



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Cátia Alexandra Pimentel Morais

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “A aplicação das vesículas extracelulares de parasitas no desenvolvimento de vacinas” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Joana Parente, do Dr. João Braga e da Professora Doutora Maria do Céu Sousa apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019



UNIVERSIDADE D COIMBRA

Cátia Alexandra Pimentel Morais

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “A aplicação das vesículas extracelulares de parasitas no desenvolvimento de vacinas” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação da Dra. Joana Parente, do Dr. João Braga e da Professora Doutora Maria do Céu Sousa e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2019

Eu, Cátia Alexandra Pimentel Morais, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2014211736, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “A aplicação das vesículas extracelulares de parasitas no desenvolvimento de vacinas” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 5 de Setembro de 2019.



(Cátia Alexandra Pimentel Morais)

Agradecimentos

Agora que esta longa caminhada chegou ao fim, resta-me agradecer a todos os que dela fizeram parte e que, de alguma maneira, contribuíram para que fosse uma experiência incrível.

Antes de mais, quero agradecer aos meus pais por me terem deixado viver esta aventura. Por todas as palavras de coragem e motivação, fazendo-me sempre acreditar nas minhas capacidades e que iria conseguir alcançar todos os meus objectivos e sonhos.

À minha irmã, pela inspiração constante. Um pilar e companheira fiel com a qual pude sempre contar.

Ao Hélder, por todo o apoio, incentivo e compreensão. Por estar sempre presente, nunca me deixando ir abaixo nos momentos mais complicados.

Aos meus avós, pelos conselhos sábios, coragem transmitida e pelas palavras de carinho.

Aos meus amigos, por terem realizado este percurso comigo, por todos os momentos partilhados, sorrisos e por todas as memórias que ficam para a vida.

A toda a equipa da Farmácia Manso pela oportunidade que me deram de poder aprender e crescer como farmacêutica. Por toda a simpatia, conhecimentos e valores transmitidos.

A toda a equipa da Farmalabor, em particular ao departamento de Garantia de Qualidade, pelo companheirismo, ensinamentos e espírito de ajuda.

À Professora Doutora Maria do Céu Sousa, por toda a ajuda, simpatia e disponibilidade.

Por fim, a Coimbra que se tornou a minha casa longe de casa. Onde conheci pessoas incríveis, aprendi e vivi momentos inesquecíveis.

Índice

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA

Abreviaturas	7
Introdução.....	8
Análise SWOT.....	9
1.Pontos Fortes.....	9
1.1 Estruturação do Plano de Estágio	9
1.2 Localização da farmácia e Público alvo	10
1.3 Equipa de trabalho e integração	11
1.4 Formações externas	11
1.5 Serviços Farmacêuticos.....	12
1.6 Gestão de <i>stock</i> , seleção dos fornecedores, armazenamento e receção.....	12
1.7 Prescrição por DCI	13
2.Pontos Fracos.....	14
2.1 Aconselhamento de MNSRM	14
2.2. Preparação inexistente de medicamentos manipulados	14
3.Oportunidades.....	14
3.1 Formações.....	14
3.2 Integração e aplicação de conhecimentos adquiridos.....	15
4.Ameaças.....	15
4.1 Formação limitada em algumas áreas	15
4.2 Conhecimento insuficiente do programa Sifarma 2000®	16
4.3 Outros estabelecimentos de venda de MNSR.....	16
4.4 Medicamentos Esgotados.....	16
Casos Práticos	17
Considerações Finais.....	18
Referências Bibliográficas	19

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Abreviaturas	21
Introdução.....	22
Enquadramento do Estágio.....	23

Análise SWOT.....	24
1.Pontos Fortes.....	24
1.1 Departamento Multidisciplinar	24
1.2 Equipa de trabalho e integração	24
1.3 Perceção mais real e detalhada do funcionamento de uma indústria.....	25
1.4 Promoção da autonomia e do sentido crítico	25
1.5 Formação contínua.....	26
2.Pontos Fracos.....	26
2.1 Duração do estágio	26
2.2. Falta de planeamento do estágio.....	27
3.Oportunidades.....	27
3.1 Desenvolvimento de competências informáticas.....	27
3.2 Integração e aplicação dos conhecimentos adquiridos	28
3.3 Desenvolvimento da língua inglesa	28
4. Ameaças	28
4.1 Departamento do estágio	28
4.2 Contexto económico atual e a constante mudança	29
Considerações Finais.....	30
Referências Bibliográficas	31

MONOGRAFIA - A aplicação das vesículas extracelulares de parasitas no desenvolvimento de vacinas

Abreviaturas.....	33
Resumo	34
Abstract.....	35
1. Introdução	36
1.1 Vesículas Extracelulares.....	36
1.2 Biogénese da Vesículas Extracelulares	37
1.3 Composição das Vesículas Extracelulares	38
1.4 Aplicações clínicas das VEs	39
2. Protozoários Flagelados.....	40
2.1 <i>Trichomonas vaginalis</i>	40
2.1.1 Tricomoniase	41
2.1.2 Resposta imunológica à infeção e estudos com VEs.....	42

2.2	<i>Leishmania spp.</i>	43
2.2.1	Leishmaniose	43
2.2.2	Resposta imunológica à infecção e estudos com VEs	44
3.	Parasitas Esporozoários	46
3.1	<i>Toxoplasma gondii</i>	47
3.1.1	Toxoplasmose.....	48
3.1.2	Resposta imunológica à infecção e estudos com VEs	48
3.2	<i>Plasmodium spp.</i>	50
3.2.1	Malária	51
3.2.2	Resposta imunológica à infecção e estudos com VEs	51
	Conclusão.....	54
	Referências Bibliográficas	55

Relatório de estágio em Farmácia Comunitária



Orientadora: Dra. Joana Parente

Abreviaturas

DCI - Denominação Comum Internacional

FM - Farmácia Manso

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM - Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

MSRM - Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

SNS - Sistema Nacional de Saúde

SWOT - *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats* / Forças, Fraquezas, Oportunidades e Ameaças

Introdução

O farmacêutico sendo um agente de saúde pública, deve atuar em articulação com os restantes profissionais de saúde. É uma profissão antiga e bastante complexa, englobando diferentes vertentes como: Farmácia Hospitalar, Análises Clínicas, Indústria Farmacêutica, Distribuição Grossista, Farmácia Comunitária, entre outras, sendo a última a vertente mais visível da profissão, representando muitas vezes o primeiro local a que os utentes recorrem numa situação de necessidade. ⁽¹⁾

O farmacêutico desempenha a sua tarefa de uma forma discreta mas com grande eficácia, qualidade e profissionalismo. As constantes mudanças do setor farmacêutico, com subsequente necessidade de adaptação, faz com que haja a necessidade de investir na formação contínua, de forma a integrar-se numa rede multidisciplinar de cuidados de saúde centrados no doente.

