

Tânia Patrícia Gil Baptista

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Exossomas: o futuro enquanto transportadores endógenos”

Referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação do Professor Doutor João Nuno Moreira e da Dra. Cláudia Francisco apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Julho, 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



FFUC FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Tânia Patrícia Gil Baptista

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Exossomas: o futuro enquanto transportadores endógenos”

Referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação do Professor Doutor João Nuno Moreira e da Dra. Cláudia Francisco apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Coimbra, julho de 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Tânia Patrícia Gil Baptista, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2013146374, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Exossomas: o futuro enquanto transportadores endógenos” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular 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, 16 de julho de 2018

(Tânia Patrícia Gil Baptista)

Capa

Fonte:<https://ivi-fertility.com/notes/ivi-foundation-demonstrates-for-the-first-time-communication-between-the-future-mother-and-the-embryo-prior-to-implantation/>
[Acedido a 13/07/2018 às 23h42]

Agradecimentos

A Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra facultou-me cinco anos de acolhimento e formação com excelentes profissionais da área das Ciências Farmacêuticas, que me fortaleceram a nível pessoal e profissional. Desta forma, quero começar por agradecer à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pelos cinco magníficos anos de aprendizagem, e principalmente ao Professor Doutor João Nuno Moreira, por toda a compreensão e colaboração na realização da monografia.

Quero agradecer também à Farmácia Campeão, especialmente à Dra. Cláudia Francisco, à Professora Doutora Maria Luisa Sá e Melo, à Dra. Yaron Siegerts e ao Dr. Pedro Ramalho, pelo acolhimento, possibilidade da realização do estágio curricular, pela prática e aquisição de conhecimentos e por me mostrarem o dia-a-dia de um farmacêutico comunitário. Com a equipa desta farmácia entendi um pouco mais sobre a situação atual do mercado farmacêutico, bem como a execução de alguns processos característicos da farmácia comunitária que não são tão desenvolvidos ao longo do ciclo de estudos do MICEF.

Não posso deixar de agradecer aos que sempre estiveram ao meu lado: a minha família, nomeadamente os meus pais e irmãos. A eles o meu mais profundo obrigado por toda a paciência e desabafos, por entenderem ao longo destes cinco anos o porquê de não poder estar presente em muitas ocasiões especiais, e por me apoiarem incondicionalmente em todas as decisões que tomei ao longo da minha vida.

Outra das pessoas a quem quero deixar a minha gratidão é à Inês Silvério. Uma amiga com a qual sei que posso sempre contar independentemente do que precise e esteja eu onde estiver. A ela agradeço-lhe toda a ajuda e suporte e a paciência para me ouvir quando mais preciso, para me aconselhar nesses momentos e por me aturar ao longo de dez anos.

Quero expressar também a minha gratidão a todos os meus amigos. Obrigada pela partilha de bons momentos, pelo apoio e paciência nas alturas difíceis e por estarem sempre disponíveis, fosse para ajudar ou para uma boa risada. Não esquecerei todas as nossas aventuras e momentos únicos.

Resumo

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) é um ciclo de estudos composto por cinco anos de formação rica e capaz de preparar os seus alunos enquanto profissionais da área das Ciências Farmacêuticas.

A fase final deste ciclo de estudos é o estágio curricular que pode ser dividido pelos vários ramos das Ciências Farmacêuticas.

Desta forma, o presente documento contém o Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária, que foi realizado na Farmácia Campeão. Este estágio teve a orientação da Dra. Cláudia Francisco, tendo decorrido entre 2 de abril e 13 de julho de 2018. O relatório de estágio tem como objetivo uma análise SWOT do estágio curricular e da integração e adequação do que foi aprendido no ciclo de estudos do MICF da FFUC num contexto mais prático e profissional.

Este documento único inclui ainda uma monografia intitulada “Exossomas: o futuro enquanto transportadores endógenos”. Esta tem como objetivo perceber o que são os exossomas, as suas funções e mecanismos, de modo a entender como os mesmos podem ser modificados e utilizados numa futura terapêutica, mais especificamente como transportadores endógenos de fármacos.

Palavras-Chave: MICF; Farmácia Comunitária; Exossomas; Cancro

Abstract

The Integrated Master's Degree in Pharmaceutical Sciences (MICF) of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra (FFUC) is a study cycle consisting of five years of rich learning and able to prepare its students as professionals in the area of Pharmaceutical Sciences.

The final phase of this cycle of studies is the curricular stage that can be divided by the various branches of Pharmaceutical Sciences.

In this way, this document contains the Report of Internship in Community Pharmacy, which was held at the Farmácia Campeão. This internship was supervised by Dr. Cláudia Francisco from April 2 to July 13 of 2018. The internship report aims at a SWOT analysis of the curricular internship and the integration and adaptation of what was learned in the MICF study cycle of FFUC in a more practical and professional context.

This single document also contains a monograph entitled "Exossomas: o futuro enquanto transportadores endógenos". It aims to understand what exosomes are, their functions and mechanisms, to understand how they can be modified and used in future therapy, more specifically as endogenous carriers of drugs.

Keywords: MICF; Community pharmacy; Exosomes; Cancer

Lista de Abreviaturas

ABC - *ATP-binding cassette*

AEX - *cell-derived exosomes*

MHC - Complexo Major de Histocompatibilidade

DEX - *Dendritic cell-derived exosomes*

DLS - Dispersão dinâmica da luz

ESCRT - *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*

FFUC - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

GM3 - *N-acetylneurami-nylgalactosylglucosylceramide*

GM-CSF - *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

HSP - *heat shock proteins*

HER2 - recetor de fator de crescimento humano epidérmico 2

IC9 – Itinerário complementar 9

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

mirna - *microRNA*

NK - *natural killers*

OTC - *over the counter*

PI3 cinase - *fosfatidilinositol 3 cinase*

shRNA - *short interfering RNA*

siRNA - *small interfering RNA*

SNARE - *soluble NSF-attachment protein receptor*

TEM - microscópio eletrónico de transmissão

TEX - *tumor cell-derived exosomes*

Th2 - células helper 2

VCI - Via de cintura interna

VIL - Vesículas intraluminais

RESUMO	I
ABSTRACT	II
CAPÍTULO I RELATÓRIO DE ESTÁGIO	
INTRODUÇÃO	1
1. ANÁLISE SWOT (FORÇAS, FRAQUEZAS, AMEAÇAS E OPORTUNIDADES)	2
1.1. FORÇAS	2
1.1.1. LOCALIZAÇÃO E HORÁRIO DE FUNCIONAMENTO.....	2
1.1.2. CARATERÍSTICAS DO LOCAL DE ESTÁGIO	2
1.1.3. INTEGRAÇÃO NA EQUIPA E COM A COMUNIDADE DA FARMÁCIA CAMPEÃO	3
1.1.4. INTERAÇÃO COM A COMUNIDADE.....	3
1.1.5. VALOR DO FARMACÊUTICO NA COMUNIDADE	5
1.1.6. FUNÇÕES AO LONGO DO ESTÁGIO	6
1.1.7. <i>SIFARMA 2000</i> ®	6
1.2. FRAQUEZAS	7
1.2.1. COMUNICAÇÃO ENTRE A EQUIPA	7
1.2.2. PLANO DE ESTÁGIO	7
1.2.3. FALTA DE FORMAÇÃO.....	8
1.2.4. FALTA DE CONFIANÇA NO ATENDIMENTO	8
1.2.5. LOCAL DE PASSAGEM.....	9
1.3. OPORTUNIDADES.....	9
1.3.1. CICLO DE ESTUDOS DO MICF NA FFUC.....	9
1.3.2. FARMÁCIA CAMPEÃO	10
1.3.3. PRODUTOS DE SAÚDE E BEM-ESTAR DE VENDA LIVRE.....	10
1.4. AMEAÇAS	11
2. CASOS PRÁTICOS.....	13
2.1. CASO 1	13
2.2. CASO 2	13
2.3. CASO 3	14
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	15
CAPÍTULO II “EXOSSOMAS: O FUTURO ENQUANTO TRANSPORTADORES ENDÓGENOS”	
RESUMO	15
ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO	17

1. EXOSSOMAS: CARATERÍSTICAS E COMPOSIÇÃO	19
1.1. FORMAÇÃO E SECREÇÃO DE EXOSSOMAS	21
1.1.1. MECANISMO DEPENDENTE DO ESCRT	21
1.1.2. MECANISMO INDEPENDENTE DO ESCRT	23
2. FUNÇÕES.....	26
3. OBTENÇÃO DE EXOSSOMAS.....	26
4. INTRODUÇÃO DE MOLÉCULAS NOS EXOSSOMAS.....	27
4.1. MÉTODOS ENDÓGENOS.....	28
4.1.1.1. Transfecção/sobreexpressão	28
4.1.1.2. “ <i>Sequence sorting mechanism</i> ”	28
4.2. MÉTODOS EXÓGENOS OU DE <i>LOADING</i> DIRETO	29
4.2.1. <i>LOADING</i> ATIVO	29
4.2.1.1. Eletroporação	29
4.2.1.2. Sonicação	30
4.2.1.3. Cloreto de cálcio (CaCl ₂) com choque térmico	30
4.2.1.4. Extrusão	31
4.2.1.5. Ciclos de gelo e degelo.....	31
4.2.1.6. Adição de surfactantes	31
4.2.2. <i>LOADING</i> PASSIVO.....	32
4.2.2.1. Incubação simples com a molécula terapêutica	32
5. INTERNALIZAÇÃO DOS EXOSSOMAS E LIBERTAÇÃO DAS MOLÉCULAS TERAPÊUTICAS NAS CÉLULAS-ALVO	33
6. VANTAGENS E DESVANTAGENS	34
7. APLICAÇÕES.....	36
7.1. DIAGNÓSTICO.....	36
7.2. TERAPÊUTICA	37
7.2.1. TRANSPORTADORES	37
7.2.2. IMUNOTERAPIA	38
7.2.2.1. Cancro da mama	39
7.2.2.2. Glioblastoma multiforme	42
8. CONCLUSÃO.....	44
9. BIBLIOGRAFIA.....	46
10. ANEXOS	55
10.1. GLOSSÁRIO	55
10.2. ANEXO 1	56

10.3. ANEXO 2	57
10.4. ANEXO 3	58
10.5. ANEXO 4	61
10.6. ANEXO 5	62
10.7. ANEXO 6	63
10.8. ANEXO 7	64
10.9. ANEXO 8	65

Índice de Figuras

Figura 1: Imagem obtida por TEM de uma amostra de exossomas isolados por protocolo de ultracentrifugação a partir de soro humano-----	3
Figura 2: Funções biológicas dos exossomas na tumorigênese-----	4
Figura 3: Esquema representativo da secreção de exossomas num modelo de células tumorais--	8
Figura 4: Procedimento geral para o isolamento de exossomas-----	11
Figura 5: Procedimento geral de purificação após o isolamento de exossomas-----	11
Figura 6: A vacina HuRt-TEXO estimula uma potente resposta das células T CD8+. Após 30 dias da vacinação com HuRt-TEXO, os murganhos foram estimulados com células dendríticas contendo HER. Após quatro dias foram recolhidas amostras, que mostram um maior número de células T CD8+ HER2-específica em murganhos vacinados com HuRt-TEXO do que em murganhos vacinados com HER2-TEXO-----	23
Figura 7: A vacina HuRt-TEXO induz uma potente terapêutica imune HER2-específica contra células do canco da mama 4T1HER2 em murganho BALB/c. C: Os murganhos foram injetados com células tumorais e vacinados seis dias depois. Após vinte dias da vacinação com HuRt-TEXO e HER2-TEXO, observou-se a formação de metástases nos murganhos controlo e em menor número nos vacinados com HER2-TEXO, sendo que o menor número de metástases apareceu em murganhos vacinados com HuRt-TEXO. E: observa-se que o crescimento tumoral é maior nos controlos, seguindo-se dos murganhos vacinados com HER2-TEXO, e o menor crescimento foi encontrado nos animais vacinados com HuRt-TEXO-----	24
Figura 8: A citotoxicidade dos exossomas contra as células do glioblastoma multiforme. À cultura de células tumorígenas juntou-se-lhe exossomas criados em diferentes concentrações. As imagens foram obtidas com bioluminescência e traduzidas em gráficos por um software. Através da sua análise, observa-se uma diminuição das células com uma dosagem de 5mg, sendo esta descida mais acentuada ainda com a dosagem de 20mg-----	26

CAPÍTULO I
RELATÓRIO DE ESTÁGIO

Introdução

O ciclo de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) ministrado na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) é um curso com o objetivo de formar profissionais competentes na área das Ciências Farmacêuticas. Ao longo de cinco anos são administrados conhecimentos teóricos desta mesma área e dos diversos ramos que a compõem, culminando tudo com a práticas desses mesmo conhecimentos no estágio curricular.

A FFUC dá a excelente oportunidade aos seus alunos de poderem dividir o estágio curricular nos principais ramos da área.

A escolha da Farmácia Campeão para o estágio curricular deveu-se tanto à proximidade à residência, bem como a um estágio extracurricular realizado no verão de 2015, o que possibilitou o conhecimento do espaço e da equipa.

O estágio curricular é uma grande vantagem num ciclo de estudos, porque permite ao aluno praticar e aplicar os conhecimentos teóricos, aprender mais sobre as suas funções enquanto farmacêutico e ainda conhecer um pouco mais sobre o mercado de trabalho.

É importante tirar partido do estágio curricular com o decorrer deste, através de uma aprendizagem diária sobre os processos operados no local de estágio, sempre aplicando os conhecimentos apreendidos com o ciclo de estudos do MICF. O estagiário também se deve integrar na equipa e seguir o mesmo rumo e missão da farmácia acolhedora. No caso da Farmácia Campeão procura-se satisfazer cada utente com um atendimento personalizado e o mais atencioso e informativo possível, confluindo com a missão da empresa: “o bem-estar dos utentes é a nossa prioridade”.

Este relatório de estágio contém uma análise SWOT do estágio realizado. Desta forma, estão presentes as Forças (*Strengths*), Fraquezas (*Weaknesses*), Oportunidades (*Opportunities*) e Ameaças (*Threats*) do estágio curricular realizado entre 2 de abril e 13 de julho de 2018, estando intimamente relacionadas com o ciclo de estudos do MICF da FFUC. Na última parte são ainda apresentados casos práticos, onde foi possível aplicar conhecimentos adquiridos ao longo do ciclo de estudos e do estágio num contexto de atendimento ao utente.

1. Análise SWOT (Forças, Fraquezas, Ameaças e Oportunidades)

1.1. Forças

1.1.1. Localização e horário de funcionamento

A Farmácia Campeão encontra-se próxima a duas das artérias de maior circulação em Alcobaça, a IC9 e VCI. Também, a sua contiguidade tanto com o Hospital Bernardino Lopes de Oliveira, como com um supermercado e o acessível estacionamento, tornam esta farmácia um local de rápido e fácil acesso pelos utentes que estão de passagem.

O horário alargado e interrupto de segunda a sexta entre as 8h30 e as 20h30 e aos sábados entre as 9h e as 19h dá ao utente a flexibilidade de poder adquirir bens quando lhe é mais conveniente. O mesmo horário também oferece aos colaboradores alguma elasticidade para tratarem de assuntos pessoais quando necessário, pois têm um emprego por turnos.

1.1.2. Características do local de estágio

Apesar da Farmácia Campeão ter 112 anos de existência, foi transferida para um novo edifício há seis anos, mantendo-se da mesma forma em Alcobaça. Esta realocação permitiu à farmácia fazer um *upgrade* nas suas características.

Atualmente, a farmácia é um local constituído por um vasto espaço de acolhimento ao utente capaz de mostrar as inúmeras marcas de produtos “*over the counter*” (OTC’s) e dermocosmética que a comunidade desta farmácia tem à sua disposição. Além disso, possui três gabinetes. Dois deles são utilizados para os diversos serviços oferecidos, como nutrição e dietética e enfermagem. Enquanto o terceiro está ao uso dos farmacêuticos e técnicos de farmácia para as medições de glicémia, pressão arterial, triglicérides, colesterol total, HDL, LDL e ácido úrico.

No seu interior, a farmácia contempla uma sala de reuniões, onde também são dadas formações; um laboratório com o tamanho adequado para a preparação dos poucos manipulados solicitados; e um conjunto de deslizantes para armazenamento de dispositivos, produtos OTC’s e de dermocosmética. Esta farmácia adquiriu recentemente um robot para a armazenagem de medicamentos, o que torna o trabalho no “*backoffice*” e no “*frontoffice*” muito mais rápido e eficiente. Para tal, contribuem a diminuição de erros

na entrada, arrumação e na dispensa ao utente, uma armazenagem mais eficiente e um mais rigoroso controlo de stocks e validades dos medicamentos.

1.1.3. Integração na equipa e com a comunidade da Farmácia Campeão

Para a formação de um bom farmacêutico comunitário e de um bom profissional, é indispensável uma boa equipa que saiba integrar um estagiário.

A Farmácia Campeão tem sem dúvida uma excelente equipa de farmacêuticos com elevados conhecimentos técnicos que partilharam sempre que possível e quando solicitado. Isto, bem como, a simpatia da equipa e o estágio extracurricular realizado há cerca de três anos permitiram uma boa integração neste local de estágio.

Além do mais, esta mesma equipa mostrou num contexto prático o quão importante é o farmacêutico na comunidade, já que o mesmo assunto havia sido abordado ao longo do ciclo de estudos.

A equipa da Farmácia Campeão possibilitou a integração da estagiária em projetos da equipa, como em ações e atividades de formação de diversas marcas, bem como em novos projetos da equipa, como uma competição promovida pela Bioderma® e o “MighT World”. Este último projeto consiste numa avaliação por parte dos elementos da equipa, utentes e familiares, de modo a que cada colaborador possa ter noção das suas mais valias e características.

A interação com os utentes desta farmácia também foi facilitada, através da demonstração de empatia com o utente e de conhecimentos técnicos com as soluções apresentadas e os esclarecimentos feitos ao seu problema e/ou produto. Estas particularidades transmitem confiança aos utentes que possam inicialmente ter alguma relutância ao serem atendidos por um estagiário.

