica de exossomas isolados de amostras de soro permitiu ainda identificar uma expressão diferencial de 23 proteínas exossomais entre doentes de Parkinson e pessoas saudáveis, incluindo a syntenin I, uma proteína envolvida na regulação da biogénese dos exossomas (TOMLINSON *et al.*, 2015). Noutro estudo, Gui *et al.* investigaram o perfil de expressão de miRNAs exossomais isolados de LCR de doentes de Parkinson e de Alzheimer. Em doentes de Parkinson, comparativamente a controlos saudáveis, foram identificados 16 miRNAs com uma elevada expressão, de entre os quais foram validados quatro (miR-153, miR-409-3p, miR-10a-5p e let-7g-3p), e 11 miRNAs com uma reduzida expressão, dos quais foram validados o miR-1 e o miR-19b-3p (GUI *et al.*, 2015).

7.4. Glioblastoma Multiforme

O glioblastoma multiforme (GBM) representa a forma mais comum e agressiva dos tumores cerebrais primários.

Assim como em outras doenças do SNC, a comunicação intercelular mediada por vesículas extracelulares tem sido associada ao glioblastoma (BUDNIK *et al.*, 2016) (Figura 2). Os exossomas derivados de células de glioblastoma revelaram conter proteínas angiogénicas e moléculas de RNA, como mRNAs e miRNAs, associadas ao processo tumorigénico. Estas vesículas podem ser captadas por outras células no ambiente tumoral e proceder à transferência de proteínas e de informação genética para estas células (SKOG *et al.*, 2008). Kucharzewska *et al.* demonstraram que exossomas derivados de células de glioblastoma, em condições de hipoxia, favorecem o crescimento e a proliferação tumoral, assim como induzem o processo de angiogénese (KUCCHARZEWSKA *et al.*, 2013).

Num estudo que pretendeu avaliar o potencial dos ácidos nucleicos como biomarcadores de glioblastoma em microvesículas isoladas de soro de doentes com este tipo de tumor, Skog *et al.* identificaram um mRNA específico tumoral associado a glioblastomas, designado por *epidermal growth factor receptor variant III* (EGFRvIII), sugerindo que as microvesículas podem ser úteis como biomarcadores no diagnóstico deste tumor (SKOG *et al.*, 2008). Uma investigação levada a cabo por Manterola *et al.* revelou um perfil de expressão de RNA distinto em exossomas isolados do soro de doentes com glioblastoma, comparativamente com controlos saudáveis. Neste estudo, os níveis de expressão de dois miRNAs (miR-320 e miR-574-3p) e de um small nuclear RNA (RNU6-1) foram associados de forma significativa ao diagnóstico deste tumor (MANTEROLA *et al.*, 2014). Akers *et al.* detetaram ainda níveis elevados de miR-21 em vesículas extracelulares provenientes de LCR de doentes com glioblastoma, comparativamente a pessoas sem cancro (AKERS *et al.*, 2013). Num outro estudo, Chen *et al.* analisaram vesículas extracelulares isoladas de LCR de doentes com gliomas e identificaram um aumento significativo no número de cópias de mRNA mutante da *isocitrate dehydrogenase I* (IDH1), uma enzima cuja mutação se encontra associada a casos de glioblastoma (CHEN *et al.*, 2013).

No âmbito da utilização de biomarcadores exossomais como ferramentas de monitorização da eficácia de terapias, Shao *et al.* desenvolveram um método de análise de mRNA exossomal de MGMT (*O6-methylguanine DNA methyltransferase*) e de APNG (*alkylpurine-DNA-N-glycosylase*), duas enzimas capazes de reparar os danos induzidos no DNA pela temozolomida, e cujos níveis no tecido tumoral estão inversamente relacionados com a eficácia do tratamento quimioterápico. Os resultados deste estudo revelaram uma relação

qualitativa entre as variações dos níveis de mRNA exossomal destas enzimas e as diferentes trajetórias dos tratamentos com temozolomida em doentes com glioblastoma, realçando a possibilidade destes mRNAs exossomais serem usados na previsão da resposta ao tratamento quimioterápico, através do isolamento de exossomas de fluidos corporais como o sangue (SHAO *et al.*, 2015).