Para exercer a atividade, o farmacêutico deve estar inscrito na Ordem dos Farmacêuticos, sendo portanto fundamental ser titular do mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas. ⁽²⁾ O estágio curricular constitui o último semestre do MICEF, o culminar de 5 anos de formação e a primeira experiência dos estudantes enquanto profissionais de saúde, permitindo a consolidação de todos os conhecimentos adquiridos até então. Por estas razões, penso que esta é uma etapa imprescindível na formação dos futuros farmacêuticos e também para o crescimento pessoal.

A escolha do local de estágio recaiu sobre a Farmácia Manso, em Viana do Castelo, sob a orientação da Dra. Joana Parente, com início a 7 de janeiro e fim a 30 de abril. A opção por esta farmácia foi pelo facto de já conhecer desde há alguns anos, sendo eu própria cliente da mesma, assim como também pelo facto de ser constituída por uma equipa jovem com um espírito de entreajuda bastante visível.

Análise SWOT

O presente relatório tem como finalidade apresentar uma análise crítica às atividades realizadas e conhecimentos adquiridos durante o estágio sob a forma de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*). A análise SWOT é uma ferramenta de gestão amplamente utilizada por diversas empresas, de diversas áreas, sendo utilizada para identificar os pontos fortes e fracos de uma empresa/organização, assim como as oportunidades e ameaças das quais a mesma está exposta. Dividindo-se em duas vertentes: análise interna (Pontos Fortes e Pontos Fracos) e análise externa (Oportunidades e Ameaças).⁽³⁾ Assim, o relatório consiste numa análise dos fatores que marcaram tanto positivamente (as mais valias e tarefas que contribuíram para a minha aprendizagem) como negativamente o estágio (aspectos menos positivos e que se apresentaram como dificuldades), são ainda analisadas as oportunidades adicionais que o estágio me proporcionou assim como os fatores que possam ter ameaçado o seu sucesso.

I. Pontos Fortes

I.1 Estruturação do Plano de Estágio

O planeamento do estágio foi sem dúvida um fator decisivo no sucesso do mesmo e permitiu que todo o processo decorresse de forma lógica com o objetivo de proporcionar a melhor formação possível e de acordo com a evolução dos meus conhecimentos e capacidades enquanto estagiária. No início do estágio, comecei por desempenhar tarefas de *back office*. Estas consistiam maioritariamente no processo de visualização da receção de encomendas e reposição de medicamentos nas gavetas e lineares. Esta fase foi especialmente importante porque me permitiu ter contacto com a maioria dos produtos da farmácia, assim como conhecer a sua localização, o que agilizou posteriormente o atendimento ao balcão.

Durante as primeiras semanas, realizei também alguns serviços farmacêuticos que a farmácia disponibiliza como a medição da tensão arterial e glicémia. Estas atividades proporcionaram um primeiro contacto com os utentes da farmácia e foram fundamentais no relacionamento com o público.

Seguiu-se a receção de encomendas, tarefa que passei a realizar diariamente. Comecei também a assistir aos atendimentos realizados pelos elementos da equipa técnica. Esta atividade foi extremamente importante visto que me permitiu entender o funcionamento básico do programa vigente na FM, o Sifarma 2000[®] assim como adquirir

formação indispensável relativa ao aconselhamento de medicamentos e outros produtos, nomeadamente os de venda livre. Passei também a colaborar com as farmacêuticas responsáveis pela conferência do receituário e separação do mesmo de acordo com os diferentes planos de comparticipação envolvidos. Apesar das receitas manuais já não serem tão comuns, ainda surgem na farmácia e é necessário certificar que todos os parâmetros estão corretos antes do seu envio às entidades competentes.

O último passo foi o atendimento ao balcão, tarefa muito importante, que me permitiu descobrir novas especificidades e funcionalidades do Sifarma 2000®, desenvolver ainda mais o relacionamento com o público e também aumentar o meu aconselhamento a nível da medicação, produtos de cosmética e MNSRM.

1.2 Localização da farmácia e Público alvo

A FM localiza-se no centro histórico de Viana do Castelo, em frente ao jardim público, acaba por ser uma zona de passagem de muitos cidadãos, turistas e até peregrinos dos Caminhos de Santiago de Compostela. Posto isto, pode dizer-se que a população alvo da FM é bastante abrangente e envolve várias faixas etárias, sendo, contudo, a população idosa o cliente-tipo mais abundante. Este leque de clientes de diferentes idades foi um aspeto significativamente positivo no meu estágio pois permitiu-me lidar com diversas situações e adaptar a comunicação e o aconselhamento ao utente em questão.

Com o público mais jovem, e na sua maioria mulheres, tive a oportunidade de desenvolver o aconselhamento e conhecimentos a nível da cosmética. Relativamente a grávidas e mães recentes foi-me possível desenvolver aptidões e familiarizar-me com os produtos de puericultura e ainda analisar os medicamentos passíveis de serem utilizados em situações de gravidez e aleitamento. Em relação aos utentes mais idosos, permitiu-me uma aprendizagem ainda mais abrangente, na medida em que era confrontada com diversas doenças e múltiplas terapêuticas, tendo desenvolvido a capacidade de análise e espírito crítico em relação aos diferentes regimes terapêuticos. No que diz respeito aos turistas e peregrinos, na sua maioria estrangeiros, considero também um ponto muito benéfico do meu estágio, permitindo-me explorar a comunicação numa outra língua, maioritariamente o inglês, capacidade que julgo ser cada vez mais importante num profissional.