Outras das forças deste local de estágio são o “*pharmadrive*”, para utentes com dificuldades de locomoção e/ou necessitem de um atendimento mais rápido, e o *Pharmashop24*®, que possibilita à comunidade meios mais cómodos de obterem produtos de saúde e bem-estar de venda livre, mesmo quando a farmácia está fechada.

1.1.4. Interação com a comunidade

A Farmácia Campeão prima pela sua integração e preocupação com a comunidade que a rodeia. Desta forma, cria diversas atividades que apelem e interessem aos utentes.

Ao longo do estágio foi possível observar várias atividades e workshops desenvolvidos, muitas vezes direcionados para dermocosmética. Contudo, existiu uma atividade com a participação ativa da estagiária, sendo esta mais direcionada à saúde dos utentes: o “Mês do Coração”.

O “Mês do Coração” ocorreu ao longo de todo o mês de maio com atividades diferentes dependendo da semana e sempre tendo em conta o risco cardiovascular. Na primeira semana foi feita uma avaliação do peso dos utentes da farmácia, alertando sempre que tal se justificasse para a problemática do excesso de peso no risco cardiovascular. Os resultados foram anotados num formulário igual ao presente Anexo 1, e foram distribuídos folhetos aos utentes (Anexo 2)

A segunda semana foi dedicada à hipertensão, sendo que ao longo de toda a semana foi medida a pressão arterial aos utentes. Além disto, distribuíram-se folhetos com a problemática da hipertensão no risco cardiovascular (Anexo 3) e os resultados foram registados num formulário igual ao presente no Anexo 4. Nas duas semanas seguintes seguiu-se o mesmo procedimento da segunda semana. Na terceira semana foram abordados o colesterol e o risco cardiovascular, com medições do colesterol total (Anexo 5 e Anexo 6). A quarta e última semana debruçou-se sobre a temática da diabetes e o risco cardiovascular, com a medições da glicémia aos utentes (Anexo 7 e Anexo 8).

Esta farmácia também participa no Programa de Troca de Seringas. Esta é uma grande vantagem para a comunidade, já que contribui para a diminuição de doenças transmissíveis através da partilha ou picada de seringas infetadas. Além disso, sensibiliza os toxicod dependentes para estes perigos.

Todas as atividades desenvolvidas por esta farmácia e a preocupação do farmacêutico com os seus utentes, bem como o bom aconselhamento no atendimento, leva à fidelização dos utentes à farmácia. Esta situação, além de trazer vantagens para a farmácia, possibilita aos farmacêuticos conhecer o utente, o seu perfil farmacoterapêutico e o seu histórico de medicamentos, medicamentos não sujeitos a receita, suplementos, produtos de dermocosmética e outros bens de venda livre.

Este estágio curricular também possibilitou o contacto com delegados de informação médica, fornecedores e médicos. Esta é uma área também muito importante,

porque o discurso que se tem com os utentes é diferente daquele que se tem com outros profissionais de saúde. Este implica uma linguagem muito mais técnica, tendo em conta o bem-estar e a saúde do doente. Neste discurso também é importante o respeito de parte-a-parte e uma clara explicação do problema, de modo a que o problema em questão se resolva rapidamente e de encontro ao bem-estar do doente.

1.1.5. Valor do farmacêutico na comunidade

Todos os dias é possível observar o valor do farmacêutico na comunidade onde se insere.

O farmacêutico é o especialista do medicamento, o que permite ao utente ter um aconselhamento de qualidade e personalizado em relação à sua terapêutica. No entanto, o farmacêutico é também uma ponte entre os profissionais de saúde e o utente devendo adequar a sua linguagem conforme a quem quer transmitir a informação, de modo a gerar no seu conjunto um melhor bem-estar ao utente.

É dever de um farmacêutico prestar o melhor cuidado possível ao doente, ao assegurar que o doente está a tomar “o medicamento certo, na dose certa, no momento certo, ao doente certo e ao preço certo”¹. Todos os atendimentos devem ser personalizados e adaptados a cada utente. Por isso, aquando do aconselhamento tanto sobre medicamentos não sujeitos a receita médica, bem como outros produtos de venda livre, tais como suplementos, dispositivos, produtos de veterinária, puericultura e dermocosmética, deve-se ter em atenção às patologias e terapêutica do utente, pois nesta situação o doente confia a sua saúde ao farmacêutico.

O farmacêutico tem também uma atuação indireta nas populações onde se insere, através de iniciativas de promoção e educação para a saúde e de promoção da adesão da terapêutica. Estas atividades contribuem para um melhor bem-estar e melhoria tanto na saúde individual, como na saúde coletiva da comunidade.

Desta forma é possível notar a importância e a mais-valia de existirem farmacêuticos junto das comunidades.

1.1.6. Funções ao longo do estágio

No decorrer do estágio curricular houve a possibilidade de percorrer e conhecer todas as valências da farmácia comunitária. Nos primeiros dois meses foi dado a conhecer os diversos processos do “*backoffice*”, tais como:

- receção de encomendas;
- devoluções de produtos;
- regularizações de notas de crédito;
- recolha de produtos, tanto devido a validades como a circulares emitidas por fornecedores, laboratórios ou INFARMED;
- conferência de validades.

Depois destes primeiros meses, o “*frontoffice*” passou a estar em destaque na aprendizagem. No mesmo existiu um contacto mais próximo com os utentes e com os vários processos desta área.

O “*frontoffice*” permite o contacto com os diversos tipos de receitas e planos de participação. O atendimento aos doentes deve ser suplementado com informações úteis, tal como reações adversas, contraindicações e posologia dos produtos adquiridos. Esta interação com utentes da farmácia cria abertura para o aconselhamento farmacêutico tanto a nível dermocosmético, bem como em relação a medicamentos não sujeitos a receita médica, puericultura e outras áreas. Entre estes incluem-se suplementos, produtos buco-dentários, dispositivos médicos, produtos de emagrecimento e dieta, entre outros.

A preparação de manipulados e suspensões extemporâneas para os utentes, com especial atenção para a boas práticas farmacêuticas, através de uma boa preparação, utilização e conservação do medicamento, foi também uma das oportunidades oferecidas durante o estágio curricular.

1.1.7. Sifarma 2000®

O *Sifarma 2000*® é uma ferramenta desenvolvida pela *Glintt* e cada vez mais indispensável no dia-a-dia das farmácias. Em Portugal, 90% das farmácias já a utilizam, incluindo a Farmácia Campeão².

Este programa informático permite aceder às receitas eletrónicas, em papel e sem papel, às receitas manuais renováveis e às receitas manuais não renováveis de uma forma rápida e eficiente. Com a introdução das receitas eletrónicas no sistema verificou-se uma diminuição dos erros na dispensa dos medicamentos do doente, o que ainda sofreu um decréscimo mais significativo com o uso do robot. Além disso, o *Sifarma 2000*[®] possibilita o acesso ao histórico do doente, caso ele possua ficha na farmácia, o que muitas vezes o ajuda a obter precisamente os medicamentos que leva habitualmente. Da mesma forma, o *Sifarma 2000*[®] alerta para possíveis interações na prescrição, bem como faz referência a contra-indicações dos produtos adquiridos. Caso existam dúvidas sobre interações com outra medicação comitente é possível esclarecê-la, sempre conscientemente que estamos a lidar com um programa que não tem toda a informação disponível.

O *Sifarma 2000*[®] tem também uma importante relevância na receção de encomendas, na devolução de produtos, receituário, desempenho do colaborador, conferências de validades, regularização de notas de crédito, entre outras, porque possui ferramentas capazes de auxiliar em todas estas tarefas.

1.2. Fraquezas

1.2.1. Comunicação entre a equipa

Durante o estágio, denotou-se algumas falhas na comunicação entre a equipa, o que gera algumas diferenças na execução dos processos. Para tal situação contribui o horário por turnos, porque apesar de trazer vantagens já enunciadas anteriormente, leva a que a equipa não esteja toda reunida ao mesmo tempo no mesmo local. Desta forma, cria-se também uma desunião da equipa, o que conseqüentemente possibilita alguma desorganização e colaboração contraproducente dos funcionários.

1.2.2. Plano de estágio

A observação de atendimentos antes de proceder ao atendimento e receção de utentes na farmácia de uma forma independente foi baixa, sendo isto considerado um ponto negativo. Seria uma vantagem a assistência a um maior número de atendimentos efetuados pelos colaboradores. Esta situação possibilitaria uma maior atenção a certos pormenores durante o atendimento, um melhor aconselhamento de produtos de maior interesse para a farmácia e uma melhor aprendizagem em relação a algumas situações

mais específicas ou mais recorrentes, que requeiram um trabalho diferente durante o atendimento.

Todavia, esta fraqueza foi contornada através da experiência que se foi adquirindo, de questões aos colaboradores durante os atendimentos e fora dos mesmos através de problemas-caso, e, também, ao relembrar alguns conhecimentos aprendidos ao longo do ciclo de estudos do MICF da FFUC.

1.2.3. Falta de formação

No decorrer deste estágio de quatro meses existiram diversas formações. Contudo, a maioria ocorreu de uma forma rápida durante o horário de trabalho, através dos delegados de informação médica, sendo que apenas uma (Formação da Globalvet®) foi conduzida fora do horário laboral.

Desta forma, para a grande parte das formações, apenas existiu a possibilidade de serem destacadas as vantagens dos produtos, o que não permitia o desenvolvimento de grandes detalhes em relação a interações, eficácia e efeitos adversos nos utentes.

Além disso, grande parte das formações foi direcionada à dermocosmética, o que deixou muito espaço de abertura para conhecimentos sólidos sobre suplementos. Ainda que o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) seja muito rico em diversas valências, deixa os seus alunos pouco preparados para aconselhar dermocosmética e suplementos. Todavia, esta é uma área muito vasta, tendo cada farmácia as suas preferências e a impossibilidade de o ciclo de estudos do MICF abordar todos os produtos do mercado.

É importante continuar o trabalho realizado já nas unidades curriculares de Farmacoterapia e Intervenção Farmacêutica em Auto-cuidados de Saúde e Fitoterapia do ciclo de estudos do MICF da FFUC, progredindo para uma maior abrangência de suplementos e dermocosmética.

1.2.4. Falta de confiança no atendimento

O ciclo de estudos do MICF da FFUC oferece aos seus alunos uma vastidão de conhecimentos teóricos, mas tem algumas falhas relativamente à prática ou simulação dos mesmos antes do início do estágio curricular. Contudo um bom trabalho nesse sentido tem sido desenvolvido em unidades curriculares como Farmacologia II, Farmácia Clínica,

Farmacoterapia e Intervenção Farmacêutica em Auto-cuidados de Saúde e Fitoterapia no ciclo de estudos do MICF da FFUC. No entanto, num contexto mais profissional, tal como é o estágio curricular, é importante que o utente sinta confiança relativamente ao que lhe é transmitido do outro lado, e, para isso, é necessário que o estagiário sinta essa mesma confiança.

Em relação às atividades de “*backoffice*”, quando se fazem vários estágios extracurriculares abordando esta mesma área, é mais fácil para o estagiário sentir-se mais confiante com as tarefas aí desenvolvidas.

Contudo, é importante a partilha de conhecimentos com a restante equipa ao longo do estágio, de modo a que se transmitam aprendizagens adquiridas com a experiência, mas também o estagiário se sinta ajudado e apoiado quando necessário. Deste modo, eleva-se também o grau de confiança do estagiário aquando do atendimento aos utentes e na realização das tarefas atribuídas.

1.2.5. Local de passagem

A maioria da comunidade da Farmácia Campeão caracterizam-se por utentes que estão de passagem, seja pela proximidade ao hospital, como ao centro escolar do concelho. Desta forma, o maior volume de trabalho ocorre durante o ano letivo, denotando-se uma diminuição aquando das férias escolares.

1.3. Oportunidades

1.3.1. Ciclo de estudos do MICF na FFUC

O ciclo de estudos do MICF da FFUC permite aos seus estudantes estagiar na maior parte das valências das Ciências Farmacêuticas. Isto revela uma maior sensibilidade à vontade dos alunos que frequentam esta faculdade em poder experimentar as áreas que lhes geram maior interesse. Esta característica é sem dúvida uma grande oportunidade que não se encontra em outras faculdades do país e traz aos estudantes uma maior perceção da realidade profissional na(s) área(s) do estágio curricular escolhida(s).

Este curso também pode e deve direcionar ou criar novas unidades curriculares com vista a uma maior confiança do estudante em situações práticas de aconselhamento perante o doente, bem como de maiores conhecimentos práticos acerca de suplementos e dermocosmética. Apesar de haver uma unidade curricular destinada à dermocosmética,

Dermofarmácia e Cosmética, esta está mais direcionada para a formulação dos produtos, do que para o seu aconselhamento prático. Deste modo, é cada vez mais relevante a aplicação de casos práticos ao longo das aulas, porque deixa os estudantes mais confiantes para o aconselhamento aos utentes.

A existência de mais estágios ao longo do curso seria uma grande vantagem para este ciclo de estudos, já que possibilitaria aos alunos um maior conhecimento de processos e segurança relativamente às várias áreas das Ciências Farmacêuticas.

1.3.2. Farmácia Campeão

A Farmácia Campeão dispõe de diversos serviços de base farmacêutica aos seus utentes, mas estes estão mais direcionados aos parâmetros bioquímicos.

É importante a implementação neste local de serviços com uma abordagem mais clínica aos utentes. Entre estes encontram-se a revisão da terapêutica, o embalamento individualizado da medicação, a realização de mais rastreios e um acompanhamento mais personalizado e detalhado da terapêutica que o utente faz.

A implementação destes serviços oferece ao utente uma terapêutica mais segura, porque é possível verificar os medicamentos que têm reações adversas, os que estão duplicados e os que não se encontram indicados tendo em conta as patologias e os medicamentos não sujeitos a receita médica, suplementos e produtos naturais utilizados pelo doente. Os rastreios possibilitam ao utente promover novos e melhores hábitos de vida que retardem o aparecimento de algumas patologias, ou um acompanhamento mais precoce das patologias.

1.3.3. Produtos de saúde e bem-estar de venda livre

O farmacêutico tem conhecimentos técnico-científicos que o capacitam de aconselhar suplementos, medicamentos não sujeitos a receita médica e produtos de dermocosmética.

Este conhecimento confere a oportunidade ao utente de poder adquirir um produto adequado à sua necessidade, sem ter de recorrer desnecessariamente a serviços médicos. Já à farmácia dá a chance de não só satisfazer o utente, bem como ter uma maior margem de lucro no produto vendido, quando a situação se adequa.

1.4. Ameaças

Relativamente às ameaças encontradas, realça-se o ciclo de estudos do MICF da FFUC por não conter no seu plano curricular uma unidade curricular vocacionada para a comunicação do farmacêutico com os utentes. Esta é muito importante, porque ajuda a adequar a linguagem ao utente de forma a que ele entenda como utilizar o medicamento, suplemento, dispositivo e/ou produtos de puericultura e dermocosmética. Contribuiu para a aplicação dos conhecimentos teóricos em situações-caso práticas. E também transmite confiança ao estagiário para o atendimento, e ainda lhe destaca pontos em que deve ter atenção ao longo do mesmo.

Já em relação ao estágio na Farmácia Campeão é de realçar que vários utentes referiam comprar medicamentos sujeitos a receita médica facilmente noutras farmácias das proximidades. Este comportamento é uma ameaça tanto para a farmácia em si, mas principalmente para o valor do farmacêutico na comunidade, que é desta forma desvalorizado, pois as pessoas vêm nele apenas um meio para chegar ao medicamento.

Outra das questões levantadas pelos utentes foi o preço dos produtos, principalmente os não sujeitos a receita médica. Os utentes conseguiam encontrar os mesmos mais baratos noutros locais, nomeadamente em parafarmácias de grandes superfícies comerciais. Esta é talvez um dos maiores concorrentes para todas as farmácias, porque as compras em bloco praticadas pelas parafarmácias permitem-lhes obter descontos muito superiores aos das farmácias, conseguindo elas desta forma praticar um preço mais baixo.

Esta situação gera uma fuga de alguns utentes das farmácias, devido aos preços praticados e à comodidade oferecida, pois estão localizadas nas proximidades de um supermercado, evitando a deslocação do utente para outro local.

As farmácias estão muito dependentes do Governo Português, porque cerca de 71% do volume de vendas, em 2016, provém de medicamentos sujeitos a receita médica³. Desta forma, o lucro das farmácias e a sua sustentabilidade estão muito relacionados com as margens destes medicamentos, que são geridas pelo estado português. Em 2012 observou-se o impacto que estes medicamentos e as suas margens têm nas farmácias. No mesmo ano, o Governo Português baixou muito as margens dos medicamentos sujeitos a receita médica, o que gerou uma grande insustentabilidade nas farmácias.

A insustentabilidade das farmácias leva a encerramentos permanentes, o que condiciona a obtenção de medicamentos por algumas populações. Isto, a par com a crise económica que afetou bastante as famílias portuguesas, limitou o poder de compra disponível para a aquisição de medicamentos. Desta forma, ocorre uma menor adesão à terapêutica, o que agrava as patologias e a saúde dos doentes. Pode-se assim afirmar que a verdadeira ameaça para o bem-estar do utente reside na não-adesão da terapêutica, o que muitas vezes depende de questões económicas.

2. Casos Práticos

2.1. Caso 1

Uma senhora com cerca de 50 anos entra na farmácia e observa atentamente a área dos produtos de higiene íntima. Após lhe perguntar se solicitava de ajuda, refere que procurava algo que ajudasse com a irritação vulvar.

Por isso, questionei se já estava na menopausa, ao que me disse que sim. No entanto, perguntei também se notava algum corrimento branco a amarelo anormal, para despistar uma possível candidíase, ao que me respondeu que não. Contudo acrescentou que sentia um mau cheiro. Perguntei se sentia ardor a urinar, urinava com mais frequência ou notou alguma diferença na cor da urina, ao que me respondeu negativamente a tudo. Aproveitei ainda para perguntar se fazia alguma higiene íntima com alguma solução de lavagem, o que disse também que não

Através dos conhecimentos adquiridos no ciclo de estudos do MICF da FFUC, sei que uma mulher menopáusica tem muitas alterações hormonais. Esta situação pode provocar desidratação vulvar e vaginal, mas também uma maior recorrência de infeções urinárias e candidíase. Após ter despistado estas duas últimas situações, percebi que se deveria tratar de uma situação desidratação. Desta forma, recomendei uma solução de higiene íntima hidratante e um creme hidratante vulvar.