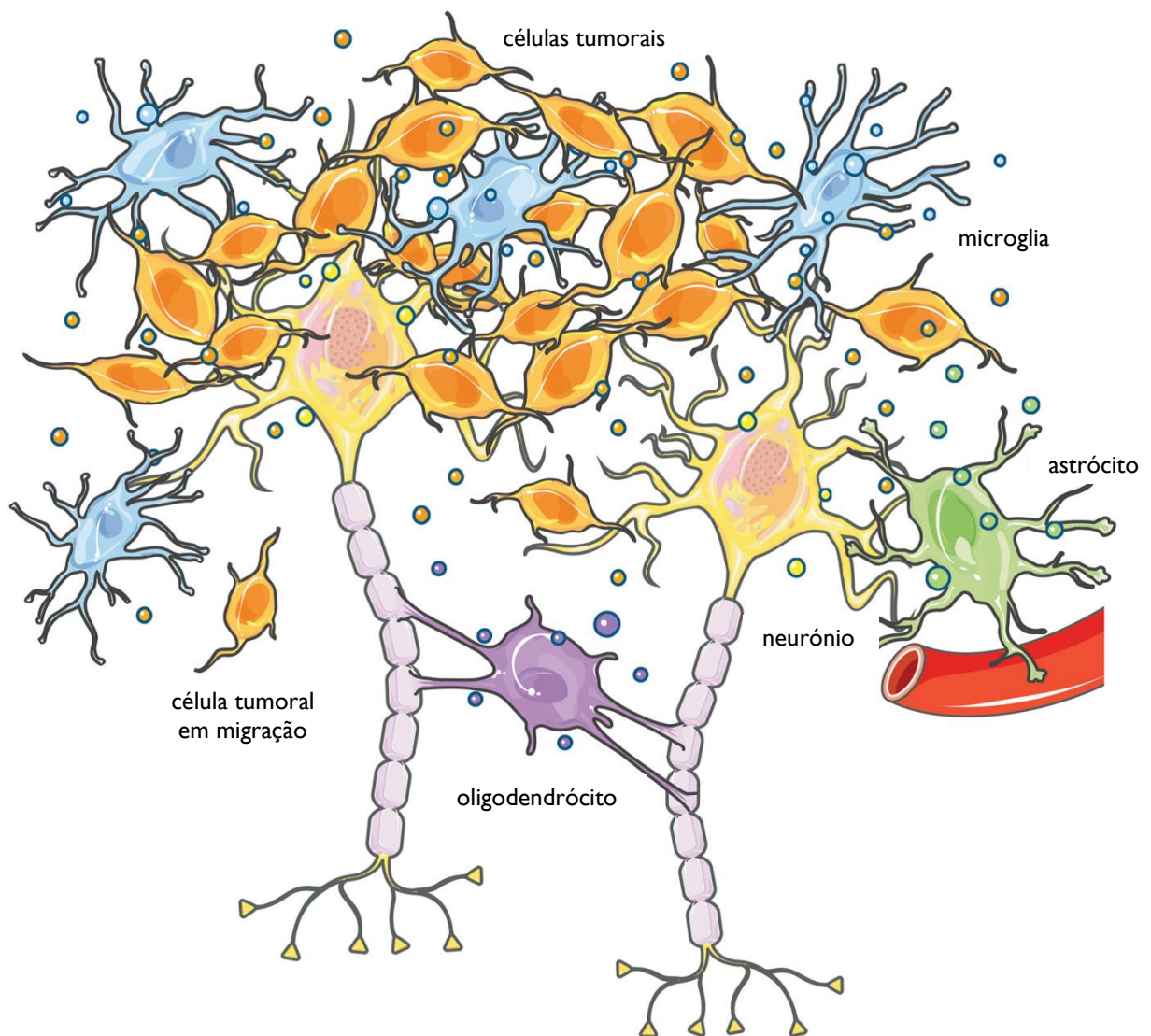


Figura 2 - Representação do microambiente tumoral do glioblastoma. As células tumorais comunicam através de vesículas extracelulares com diversos tipos de células, incluindo neurónios, astrócitos, microglia e oligodendrócitos. Adaptado de RAJENDRAN *et al.*, 2014.