Para finalizar, um outro aspeto positivo é o facto de a equipa técnica conhecer a maioria dos seus utentes, não só devido ao estatuto adquirido pela farmácia como também pela fidelidade da população, o que permite um atendimento mais personalizado e cuidado.

I.3 Equipa de trabalho e integração

A equipa de trabalho da FM é composta pela Dra. Joana, diretora técnica, Dra. Helena, farmacêutica, e pela Rosa, Tiago e Vítor, técnicos de farmácia. Todas as tarefas estão organizadas e distribuídas por todos, estando cada um ciente das suas responsabilidades permitindo assim realizar o trabalho em harmonia. Esta divisão de tarefas permitiu que cada um me ensinasse aquilo que lhe competia, acabando por ter aprendido um pouco com todos, tudo o que se faz diariamente na farmácia.

Desde o primeiro dia que me receberam muito bem, o que facilitou logo os primeiros contactos e amenizou o natural nervosismo dos primeiros dias. Para além disso, a equipa da farmácia é uma equipa jovem onde reina o bom ambiente e um bom espírito de equipa, o que permitiu que me entrosasse facilmente. Houve sempre uma grande disponibilidade por parte de todos para me ensinar e auxiliar em todos os aspetos, sendo fulcral para a minha aprendizagem. Além do mais, também todos os utentes me acolheram de forma muito carinhosa, tendo sido bastante recetivos a que lhes fosse eu a prestar o atendimento.

I.4 Formações externas

Ao farmacêutico, como especialista do medicamento, é-lhe exigida uma permanente preocupação em assegurar uma formação contínua que lhe possibilite responder aos contínuos avanços científicos e tecnológicos na área da saúde, permitindo assim otimizar o seu desempenho e cumprir com as suas obrigações profissionais com maior eficácia. Ao longo do estágio tive a oportunidade de frequentar diversas formações na farmácia onde, através da visita dos delegados à mesma, eram promovidos novos produtos/gamas ou então um produto/gama já existente. Além da informação teórica que é dada relativamente à composição, propriedades, conselhos de utilização e orientações para o aconselhamento dos produtos, foi também possível experimentar alguns e assim ter uma melhor perceção das suas características como a textura e cheiro, o que é especialmente útil para o posterior aconselhamento dos mesmos.

Todas estas formações foram essenciais na medida em que me permitiu fazer um aconselhamento mais completo, com uma visão mais abrangente sobre o mercado existente, por forma a indicar o produto mais adequado a cada situação em particular.

1.5 Serviços Farmacêuticos

Atualmente, e cada vez mais, as farmácias apresentam diversos serviços farmacêuticos acessíveis aos seus utentes o que permite, muitas vezes, um melhor acompanhamento e controlo de certas doenças. A FM possui os serviços de medição de peso e altura, tensão arterial e glicémia. Qualquer um destes serviços é gratuito e prestado pelos diversos elementos da equipa técnica.

Durante o estágio foi-me possível realizar estes serviços disponibilizados pela farmácia, ajudando-me assim a ganhar prática no procedimento das medições bem como na avaliação dos respectivos resultados e comunicação com o utente, que procura num profissional de saúde um aconselhamento profissional.

1.6 Gestão de stock, seleção dos fornecedores, armazenamento e receção

A gestão dos produtos existentes na farmácia é fundamental para que não haja excesso de produtos e portanto empate de capital mas deve-se assegurar sempre a satisfação das necessidades dos utentes. Na gestão dos existências tem que se ter em conta alguns fatores, nomeadamente o perfil dos seus utentes (faixa etária, sexo, recursos económicos), localização e dimensão da farmácia, rotação dos produtos, variações sazonais, vantagens comerciais (descontos, ofertas), produtos publicitados pelos *media* e produtos novos, frequência de entregas e número diário de encomendas.

O aprovisionamento dos produtos pode ser realizado por diversos fornecedores, sendo a seleção dos mesmos o primeiro passo. A FM tem, como principal fornecedor, a *Alliance Healthcare*[®] que efetua entregas bidiárias, de manhã e a meio da tarde, havendo uma terceira em dias de serviço, ao fim da tarde; e a *Cooprofar*[®] cuja entrega é apenas de manhã. Existem ainda produtos que são encomendados diretamente aos laboratórios, tais como *Pierre Fabre*[®], *Cosmética Ativa*[®], entre outros.

A receção das encomendas é igualmente um fator importante sendo sempre imperativo certificar que a encomenda recebida está de acordo com a efetuada, isto é, que as quantidades, produtos, descontos ou ofertas estão de acordo com o previsto. Para além disso, é necessário também conferir os preços, prazos de validade e estado da embalagem.

Depois de todos os produtos entrarem correctamente no stock da farmácia, passa-se à sua etiquetagem, para aqueles cujos preços não são fixos, e arrumação dos mesmos,

verificando se o *stock* dos produtos indicados no Sifarma 2000[®] corresponde ao real, evitando assim a ocorrência de erros. O princípio de arrumação é feito segundo o princípio “*first expire, first out*”, ou seja, o produto a escoar em primeiro lugar deve ser o de prazo de validade mais curto, assegurando a segurança e eficácia dos produtos, salvaguardando assim a saúde do utente.

Durante o meu estágio tive a oportunidade de efetuar diversas vezes a receção das encomendas, quer das diárias quer das manuais, o que considero bastante vantajoso pois contribuiu para que me familiarizasse mais facilmente com os diversos produtos da farmácia assim como associar o princípio ativo dos medicamentos ao seu nome comercial. Para além disso, permitiu-me ser mais autónoma e aprofundar o meu conhecimento relativamente às diversas funcionalidades do programa informático, essencial quando estamos perante o utente, na medida em que, para além de agilizar o atendimento, transmitimos maior confiança.

1.7 Prescrição por DCI

A prescrição eletrónica tem sido uma mais-valia, não só porque facilita a sua leitura a nível visual como também a nível do programa informático, onde depois de inserir o código da receita e o código de acesso, é-nos apresentada a lista de todos os medicamentos prescritos assim como as quantidades dos mesmos e respectivas posologias. Para além disso dão uma maior segurança e conforto ao profissional uma vez que os erros de prescrição são imediatamente detetados pelo Sifarma 2000[®].