2.2. Caso 2

Senhora com idade entre os 40 e 45 anos dirige-se à farmácia afirmando que está sente a sua pele está seca e que necessitava de algo que a ajudasse com esse problema.

Questionei-a em relação ao tipo de pele disse-me que tem pele seca e sensível. Após uma observação mais atenta reparo que tem a zona do nariz brilhante. Pergunto-lhe se colocou creme antes de sair de casa, ao que me respondeu que sim, mas que isso já teria sido cerca das 8h. Tendo em conta que já passavam das 13h percebi que me encontra diante de uma pele mista e desidratada.

Explico a diferença entre pele seca e desidratada à utente. Pergunto-lhe quais os seus cuidados diários relativamente ao rosto. Compreendo que a utente usa um creme diário adequado a peles desidratadas e que não o queria desperdiçar. Desta forma, aconselho uma

água micelar para peles desidratadas e um sérum para o mesmo efeito. Recomendo a utilização do sérum de manhã e à noite, devendo a mesma continuar com o seu creme diário, podendo-o colocar de manhã, após o sérum.

2.3. Caso 3

Homem com cerca de 35 anos apresentou-se ao balcão dizendo que queria um xarope para a tosse seca. Perguntei-lhe se teve alguma gripe ou constipação com tosse recentemente, ao que me responde afirmamente, pois teria tido gripe na semana anterior. Questionei um pouco mais sobre o tipo de tosse e se sentia que quando tossia tinha alguma expetoração que parecia presa e não saía ao que me disse que sim.

Com esta análise percebi que teria uma tosse com expetoração e necessitava de um mucolítico, de modo a que este se tornasse menos espesso e o organismo o conseguisse expulsar. Perguntei se tinha mais algum problema de saúde, tal como problemas de estômago ou diabetes ou se tomava outra medicação, ao que me respondeu que não.

Tendo em consideração o pedido por um xarope optei pelo Bisolvon® Linctus Adulto (Cloridrato de Bromexina). Expliquei que deveria beber muita água e nos primeiros dias sentiria mais tosse. Alertei também para caso a tosse não melhorasse nos próximos três a cinco dias, que se deveria dirigir a uma unidade de saúde.

3. Considerações finais

O estágio curricular é uma mais-valia para o culminar de cinco anos de conhecimentos transmitidos por excelentes profissionais. Isto, porque permite consolidar estes mesmos conhecimentos e aprender novas técnicas utilizadas usualmente nas farmácias portuguesas. Além disso, possibilita a perceção de capacidades e aptidões, mas também de falhas que o estagiário tem a melhorar.

Este estágio permite um melhor entendimento sobre todos os processos da farmácia comunitária, bem como sobre o exigente mercado farmacêutico. O que traz um crescimento para a realidade e oferece uma maior competência ao estagiário.

É importante aproveitar todos os momentos e oportunidades fornecidas neste momento de aprendizagem, de modo a contrapesar algumas falhas existentes na formação com o ciclo de estudos MICF da FFUC.

Na Farmácia Campeão foram diariamente transmitidas técnicas para um atendimento cada vez mais focado, personalizado e de encontro ao bem-estar do utente, mas também para uma realização de tarefas e processos cada vez mais eficientes.

A partilha de conhecimentos e práticas através dos estagiários torna-se assim essencial para as instituições académicas e para as instituições acolhedoras de estágio, porque mostra o paradigma atual da área, mas também leva à troca de experiências e novos conhecimentos.

CAPÍTULO II

“Exossomas: o futuro enquanto transportadores endógenos”

Resumo

Esta monografia aborda os exossomas desde a sua formação e composição até às possíveis aplicações destes em diversas patologias. Contempla ainda pontos como o *uptake* de carga exossomal e as suas vantagens e desvantagens. Em relação às aplicações considera o diagnóstico e principalmente a terapêutica, especificamente no cancro da mama e do glioblastoma multiforme.

Os exossomas são vesículas de origem endossomal capazes de transportar pequenas moléculas e ácidos nucleicos. Têm a característica de serem produzidos em praticamente todas as células, o que lhes confere a grande vantagem de serem encontrados em praticamente todos os fluídos do organismo.

Inicialmente, julgava-se que os exossomas apenas serviam como um meio para eliminar moléculas sem interesse para as suas células de origem. No entanto, com o avançar da investigação sobre estas vesículas, descobriu-se que têm um papel muito relevante na comunicação intercelular.

Tal descoberta despoletou a investigação dos exossomas, revelando uma elevada importância e inovação tanto em terapêutica como no diagnóstico de diversas patologias. Estes diversos avanços determinaram a escolha e o interesse neste tema, o que levou à concretização desta monografia.

Com este trabalho pode-se concluir que, apesar dos exossomas mostrarem um imenso potencial, enquanto agentes imunoterapêuticos, agentes transportadores e agentes usados em diagnóstico, ainda demorará até poderem ser utilizados eficazmente e eficientemente em humanos. Como tal, será apenas uma questão de tempo e investigação até que se ultrapassem os problemas encontrados atualmente, e se consiga utilizar exossomas ou vesículas baseadas em exossomas em diagnóstico e terapêutica de diversas patologias.

Abstract

This monograph deals with the exosomes since their formation and composition to the possible applications of these in diverse pathologies. It also includes points like uptake of exosomal cargo and advantages and disadvantages. Regarding applications, it considers the diagnosis and especially the therapeutics, specifically in breast cancer and glioblastoma multiform.

Exosomes are vesicles of endosomal origin capable of transporting small molecules and nucleic acids. They have the characteristic of being produced in almost all the cells, which gives them the great advantage of being found in almost all the body fluids.

Initially, it was thought that exosomes only served to expel molecules of no interest to their source cells. However, with the advancement of research on these vesicles, it has been found that they play a relevant role in intercellular communication.

This discovery triggered the investigation of exosomes, revealing a high importance and innovation both in therapeutics and in the diagnosis of several pathologies. These advances determined the choice and the interest in this theme, which led to the realization of this monograph.

With this work, it can be concluded that although the exosomes show immense potential, as immunotherapeutic agents, transporters and agents used in diagnosis, it will take time until they can be used efficiently and with a good efficacy in humans. Furthermore, it will only be a matter of time and research until the problems currently encountered are overcome, and exosomes or exosomes-based vesicles can be used in diagnosis and therapy of various pathologies.

Introdução

Esta monografia tem como tema os exossomas e aborda as competências dos mesmos enquanto possíveis transportadores endógenos e estimuladores do sistema imune.

Os exossomas foram primeiramente descritos por HARDING et. al. (1983) e por PAN et. al. (1983), sendo que ainda não eram referenciados como exossomas, tendo isso ocorrido apenas anos mais tarde⁴⁻⁶. Também no início se consideravam os exossomas como os “*caixotes do lixo das células*”, pois julgava-se que apenas eram uma forma de a célula expulsar as moléculas que não lhe tinham interesse⁷.

No entanto, com o tempo descobriu-se que estas vesículas de origem endossomal⁸ permitiam a comunicação entre as células, mesmo que estas estivessem a distâncias significativas umas das outras⁹. Esta descoberta abriu portas ao uso de exossomas no diagnóstico e na terapêutica, tendo-se mostrado a elevada importância dos exossomas nestas áreas.

Todo este desenvolvimento tornou os exossomas num assunto da ordem do dia, o que muito influenciou a escolha deste tema para esta monografia. Já que nos últimos anos os exossomas têm demonstrado cada vez a sua relevância em diagnósticos e tratamentos de doenças onde a terapêutica atual não seja eficaz e em doenças que requerem especificidade e precisão do alvo celular. Exemplos disso são o transporte de moléculas terapêuticas que não conseguiam chegar à célula alvo¹⁰, a diminuição de resistências a fármacos¹¹ e diagnósticos sem necessidade de métodos invasivos¹².

Objetiva-se com este trabalho conseguir primeiramente compreender o que são os exossomas, a sua formação e entrada de carga e vantagens e desvantagens. Para que se possa perceber em como são relevantes para alteração do paradigma de terapêuticas e diagnósticos atualmente. Por isso, no final apela-se às aplicações destas vesículas e a exemplos práticos que demonstrem essa mesma possível mudança.

Desta forma, esta monografia aborda a formação e composição exossomal, a obtenção de exossomas, a introdução de moléculas nestas vesículas e a sua libertação em células-alvo. Além destas questões contempla ainda vantagens e desvantagens dos exossomas e as suas aplicações, tendo-se neste ponto especificado alguns estudos sobre

os desenvolvimentos terapêuticos com exossomas no cancro da mama e no glioblastoma multiforme.

Apesar da rápida evolução da ciência neste assunto e dos inúmeros exemplos existentes, os exossomas ainda estão longe de estarem presentes numa terapêutica custo-eficiente⁹ num futuro próximo. A principal causa disso é a dificuldade em obter exossomas em quantidades e qualidade suficiente para produções em larga escala^{13,14}.

Enquanto este obstáculo não é ultrapassado perspectiva-se também que se possam criar vesículas artificiais baseadas nos exossomas¹⁵. No entanto, também estas estão longe de uma realidade próxima, pois a estrutura exossomal ainda não é conhecida com elevada exatidão, o que pode originar problemas de citotoxicidade¹⁵. Devendo-se esta situação às diferenças encontradas em exossomas de diferentes células¹⁵.

1. Exossomas: características e composição

Os exossomas são vesículas extracelulares secretadas da membrana plasmática de praticamente todas as células^{16,17}, tal como células dendríticas, linfócitos B, adipócitos, células endoteliais, células epiteliais⁷, plaquetas⁸, entre outras. As vesículas podem ser secretadas tanto em condições normais, como em condições patológicas¹⁸. Estas apresentam a forma de *cup shape*^{17,19,20} ou *saucer-like*^{16,18} e, tal como se observa na Figura 1¹⁷, têm um tamanho entre 30 e 150nm de diâmetro^{19,21-23}. No entanto, sendo que os exossomas de proveniência tumoral têm um maior tamanho¹⁹, quando visualizados com um microscópio eletrónico.

É possível encontrar exossomas na maioria dos fluídos corporais^{7,8}, são exemplos o sangue, o fluído amniótico, a urina, o leite, a saliva e o fluído cérebrorraquidiano^{8,17,18}. A membrana dos exossomas é composta maioritariamente por uma bicamada fosfolipídica^{18,24} e por um conjunto específico de proteínas, já que os exossomas são compostos por um compartimento subcelular específico²⁵. A membrana é enriquecida com *lipid rafts*⁸, colesterol, diglicerídeos, glicerosfosfolípidos, fosfolípidos, fosfatidilserina, esfingolípídeos ou glicosilceramidas, tal como esfingomiéline e ceramida^{7,25}.

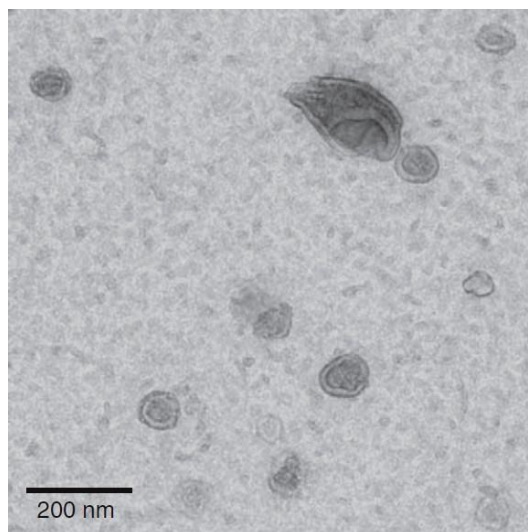


Figura 1: Imagem obtida por TEM de uma amostra de exossomas isolados por protocolo de ultracentrifugação a partir de soro humano

Fonte: VLASSOV, A. V., MAGDALENO, S., SETTERQUIST, R. & CONRAD, R. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1820, (2012) 940–948

Devido à vasta origem celular dos exossomas, estes podem conter muitas moléculas diferentes à sua superfície¹⁸, o que lhes permite ligar a diferentes recetores celulares de forma simultânea e a trocar moléculas com outras células. Deste modo, é possível encontrar moléculas como *tetraspanins* (CD9, CD63, CD81 e CD82), co-estimuladores do sistema imunitário (CD86) e moléculas de adesão (CD11 e CD54)¹⁸, proteínas envolvidas na biogénese dos exossomas (Alix e TSG101) e proteínas de transporte e fusão (GTPases, *annexins* e *flotillin*)¹⁷. Além das proteínas referidas anteriormente, podem ainda ser encontradas nos exossomas as *heat shock proteins* HSP70 e HSP90, que representam um papel na resposta celular ao stress, bem como na cedência

de peptídeos aos Complexos Major de Histocompatibilidade (MHC) I e II¹⁸. O facto de algumas destas proteínas estarem presentes na maioria dos exossomas, levou a que as mesmas pudessem funcionar como marcadores, sendo maioritariamente usadas as *tetraspanins*, *Alix*, *flotillin*, *TSG101* e a *Ra5b*¹⁷.

Pela literatura descobriu-se que os exossomas podem ainda conter no seu lúmen ácidos nucleicos como mRNA, microRNA, DNA e RNA não codificante^{7,8}. Desta forma, surge a explicação do seu relevante papel na transferência de informação biológica às células vizinhas em funções biológicas⁷ e na fisiopatologia de algumas doenças¹⁸, tal como se pode observar Figura 2⁷ relativamente ao cancro. Tal descoberta levou a um elevado interesse nos exossomas enquanto marcador biológico, bem como na sua utilização como transportador de ácidos nucleicos e de fármacos.

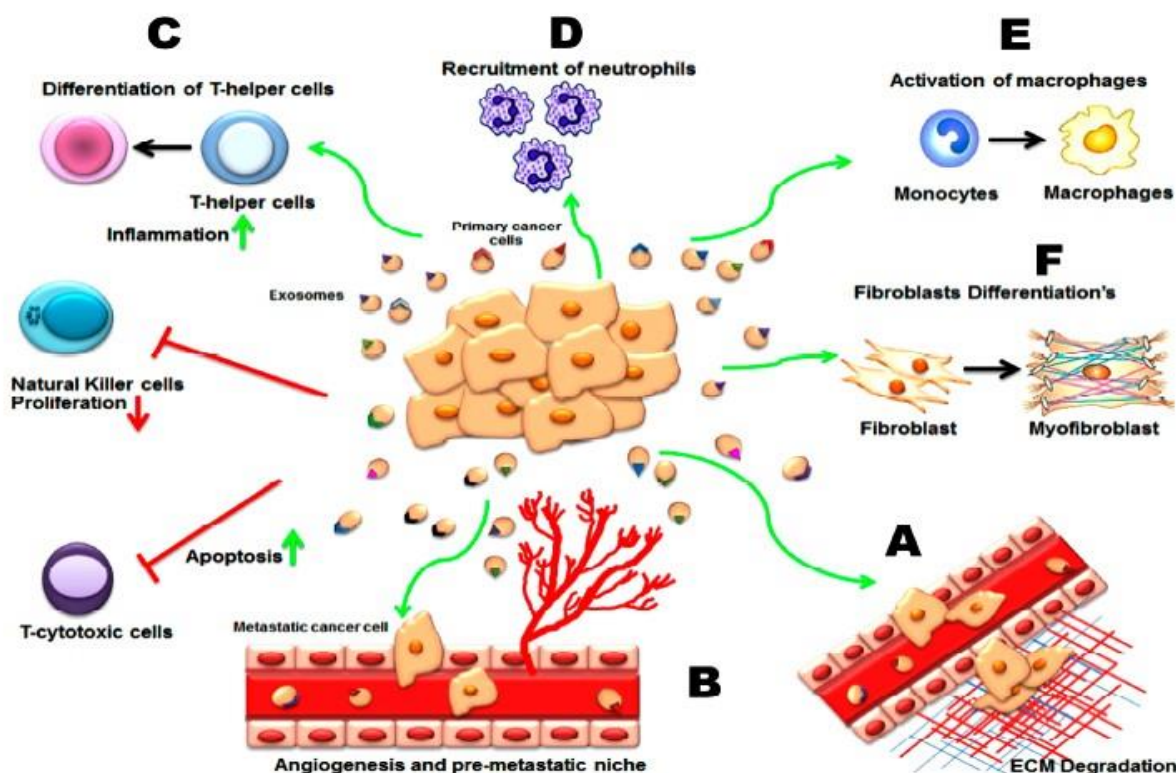


Figura 2: Funções biológicas dos exossomas na tumorigénese.

Fonte: RASHED, M. H. et al. Exosomes: From garbage bins to promising therapeutic targets. *Int. J. Mol. Sci.* 18, (2017)

Ainda referente aos elementos presentes nos exossomas, pode ser mencionada a elevada presença de enzimas proteolíticas, sugerindo que os exossomas possam amplificar a migração de células²⁶. No entanto, não foram encontradas proteínas mitocondriais, nucleares e endoplasmáticas em exossomas¹⁸.

1.1. Formação e secreção de exossomas

A formação e secreção de exossomas necessita de ATP e enzimas. Contudo, os perfis de ácidos nucleicos encontrados em exossomas diferem consoante a célula progenitora⁸.

Os exossomas iniciam a sua formação a partir da endocitose. Neste processo a membrana plasmática da célula é internalizada, de modo a produzir endossomas⁸. Durante a maturação do endossoma inicial a endossoma tardio ocorre em pequenas invaginações da membrana lipídica deste e formam-se vesículas no lúmen – vesículas intraluminais (VIL)⁷. Estas últimas apresentam um tamanho entre 30 e 100nm de diâmetro¹⁸, o que leva à formação de endossomas multivesiculares^{27,28}. Estes podem ser direcionados para a fusão com lisossomas, ocorrendo degradação lisossomal, ou para a fusão com a membrana plasmática da célula, onde existe a libertação do seu conteúdo (as VIL) para o meio extracelular^{7,8}. Com esta libertação, as VIL passam a ser denominadas exossomas¹⁸. É de ressaltar que, para que ocorra a fusão entre os endossomas multivesiculares e a membrana plasmática, são incorporadas proteínas transmembranares na membrana que sofre invaginação, de modo a obter uma orientação topológica semelhante à da membrana plasmática⁷.