Tabela 4 - Sumário de biomarcadores associados a vesículas extracelulares em doenças do SNC.

Doença	Tipo de amostra	Biomarcadores
Doenças do Prião	Cultura de Neurónios	miRNAs com elevada expressão: let-7b, let-7i, miR-128a, miR-21, miR-222, miR-29b, miR-342-3p, miR-424; miRNA com reduzida expressão: miR-146
Doença de Alzheimer	LCR	Proteína tau fosforilada
	Sangue	β -amilóide 1-42 e proteínas tau
	Plasma	Proteínas lisossomais, incluindo a catepsina D e a LAMP-1
Doença de Parkinson	Plasma	α -sinucleína
	Urina	Ser(P)-1292 LRRK2
	Soro	Expressão diferencial de 23 proteínas incluindo a syntenin 1
	LCR	16 miRNAs com elevada expressão, (validados: miR-153, miR-409-3p, miR-10a-5p, let-7g-3p); 11 miRNAs com baixa expressão (validados: miR-1, miR-19b-3p)
Glioblastoma	Soro	EGFRvIII mRNA
	Soro	miR-320, miR-574-3p, RNU6-1
	LCR	miR-21
	LCR	mRNA mutante de IDH1

LAMP-1 (*lysosome-associated membrane protein-1*); LRRK2 (*leucine-rich repeat serine/threonine kinase 2*); EGFRvIII (*epidermal growth factor receptor variant III*); IDH1 (*isocitrate dehydrogenase 1*); LCR (líquido cefalorraquidiano).

8. Conclusão

As vesículas extracelulares constituem, indubitavelmente, uma área de investigação emergente. Estas vesículas assumem um papel preponderante na mediação da comunicação intercelular e o vasto e complexo conteúdo molecular por estas transportado tem revelado constituir uma fonte promissora de biomarcadores.

O envolvimento de vesículas extracelulares em processos fisiológicos e patológicos tem sido alvo de inúmeros estudos que têm demonstrado que estas vesículas, para além de estarem implicadas no normal funcionamento do SNC, estão também associadas à propagação de proteínas tóxicas no tecido cerebral e à proliferação de células tumorais, como no caso do glioblastoma.

A investigação levada a cabo pela comunidade científica no âmbito destas vesículas tem ainda permitido identificar diversas proteínas e material genético com padrões alterados em doenças neurodegenerativas e tumores cerebrais, o que tem contribuído para a descoberta de novos biomarcadores importantes no diagnóstico e monitorização destas patologias.

Dada a evidência emergente nesta temática, exossomas e outras vesículas extracelulares destacam-se como uma notória e inovadora fonte de informação para o diagnóstico de doenças de grande relevância para a sociedade e revelam uma enorme potencialidade no que respeita à sua utilização na prática clínica.

9. Bibliografia

AKERS, J. C., RAMAKRISHNAN, V., KIM, R., SKOG, J., NAKANO, I., PINGLE, S., ... CHEN, C. C. – miR-21 in the Extracellular Vesicles (EVs) of Cerebrospinal Fluid (CSF): A Platform for Glioblastoma Biomarker Development. **PLoS ONE**. 8:10 (2013) 1–13.

ASAI, H., IKEZU, S., TSUNODA, S., MEDALLA, M., LUEBKE, J., HAYDAR, T., ... IKEZU, T. – Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. **Nature Neuroscience**. 18:11 (2015) 1584–93.

BAHRINI, I., SONG, J., DIEZ, D., HANAYAMA, R. – Neuronal exosomes facilitate synaptic pruning by up-regulating complement factors in microglia. **Scientific Reports**. 5 (2015) 7989.

BECKER, A., THAKUR, B. K., WEISS, J. M., KIM, H. S., PEINADO, H., LYDEN, D. – Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. **Cancer Cell**. 30:6 (2016) 836–848.

BELLINGHAM, S. A., COLEMAN, B. M., HILL, A. F. – Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. **Nucleic Acids Research**. 40:21 (2012) 10937–10949.

BELLINGHAM, S. A., GUO, B., HILL, A. F. – The secret life of extracellular vesicles in metal homeostasis and neurodegeneration. **Biology of the Cell**. 107:11 (2015) 389–418.

BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP – Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**. 69:3 (2001) 89–95.