A prescrição por denominação comum internacional (DCI) dá ao utente, salvo exceção, o direito de optar pelo medicamento genérico ou de marca, o que considero um aspeto importante visto que o utente pode escolher de acordo com as suas capacidades monetárias ou pelo facto de estar habituado a determinado medicamento.

Quando iniciei o atendimento ao público, constei que este aspeto foi bastante facilitador para mim na medida em que, durante a formação académica, o objeto de estudo são os princípios ativos e não as suas denominações comerciais, permitindo-me reconhecer mais facilmente os produtos através da substância ativa.

2. Pontos Fracos

2.1 Aconselhamento de MNSRM

Ao longo do estágio foram algumas as dificuldades sentidas, uma das principais foi no aconselhamento de certos produtos. A existência de falhas na minha formação académica condicionou, por vezes, a minha intervenção, não me permitindo realizar certas tarefas com a autonomia que pretendia. Penso que existem algumas áreas que o curso deveria explorar mais, como por exemplo a dermofarmácia e cosmética, os medicamentos veterinários, a área da ortopedia, puericultura e alimentação infantil.

Sendo o farmacêutico, muitas vezes, o primeiro e mais acessível ponto de contacto com o SNS, onde os utentes recorrem pedindo uma orientação profissional para resolver situações menores, penso que, o aconselhamento dos MNSRM foi um dos maiores desafios e dificuldades pelas quais passei durante o estágio devido à falta de prática e poucos conhecimentos nas áreas acima referidas.

2.2. Preparação inexistente de medicamentos manipulados

A FM pertence a um grupo de farmácias e, dado que a preparação de medicamentos manipulados está centralizada numa das farmácias do grupo, não me foi possível, durante o estágio, observar ou preparar medicamentos manipulados. Sendo que o conhecimento e experiência relativos à preparação de manipulados são uma vantagem e mais-valia para qualquer farmacêutico, gostaria de ter tido a oportunidade de proceder à preparação dos mesmos e, por esse motivo, penso que este foi um ponto fraco do estágio.

3. Oportunidades

3.1 Formações

Sendo o farmacêutico um especialista do medicamento e um profissional de saúde, a sua formação é contínua e deve ser corretamente actualizada, acompanhando os avanços científicos e médicos assim como também a entrada de novos produtos no mercado de modo a proporcionar o melhor aconselhamento possível e satisfazer as necessidades dos utentes. Torna-se fulcral o conhecimento dos produtos disponíveis na farmácia e, para tal, a FM proporciona à sua equipa a oportunidade de assistir a diversas formações quer realizadas na farmácia através da visita dos delegados como também na sede dos laboratórios.

Como estagiária tive também a oportunidade de assistir e participar em diversas formações, o que penso que foi bastante importante, ajudando-me não só a entender melhor as formulações e aplicações de certos produtos como também a obter a informação necessária para realizar um melhor atendimento. Foi-me ainda fornecido diverso material de consulta, como tabelas de aconselhamento e catálogos que se tornam muito úteis, além de serem ferramentas de fácil consulta.

Para além de ter considerado um ponto forte do meu estágio, considero também que tenha sido uma oportunidade de aprendizagem e formação, não só enquanto estagiária como também como futura farmacêutica.

3.2 Integração e aplicação de conhecimentos adquiridos

Ao longo do curso, foram inúmeras as unidades curriculares que contribuíram para a minha formação enquanto estagiária em farmácia comunitária. De entre elas destaco as unidades curriculares de Farmacologia, Farmacoterapia e Intervenção Farmacêutica, uma vez que considero que foram as que me forneceram os conhecimentos necessários para o desempenho de grande parte das funções enquanto farmacêutica comunitária. O estágio curricular foi sem dúvida uma excelente oportunidade para os integrar, aplicar em contexto real e ainda ampliá-los, contribuindo também para relembrar certos conhecimentos.

4. Ameaças

4.1 Formação limitada em algumas áreas

No final do estágio, considero que as principais dificuldades que senti estão relacionadas com a formação limitada em algumas áreas do curso. De entre elas, destaco a dermocosmética, a veterinária, a suplementação alimentar e também a ortopedia como aquelas em que senti maior dificuldade e onde a escassez dos meus conhecimentos possa ter sido uma ameaça ao sucesso do estágio. Embora estes sejam domínios abordados durante o MICF, considero que a formação não é dada com o detalhe necessário para que os alunos possam posteriormente aconselhar confortavelmente estes produtos, assim como responder a dúvidas apresentadas pelos utentes.

4.2 Conhecimento insuficiente do programa Sifarma 2000®

Um outro fator que considero que possa ter sido uma ameaça foi, sem dúvida, a falta de conhecimentos relativamente ao programa Sifarma 2000®. Embora não seja o único programa informático disponível em Portugal para as farmácias, é o mais utilizado em todo o país e, por essa razão, seria lógico existir uma maior formação nesta área. Além disso, o Sifarma 2000® é um programa extremamente complexo e com inúmeras funcionalidades, sendo que, mesmo durante o estágio não me foi possível explorar todas as suas potencialidades. Assim sendo, penso que seria benéfico para futuros estagiários receber formação aprofundada sobre este programa antes de iniciar o estágio curricular, agilizando assim o atendimento e todas as atividades de *back office*.

4.3 Outros estabelecimentos de venda de MNSR

A existência de locais autorizados para a venda de MNSRM pode representar uma ameaça para as farmácias. Este tipo de estabelecimentos consegue ter produtos a preços mais competitivos e para além disso há um acesso muito facilitado aos medicamentos, podendo estimular a automedicação irresponsável por parte dos utentes, levando à ocorrência de efeitos adversos ou possíveis interações entre produtos.

4.4 Medicamentos Esgotados

O setor farmacêutico tem sofrido constantes alterações devido à crise económico-financeira do setor, levando a medidas de diminuição de custos, o que influencia os *stocks* nas farmácias, resultando muitas vezes na indisponibilidade de certos medicamentos ou outros produtos de saúde.