A formação das VIL pode ocorrer através de dois mecanismos: o mecanismo dependente do *Endosomal Sorting Complex Required for Transport* (ESCRT) e o mecanismo independente do ESCRT²⁵. Ambos têm um papel relevante na formação do conteúdo das vesículas que irão formar os exossomas^{7,18}.

1.1.1. Mecanismo dependente do ESCRT

O ESCRT reconhece proteínas com ubiquitina e associadas a *tetraspanins*, que criam um rearranjo da membrana do endossoma, de tal modo que estas proteínas se tornam parte da mesma¹⁸. Este complexo consiste em quatro complexos associados a proteínas²⁵:

- ESCRT-0 que é responsável pela acumulação de carga nos exossomas de uma forma dependente de ubiquitina²⁵;
- ESCRT-I e ESCRT-II que induzem a formação de vesículas²⁵;
- ESCRT-III que leva a que à fusão de vesículas²⁵;

- As proteínas acessórias, como TSG101, ALIX e VPS4, permitem a dissociação e a reciclagem do complexo ESCRT²⁵.

Vários estudos demonstram a importância deste mecanismo na formação das VIL, tal como se pode verificar nos exemplos descritos em seguida.

Em vesículas formadas através deste mecanismo a inibição do HRS, um componente do ESCRT-0, demonstrou uma diminuição da secreção de exossomas, tal como a diminuição de um outro componente do mesmo complexo, STAM1²⁹. Em relação ao complexo ESCRT-I, a diminuição do componente TSG101 também levou a uma diminuição da secreção de exossomas, assim como a diminuição simultânea ou isolada das isoformas do componente CHMP4 do complexo ESCRT-III²⁵.

ALIX é também uma proteína associada ao complexo ESCRT-III que, em interação com *syndecan* e *syntenin*, tem mostrado promover formação intraluminal das VIL, o que, consequentemente, promove a formação de exossomas^{8,29}. Além disso, a secreção de *syntenin* para os exossomas por parte de *syndecan* leva a um aumento na clivagem da heparina sulfato, resultando num aumento da secreção dos exossomas⁷.

A proteína acessória VPS4 está envolvida na fase final da formação das VIL, mais precisamente na “cisão da membrana e/ou na dissociação do complexo ESCRT-III”²⁵. Porém, os dados do seu impacto na formação de exossomas têm-se mostrado diferentes e contraditórios, dependendo da célula e da linhagem celular²⁵. Para comprovar tal afirmação seguem os seguintes exemplos: inibição de VPS4B nas células HeLa-CIITA leva a um aumento da secreção de exossomas²⁹, mas o oposto foi verificado em células MCF-7 após o silenciamento simultâneo de VPS4A e VPS4B, não existindo um efeito significativo na inibição isolada das isoformas²⁵.

Todavia é necessária precaução com a utilização da inibição do ESCRT enquanto ferramenta de inibição da secreção de exossomas, porque uma vez que algumas das proteínas envolvidas neste complexo estão também envolvidas noutros mecanismos, como na reparação da membrana plasmática e na citocinese²⁵. Deste modo, a inibição do ESCRT poderá levar a alterações nas funções celulares além do pretendido²⁵.

1.1.2. Mecanismo independente do ESCRT

Este mecanismo envolve lípidos, *tetraspanins* e *heat shock proteins*²⁵.

Um dos lípidos que está presente em abundância na membrana dos exossomas é o colesterol²⁵. Foi demonstrado que quando este se acumula nos endossomas multivesiculares e aumenta a secreção de vesículas que contenham *Flotillin-2*, *ALIX*, *CD63* e colesterol²⁵, como é o caso dos exossomas. Além do colesterol, o metabolito da esfingomielina, o *sphingosine-1-phosphate* (S1P), tem um papel importante na formação dos exossomas, pois a inibição dos seus recetores prejudica as moléculas *CD63*, *CD81* e *flotillin*⁷.

Também se supõe que a formação de ácido fosfatídico na membrana interna dos endossomas multivesiculares leva à invaginação da mesma, tendo como consequência a formação de VIL e, posteriormente, exossomas, já que os mesmos são ricos em fosfolipase D2. Esta molécula está envolvida na hidrólise da fosfatidilcolina a ácido fosfatídico²⁵, o que corrobora com a hipótese de que os exossomas provêm dos endossomas multivesiculares.

As *tetraspanins* estão em abundância nas VIL e nos exossomas, adicionalmente têm mostrado um papel enquanto selecionadoras de carga dos exossomas²⁵. É exemplo disso a TSPAN 8 que pode modificar o conteúdo em ácidos nucleicos (mRNA) e proteico de exossomas provenientes de células de adenocarcinoma pancreático de rato³⁰. Além da TSPAN 8, as *CD9*, *CD63* e *CD81* estão também envolvidas na formação e *loading* proteico dos exossomas⁷.

Em relação às *heat shock proteins*, a chaperone HSC70 facilita a ligação do recetor da transferrina aos exossomas, bem como de proteínas do citoplasma que contenham KFERQ modificada²⁵. Este processo demonstra uma transferência seletiva para as VIL²⁵.

Segundo KOWAL et. al. (2014) existe uma heterogeneidade de endossomas multivesiculares na mesma célula. Todavia, não foi possível concluir ainda se os vários mecanismos podem ocorrer num único endossoma multivesicular ou se existem diferentes populações destas vesículas na mesma célula²⁵.

Relativamente à secreção dos exossomas, estão envolvidas proteínas da família Rab, tal com a *Rab27a* e *Rab27b*, que atuam como reguladores chave neste processo¹⁸, mas também auxiliam na formação de vesículas, na mobilidade de vesículas e organelos

pelo citoesqueleto da célula e na ancoragem de vesículas ao seu alvo, levando à fusão das membranas²⁵. Deste modo, a sua inibição ou a inibição dos seus efetores (SYTL4 e EXPH5) pode impedir a secreção dos exossomas⁸. Já o repressor tumoral da proteína p53 e o seu efetor TSAP6 podem levar ao aumento da produção de exossomas⁸. As proteínas Rab35 e Rab11 também estão envolvidas no processo da regulação da secreção de exossomas, através da interação com a TBC1D10A-C¹⁸. Observou-se ainda que a família de proteínas Rab está frequentemente mutada ou com uma expressão aumentada em células cancerígenas¹⁸, traduzindo-se numa maior secreção de exossomas neste tipo de células.

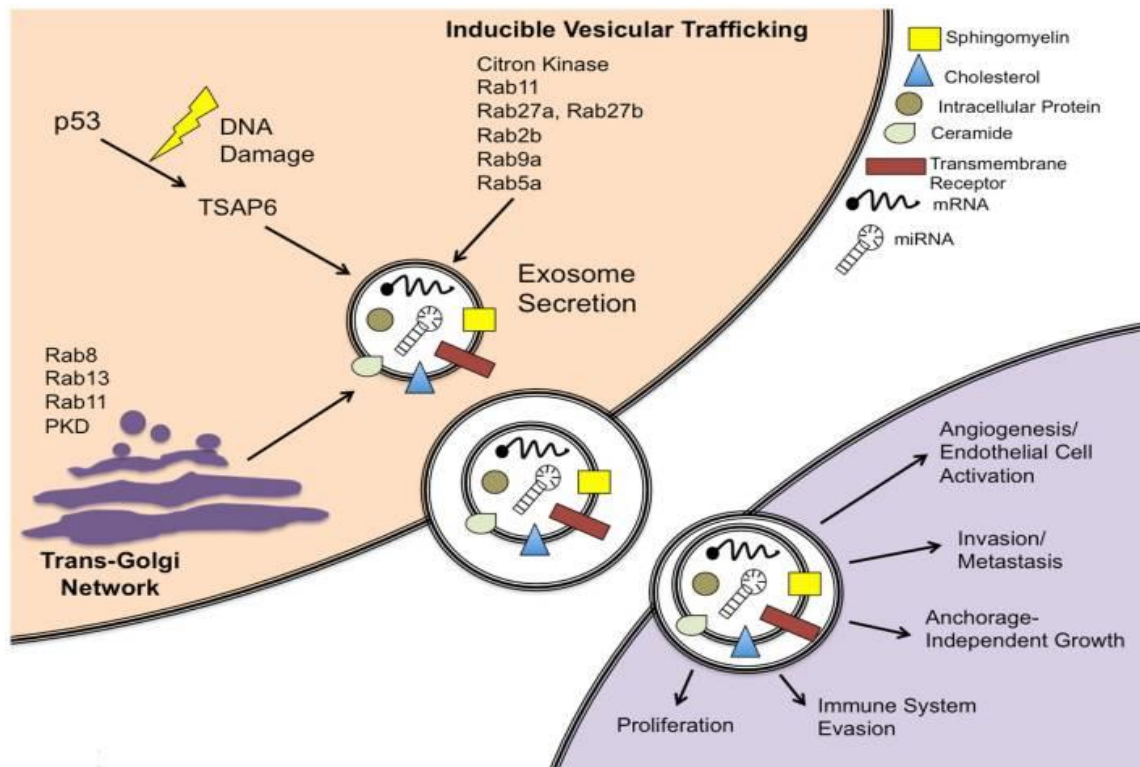


Figura 3: Esquema representativo da secreção de exossomas num modelo de células tumorais.

Fonte: BEACH, A., ZHANG, H. G., RATAJCZAK, M. Z. & KAKAR, S. S. Exosomes: An overview of biogenesis, composition and role in ovarian cancer. *J. Ovarian Res.* 7, (2014) BEACH, A., ZHANG, H. G., RATAJCZAK, M. Z. & KAKAR, S. S. Exosomes: An overview of biogenesis, composition and role in ovarian cancer. *J. Ovarian Res.* 7, (2014)

Quando uma célula é submetida a stress que lhe cause dano, o DNA, existe uma resposta da proteína p53, que faz aumentar a secreção de exossomas, tal como se pode concluir pela observação da Figura 3. Este processo permite a obtenção de uma comunicação com as células circundantes, de modo a que as mesmas auxiliem numa resposta que compense o stress sofrido pela célula¹⁸. A secreção de exossomas também parece ser aumentada através da despolarização induzida de potássio nas células neuronais, do *crosslinking* da proteína CD3 às células T, dos níveis intracelulares de cálcio, e, dependendo da célula, das alterações do pH da membrana¹⁸.

Apesar dos mecanismos para o *loading* proteico dos exossomas estarem convenientemente descritos, o mesmo não ocorre com o *loading* de ácidos nucleicos, tal como de RNA. Todavia, sabe-se que a presença da sequência GGAG está envolvida na disposição e regulação da localização de microRNA (miRNA) nos exossomas⁷.

Em relação à secreção dos exossomas pensa-se que estejam envolvidos mecanismos dependentes do íão Ca^{2+} e do pH⁷, e o envolvimento da família de proteínas RAB na ligação entre os endossomas multivesiculares e a membrana plasmática^{18,25}. Esta afirmação podem ser corroborada através de estudos que demonstram que a inibição da proteína Rab35 leva a uma diminuição da secreção de exossomas³¹, bem como a Rab11 na linha humana celular RPE1³², as proteínas Rab5a, Rab9a, Rab2b e, sobretudo, as Rab27a e Rab27b³³. Suspeita-se que as Rab35 e Rab11 estejam associadas à reciclagem e aos endossomas iniciais, enquanto as Rab27a e Rab27b estejam relacionadas com endossomas tardios e compartimentos secretórios²⁵. É de ressaltar que existem secreções independentes de algumas destas proteínas, o que pode revelar um comportamento distinto do aqui descrito, tal como a secreção independente da proteína Rab27a em exossomas contendo antrax de uma linha celular humana de células epiteliais³².

Após a ligação das membranas é necessária a fusão das mesmas para que haja secreção das vesículas presentes nos endossomas multivesiculares²⁵. Esta pode ocorrer através dos complexos SNARE (*soluble NSF-attachment protein receptor*), onde as proteínas SNAP-23, VAMP-7 e VAMP-8 estão envolvidas numa fusão de lisossomas com a membrana plasmática regulada pelo íão Ca^{2+} em vários tipos de células²⁵. Contudo, este complexo não medeia forçosamente a fusão entre as membranas, mas sabe-se que a VAMP-7 é essencial na libertação de vesículas que contenham acetilcolinesterase, como é o caso dos exossomas²⁵. Outra proteína deste complexo é a YKT6 que mostrou ser necessária para a secreção de exossomas que contenham o morfógeno WNT3A na linha celular HEK293²⁵.

Após a secreção dos exossomas da sua célula de origem, estas vesículas podem unir-se a outras células específicas para a transmissão de informação. O atual mecanismo não é totalmente perceptível, sendo que ainda é controverso a envolvimento da fusão direta ou endocitose⁷. No entanto, sabe-se que pode ser um mecanismo dependente ou independente de clatrina, mediado por *lipid rafts*, proteoglicanos heparina sulfato, e, possivelmente, fagocitose⁷.

2. Funções

Inicialmente os exossomas eram considerados apenas um meio das células eliminarem proteínas e RNA indesejáveis ou que já não fossem necessários, beneficiando células com uma baixa capacidade degradativa^{7,17}. Com o desenvolvimento da investigação acerca dos exossomas descobriu-se que estes detêm também uma importante função de intercomunicação celular, mesmo em células distanciadas num mesmo organismo^{7,18}.

Os exossomas estão, então, presentes no controlo, tanto em processos fisiológicos normais, como, por exemplo, na estimulação ou inibição da resposta imune^{18,34,35}, com a apresentação de antígenos, no auxílio do desenvolvimento do sistema imune numa criança durante a lactação¹⁷ e durante uma gravidez¹⁹, na regeneração de tecidos^{36,37}, no ciclo e na programação da morte celular, angiogénese, inflamação e coagulação³⁸. A importância estende-se ao progresso de doenças, como de doenças neurodegenerativas^{39,40} e na expansão de tumores^{41,42,43,44}, onde, por exemplo, as células migratórias libertam exossomas, criando um “*trilho*” que outras células possam seguir¹⁷.

Os exossomas podem ter efeitos opostos aos descritos, como, por exemplo, uma ação anti-tumorigénica^{45,78} ou como auxiliares na propagação de patogénicos, tal como príons e vírus^{17,18,46}.

3. Obtenção de exossomas

Apesar de existirem vários métodos possíveis para a obtenção de exossomas a partir de culturas de células, a comunidade científica baseia-se maioritariamente em procedimentos com centrifugações repetidas, seguidos de filtração e terminando com ultracentrifugação. Este processo, permite obter um *pellet*, onde os exossomas estão depositados²¹, tal como se pode examinar resumidamente na **Erro! A origem da referência não foi encontrada**. A este procedimento pode ainda acrescentar-se um passo onde existe ressuspensão com PBS e adição de sacarose¹⁶. Este último passo permite purificar a amostra obtida de outros agregados, de modo a que apenas contenha exossomas, já que estes têm uma densidade entre 1,13 e 1,19 g/ml de sacarose, o que lhes permite flutuar num gradiente de 30% de sacarose¹⁹.



Figura 4: Procedimento geral para o isolamento de exossomas

Fonte: Elaboração própria

As primeiras centrifugações servem para eliminar células e restos celulares²³, sendo que a filtração com um filtro 0,2 µm tem a função de reduzir a contaminação por vesículas com um tamanho superior ao do filtro¹⁶, deixando passar os exossomas que têm no máximo 0,15µm. Após este processo e tal como foi dito anteriormente pode-se seguir a purificação, tal como observado na Figura 5, sendo que o último passo deste processo, o armazenamento, é opcional.

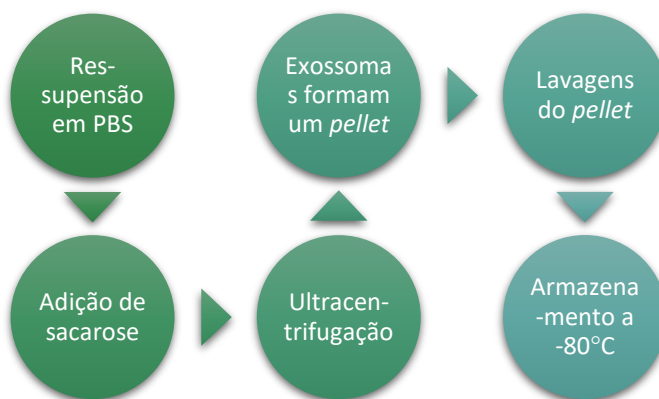


Figura 5: Procedimento geral de purificação após o isolamento de exossomas

Fonte: Elaboração própria

Após o isolamento dos exossomas é possível fazer a caracterização dos mesmos através de um TEM e de Dispersão dinâmica da luz (DLS) ou de citometria de fluxo associada a marcação com anticorpos^{19,21}. Também é possível saber parte das proteínas presentes nos exossomas por meio de uma *Ion Trap* ou *nano-LC-MS/MS*, resultados estes que podem ser validados com um *Western Immunoblot*^{19,23}.

4. Introdução de moléculas nos exossomas

Existem diversos métodos para introduzir moléculas, tais como ácidos nucleicos, proteínas ou fármacos de pequena dimensão, nos exossomas. Estes métodos podem-se subdividir em duas grandes categorias: os métodos endógenos e os métodos exógenos ou de *loading* direto⁴⁷. Em seguida serão descritos alguns dos métodos mais relevantes e mais utilizados.

4.1.Métodos endógenos

Os métodos endógenos caracterizam-se por serem métodos em que a célula transmite a carga diretamente aos exossomas, antes da sua libertação, ou seja, quando ainda é uma VIL⁴⁷. Para este tipo de métodos a carga mais frequente é o RNA⁴⁷.