BOUKOURIS S., MATHIVANAN S. – Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers. **Proteomics Clinical applications**. 9:3-4 (2015) 358–367.

BUDNIK, V., RUIZ-CAÑADA, C., WENDLER, F. – Extracellular vesicles round off communication in the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**. 17:3 (2016) 160–72.

CANDELARIO, K. M., STEINDLER, D. A. – The role of extracellular vesicles in the progression of neurodegenerative disease and cancer. **Trends in Molecular Medicine**. 20:7 (2014) 368–374.

CHEN, W. W., BALAJ, L., LIAU, L. M., SAMUELS, M. L., KOTSOPOULOS, S. K., MAGUIRE, C. A., ... SKOG, J. – BEAMing and Droplet Digital PCR Analysis of Mutant IDH1 mRNA in Glioma Patient Serum and Cerebrospinal Fluid Extracellular Vesicles. **Molecular Therapy. Nucleic Acids**. 2 (2013) e109.

COLEMAN, B. M., HILL, A. F. – EXTRACELLULAR VESICLES - Their role in the packaging and spread of misfolded proteins associated with neurodegenerative diseases. **Seminars in Cell and Developmental Biology**. 40 (2015) 89–96.

EITAN, E., HUTCHISON, E. R., MAROSI, K., COMOTTO, J., MUSTAPIC, M., NIGAM, S. M., ... MATTSON, M. P. – Extracellular Vesicle-Associated A β Mediates Trans-Neuronal Bioenergetic and Ca(2⁺)-Handling Deficits in Alzheimer's Disease Models. **NPJ Aging and Mechanisms of Disease**. 2 (2016) 16019.

EL ANDALOUSSI, S., MAGER, I., BREAKFIELD, X. O., WOOD, M. J. – Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**. 12:5 (2013) 347–357.

EMMANOULIDOU, E., MELACHROINOY, K., ROUMELIOTIS, T., GARBIS, S. D., NTZOUNI, M., MARGARITIS, L. H., ... VEKRELLIS, K. – Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. **Journal of Neuroscience**. 30:20 (2010) 6838–6851.

FIANDACA, M. S., KAPOGIANNIS, D., MAPSTONE, M., BOXER, A., EITAN, E., SCHWARTZ, J. B., ... GOETZL, E. J. – Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study. **Alzheimer's and Dementia**. 11:6 (2015) 600–607.e1.

FRASER, K. B., RAWLINS, A. B., CLARK, R. G., ALCALAY, R. N., STANDAERT, D. G., LIU, N., WEST, A. B. – Ser(P)-1292 LRRK2 in urinary exosomes is elevated in idiopathic Parkinson's disease. **Movement Disorders**. 31:10 (2016) 1543–1550.

- FRÜHBEIS, C., FRÖHLICH, D., KUO, W. P., AMPHORN RAT, J., THILEMANN, S., SAAB, A. S., ... KRÄMER-ALBERS, E. M. – Neurotransmitter-Triggered Transfer of Exosomes Mediates Oligodendrocyte-Neuron Communication. **PLoS Biology**. 11:7 (2013).
- GARDINER, C., VIZIO, D. DI, SAHOO, S., THÉRY, C., WITWER, K. W., WAUBEN, M., HILL, A. F. – Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: Results of a worldwide survey. **Journal of Extracellular Vesicles**. 5:1 (2016) 32945.
- GOETZL, E. J., BOXER, A., SCHWARTZ, J. B., ABNER, E. L., PETERSEN, R. C., MILLER, B. L., KAPOGIANNIS, D. – Altered lysosomal proteins in neural-derived plasma exosomes in preclinical Alzheimer disease. **Neurology**. 85:1 (2015) 40–47.
- GOLDIE, B. J., DUN, M. D., LIN, M., SMITH, N. D., VERRILLS, N. M., DAYAS, C. V., CAIRNS, M. J. – Activity-associated miRNA are packaged in Map1b-enriched exosomes released from depolarized neurons. **Nucleic Acids Research**. 42:14 (2014) 9195–9208.
- GREY, M., DUNNING, C. J., GASPAR, R., GREY, C., BRUNDIN, P., SPARR, E., LINSE, S. – Acceleration of α -synuclein aggregation by exosomes. **Journal of Biological Chemistry**. 290:5 (2015) 2969–2982.
- GUI, Y., LIU, H., ZHANG, L., LV, W., HU, X. – Altered microRNA profiles in cerebrospinal fluid exosome in Parkinson disease and Alzheimer disease. **Oncotarget**. 6:35 (2015) 37043–53.
- HE, M., CROW, J., ROTH, M., ZENG, Y., GODWIN, A. K. – Integrated immunoisolation and protein analysis of circulating exosomes using microfluidic technology. **Lab on a Chip**. 14:19 (2014) 3773–3780.
- HU, G., YANG, L., CAI, Y., NIU, F., MEZZACAPPA, F., CALLEN, S., ... BUCH, S. – Emerging roles of extracellular vesicles in neurodegenerative disorders: focus on HIV-associated neurological complications. **Cell Death and Disease**. 7:11 (2016) e2481.
- KALRA, H., SIMPSON, R. J., JI, H., AIKAWA, E., ALTEVOGT, P., ASKENASE, P., ... MATHIVANAN, S. – Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation. **PLoS Biology**. 10:12 (2012) 8–13.