Para além da falta de *stocks*, existem muitos medicamentos esgotados ou cuja distribuição é rateada, sendo esta situação alheia à farmácia e fora do seu controlo. Por vezes estas situações são de difícil compreensão por parte dos utentes e acabam por gerar um certo descontentamento.

Estas situações tornam-se um pouco desagradáveis tanto para os utentes como também para a equipa técnica, que tem de trabalhar no sentido de acalmar a situação, esclarecer todas as dúvidas e expor as situações da melhor maneira para que o utente possa compreender.

Casos Práticos

Caso 1

Um senhor de cerca de 50 anos solicitou, na FM, uma solução e aconselhamento para os sintomas que o andavam a incomodar há uns dias. Estes sintomas passavam por dores de cabeça, congestão nasal e dores musculares. Tendo identificado estes sintomas como característicos de uma gripe aconselhei a toma de Ilvico[®], sendo este uma associação de paracetamol, um analgésico e antipirético, com hidrogenomaleato de bromofeniramina, um anti-histamínico e ainda cafeína. Para tal sugeri a toma de 2 comprimidos 3 vezes ao dia.

Caso 2

Uma senhora com idade por volta dos 40 anos dirigiu-se à FM para obter um aconselhamento. Afirmou que sentia algum desconforto vaginal, tendo relatado sintomas de dor e ardência ao urinar e corrimento vaginal, contudo sem dor abdominal. Considerando que se tratava de uma infeção fúngica sugeri o Gyno-Pevaryl Combipack[®], o pack de 3 óvulos e da pomada, ambos de econazol, um antifúngico. Para sua aplicação sugeri que colocasse a pomada na zona vulvar uma vez por dia após a sua higiene pessoal, e que introduzisse o óvulo o mais profundamente na vagina, ao deitar.

Considerações Finais

O estágio curricular, sendo o culminar de 5 anos, torna-se fundamental para o desenvolvimento, aperfeiçoamento e consolidação dos conhecimentos adquiridos ao longo do MICEF. Permitindo aliar os conhecimentos teóricos à prática e confirmar o papel interativo e essencial que o farmacêutico pode ter na sociedade, possuindo a capacidade de fazer a diferença através dos serviços e aconselhamentos prestados.

A farmácia comunitária, sendo a área mais visível da profissão, é, sem dúvida, um local de aprendizagem constante onde diariamente são enfrentadas novas situações e desafios, estimulando assim o desenvolvimento e superação.

Encaro esta experiência, com todos os seus pontos fortes, fracos, ameaças e oportunidades, como algo que me ajudou imenso a crescer não só a nível pessoal, como também a nível profissional e social. O modo como fui acolhida ajudou imenso, tendo sido uma mais-valia na medida em que me fez sentir bem-vinda e parte integrante da equipa. Toda a dedicação, simpatia e solidariedade sentida fez-me enfrentar cada desafio e superar-me a cada dia, tornando o meu percurso mais fácil e enriquecedor.

Referências Bibliográficas

1. Farmacêutico - [Acedido a 20 de março de 2019]. Disponível na internet: <http://www.valordo farmaceutico.com/>
2. Registo e Admissão na Ordem dos Farmacêuticos - [Acedido a 20 março de 2019]. Disponível na internet: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/a-ordem-dos-farmaceuticos/admissao/>
3. Análise SWOT: o que é e para que serve? - [Acedido a 25 março de 2019] Disponível na internet: <https://www.economias.pt/analise-swot-o-que-e-e-para-que-serve>

Relatório de estágio em Indústria Farmacêutica



Orientador: Dr. João Braga

Abreviaturas

BPF - Boas Práticas de Fabrico

BPL - Boas Práticas de Laboratório

GQ - Garantia da Qualidade

IPC/CEP - *In-process control* / Controlo em Processo

ISO - *International Organization for Standardization*

I&D - Investigação e Desenvolvimento

MICF - Mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas

SWOT - *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats* / Forças, Fraquezas, Oportunidades e Ameaças

Introdução

O farmacêutico, enquanto agente de saúde pública e prestador de cuidados, deve zelar e contribuir para uma melhoria contínua da qualidade de vida da população, desempenhando assim um papel determinante na sociedade. Nas diversas áreas de atividade, o farmacêutico deve cumprir e fazer cumprir as normas de boas práticas de fabrico, laboratoriais, clínicas e de registo que assegurem a qualidade, eficácia e segurança dos produtos de saúde.

A formação do MICF da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra é multidisciplinar e visa a preparação de profissionais competentes em todas as áreas ligadas ao medicamento, ao utente e à saúde pública. Durante o curso, senti também a necessidade de ter uma ideia mais alargada relativamente ao ciclo de vida do medicamento, daí a minha escolha para a realização do estágio curricular ter recaído na indústria. Além disso, considerei esta possibilidade de estágio como uma mais-valia para o desenvolvimento de novas capacidades e conhecimentos noutras áreas, o que é cada vez mais valorizado no contexto actual.

O presente relatório pretende descrever e refletir sobre as aprendizagens feitas ao longo do estágio na Farmalabor, orientado pelo responsável do departamento da Garantia de Qualidade, Dr. João Braga, realizado de 2 de maio a 26 de julho, procurando respeitar a confidencialidade e o sigilo adequado a uma empresa desta natureza. Através de uma análise SWOT, vou referir, de forma sucinta, os pontos fortes, fracos, oportunidades e ameaças que vivenciei durante este período de aprendizagem.

Enquadramento do Estágio

A Farmalabor é a unidade de produção do grupo Medinfar, localizada na zona industrial de Condeixa-a-Nova, opera essencialmente em regime de produção para terceiros (*contract manufacturing*).

Dedica-se ao fabrico de uma grande variedade de produtos farmacêuticos, cosméticos e suplementos alimentares, em formulações sólidas, líquidas e pastosas não-estéreis, para uma vasta gama de clientes, tanto nacionais como internacionais, entre os quais se encontra o grupo Medinfar. ⁽¹⁾

Tendo como foco a melhoria contínua da qualidade dos seus produtos e serviços, a política do Grupo Medinfar tem como referência a satisfação das necessidades dos clientes e a responsabilidade social, nas vertentes de ambiente e segurança, encontrando-se assim certificada pelas normas ISO 9001 (Qualidade), ISO 14001 (Ambiente) e OHSAS 18001 (Higiene e Segurança no Trabalho). Além disso, as Boas Práticas de Fabrico (BPF) e de Laboratório (BPL) nunca são esquecidas, sendo cumpridas com rigor e dedicação, visando um grau acrescido de eficiência e confiança, possibilitando assim desenvolver os melhores serviços orientados para as necessidades de cada um dos seus clientes.