Dois exemplos de métodos endógenos são a transfeção/sobreexpressão e o mecanismo de triagem por sequência;

4.1.1. Transfeção/sobreexpressão

Baseia-se na transferência de oligonucleótidos ou de um plasmídeo que os expresse ou expresse uma proteína com capacidades terapêuticas, diretamente para as células que irão carregar passivamente os exossomas^{47,48}. Posteriormente, estes podem ser utilizados em terapias, devido à sua carga terapêutica transferida pelas células.⁴⁷

A transfeção para as células pode ocorrer por método de cálcio-fosfato ou por reagentes lipídicos disponíveis comercialmente⁴⁷. Já a sobreexpressão de uma proteína na célula pode levar a que se produza mRNA e proteína suficiente para serem carregados para os exossomas⁴⁷. YIM et. al. (2016) desenvolveram um trabalho com exossomas e proteínas solúveis envolvendo este mesmo método⁴⁸.

Em relação a outros métodos como a conjugação com colesterol e a eletroporação, a transfeção/sobreexpressão exhibe uma menor eficiência de carga e necessita de otimização dependendo da carga e da célula envolvida na origem dos exossomas⁴⁷.

4.1.2. “Sequence sorting mechanism”

Sabe-se que existem sequências de RNA que têm elevada representação em miRNA's presentes em exossomas, o que indica que estas podem ter um papel importante na seleção do conteúdo dos exossomas⁴⁹. Intitularam-se estas sequências de EXOmotif's⁴⁹.

Através desta descoberta, percebeu-se que a introdução de um miRNA com EXOmotif numa célula, este será guiado para os exossomas e fará parte da sua carga⁴⁷. Deste modo, e por meio da manipulação genética, é possível introduzir este tipo de ácidos nucleicos alterados e produzir exossomas com uma carga de RNA específica. No entanto, não é possível a incorporação de outro tipo de moléculas como proteínas ou fármacos, devido ao mecanismo como ocorre a introdução.

4.2. Métodos exógenos ou de *loading* direto

Neste tipo de métodos, o *loading* da carga exossomal pretendida ocorre diretamente nos exossomas, estando estes já isolados⁴⁷. Os métodos exógenos podem ainda ser subdivididos em *loading* passivo e *loading* ativo. Isto é, no primeiro, a carga pretendida é carregada passivamente nos exossomas, enquanto que o segundo exige uma interrupção na membrana⁴⁷. Porém, este tipo de métodos pode não transmitir carga funcional e ativa às células alvo, tanto pela baixa eficiência de transfeção dos exossomas, como à degradação de ácidos nucleicos durante o *loading* destes¹⁵.

4.2.1. Loading ativo

4.2.1.1. Eletroporação

Este método consiste na criação de poros na membrana dos exossomas, de forma a facilitar a entrada da carga⁴⁷. Para este efeito, a carga pretendida e os exossomas purificados são colocados num *buffer*, sendo depois aplicada uma corrente elétrica⁴⁷. Tal fenómeno leva à alteração da posição das moléculas lipídicas que compõem a membrana exossomas⁵⁰, levando à formação espontânea poros temporários na mesma, o que permite à carga terapêutica entrar por difusão nesta vesícula^{9,47}. Após este evento, ocorre a incubação dos exossomas a 37°C, de modo a que estes possam recuperar, seguindo-se de lavagem com PBS e ultracentrifugação⁴⁷.

Este método tem efeitos mínimos nos componentes dos exossomas, mas pode despoletar a agregação de exossomas e da carga, bem como alterar morfológicamente os exossomas^{15,47,51}, resultando numa instabilidade e, conseqüentemente, originando numa baixa capacidade de *loading*⁹.

A eletroporação é um dos métodos mais usados para o *loading* de *small interfering* RNA (siRNA) e miRNA, pois estes são maiores que pequenas moléculas hidrofóbicas e, por essa razão, não se difundem espontaneamente para os exossomas⁹. No entanto, apresenta também problemas para a produção em escala, devido à dificuldade em fornecer as quantidades necessárias para um uso clínico^{13,47,52}.

A eletroporação pode ser aplicada tanto a ácidos nucleicos, como a pequenas moléculas terapêuticas das quais são exemplos a doxorrubicina^{51,52}, paclitaxel^{53,54} e ácidos nucleicos como *short interfering* RNA (shRNA)⁵⁵ e miRNA⁵⁰.

4.2.1.2. Sonicação

A sonicação consiste em colocar os exossomas e as moléculas terapêuticas pretendidas juntos e usar uma sonda homogenizadora⁹. A força mecânica que esta aplica compromete a integridade da membrana exossomal e permite a difusão das moléculas terapêuticas para os exossomas⁹. Apesar deste método induzir uma menor viscosidade da membrana exossomal, esta é restaurada após algum tempo em incubação a 37°C⁹.

Este método induz uma menor agregação de siRNA do que a eletroporação¹⁵, porém pode levar a exossomas maiores do que aqueles formados por eletroporação e incubação simples^{53,54}, bem como a exossomas com diversas formas⁵⁶. A sonicação também mostrou não afetar significativamente o conteúdo proteico e lipídico dos exossomas⁵³. Todavia, e comparando com outros métodos como a incubação simples, ciclos de gelo e degelo e eletroporação, mostrou ter o maior *loading* nos exossomas, o que corresponde também à maior atividade terapêutica^{53,56}.

Além da encapsulação das moléculas terapêuticas nos exossomas, existem por vezes moléculas ligadas à membrana exterior exossomal, o que cria duas fases de libertação da molécula terapêutica em questão^{9,53}.

As moléculas terapêuticas que podem ser usadas são fármacos, como o paclitaxel^{53,54} e proteínas como a catalase⁵⁶.

4.2.1.3. Cloreto de cálcio (CaCl₂) com choque térmico

O método por cloreto de cálcio medeia a transfeção de miRNA's ou dos seus inibidores para os exossomas^{15,50}. Tem como base a formação de um precipitado de cloreto de cálcio com o ácido nucleico, sendo que o cloreto de cálcio contribui nas interações entre o ácido nucleico e a superfície celular, para que haja uma endocitose deste⁵⁷. No entanto, como os exossomas não tem a capacidade de realizar uma endocitose é necessário aplicar também um choque térmico, já que se demonstrou que sem esse processo não existe a transfecção dos ácidos nucleicos para os exossomas⁵⁰. O choque térmico altera a fluidez da membrana dos exossomas, o que se torna crucial para a entrada dos ácidos nucleicos nos exossomas⁵⁰.

4.2.1.4. Extrusão

Na extrusão misturam-se os exossomas e as moléculas terapêuticas pretendidas, como por exemplo proteínas⁵⁶. Posteriormente, coloca-se a mistura num extrusor lipídico à base de seringa com um poro entre 100 e 400nm e temperatura controlada⁹. Durante a extrusão ocorre uma disrupção da membrana exossomal, permitindo à molécula terapêutica entrar para o interior dos exossomas⁹. Este é um método com uma capacidade de *loading* e efeito terapêutico semelhante ao da sonicação⁵⁶

Foi demonstrado durante uma extrusão intensiva que este método pode provocar alteração das propriedades da membrana dos exossomas, como por exemplo do potencial zeta, gerando citotoxicidade⁵⁸. No entanto, HANEY et. al. (2015) mostraram que a extrusão pode também produzir um aumento do tamanho dos exossomas, sem a citotoxicidade acima mencionada. Deste modo, são necessários mais estudos para entender a influência deste método nas células.

4.2.1.5. Ciclos de gelo e degelo

Neste método, os exossomas estão numa mistura com as moléculas terapêuticas à temperatura ambiente durante um determinado tempo, depois a mistura é congelada rapidamente à temperatura de -80°C ou colocada em nitrogénio líquido, sendo que após este passo é descongelada à temperatura ambiente⁹. Este processo é repetido pelo menos três vezes para que os exossomas adquiram moléculas terapêuticas⁹.

Contudo, este é um método que pode induzir a agregação de exossomas, o que gera uma distribuição ampla de tamanhos dos exossomas, bem como tem uma menor capacidade de *loading* em relação a métodos como a sonicação e a extrusão^{9,56}. Apesar disto, mostrou ser um método que permite uma maior estabilidade da molécula terapêutica em relação à sonicação e à extrusão, mas menor comparativamente à incubação simples⁵⁶.

O método de ciclos de gelo e degelo podem ser usados para a inclusão de proteínas, como por exemplo a catalase⁵⁶.

4.2.1.6. Adição de surfactantes

Tal como o nome indica, este método utiliza surfactantes que forma complexos com colesterol da membrana dos exossomas, criando um poro, sem a destruírem na íntegra^{9,47}.

Um dos exemplos de surfactantes usados são as saponinas^{47,56}. HANEY et. al. (2015) mostraram que este é um método com uma alta eficiência de carga, tal com a sonicação, pois as saponinas são um eficiente agente de permeabilização. Outros autores demonstraram, ainda, que este método não provoca alterações significativas de tamanho, ao inverso, dos outros métodos com o qual houve comparação, bem como tem ainda um efeito terapêutico superior⁵⁶. Tal fenómeno deve-se, provavelmente, ao facto deste método deixar mais proteínas membranares intactas, e assim obter uma maior uniformidade da bicamada lipídica dos exossomas⁵⁶.

No entanto, as saponinas têm uma atividade hemolítica *in vivo*⁵⁹, devendo por isso a sua concentração ser limitada, e ocorrer purificação dos exossomas após a incubação com este composto⁹.

4.2.2. *Loading* passivo

4.2.2.1. Incubação simples com a molécula terapêutica

Tal como o nome indica, este é um método que tem como base a incubação da molécula terapêutica com os exossomas durante algum tempo, à temperatura ambiente^{53,56} ou a 37°C¹³. Apesar de ser um método que tem a vantagem de não deformar praticamente os exossomas, tem demonstrado uma baixa eficiência de carga, tal como uma libertação rápida da molécula terapêutica, em comparação com outros métodos⁵⁶.

A este método pode juntar-se uma variação, a conjugação de colesterol ao oligonucleotídeo terapêutico, mais especificamente uma ligação 3' no final do ácido nucleico^{13,47}. Apesar da maioria dos oligonucleotídeos se ligarem à membrana, alguns também se apresentam no lúmen dos exossomas. Assim, mostra-se como um método robusto, eficiente e com elevada reprodutibilidade para o *loading* de oligonucleotídeos estáveis e hidrofóbicos, pois estes têm uma maior tendência a serem armazenados no lúmen dos exossomas¹³.

Este é um procedimento que pode ser usado tanto com ácidos nucleicos como siRNA¹³, ou com outro tipo de moléculas terapêuticas, como são exemplos a catalase⁵⁶ e o paclitaxel⁵³.

5. Internalização dos exossomas e libertação das moléculas terapêuticas nas células-alvo

A internalização dos exossomas nas células-alvo pode ocorrer através da fusão do exossoma com a membrana celular ou através de endocitose, onde há fusão com a vesícula através da qual o exossoma foi internalizado^{60,61}. O processo pelo qual ocorre tal processo depende do tipo de carga, das proteínas do exossomas e do destino intracelular da carga exossomal^{62,63}. No entanto, o mecanismo de como os exossomas chegam até à célula-alvo e se ligam às mesmas não está ainda totalmente esclarecido⁶⁴, supondo-se apenas que os recetores associados a *tetraspanins* estejam relacionados com a seletividade de alvo dos exossomas⁶⁵.

No que concerne à fusão, suspeita-se que seja um fenómeno muito rápido e/ou localizado e que necessita de microdomínios ricos em colesterol⁶¹. Tal como MONTECALVO et. al. (2012) expôs através da presença de um agente sequestrador de colesterol. Neste estudo, ocorreu uma diminuição da fluorescência de R18, demonstrando uma menor ligação entre os exossomas e as células alvo, e, conseqüentemente menor fusão ou hemifusão⁶¹. Também PAROLINI et. al. (2009) mostrou que a composição lipídica membranar da célula alvo tem elevada importância na fusão de exossomas provenientes de melanoma⁶⁶.

MEHLEN et. al. (2005) revelou ainda que uma parte dos exossomas pode ser internalizada por um processo de duas etapas⁶⁷. Iniciando-se pela hemifusão dos exossomas com a membrana da célula-alvo e seguidamente com endocitose e fusão dos exossomas com a vesícula através da qual ocorreu a internalização⁶¹.

Já endocitose pode ser mediada por recetores e *lipid rafts* ou ocorrer através de pinocitose ou fagocitose^{60,63}. HAZAN-HALEVY et. al. (2015) mostrou que apesar dos exossomas necessitarem de *dynamina*, tirosina cinase, *lipid rafts* e colesterol para a sua internalização⁶⁶, quando todas estas vias são inibidas existe uma percentagem dos exossomas que consegue entrar na célula alvo, mostrando a utilização de uma via não clássica, ou seja, por uma das três indicadas acima⁶². Também outras proteínas podem ser utilizadas na endocitose, tal como a *clathrin* e a *caveolin* que ajudam a formar invaginações na membrana celular^{62,66,68}, bem como a Arf6, *flotillin*, Cdc42 e RhoA⁶⁹.

A fagocitose ocorre geralmente em células fagocíticas profissionais, como por exemplo os macrófagos, neutrófilos e monócitos^{63,69}. Para este processo a proteína *dynamin2* é de elevada importância, já que a sua inibição revela um impedimento praticamente completo da internalização dos exossomas⁶³. Outros fatores importantes para a formação do fagossoma que envolvem o exossoma são a polimerização da actina e a presença da fosfatidilinositol 3 cinase (PI3 cinase)⁶³. Após a internalização, foi possível encontrar exossomas encontrados em fagolisossomas⁶³.

Outros fatores a considerar na internalização de exossomas é o pH do meio, já que foi demonstrado que exossomas provenientes de células de melanoma que produzem em seu redor um meio ácido, têm uma maior internalização⁶⁶. No entanto, fundem melhor com células de melanoma produzidas em *buffer*, supondo-se que tal se deve à carga negativa dada pelo elevado conteúdo em *N-acetylneurami-nylgalactosylglucosylceramide* (GM3), que ao estar num meio rico em iões H⁺, obtém uma carga positiva, fundindo, deste modo, melhor em condições *buffer* do que num meio rico em aniões, como é o caso de um meio ácido⁶⁶.

Também se deve ter em atenção ao tamanho, já pelos estudos de CAPONNETTO et. al. (2016) o método de extração pode alterar a média da distribuição de tamanhos dos exossomas, e esta situação pode ter como consequência uma mais rápida internalização com um tamanho menor⁷⁰.

6. Vantagens e Desvantagens

Os exossomas têm-se mostrado muito promissores numa futura terapia, mas também apresentam algumas vantagens e desvantagens.

Dos principais benefícios destacam-se a resolução de alguns problemas apresentados por outras terapias, combinando vantagens tanto dos transportadores sintéticos, bem como do transporte de fármacos mediado por células⁵³.

Em primeiro lugar, os exossomas são moléculas de tamanho nanométrico, o que em conjunto com a sua flexibilidade, permite a passagem pela maioria das barreiras biológicas^{14,53}, tal como a barreira hematoencefálica⁷ e a evasão à fagocitose pelo sistema imune⁵². Em segundo lugar reside o facto de estas serem vesículas formadas naturalmente a partir de células do próprio organismo, o que permite que tenham ao longo da sua estrutura uma bicamada lipídica com proteínas do próprio organismo que possibilitam a

adesão a outras células⁷, favoreçam a endocitose⁵⁵ e a fusão dos exossomas⁵² e, conseqüentemente, a entrada do conteúdo exossomal na célula-alvo⁵⁴. Tais características contribuem também para a diminuição da *clearance* destas vesículas da circulação do organismo⁵⁵, o que resulta num maior tempo na circulação sistémica¹⁴, e, assim, um melhor *uptake* dos exossomas por parte das células-alvo.

Resultante do facto de serem vesículas formadas naturalmente por um organismo vivo, como já anteriormente enunciado, os exossomas são menos imunogénicos que moléculas artificiais⁵², levando a uma baixa toxicidade⁵³ e uma boa biocompatibilidade^{7,14,71}. Deste modo gera-se um melhor perfil de segurança e de seletividade em relação a nanossistemas de entrega baseados em lipossomas e polímeros⁵¹.

Os exossomas são vesículas encontradas em praticamente todos os fluídos corporais⁷, mostrando assim uma boa e rápida biodistribuição, sendo que não se acumulam no fígado nem nos pulmões, a menos que estes sejam tecidos-alvo¹⁴. Têm também a capacidade de transportar diversos tipos de pequenas moléculas lipofílicas ou hidrofílicas e biológicas⁵¹ ou não, tal como proteínas, ácidos nucleicos (mRNA, miRNA e RNA não codificante)^{7,8} e moléculas terapêuticas (doxorrubicina^{51,52}, paclitaxel^{53,54} e curcumina^{51,72}). Em comparação com outros transportadores, tal como lipossomas artificiais, mostrou um melhor perfil de eficácia na entrega do conteúdo da vesícula⁵⁵.

No presente momento os exossomas ainda têm alguns problemas que têm de ser resolvidos antes de se tornarem uma terapia ou um meio de diagnóstico, sendo que tais questões possam ser consideradas desvantagens. Entre elas está presente a dificuldade em adicionar carga aos exossomas sem que haja alterações significativas na estrutura e no conteúdo membranar dos exossomas^{53,54}.

Outra das desvantagens é a dificuldade em otimizar a produção custo-eficiente de exossomas tanto em quantidade⁹ como em elevada qualidade, pureza¹³ e *loading*¹⁴, pois alguns estudos mostram uma baixa eficiência, bem como agregação ou degradação dos ácidos nucleicos aquando do *loading* nos exossomas¹⁵.

7. Aplicações

Os exossomas são vesículas com inúmeras aplicações, devido às várias vantagens já referidas anteriormente, como o facto de estarem presentes em praticamente todos os fluídos⁴⁷ e tecidos, serem pouco imunogénicos⁵³ e biocompatíveis¹⁴ com os organismos. Tais benefícios permitem que os exossomas possam ser usados tanto para diagnóstico de patologias como na terapêutica das mesmas.