KANWAR, S. S., DUNLAY, C. J., SIMEONE, D. M., NAGRATH, S. – Microfluidic device (ExoChip) for on-chip isolation, quantification and characterization of circulating exosomes. **Lab on a Chip**. 14 (2014) 1891–900.

KIM, D. K., LEE, J., KIM, S. R., CHOI, D. S., YOON, Y. J., KIM, J. H., ... GHO, Y. S. – EVpedia: A community web portal for extracellular vesicles research. **Bioinformatics**. 31:6 (2015) 933–939.

KUCHARZEWSKA, P., CHRISTIANSON, H. C., WELCH, J. E., SVENSSON, K. J., FREDLUND, E., RINGNÉR, M., ... BELTING, M. – Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 110:18 (2013) 7312–7.

KEERTHIKUMAR, S., CHISANGA, D., ARIYARATNE, D., AL SAFFAR, H., ANAND, S., ZHAO, K., ... MATHIVANAN, S. – ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. **Journal of Molecular Biology**. 428:4 (2016) 688–692.

KOWAL, J., ARRAS, G., COLOMBO, M., JOUVE, M., MORATH, J. P., PRIMDAL-BENGTSON, B., ... THÉRY, C. – Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 113:8 (2016) E968–77.

LI, P., KASLAN, M., LEE, S. H., YAO, J., GAO, Z. – Progress in Exosome Isolation Techniques. **Theranostics**. 7:3 (2017) 789–804.

LLORENTE, A., SKOTLAND, T., SYLVÄNNE, T., KAUKANEN, D., RÓG, T., ORŁOWSKI, A., ... SANDVIG, K. – Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**. 1831:7 (2013) 1302–1309.

MAAS, S. L. N., BREAKFIELD, X. O., WEAVER, A. M. – Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. **Trends in Cell Biology**. 27:3 (2017) 172–188.

- MANTEROLA, L., GURUCEAGA, E., PÉREZ-LARRAYA, J. G., GONZÁLEZ-HUARRIZ, M., JAUREGUI, P., TEJADA, S., ... ALONSO, M. M. – A small noncoding RNA signature found in exosomes of GBM patient serum as a diagnostic tool. **Neuro-Oncology**. 16:4 (2014) 520–527.
- MINCIACCHI, V. R., FREEMAN, M. R., DI VIZIO, D. – Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes. **Seminars in Cell and Developmental Biology**. 40 (2015) 41–51.
- POEWE, W., SEPPI, K., TANNER, C. M., HALLIDAY, G. M., VOLKMANN, J., SCHRAG, A., LANG, A. E. – Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**. 3 (2017) 17013.
- RAJENDRAN, L., HONSHO, M., ZAHN, T. R., KELLER, P., GEIGER, K. D., VERKADE, P., SIMONS, K. – Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 103:30 (2006) 11172–7.
- RAJENDRAN, L., BALI, J., BARR, M. M., COURT, F. A., KRAMER-ALBERS, E.-M., PICOU, F., ... BREAKEFIELD, X. O. – Emerging Roles of Extracellular Vesicles in the Nervous System. **Journal of Neuroscience**. 34:46 (2014) 15482–15489.
- RAPOSO, G., STOOORVOGEL, W. – Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**. 200:4 (2013) 373–383.
- RECORD, M., CARAYON, K., POIROT, M., SILVENTE-POIROT, S. – Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**. 1841:1 (2014) 108–120.
- SAMAN, S., KIM, W. H., RAYA, M., VISNICK, Y., MIRO, S., SAMAN, S., ... HALL, G. F. – Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. **Journal of Biological Chemistry**. 287:6 (2012) 3842–3849.
- SHAO, H., CHUNG, J., LEE, K., BALAJ, L., MIN, C., CARTER, B. S., ... WEISSLEDER, R. – Chip-based analysis of exosomal mRNA mediating drug resistance in glioblastoma. **Nature Communications**. 6 (2015) 6999.