A Farmalabor é uma indústria que se destaca pela tecnologia inovadora, elevada competitividade e uma equipa repleta de pessoas qualificadas, com preocupações atuais, onde a aposta na formação contínua dos seus colaboradores permite um enorme profissionalismo em todos os serviços prestados.

Análise SWOT

A análise SWOT é uma ferramenta de gestão amplamente utilizada por diversas empresas, de inúmeras áreas, tendo como objetivo definir as relações existentes entre os pontos fortes e fracos da empresa assim como também identificar quais as oportunidades e ameaças às quais a mesma se encontra exposta. Assim, o relatório consiste numa análise dos fatores que marcaram tanto positivamente como negativamente o meu estágio. Além disso são ainda analisadas as oportunidades e as ameaças com as quais me deparei durante este período de aprendizagem. ⁽²⁾

I. Pontos Fortes

I.1 Departamento Multidisciplinar

A Indústria Farmacêutica caracteriza-se pelos seus elevados padrões de Garantia da Qualidade (GQ) de modo a produzir medicamentos mais estáveis, eficazes e seguros.

A GQ é responsável por inúmeras tarefas, nomeadamente controlo dos registos, revisão da qualidade de produto, qualificação de fabricantes, validação de higienização e de processos de fabrico, controlo de alterações, tratamento de desvios e de não conformidades. Englobando todas as atividades que influenciam a qualidade do produto final, torna-se essencial ao longo de todas as fases do ciclo do medicamento.

Uma das mais-valias de ter estagiado no departamento da GQ foi, sem dúvida, o facto de este funcionar em estreita colaboração com todos os outros departamentos da empresa, sendo portanto um departamento multidisciplinar, o que me permitiu alargar horizontes e ter uma visão global do que é feito nos outros setores da empresa.

I.2 Equipa de trabalho e integração

Toda a equipa da GQ da Farmalabor foi determinante para o sucesso do meu estágio. Desde o primeiro dia que fui recebida num ambiente familiar, de pessoas preocupadas com a minha integração e sempre muito prestáveis para me auxiliar a todo o momento. Todos eles me acompanharam ao longo do estágio, e sempre me transmitiram os seus conhecimentos da melhor forma, depositando em mim a confiança e autonomia necessárias para a realização de todas as atividades, contribuindo para o meu desenvolvimento quer a nível profissional quer a nível pessoal.

Sem exceção, toda a equipa contribuiu para que esta experiência tenha sido mais enriquecedora e gratificante. Foi um privilégio ter feito parte deste grupo de trabalho durante 3 meses.

1.3 Perceção mais real e detalhada do funcionamento de uma indústria

Esta experiência deu-me uma noção muito mais real e alargada do grau de exigência necessário até se obter o produto acabado. Todo o processo, desde o momento da receção das ordens de produção até à obtenção do produto final, vai muito além do processo de fabrico em si e, portanto, é uma noção que só quem experiencia é que a pode ter.

A indústria, envolve uma série de profissionais, áreas e requisitos que são essenciais para que tudo se realize, tais como: registos, análises e estudos, passando pelos procedimentos de higienização, fulcrais para assegurar a qualidade dos produtos, pela montagem, afinação e funcionamento das máquinas, e ainda por todos os controlos realizados, tanto no início como durante o processo de fabrico (*in-process control (IPC/CEP)*).

Sem dúvida que foi uma experiência muito enriquecedora, não só porque possibilitou a aplicação de conceitos adquiridos ao longo do ciclo de estudos, como também me permitiu adquirir com novos conhecimentos e contactar com a realidade profissional do farmacêutico na área da indústria, reforçando a importância de valores como o trabalho em equipa, as relações interpessoais e a dinâmica de trabalho de uma grande indústria farmacêutica.

1.4 Promoção da autonomia e do sentido crítico

Um dos pontos fortes deste estágio foi, sem dúvida, o facto de ter permitido desenvolver a minha autonomia e sentido crítico. Assim sendo, e apesar de todas as minhas tarefas terem sido devidamente orientadas, tive toda a liberdade para as realizar e para procurar soluções para os obstáculos que iam surgindo. No decorrer do estágio, com os diversos trabalhos que efetuei tive contacto com bases de dados e sites inicialmente desconhecidos, o que também permitiu desenvolver a minha autonomia na medida em que, ao ter explorá-los, consegui familiarizar-me com os mesmos. Relativamente à promoção do sentido crítico, grande parte do trabalho que realizei envolveu seleccionar e compilar informação, tarefas que pressupõem uma análise detalhada e crítica da informação.

Considero que estas duas características são fulcrais para qualquer farmacêutico, particularmente na execução de funções na área da GQ numa indústria farmacêutica, um departamento onde é constantemente necessário tomar decisões importantes baseadas em dados recolhidos e resultados obtidos.

1.5 Formação contínua

Um dos princípios da Farmalabor assenta na formação contínua, no sentido de dotar todos os seus colaboradores com o conhecimento adequado para o melhor desempenho das suas atividades. Esta necessidade de formação baseia-se na realidade atual do mercado, na estratégia e objetivos futuros aos quais a empresa se propõe a alcançar.

Com o intuito de adotar os princípios da proteção do ambiente, prevenção da poluição e uso sustentável de recursos, assim como medidas para prevenir os riscos profissionais foi-me dada uma formação sobre Ambiente e Segurança, pelas responsáveis destes setores. Além disso, foram explicados os riscos laborais de cada uma das áreas existentes na indústria e foi feita também uma breve explicação de todo o material de segurança e regras a adotar na área de produção. Para além destas, tive também a oportunidade de realizar outras formações noutros departamentos da empresa, como por exemplo no armazém.