7.1. Diagnóstico

Os exossomas são vesículas com uma origem endossomal^{27,28}, levando a esta vesícula contenha alguns vestígios da sua célula de origem, tal como ácidos nucleicos e proteínas¹². Este importante pormenor em conjunto com a presença em praticamente todos os fluídos do organismo destas vesículas⁴⁷, resulta num meio de fácil obtenção através de um método não invasivo^{12,73}, que pode ser usado para rastrear algumas patologias e o seu desenvolvimento, tais como cancro^{74,75,76}, doenças cardiovasculares⁷⁷, entre outras^{73,78}.

A deteção de exossomas no organismo pode ser feita por anticorpos que geralmente se ligam a algum perfil proteico ou de ácidos nucleicos que se encontram especificamente no exossoma-alvo⁷⁹. Todavia a deteção também pode ser feita por peptídeos. Um exemplo disso é o estudo de GAO et. al. (2018) em que se prova que o peptídeo CP05 se liga a exossomas que tenham CD63⁷⁴. Esta ligação além de possibilitar o isolamento dos exossomas em teste, também proporciona um direcionamento maior para determinadas células-alvo⁷⁴. O peptídeo CP05 permite também a ancoragem de cargas terapêuticas, contribuindo para que estas cheguem aos alvos através dos exossomas. Desta forma, este peptídeo mostra uma grande potencialidade enquanto auxiliar no diagnóstico e na terapêutica baseados em exossomas⁷⁴.

A utilidade dos exossomas, enquanto marcadores biológicos, pode ser útil na gravidez, uma vez que alteração lipídica de microvesículas, tais como os exossomas, provenientes de sinciotrofoblastos mostrou estar relacionada com pré-eclâmpsia e abortos recorrentes⁸⁰. Deste modo, no futuro os exossomas derivados de sinciotrofoblastos podem ser usados a partir das 6 semanas de gestação de uma forma não invasiva para detetar problemas no desenvolvimento fetal, bem como de alguma anormalidade na gravidez, tal como descrito anteriormente⁷³. Consequentemente,

permitirá intervenções mais prematuras, e assim, menor consequências para o embrião ou feto⁷³.

Outro dos campos onde os exossomas têm mostrado a sua relevância é nos transplantes. SIGDEL et. al. (2015) e ALVAREZ et. al. (2013) mostraram uma relação entre a rejeição aguda de transplante renal e alterações proteicas em exossomas encontrados em urina dos doentes^{81,82} e VALLABHAJOSYULA et. al. (2017) demonstrou a presença de insulina, somatostatina e glucagon em exossomas derivados de ilhas de Langerhans transplantadas, que foram recolhidos através de amostras de sangue^{83,84}. Consequentemente, os exossomas derivados das células transplantadas são a principal fonte de antigénios para o reconhecimento de alelos pelas células T, já que poucos leucócitos provenientes do transplante migram até aos órgãos linfóides do hospedeiro, podendo despoletar a rejeição do transplante. Apesar deste ponto negativo, a facilidade em encontrar e extrair exossomas do hospedeiro permite saber se existe alguma alteração que indique a rejeição do(s) órgão(s) transplantado(s), possibilitando a toma atempada de medidas contra a mesma⁸⁴.

Os exossomas têm mostrado também uma elevada importância no diagnóstico de tumores, já que são uma fonte viável de moléculas associadas a tumores, presente em praticamente todo o organismo, tal como miRNA, e com uma obtenção não invasiva para o doente¹². O seu possível uso em diagnóstico pode, como tal, ser empregue em tumores como o adenocarcinoma do pulmão⁸⁵, cancro dos ovários⁷⁵, cancro da mama⁸⁶, cancro da próstata⁸⁷, cancro gastrointestinal⁸⁸, cancro pancreático⁷⁹, cancro hepatocelular⁸⁹, cancro do cólon-retal⁹⁰, melanoma⁹¹, entre outros.

7.2. Terapêutica

A utilização de exossomas na terapêutica tem vasta abrangência, porque os exossomas podem atuar como agentes imunoterapêuticos⁹² e transportadores de fármacos⁵² e ácidos nucleicos⁵⁰.

7.2.1. Transportadores

O facto dos exossomas serem vesículas com origem endógena, permite que permaneçam mais tempo no organismo sem uma rápida *clearance*⁵⁵ e elevada toxicidade⁵³. Isto cria as condições ideais para o transporte de pequenas moléculas que

sofram rápida eliminação, que não consigam chegar devidamente às células-alvo ou que provoquem uma elevada toxicidade no organismo.

O tipo de carga que os exossomas conseguem transportar varia entre ácidos nucleicos com siRNA, miRNA, proteínas, mRNA, anti-miRNA e pequenas moléculas terapêuticas^{12,10}.

ZHUANG et. al. (2011) mostrou que é possível fazer chegar curcumina e JSI-124 ao cérebro de murganhos através de exossomas por via intranasal⁹³. Estas moléculas exerceram a sua ação ao mostrar serem capazes de diminuir a inflamação por indução da apoptose de células microgliais e da inibição de citocinas tais como IL-1 β e IL-6⁹³.

Também GAO et. al. (2018) mostrou que os exossomas contendo CD63 e o peptídeo CP05 são capazes de aumentar o *uptake* de moléculas que lhe são ancoradas, tal como referido anteriormente⁷⁴.

7.2.2. Imunoterapia

Outra da possibilidade dos exossomas enquanto agentes terapêuticos é a imunoterapia, onde estimulam o sistema imune contra os antígenos tumorígenos, criando-se assim uma vacina.

Para este efeito podem-se usar exossomas derivados de células dendríticas (DEX) de células tumorais (TEX)⁹⁴. As células dendríticas são agentes apresentadores de antígenos que interagem com as células T, induzindo uma resposta imune específica⁹⁴. Quando estas células são estimuladas por antígenos cancerígenos ou peptídeos tumorais existe a libertação de DEX que induz a libertação de anticorpos e produção de citocinas, levando a uma resposta imune forte⁹⁴. Os exossomas tumorais contêm antígenos do tumor em questão, moléculas do MHC-I, *heat shock proteins* e moléculas de adesão intercelular o que permite estimular as células do sistema imune e reduzir o crescimento tumoral^{94,95}.

ZHANG et. al. (2009) criou exossomas a partir de células tumorais de cancro renal ligadas à citocina IL-12⁹⁵. Além de ter mostrado que estes exossomas induzem a proliferação de células T e linfócitos a secretar a citocina IFN- γ , demonstrou que estas vesículas eliminaram mais eficientemente células tumorais⁹⁵. Deste modo, observa-se uma maior citotoxicidade às células tumorais induzida por antígenos⁹⁵. Tal feito expõe a potencialidade de exossomas numa vacina tumoral⁹⁵.

Outro exemplo foi dado por DAI et. al. (2008) através de um ensaio clínico de fase I com 40 doentes de cancro colorectal⁹⁶. Neste ensaio foram usados exossomas derivados de ascites, ricos em moléculas do MHC e *heat shock proteins* que induzem linfócitos T citotóxicos e imunidade antitumoral sistemática específica do tumor⁹⁶. Também foi demonstrado que a presença de GM-CSF atua como adjuvante na eficácia desta vacina⁹⁶. Os efeitos adversos mais frequentes foram eritema, prurido, dor, febre, náuseas e fadiga, mas não provocou toxicidade hepática, renal, pulmonar, cardíaca, neurológica e hematológica⁹⁶.

As vacinas que contêm exossomas também podem ser usadas contra antigénios virais, através da estimulação de linfócitos T CD8⁺ específicos para o antigénios virais⁹⁷.

Outro dos usos que a imunoterapia com exossomas pode ter está relacionado com o tratamento da inflamação por alergia, através da regulação negativa da resposta alérgeno-específica das células *helper 2* (Th2). Os doentes com alergias têm tendência a produzir uma menor quantidade de IL-10 após o contato com o alérgeno, resultando numa reação inflamatória mais exacerbada⁹⁸. Existe evidência que ao se utilizarem células dendríticas que produzam IL-10, pode ocorrer a libertação de exossomas derivados destas células que supressem a inflamação e a resposta autoimune⁹⁸.

De seguida serão abordados dois exemplos para que em específico se perceba a diversas aplicações que os exossomas podem ter no mesmo tipo de cancro. Assim como exemplos foram escolhidos o cancro da mama por ser em Portugal a segunda causa de morte por cancro em mulheres e estar presente em 1% dos homens⁹⁹ e o glioblastoma multiforme, que tem um crescimento rápido e uma mortalidade elevada¹⁰⁰.

7.2.2.1. Cancro da mama

O uso de uma terapia com exossomas no cancro permite uma terapêutica não evasiva e com uma menor citotoxicidade, o que pode levar no futuro a uma maior qualidade de vida durante os tratamentos.

Atualmente existe tratamento do cancro da mama recetor de fator de crescimento humano epidérmico 2 (HER2) positivo tal como o anticorpo anti HER2 humanizado trastuzumab, também conhecido como Herceptin¹¹. No entanto é recorrente o aparecimento de resistência a este anticorpo, bem como risco de toxicidade cardiovascular¹¹.

Devido a esta situação, XIE et. al. (2018) vacinou murganhos transgênicos com uma dupla tolerância autoimune ao cancro da mama HLA-A2/HER2 positivo e ratos *wild type* BALB/c com exossomas contendo sequências de DNA humano e com a proteína de fusão HuRt de rato¹¹. A formação destas vesículas foi possível recorrendo a um vetor adenoviral recombinante e à tecnologia de DNA recombinante¹¹.

A vacina com HuRt-T_{EXO} mostrou ser eficaz na ativação do marcador de células T, CD44, em células T CD4⁺ e numa maior concentração de anticorpos anti-HER2 no soro, bem como numa maior resposta por parte de células T CD8⁺ HER2 específicas, tal como indicado pela Figura 6¹¹. Outros dos resultados obtidos com esta vacina foram uma maior estimulação de células T citolíticas específicas e da sua memória, bem como uma proteção contra o crescimento de metástases 4T1_{HER2} nos pulmões e de células tumorais BL6-10A2/HER2, o que se reflete na Figura 7: A vacina HuRt-TEXO induz uma potente terapêutica

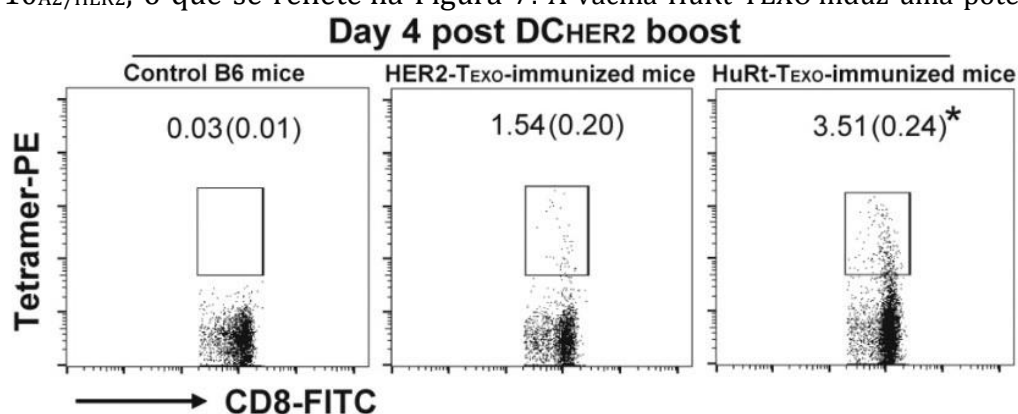


Figura 6: A vacina HuRt-T_{EXO} estimula uma potente resposta das células T CD8⁺. Após 30 dias da vacinação com HuRt-T_{EXO}, os murganhos foram estimulados com células dendríticas contendo HER. Após quatro dias foram recolhidas amostras, que mostram um maior número de células T CD8⁺ HER2-específica em murganhos vacinados com HuRt-T_{EXO} do que em murganhos vacinados com HER2-T_{EXO}.

Fonte: XIE, Y. et al. Heterologous human/rat HER2-specific exosome-targeted T cell vaccine stimulates potent humoral and CTL responses leading to enhanced circumvention of HER2 tolerance in double transgenic HLA-A2/HER2 mice. *Vaccine* 36, (2018) 1414–1422

imune HER2-específica contra células do canco da mama 4T1_{HER2} em murganho BALB/c. C: Os murganhos foram injetados com células tumorais e vacinados seis dias depois. Após vinte dias da vacinação com HuRt-TEXO e HER2-Texo, observou-se a formação de metástases nos murganhos controlo e em menor número nos vacinados com HER2-Texo, sendo que o menor número de metásteses apareceu em murganhos vacinados com HuRt-TEXO. E: observa-se que o crescimento tumoral é maior nos controlos, seguindo-se dos murganhos vacinados com HER2-Texo, e o menor crescimento foi encontrado nos animais vacinados com HuRt-TEXO.

Fonte: XIE, Y. et al. Heterologous human/rat HER2-specific exosome-targeted T cell vaccine stimulates potent humoral and CTL responses leading to enhanced circumvention of HER2 tolerance in double transgenic HLA-A2/HER2 mice. *Vaccine* 36, (2018) 1414–1422¹¹.

Em conclusão esta vacina permite estimular tanto respostas imunes humorais como de linfócitos T citolíticos, podendo funcionar como uma terapêutica para o cancro da mama HER2 positivo, principalmente para os doentes com resistência ao anticorpo HER2⁺ 11.

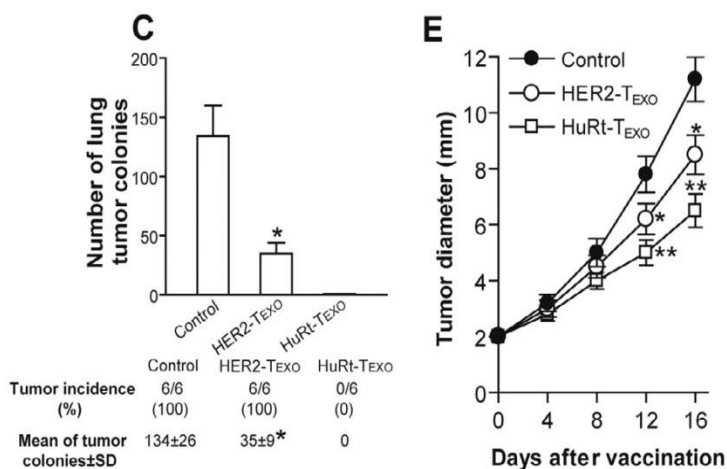


Figura 7: A vacina HuRt-T_{EXO} induz uma potente terapêutica imune HER2-específica contra células do cancro da mama 4T1_{HER2} em murganho BALB/c. C: Os murganhos foram injetados com células tumorais e vacinados seis dias depois. Após vinte dias da vacinação com HuRt-T_{EXO} e HER2-T_{EXO}, observou-se a formação de metástases nos murganhos controlo e em menor número nos vacinados com HER2-T_{EXO}, sendo que o menor número de metástases apareceu em murganhos vacinados com HuRt-T_{EXO}. E: observa-se que o crescimento tumoral é maior nos controlos, seguindo-se dos murganhos vacinados com HER2-T_{EXO}, e o menor crescimento foi encontrado nos animais vacinados com HuRt-T_{EXO}.

Fonte: XIE, Y. et al. Heterologous human/rat HER2-specific exosome-targeted T cell vaccine stimulates potent humoral and CTL responses leading to enhanced circumvention of HER2 tolerance in double transgenic HI A-A2/HER2 mice. *Vaccine* 36 (2018) 1414–1422

Com esta elevada secreção verificou-se a diminuição da proteína de resistência do cancro da mama devido à sua associação e secreção com os exossomas¹⁰¹. Deste modo, ocorreu uma maior apoptose induzida pela doxorrubicina, principalmente em células estaminais o que demonstra uma sensibilização a esta molécula terapêutica¹⁰¹. Por esta razão estas moléculas têm o potencial para poderem ser usadas como adjuvantes na terapia do cancro da mama, ao sensibilizar células resistentes a moléculas terapêutica e ao prevenir metástases¹⁰¹.

Os exossomas podem ser utilizados como transportadores de moléculas que se liga especificamente a determinadas células alvo, tal como enunciado anteriormente^{10,11}. Para isso, podem ter que ser feitas algumas modificações nos exossomas, tal como demonstrado com o seguinte exemplo. Neste estudo, OHNO et. al. (2012) injetou intravenosamente murganhos RAG2^{-/-} com exossomas modificados com o peptídeo GE11 e contendo let-7a, que têm como alvo células de cancro da mama humano⁷¹. Esta

Outro exemplo para diminuir a resistência adquirida a moléculas terapêuticas, tais como anticorpos e fármacos foi dado por Ji Na Kong et. al. em 2015. Neste estudo *in vitro*, as células MDA-MB-231 do cancro da mama foram tratadas com *guggulsterone* e *bexarotene* que elevam a quantidade de ceramida¹⁰¹. Consequentemente, ocorre uma maior secreção dos exossomas associados a transportadores *ATP-binding cassette* (ABC) nestas células, já que a ceramida induz a secreção exossomal¹⁰¹.

modificação permite aos exossomas ligarem-se mais especificamente a células que expressem EGFR⁷¹.

Todos estes desenvolvimentos contribuem para que se possa chegar a uma terapêutica cada vez eficaz e com menos efeitos adversos, o que aumentará não só a esperança de vida do doente oncológico bem como a sua qualidade de vida antes e após os tratamentos.

7.2.2.2. Glioblastoma multiforme

O glioblastoma multiforme é um cancro primário intracranial altamente agressivo e que não apresenta cura, já que não responde eficazmente nem à quimioterapia nem à imunoterapia^{92,102}. A criação de uma terapêutica para este cancro é algo que está na ordem do dia e se mostra urgente para os doentes deste cancro, que têm uma esperança média de sobrevivência de quinze meses⁹².

Tendo em conta este problema, ZHU et. al. (2018) estudaram os efeitos e a capacidade de chegar às células-alvo de exossomas derivados de células *natural killers* (NK) *in vitro* e *in vivo* em células do glioblastoma multiforme¹⁰². Apesar das células NK serem uma alternativa menos tóxica que a imunoterapia e a radioterapia, a sua aplicação numa terapia é limitada¹⁰². Tal situação deve-se à variabilidade da função e do número de células NK do doente, do ambiente tumoral, da inibição da citotoxicidade pelo tumor e problemas em obter a quantidade suficiente de exossomas¹⁰³.