SHI, M., LIU, C., COOK, T. J., BULLOCK, K. M., ZHAO, Y., GINGHINA, C., ... ZHANG, J. – Plasma exosomal α -synuclein is likely CNS-derived and increased in Parkinson's disease. **Acta Neuropathologica**. 128:5 (2014) 639–650.

SKOG, J., WÜRDINGER, T., VAN RIJN, S., MEIJER, D. H., GAINCHE, L., SENA-ESTEVEZ, M., ... BREAKEFIELD, X. O. – Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. **Nature Cell Biology**. 10:12 (2008) 1470–6.

THIND, A., WILSON, C. – Exosomal miRNAs as cancer biomarkers and therapeutic targets. **Journal of Extracellular Vesicles**. 5:1 (2016) 31292.

THOMPSON, A. G., GRAY, E., HEMAN-ACKAH, S. M., MÄGER, I., TALBOT, K., ANDALOUSSI, S. EL, ... TURNER, M. R. – Extracellular vesicles in neurodegenerative disease - pathogenesis to biomarkers. **Nature Reviews Neurology**. 12:6 (2016) 346–357.

TOMLINSON, P. R., ZHENG, Y., FISCHER, R., HEIDASCH, R., GARDINER, C., EVETTS, S., ... TOFARIS, G. K. – Identification of distinct circulating exosomes in Parkinson's disease. **Annals of Clinical and Translational Neurology**. 2:4 (2015) 353–61.

VADER, P., BREAKEFIELD, X. O., WOOD, M. J. A. – Extracellular vesicles: Emerging targets for cancer therapy. **Trends in Molecular Medicine**. 20:7 (2014) 385–393.

WANG, S., CESCA, F., LOERS, G., SCHWEIZER, M., BUCK, F., BENFENATI, F., ... KLEENE, R. – Synapsin I Is an Oligomannose-Carrying Glycoprotein, Acts As an Oligomannose-Binding Lectin, and Promotes Neurite Outgrowth and Neuronal Survival When Released via Glia-Derived Exosomes. **Journal of Neuroscience**. 31:20 (2011) 7275–7290.

VELLA, L.J., SHARPLES, R.A., LAWSON, V.A., MASTERS, C.L., CAPPAL, R., HILL, A.F. – Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. **Journal of Pathology**. 211 (2007) 582–590.

WITWER, K. W., BUZÁS, E. I., BEMIS, L. T., BORA, A., LÄSSER, C., LÖTVALL, J., ... HOCHBERG, F. – Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. **Journal of Extracellular Vesicles**. 2 (2013) 1–25.

YÁÑEZ-MÓ, M., SILJANDER, P. R. M., ANDREU, Z., ZAVEC, A. B., BORRÀS, F. E., BUZAS, E. I., ... DE WEVER, O. – Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of Extracellular Vesicles**. 4 (2015) 1–60.

YUYAMA, K., SUN, H., MITSUTAKE, S., IGARASHI, Y. – Sphingolipid-modulated exosome secretion promotes clearance of amyloid- β by microglia. **Journal of Biological Chemistry**. 287:14 (2012) 10977–10989.

ZAPPULLI, V., PUGH FRIIS, K., FITZPATRICK, Z., MAGUIRE, C. A., BREAKEFIELD, X. O. – Extracellular vesicles and intercellular communication within the nervous system. **Journal of Clinical Investigation**. 126:4 (2016) 1198–1207.