A participação nestas atividades foi indiscutivelmente uma mais-valia já que me permitiu ampliar os meus conhecimentos noutros domínios além das atividades específicas da GQ, tendo assim enriquecido a minha formação como futura profissional.

2. Pontos Fracos

2.1 Duração do estágio

A duração do estágio foi inevitavelmente um fator menos positivo nesta minha experiência. Os 3 meses de aprendizagem, apesar de proveitosos e muito enriquecedores, passaram muito rápido. Devido à curta duração não me foi possível, infelizmente, conhecer bem todas as áreas da Indústria, nem aprofundar o funcionamento, a gestão e a organização de uma empresa deste nível. Além disso, senti que o estágio terminou no momento em que me comecei a sentir mais autónoma e independente, conseguindo realizar com maior facilidade todas as tarefas propostas.

Apesar de, através do estágio, ter conseguido adquirir inúmeros e importantes conhecimentos relacionados com os aspetos regulamentares do medicamento, sinto que a duração do estágio deveria ser alargada, para que tanto o aluno como a empresa pudessem usufruir ainda mais desta experiência.

2.2. Falta de planeamento do estágio

Na minha opinião, um dos aspetos que falhou no meu estágio foi a falta de planeamento do mesmo. Planeamento este que se torna essencial, especialmente quando se trata de uma indústria, onde o trabalho é muito e, naturalmente, houve alguns momentos mortos à espera que me indicassem o que fazer, tornando-se por vezes monótono e pouco estimulante.

O facto de o tempo de estágio já não ser demasiado alargado para poder tirar total proveito desta experiência, os tempos em que não realizei nenhuma atividade acabaram por desmotivar um pouco.

3. Oportunidades

3.1 Desenvolvimento de competências informáticas

Com o mundo tecnológico em constante mudança e evolução, atualmente, uma das mais-valias e aptidões valorizadas nos profissionais das mais variadas áreas são as suas capacidades informáticas.

Durante o estágio, a maioria das tarefas que realizei exigiam a utilização da ferramenta de trabalho Microsoft Excel[®], sendo que a utilização quase diária do mesmo possibilitou o aumento da minha destreza no emprego do programa e também a descoberta de inúmeras funcionalidades úteis, especialmente na construção de tabelas. Além da folha de cálculo Microsoft Excel[®] tive contacto com outra ferramenta bastante importante na empresa, o Microsoft Outlook[®], sendo este o meio utilizado nas comunicações e no planeamento de reuniões e outras tarefas.

3.2 Integração e aplicação dos conhecimentos adquiridos

Embora os meus conhecimentos relativamente a alguns aspetos relacionados com a indústria fossem limitados, a formação durante o MICF foi sem dúvida útil no decorrer do estágio e também para os trabalhos que realizei. De entre as unidades curriculares que contribuíram para essa formação destaco a unidade curricular de Assuntos Regulamentares, pelos conhecimentos adquiridos relativamente aos aspetos regulamentares a que os medicamentos e indústrias estão sujeitos, sendo que a aplicação destes conceitos se revelou fundamental durante estes 3 meses de estágio. Saliento ainda a unidade curricular de Tecnologia Farmacêutica pelos conhecimentos adquiridos no âmbito das diferentes formas farmacêuticas, formulações e processos de fabrico, já que, durante esta experiência, ao ter contactado com produtos muito variados, tive necessidade de os aplicar e estes foram também a base para a minha aprendizagem subsequente.

3.3 Desenvolvimento da língua inglesa

Uma das capacidades e aptidões que são atualmente mais valorizadas e procuradas num trabalhador, independentemente da área em que opera, é a capacidade de entender, escrever e comunicar em inglês.

Durante o meu estágio, foram vários os momentos em que tive contacto com a língua inglesa, visto que a Farmalabor trabalha com clientes estrangeiros e portanto, todas as comunicações e documentos são feitos em inglês ou em bilingue.

Considero que esta experiência, permitiu alargar os meus conhecimentos para além do curso, ou seja, possibilitou aplicar e fortalecer o meu inglês, quer na escrita como também na comunicação.

4. Ameaças

4.1 Departamento do estágio

Apesar do meu estágio não ter decorrido no departamento que elegi inicialmente, na Produção, gostei bastante de ter experienciado a GQ, sendo este um departamento multidisciplinar, onde as oportunidades profissionais para os farmacêuticos ao nível da Indústria acabam por ser maiores.

Inicialmente foi um bocado um “choque” saber que iria para outro departamento, mas ao longo do tempo aprendi a gostar e achei todos os dias extremamente desafiantes. Percebi também a importância que aquela área da Indústria tem para o funcionamento da mesma. Fui todos os dias estimulada, desafiando a minha autonomia e espírito crítico e penso que, com a ajuda de toda a equipa, à qual estou imensamente grata, consegui superar todos os obstáculos e desafios que foram surgindo.

4.2 Contexto económico atual e a constante mudança

Para manter a capacidade competitiva, as empresas têm de fazer dispendiosos investimentos. Além disso, as constantes mudanças a nível regulamentar a que as indústrias estão sujeitas aliada à rápida evolução e exigências do mercado podem-se revelar como uma potencial ameaça, tornando-se difícil acompanhar as normas e requisitos governamentais exigidos.

Ameaçadas também pela crise económica, limites cada vez mais apertados e a alta pressão associada ao contexto atual, as indústrias farmacêuticas necessitam de um forte planeamento e flexibilidade para se conseguirem adaptar à mudança, focando-se na melhoria contínua da qualidade dos seus produtos e serviços, tendo como referência a satisfação das necessidades dos seus clientes.

Considerações Finais

Com a oportunidade de poder realizar um estágio em indústria, não hesitei em fazê-lo, visto que sempre foi uma das áreas que sempre me despertou interesse e curiosidade, sendo também uma experiência extremamente enriquecedora, onde aprendi a valorizar ainda mais o trabalho de equipa e as relações interpessoais.

Esta oportunidade permitiu-me rever e pôr em prática os conhecimentos que fui adquirindo ao longo dos 5 anos do curso e ao mesmo tempo proporcionou-me novas aprendizagens e competências que considero fundamentais para o meu futuro profissional como farmacêutica.