Optou-se por usar a linha celular humana NK-92MI para obter os exossomas¹⁰². Os exossomas estiveram em contato com células U87/MG/F e foram administrados intravenosamente em murganhos fêmea *nude* BALB/c, não se tendo registado diferenças significativas no peso ou em efeitos patológicos nos animais¹⁰².

Conjuntamente com os exossomas foi administrado intraperitonealmente sulfato de dextrano, um agente inibidor do *uptake* dos exossomas pelo fígado¹⁰². Consequentemente, aumentou o tempo de retenção no tecido tumoral, o que levou a um aumento do efeito terapêutico¹⁰². Deste modo, observaram-se efeitos terapêuticos inatos, através da inibição da proliferação de células de glioblastoma e aumento da apoptose das células tumorais¹⁰², tal como indica a Figura 8.

Outra das estratégias para novos tratamentos para o glioblastoma multiforme pode passar por diminuir a resistência a fármacos já usados na terapêutica, tal como

mostrou MUNOZ et. al. (2013). Neste estudo usaram-se exossomas derivados de células estaminais mesenquimais contendo anti-miR-9 e o marcador Cy5¹⁰⁴. O miR-9 está associado à resistência das células do glioblastoma das linhas T98G e U87 ao agente alquilante temozolomida, através da expressão do gene que codifica a glicoproteína P¹⁰⁴. Os resultados encontrados mostraram que os exossomas anti-miR-9-Cy5 diminuíram o miR-9 em 50%, tendo como consequência o aumento da apoptose de células tumorais pelo tratamento com temozolomida¹⁰⁴.

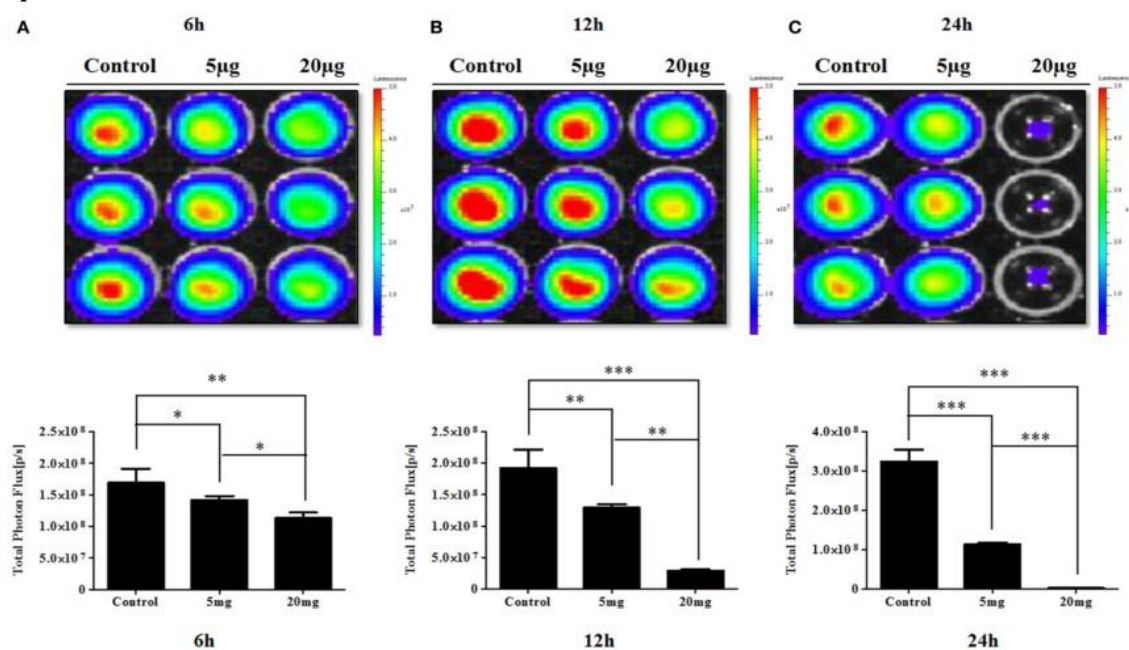


Figura 8: A citotoxicidade dos exossomas contra as células do glioblastoma multiforme. À cultura de células tumorígenas juntou-se-lhe exossomas criados em diferentes concentrações. As imagens foram obtidas com bioluminescência e traduzidas em gráficos por um software. Através da sua análise, observa-se uma diminuição das células com uma dosagem de 5mg, sendo esta descida mais acentuada ainda com a dosagem de 20mg.

Fonte: ZHU, L. et al. Targeting and therapy of glioblastoma in a mouse model using exosomes derived from Natural Killer cells. *Front. Immunol.* 9, (2018)

Noutra possibilidade terapêutica contra o glioblastoma usam-se exossomas da linha celular GL261 com um efeito imunoestimulador. Estes exossomas foram injetados subcutaneamente em murganhos macho C57BL/6 e rapidamente induziram uma resposta imune ao produzirem anticorpos que se ligam às células GL261 e mostram evidência de reatividade de células T⁹². Devido ao crescimento tumoral e/ou a cirurgias que os doentes com glioblastoma possam passar, suspeita-se que ocorra a libertação de exossomas, o que permite sensibilizar o organismo contra antigénios tumorais sem intervenção exógena⁹².

Estes são apenas alguns exemplos em como os exossomas podem ser muito úteis em futuras e alternativas terapêuticas para doenças que têm hoje em dia tratamentos complexos, com poucos resultados efetivos e ainda com pouca qualidade de vida para o doente.

8. Conclusão

Os exossomas são vesículas provenientes de praticamente todas as células do organismo, já que têm a função de eliminar conteúdo que pode ter ou não interesse à célula^{7,16}. Foi demonstrado que os exossomas têm uma capacidade comunicativa entre células diferentes e que possam estar distanciadas entre si⁷, podendo os mesmos estarem presentes em situações normais ou patológicas¹⁸.

O facto de também estarem presentes em praticamente todos os fluídos corporais⁸ permite a obtenção de exossomas sem que sejam necessários procedimentos invasivos¹⁰⁵. Além destas características os exossomas possuem um tamanho nanométrico¹⁴ e têm uma formação endógena⁸. Tais vantagens permitem não só a passagem por barreiras de difícil acesso, tal como a barreira hematoencefálica⁷, mas também uma baixa toxicidade, uma excelente biocompatibilidade com baixa *clearance*⁵⁵.

Estes são apenas alguns aspetos que se destacam dos anteriormente enunciados para justificar o interesse na utilização de exossomas em patologias, tanto como um meio de diagnóstico como terapêutico.

O uso dos exossomas em diagnóstico é de elevada importância, já que os exossomas têm característica das suas células de origem, tais como proteínas e lípidos⁸⁷. Por isso, basta recolher uma amostra que contenha exossomas da célula-alvo e procurar na amostra pelos marcadores presentes e conhecidos desta célula. Torna-se evidente que esta utilização pode ser mais benéfica e precisa que alguns dos métodos utilizados atualmente.

A terapêutica é outro dos campos onde os exossomas podem exercer uma extrema importância, já que além das vantagens enunciadas anteriormente, são também vesículas capazes de transportar pequenas moléculas de diferentes naturezas e exógenas também^{7,105}. Deste modo, os exossomas são modificados para o transporte de moléculas ou para uma melhor precisão de ligação às células-alvo para a entrega do seu conteúdo. Esta transferência deve dar lugar a uma mudança na célula de encontro ao que se pretende.

Porém, ainda existem alguns obstáculos de carácter relevante para a possível utilização de exossomas no futuro tanto em diagnóstico como em terapêutica. Uma das maiores é a dificuldade em otimizar uma produção custo-eficiente tanto em quantidade

como em qualidade^{9,13}. Por isso mesmo supõe-se a criação de moléculas semelhantes a exossomas¹⁰ para que possam ter os mesmos efeitos benéficos, sem o problema apresentado.

Ainda existe um longo caminho até se entender muito bem os exossomas e surgirem terapêuticas ou meios de diagnóstico compostos por exossomas ou baseado neles, e aprovados para uso em humanos. Esta situação deve-se a diversos fatores apresentados ao longo deste trabalho e que ainda não têm uma solução em vista para breve. Todavia, têm-se feito nestes últimos anos muitos avanços, tanto na resolução desses problemas, como nesta área tão promissora para o futuro e bem-estar dos doentes, tanto oncológicos como de outras patologias.

9. Bibliografia

1. Uso do Medicamento - Somos Todos Responsáveis. Available at: <http://www.usoresponsaveldomedicamento.com/index.php?like>. (Accessed: 8th July 2018)
2. Sifarma. Available at: <https://www.glintt.com/pt/o-que-fazemos/ofertas/SoftwareSolutions/Paginas/Sifarma.aspx>. (Accessed: 8th July 2018)
3. IBERIAN PHARMACEUTICAL MARKET 2016. (2017)
4. PAN, B. T. & JOHNSTONE, R. M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell* **33**, (1983) 967–978
5. HARDING, C. & STAHL, P. Transferrin recycling in reticulocytes: pH and iron are important determinants of ligand binding and processing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **113**, (1983) 650–658
6. HARDING, C. V., HEUSER, J. E. & STAHL, P. D. Exosomes: Looking back three decades and into the future. *J. Cell Biol.* **200**, (2013) 367–371
7. RASHED, M. H. et al. Exosomes: From garbage bins to promising therapeutic targets. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017)
8. ZHANG, J., LI, S., MI, S. & LI, L. Exosome and Exosomal MicroRNA : Trafficking , Sorting , and Function. **13**, (2015) 17–24
9. LUAN, X. et al. Engineering exosomes as refined biological nanoplatfoms for drug delivery. *Acta Pharmacol. Sin.* **38**, (2017) 754–763
10. JOHNSEN, K. B. et al. A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles - Endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1846**, (2014) 75–87
11. XIE, Y. et al. Heterologous human/rat HER2-specific exosome-targeted T cell vaccine stimulates potent humoral and CTL responses leading to enhanced circumvention of HER2 tolerance in double transgenic HLA-A2/HER2 mice. *Vaccine* **36**, (2018) 1414–1422

12. XU, R. et al. Extracellular vesicles in cancer — implications for future improvements in cancer care. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* (2018) 1–22
doi:10.1038/s41571-018-0036-9
13. DIDOT, M. C. et al. Exosome-mediated delivery of hydrophobically modified siRNA for huntingtin mRNA silencing. *Mol. Ther.* **24**, (2016) 1836–1847
14. REZAIE, J. et al. Exosomes and their Application in Biomedical Field: Difficulties and Advantages. *Mol. Neurobiol.* **55**, (2018) 3372–3393
15. LI, S. P., LIN, Z. X., JIANG, X. Y. & YU, X. Y. Exosomal cargo-loading and synthetic exosome-mimics as potential therapeutic tools. *Acta Pharmacol. Sin.* **39**, (2018) 542–551
16. KOGA, K. et al. Purification, characterization and biological significance of tumor-derived exosomes. *Anticancer Res* **25**, (2005) 3703–3707
17. VLASSOV, A. V., MAGDALENO, S., SETTERQUIST, R. & CONRAD, R. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1820**, (2012) 940–948
18. BEACH, A., ZHANG, H. G., RATAJCZAK, M. Z. & KAKAR, S. S. Exosomes: An overview of biogenesis, composition and role in ovarian cancer. *J. Ovarian Res.* **7**, (2014)
19. ATAY, S., GERCEL-TAYLOR, C., KESIMER, M. & TAYLOR, D. D. Morphologic and proteomic characterization of exosomes released by cultured extravillous trophoblast cells. *Exp. Cell Res.* **317**, (2011) 1192–1202
20. SKOGBERG, G. et al. Characterization of Human Thymic Exosomes. *PLoS One* **8**, (2013) 1–10
21. LÄSSER, C., ELDH, M. & LÖTVALL, J. Isolation and Characterization of RNA-Containing Exosomes. *J. Vis. Exp.* (2012) 1–6 doi:10.3791/3037
22. SANTONOCITO, M. et al. Molecular characterization of exosomes and their microRNA cargo in human follicular fluid: Bioinformatic analysis reveals that exosomal microRNAs control pathways involved in follicular maturation. *Fertil. Steril.* **102**, (2014) 1751–1761
23. LIANG, B. et al. Characterization and proteomic analysis of ovarian cancer-derived exosomes. *J. Proteomics* **80**, (2013) 171–182

24. VAN DER POL, E., BOING, A. N., HARRISON, P., STURK, A. & NIEUWLAND, R. Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. *Pharmacol. Rev.* **64**, (2012) 676–705
25. KOWAL, J., TKACH, M. & THÉRY, C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **29**, (2014) 116–125
26. SCHOREY, J. S. & BHATNAGAR, S. Exosome function: From tumor immunology to pathogen biology. *Traffic* **9**, (2008) 871–881
27. PIPER, R. C. & KATZMANN, D. J. Biogenesis and Function of Multivesicular Bodies. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, (2010) 519–547
28. ALBERTS, B. et al. *Molecular biology of the cell.* (Garland Science, 2002).
29. COLOMBO, M. et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J. Cell Sci.* **126**, (2013) 5553–5565
30. ESCOLA, J. M. et al. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **273**, (1998) 20121–20127
31. HSU, C. et al. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J. Cell Biol.* **189**, (2010) 223–232
32. ABRAMI, L. et al. Hijacking Multivesicular Bodies Enables Long-Term and Exosome-Mediated Long-Distance Action of Anthrax Toxin. *Cell Rep.* **5**, (2013) 986–996
33. OSTROWSKI CARMO, N. B., KRUMEICH, S., FANGET, I., RAPOSO, G., SAVINA, A., MOITA, C. F., SCHAUER, K., HUME, A. N., FREITAS, R. P., GOUD, B., BENAROCH, P., HACOEN, N., FUKUDA, M., DESNOS, C., SEABRA, M. C., DARCHEN, F., AMIGORENA, S., MOITA, L. F., THÉRY, M. Rab27a and Rab 27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat. Cell Biol.* **12**, (2010) 19–30
34. CAI, C. et al. Macrophage-derived extracellular vesicles induce long-lasting immunity against hepatitis C virus which is blunted by polyunsaturated fatty acids. *Front. Immunol.* **9**, (2018) 1–11
35. BARROS, F. M., CARNEIRO, F., MACHADO, J. C. & MELO, S. A. Exosomes and immune response in cancer: Friends or foes? *Front. Immunol.* **9**, (2018)

36. BORGES, F. T. et al. TGF- 1-Containing Exosomes from Injured Epithelial Cells Activate Fibroblasts to Initiate Tissue Regenerative Responses and Fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, (2013) 385–392
37. LAI, R. C. et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* **4**, (2010) 214–222
38. JANOWSKA-WIECZOREK, A. et al. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int. J. Cancer* **113**, (2005) 752–760
39. SAMAN, S. et al. Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **287**, (2012) 3842–3849
40. BELLINGHAM, S. A., GUO, B. B., COLEMAN, B. M. & HILL, A. F. Exosomes: Vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Front. Physiol.* **3 MAY**, (2012) 1–12
41. RASHED, M. H. et al. Exosomal miR-940 maintains SRC-mediated oncogenic activity in cancer cells: a possible role for exosomal disposal of tumor suppressor miRNAs. *Oncotarget* **8**, (2017) 20145–20164
42. TROYER, R. M. et al. Exosomes from Osteosarcoma and normal osteoblast differ in proteomic cargo and immunomodulatory effects on T cells. *Exp. Cell Res.* **358**, (2017) 369–376
43. WEN, S. W. et al. The biodistribution and immune suppressive effects of breast cancer-derived exosomes. *Cancer Res.* **76**, (2016) 6816–6827
44. PAGGETTI, J. et al. Exosomes released by chronic lymphocytic leukemia cells induce the transition of stromal cells into cancer-associated fibroblasts. *Blood* **126**, (2015) 1106–1118
45. LEE, J.-K. et al. Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells Suppress Angiogenesis by Down-Regulating VEGF Expression in Breast Cancer Cells. *PLoS One* **8**, (2013) e84256
46. KAPOOR, N. R. et al. The HBx gene of hepatitis B virus can influence hepatic microenvironment via exosomes by transferring its mRNA and protein. *Virus Res.* **240**, (2017) 166–174

47. SUTARIA, D. S., BADAWI, M., PHELPS, M. A. & SCHMITTGEN, T. D. Achieving the Promise of Therapeutic Extracellular Vesicles: The Devil is in Details of Therapeutic Loading. *Pharm. Res.* **34**, (2017) 1053–1066
48. YIM, N. et al. Exosome engineering for efficient intracellular delivery of soluble proteins using optically reversible protein-protein interaction module. *Nat. Commun.* **7**, (2016) 1–9
49. VILLARROYA-BELTRI, C. et al. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat. Commun.* **4**, (2013) 1–10
50. ZHANG, D., LEE, H., ZHU, Z., MINHAS, J. K. & JIN, Y. Enrichment of selective miRNAs in exosomes and delivery of exosomal miRNAs in vitro and in vivo. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **312**, (2017) L110–L121
51. YANG, T. ET AL. Exosome Delivered Anticancer Drugs Across the Blood-Brain Barrier for Brain Cancer Therapy in Danio Rerio Tianzhi. *Pharm Res.* **32**, (2015) 2003–2014
52. TIAN, Y. et al. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials* **35**, (2014) 2383–2390
53. KIM, M. S. et al. Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **12**, (2016) 655–664
54. KIM, M. S. et al. Engineering macrophage-derived exosomes for targeted paclitaxel delivery to pulmonary metastases: in vitro and in vivo evaluations. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **14**, (2018) 195–204
55. KAMERKAR, S. et al. Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature* **546**, (2017) 498–503
56. HANEY, M. J. et al. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *J. Control. Release* **207**, (2015) 18–30
57. LIU, H. et al. Co-delivery of tumor-derived exosomes with alpha-galactosylceramide on dendritic cell-based immunotherapy for glioblastoma. *Cancer Lett.* **411**, (2017) 182–190
58. FUHRMANN, G., SERIO, A., MAZO, M., NAIR, R. & STEVENS, M. M. Active loading into

- extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins. *J. Control. Release* **205**, (2015) 35–44
59. PODOLAK, I., GALANTY, A. & SOBOLEWSKA, D. Saponins as cytotoxic agents: A review. *Phytochem. Rev.* **9**, (2010) 425–474
 60. MCKELVEY, K. J., POWELL, K. L., ASHTON, A. W., MORRIS, J. M. & MCCRACKEN, S. A. Exosomes: Mechanisms of Uptake. *J. Circ. Biomarkers* (2015) 1 doi:10.5772/61186
 61. MONTECALVO, A. et al. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* **119**, (2012) 756–766
 62. GALLOWAY, D. A., LAIMINS, L. A., DIVISION, B. & HUTCHINSON, F. HHS Public Access. **364**, (2016) 87–92
 63. FENG, D. et al. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic* **11**, (2010) 675–687
 64. WANG, R. et al. Exosome adherence and internalization by hepatic stellate cells triggers sphingosine 1-phosphate-dependent migration. *J. Biol. Chem.* **290**, (2015) 30684–30696
 65. RANA, S., YUE, S., STADEL, D. & ZÖLLER, M. Toward tailored exosomes: The exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, (2012) 1574–1584
 66. PAROLINI, I. et al. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J. Biol. Chem.* **284**, (2009) 34211–34222
 67. MEHLEN, P., MILLE, F. & THIBERT, C. Morphogens and cell survival during development. *J. Neurobiol.* **64**, (2005) 357–366
 68. MULCAHY, L. A., PINK, R. C. & CARTER, D. R. F. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J. Extracell. Vesicles* **3**, (2014) 1–14
 69. TIAN, T. et al. Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *J. Biol. Chem.* **289**, (2014) 22258–22267
 70. CAPONNETTO, F. et al. Size-dependent cellular uptake of exosomes. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **13**, (2017) 1011–1020

71. OHNO, S. I. et al. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. *Mol. Ther.* **21**, (2013) 185–191
72. HANEY, M. J. et al. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson’s disease therapy. *J. Control. Release* **207**, (2015) 18–30
73. DELHAES, F. et al. Altered maternal and placental lipid metabolism and fetal fat development in obesity: Current knowledge and advances in non-invasive assessment. *Placenta* (2018) 0–1 doi:10.1016/j.placenta.2018.05.011
74. GAO, X. et al. Anchor peptide captures, targets, and loads exosomes of diverse origins for diagnostics and therapy. *Sci. Transl. Med.* **10**, (2018) eaat0195
75. TAYLOR, D. D. & GERCEL-TAYLOR, C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **110**, (2008) 13–21
76. SKOG, J. et al. NIH Public Access. *Nat. Cell Biol.* **10**, (2012) 1470–1476
77. YUAN, Y. et al. Stem Cell-Derived Exosome in Cardiovascular Diseases: Macro Roles of Micro Particles. *Front. Pharmacol.* **9**, (2018) 547
78. KOSAKA, N., IGUCHI, H. & OCHIYA, T. Circulating microRNA in body fluid: A new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci.* **101**, (2010) 2087–2092
79. MADHAVAN, B. et al. Combined evaluation of a panel of protein and miRNA serum-exosome biomarkers for pancreatic cancer diagnosis increases sensitivity and specificity. *Int. J. Cancer* **136**, (2015) 2616–2627
80. BAIG, S. et al. Lipidomic analysis of human placental Syncytiotrophoblast microvesicles in adverse pregnancy outcomes. *Placenta* **34**, (2013) 436–442
81. SIGDEL, T. K. et al. Perturbations in the Urinary Exosome in Transplant Rejection. *Front. Med.* **1**, (2015) 1–10
82. ALVAREZ, S. et al. Urinary exosomes as a source of kidney dysfunction biomarker in renal transplantation. *Transplant. Proc.* **45**, (2013) 3719–3723
83. VALLABHAJOSYULA, P. et al. Tissue-specific exosome biomarkers for noninvasively monitoring immunologic rejection of transplanted tissue. *J. Clin. Invest.* **127**, (2017) 1375–1391

84. GONZALEZ-NOLASCO, B., WANG, M., PRUNEVIELLE, A. & BENICHO, G. Emerging role of exosomes in allorecognition and allograft rejection. *Curr. Opin. Organ Transplant.* **23**, (2018) 22–27
85. RABINOWITS, G., GERÇEL-TAYLOR, C., DAY, J. M., TAYLOR, D. D. & KLOECKER, G. H. Exosomal microRNA: A diagnostic marker for lung cancer. *Clin. Lung Cancer* **10**, (2009) 42–46
86. CHEN, I.-H. et al. Phosphoproteins in extracellular vesicles as candidate markers for breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, (2017) 3175–3180
87. VALENTINO, A. et al. Exosomal microRNAs in liquid biopsies: future biomarkers for prostate cancer. *Clin. Transl. Oncol.* **19**, (2017) 651–657
88. NEDAEINIA, R. et al. Circulating exosomes and exosomal microRNAs as biomarkers in gastrointestinal cancer. *Cancer Gene Ther.* **24**, (2017) 48–56
89. SUGIMACHI, K. et al. Identification of a bona fide microRNA biomarker in serum exosomes that predicts hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation. *Br. J. Cancer* **112**, (2015) 532–538
90. OGATA-KAWATA, H. et al. Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer. *PLoS One* **9**, (2014)
91. ALEGRE, E. et al. Study of circulating MicroRNA-125b levels in serum exosomes in advanced melanoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **138**, (2014) 828–832
92. HARSHYNE, L. A. et al. Glioblastoma exosomes and IGF-1R/AS-ODN are immunogenic stimuli in a translational research immunotherapy paradigm. *Cancer Immunol. Immunother.* **64**, (2015) 299–309
93. ZHUANG, X. et al. Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Mol. Ther.* **19**, (2011) 1769–1779
94. TAN, A., DE LA PEÑA, H. & SEIFALIAN, A. M. The application of exosomes as a nanoscale cancer vaccine. *Int. J. Nanomedicine* **5**, (2010) 889–900
95. PARK, S. Y. et al. Dimeric Le(a) (Le(a)-on-Le(a)) status of beta-haptoglobin in sera of colon cancer, chronic inflammatory disease and normal subjects. *Int. J. Oncol.* **36**, (2010) 1291–1297

96. DAI, S. et al. Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer. *Mol. Ther.* **16**, (2008) 782–790
97. ANTICOLI, S. et al. An Exosome-Based Vaccine Platform Imparts Cytotoxic T Lymphocyte Immunity Against Viral Antigens. *Biotechnol. J.* **13**, (2018) 1–7
98. SCHÜLKE, S. Induction of interleukin-10 producing dendritic cells as a tool to suppress allergen-specific T helper 2 responses. *Front. Immunol.* **9**, (2018)
99. Cancro da Mama : Liga Portuguesa Contra o Cancro. Available at: <https://www.ligacontracancro.pt/cancro-da-mama/>. (Accessed: 30th June 2018)
100. Estadiamento - Cancro do Cérebro : Liga Portuguesa Contra o Cancro. Available at: <https://www.ligacontracancro.pt/cancro-do-cerebro-estadiamento/>. (Accessed: 30th June 2018)
101. KONG, J. N. et al. Guggulsterone and bexarotene induce secretion of exosome-associated breast cancer resistance protein and reduce doxorubicin resistance in MDA-MB-231 cells. *Int. J. Cancer* **137**, (2015) 1610–1620
102. ZHU, L. et al. Targeting and therapy of glioblastoma in a mouse model using exosomes derived from Natural Killer cells. *Front. Immunol.* **9**, (2018)
103. GUILLEREY, C., HUNTINGTON, N. D. & SMYTH, M. J. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nat. Immunol.* **17**, (2016) 1025–1036
104. MUNOZ, J. L. et al. Delivery of functional anti-miR-9 by mesenchymal stem cell-derived exosomes to glioblastoma multiforme cells conferred chemosensitivity. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2**, (2013) e126
105. BAI, SHUSHUA, T. Y. ET AL. HHS Public Access. *Pharm Res.* **32**, (2015) 2003–2014

10. Anexos

10.1. Glossário

Bexarotene - Agonista do recetor retinoide X nuclear (LI et. al., 2016)

Curcumina - Molécula com propriedades anti-inflamatórias (XIE et. al., 2018)

Dynamin - Proteína presente na internalização por fagocitose e na endocitose mediada por *lipid rafts* (Tian et. al., 2014) (FENG et. al., 2010)

Guggulsterone - Antagonista do recetor *farnesoid X* (LI et. al., 2016)

IL-10 - Tem um efeito pro-tolerogénico (DIDIOT et. al., 2016)

JSI-124 - Inibidor da molécula Stat3, crítica no crescimento de tumores, tal como glioblastoma (XU et. al., 2018)

let-7a - supressor tumoral que inibe o crescimento de células cancerígenas ao alterar o ciclo celular e ao reduzir a divisão celular (OHNO et. al., 2012)

lipid rafts - Áreas de separação de fases na bicamada lipídica, devido à limitada solubilidade dos lípidos (KAMERKAR et. al., 2017), resistentes a detergentes (KOWAL et. al., 2014)

Morfógeno - Molécula secretada por um conjunto específico de células presentes num gradiente de concentração e que direciona as células ao longo do mesmo (MEHLEN et. al., 2005)

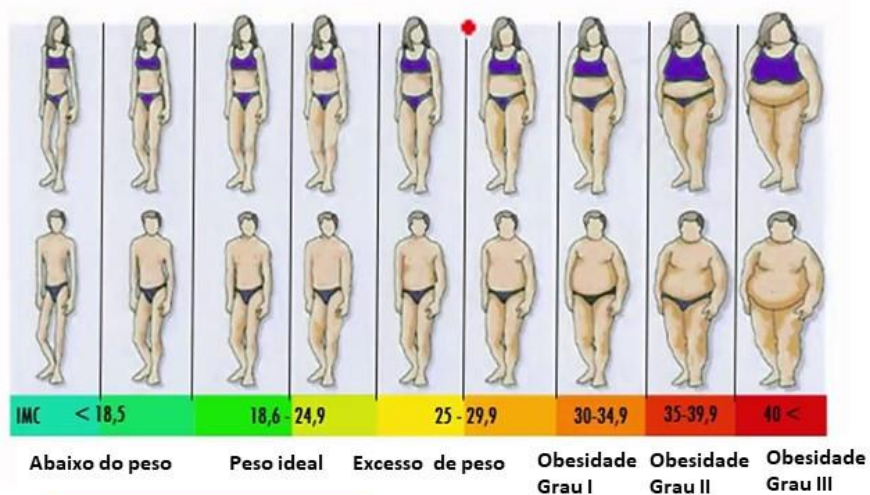
N-acetylneurami-nylgalactosylglucosylceramide (GM3) - Marcador reconhecido de *lipid rafts* (PAROLINI et al., 2009)

R18 - Corante lipofílico usado em ensaios de extinção de fluorescência (MEHLEN et. al., 2005)

Syntenin - Adaptador citoplasmático dos recetores proteoglicanos heparina sulfato detergentes (KOWAL et. al., 2014)

TBC1D10A-C - Proteína ativante da GTPase do domínio TBC1 que pertence à família 10A-C (BEACH et. al., 2014)

ÍNDICE DE MASSA CORPORAL



$$IMC = \frac{\text{peso}}{\text{altura} \times \text{altura}}$$



Riscos da obesidade



A obesidade é um dos fatores de risco para doenças cardiovasculares!

A Farmácia Campeão dispõe de serviços de nutrição e nutrição desportiva.

Não deixe a sua saúde para segundo plano! Informe-se junto de um dos nossos colaboradores.



Hipertensão arterial

NO CONSULTÓRIO.

AÍ DOUTOR... ESTOU MUITO MAL, NÃO DORMI NADA, ESTOU COM DOR DE CABEÇA, TONTURAS, MAL ESTAR, AGORA QUE VOU MORRER!!

BOM DIA DONA ABESSA, VAMOS COM CALMA, PRIMEIRO VOU MEDIR A SUA PRESSÃO!



A Pressão Arterial alta pode ou não apresentar sintomas!

A SENHORA TERÁ QUE MUDAR ALGUNS HÁBITOS A PARTIR DE HOJE COMO: DIMINUIR O SAL DOS ALIMENTOS E PRATICAR EXERCÍCIOS!

!?



Se não for detectada a tempo e feito um tratamento, a hipertensão arterial poderá causar danos irreparáveis a saúde.

É muito importante o acompanhamento do médico, e sempre que possível de uma equipe multiprofissional.

farmáciacampeão



DIGA NÃO AO FUMO



PRATIQUE DESPORTO

VERIFIQUE A QUANTIDADE DE SAL NOS RÓTULOS DOS ALIMENTOS



SAIBA SE É DIABÉTICO

DIGA NÃO A OBESIDADE E SEDENTARISMO



EVITE O STRESS

ENTÃO QUER DIZER QUE TOMANDO O MEDICAMENTO DIÁRIO E OBSERVANDO ESSAS REGRAS EU VOU PODER LEVAR UMA VIDA NORMAL

É ISSO MESMO... SEGUINDO TODAS AS REGRAS DO TRATAMENTO VOCÊ PODERÁ LEVAR UMA VIDA COM MAIS QUALIDADE.

NÃO ESQUEÇA... EVITE A INGESTÃO EXCESSIVA DE SAL!



Data	Hora	Pressão arterial	Pulsação

farmáciacampeão



Hipertensão arterial



farmáciacampeão



Data	Hora	Pressão arterial	Pulsção

farmáciacampeão

Hipertensão arterial



farmáciacampeão

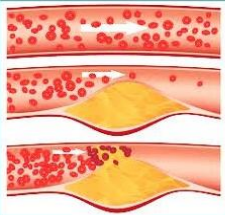


Data	Hora	Pressão arterial	Pulsação

farmáciacampeão

Por que é importante manter o nível de colesterol controlado?

O colesterol é importante para o funcionamento normal do organismo, porém, quando em excesso no sangue, pode se acumular nas paredes das artérias formando placas que aumentam o risco de doenças cardíacas e de eventos como o acidente vascular cerebral (AVC), popularmente conhecido como derrame.




Data	Hora	Colesterol Total

farmácia campeão

Existe colesterol "bom" e "mau"?

O colesterol é transportado no sangue por lipoproteínas de baixa (LDL) e alta densidade (HDL). Ambas têm funções importantes em nosso organismo, desde que em níveis adequados. O LDL, conhecido como "Colesterol mau", transporta o colesterol do fígado para as células dos tecidos e o HDL, conhecido como "colesterol bom", transporta o colesterol para o fígado, favorecendo sua eliminação. A imagem a baixo ilustra esse processo:



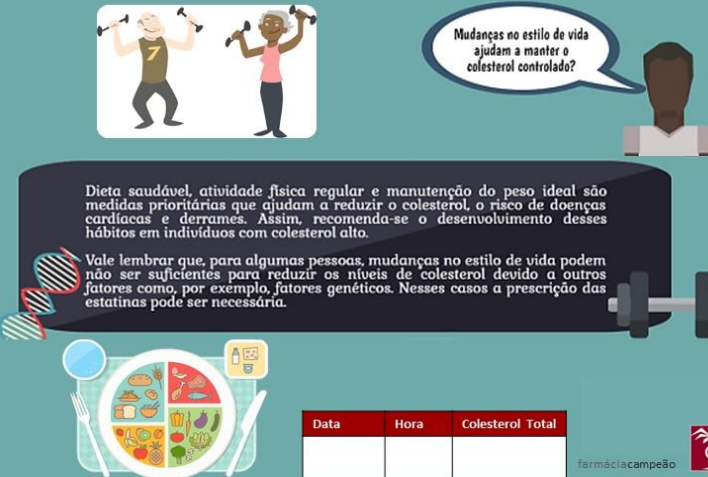
Data	Hora	Colesterol Total

farmácia campeão

Mudanças no estilo de vida ajudam a manter o colesterol controlado?

Dieta saudável, atividade física regular e manutenção do peso ideal são medidas prioritárias que ajudam a reduzir o colesterol, o risco de doenças cardíacas e derrames. Assim, recomenda-se o desenvolvimento desses hábitos em indivíduos com colesterol alto.

Vale lembrar que, para algumas pessoas, mudanças no estilo de vida podem não ser suficientes para reduzir os níveis de colesterol devido a outros fatores como, por exemplo, fatores genéticos. Nesses casos a prescrição das estatinas pode ser necessária.




Data	Hora	Colesterol Total

farmácia campeão

O que fazer se mesmo com uma dieta saudável e exercícios físicos regulares, você é diagnosticado com níveis elevados de colesterol no sangue? Nesses casos, para ajudar no controle do seu colesterol, a recomendação médica é o uso de medicamentos, como as estatinas.

Mas afinal, há riscos em utilizar estatinas?

As estatinas, como todo medicamento, podem causar reações adversas. Nesse caso, as reações adversas mais comuns são dor e fraqueza muscular. A avaliação médica é muito importante para que o medicamento seja utilizado somente quando os benefícios superarem os riscos. Além disso, é fundamental que o médico tenha conhecimento de todos os medicamentos que o paciente utiliza, para avaliar possíveis interações medicamentosas que possam ser relevantes à saúde do paciente. O farmacêutico pode ser de ajuda fundamental para garantir melhores resultados e maior segurança no tratamento do paciente.



Data	Hora	Colesterol Total

farmácia campeão

Sintomas da Diabetes mellitus



Ter muita fome



Perda de peso (tipo 1)



Ganho de peso (tipo 2)



Urinar muito



Fraqueza, cansaço físico, desânimo



Ter muita sede



Lesões de difícil cicatrização



Infeções frequentes

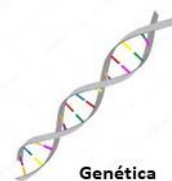


Alterações visuais

farmáciacampeão

Causas da Diabetes mellitus

Causas da Diabetes mellitus tipo 1



Genética



A diabetes é um dos fatores de risco para doenças cardiovasculares!

Data	Hora	Glicémia

Causas da Diabetes mellitus tipo 2



Obesidade



Idade



Colesterol alto



Genética



Fumar



Excesso de álcool



Pressão arterial alta

farmáciacampeão