Deixou-me bastante grata poder ajudar e deixar um pouco do meu contributo à empresa. Tive o privilégio de conhecer e contactar com várias pessoas que sempre me ajudaram e aconselharam ao longo desta experiência, tornando-se incansáveis. Resta-me agradecer ao grupo Medinfar pela oportunidade de estágio que me foi concedida e ainda a todos os colaboradores da Farmalabor, em particular à equipa da GQ, por toda a simpatia e preocupação demonstradas ao longo desta experiência, estando sempre prontos para me ajudar e colaborar na minha aprendizagem, permitindo superar-me a cada dia e enfrentar cada desafio.

Referências Bibliográficas

1. Grupo Medifar - **Farmalabor**. Grupo Medifar. [Acedido a 20 de julho de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.medifar.pt/farmalabor>
2. CARVALHO, Fernando - **Capítulo IV- A Estratégia nas Organizações**. In: LISBOA, J., COELHO, A., COELHO, F., ALMEIDA, F.. Introdução à gestão de organizações. Barcelos: Vida Económica, 2004 . ISBN: 972-788-118-1. p. 181-220.

MONOGRAFIA

A aplicação das vesículas extracelulares de parasitas no
desenvolvimento de vacinas

Orientadora: Professora Doutora Maria do Céu Sousa

Abreviaturas

ABCA1 - *ATP-binding cassette transporter*

CD - Células Dendríticas

CMVEs - Corpos Multivesiculares

DSTs - Doenças Sexualmente Transmissíveis

ESCRT - *Endosomal sorting complexes required for transport*

HSP - *Heat Shock Protein*

IFN- γ - Interferão

IL - Interleucina

LC - Leishmaniose cutânea

LCR - Líquido Cefalorraquidiano

LPG - *Lipophosphoglycan*

LV - Leishmaniose visceral

miRNA - Micro RNA

MPs - Micropartículas

mRNA - RNA mensageiro

MV - Microvesícula

NK - *Natural Killer*

NO - *Nitric Oxide*

PAMPs - *Pathogen-associated molecular pattern*

PCR - *Polymerase chain reaction*

TLRs - *Toll-like Receptors*

TNF- α - *Tumor necrosis factor*

VEs - Vesículas Extracelulares

VIL - Vesículas Intraluminais

Resumo

Na última década estudos sobre as funções das vesículas extracelulares (VEs) nas doenças parasitárias expandiram consideravelmente revelando a sua importância na patogênese e suscetibilidade da doença, bem como na comunicação célula-célula e na resposta imune.

As VEs estão envolvidas numa grande variedade de processos biológicos, sendo a sua biogênese um fenómeno altamente conservado em organismos vivos. Morfologicamente consistem em pequenas esferas envolvidas numa bicamada lipídica, sendo libertadas a partir de diferentes tipos de células (procarióticas e eucarióticas) e contêm grandes quantidades de substâncias importantes como proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e pequenos metabolitos essenciais para a comunicação celular.

As VEs são geralmente categorizadas em exossomas, microvesículas (MV) e corpos apoptóticos, com base no tamanho, biogênese e composição. Os exossomas são as vesículas de menor tamanho, podendo apresentar um diâmetro compreendido entre 40 a 100 nm. As microvesículas são as mais heterogêneas e apresentam um tamanho entre 100 nm a 1 µm e as vesículas com mais de 1 µm são designadas por corpos apoptóticos.

As VEs desempenham um papel muito importante na transmissão de informações e substâncias entre células, resultando numa série de alterações bioquímicas que ocorrem no hospedeiro, incluindo a modulação do sistema imunológico. Em algumas doenças infecciosas, como as doenças parasitárias, as VEs foram ganhando impacto como mediadores na interação parasita-hospedeiro. Estas vesículas permitem a transferência dos fatores de virulência e moléculas efetoras dos parasitas para o hospedeiro, regulando, assim, a expressão de genes no hospedeiro e respostas imunes, mediando, conseqüentemente, o processo patogénico.

Assim, tendo em conta o papel das VEs na interação parasita-hospedeiro e a sua capacidade imunológica, estas poderão fornecer perspectivas futuras para novos biomarcadores, vacinas inovadoras e contribuir também para o desenvolvimento de terapias podendo assim abrir novos caminhos para combater doenças infecciosas.

Palavras-chave: Vesículas extracelulares, interação parasita-hospedeiro, sistema imunológico, terapêutica, vacinação

Abstract

In the last decade research and studies on the functions of extracellular vesicles (EVs) in parasitic diseases have expanded considerably revealing their importance in disease pathogenesis and susceptibility, as well as cell-cell communication and immune response.

Extracellular vesicles are involved in a wide range of biological processes, and their biogenesis is a highly conserved phenomenon in living organisms. Morphologically they consist of small spheres enveloped in a lipid bilayer, being released from different cell types (prokaryotic and eukaryotic) and contain large amounts of important substances such as proteins, lipids, nucleic acids and small metabolites essential for cellular communication.

EVs are generally categorized into exosomes, microvesicles (MVs) and apoptotic bodies, based on size, biogenesis and composition. Exosomes are the smallest vesicles and may have a diameter between 40 and 100 nm. The microvesicles exhibit a size between 100nm -1 μm and they are also more heterogeneous, and the vesicles with more than 1 μm size are called apoptotic bodies.

EVs play a very important role in the transmission of information and substances between cells, resulting in a series of biochemical changes occurring in the host, including modulation of the immune system. In some infectious diseases, such as parasitic diseases, EVs have gained impact on communication mediation during parasite-host interactions. EVs allow the transfer of virulence factors and parasite effector molecules to host, regulating host gene expression and immune responses and mediating the pathogenic process.

Thus, taking into account the role of EVs in parasite-host interaction and their immunological capacity, they may provide future perspectives for new biomarkers, innovative vaccines and also contribute to the development of therapies and thus open new avenues for combating infectious diseases.

Keywords: Extracellular vesicles, parasite-host interaction, immune system, therapy, vaccination

I. Introdução

I.1 Vesículas Extracelulares

Os parasitas têm “atormentado” os seres humanos desde o seu aparecimento, afetando bilhões de pessoas em todo o mundo, sendo por isso consideradas um importante problema de saúde pública. Estima-se que perto de 400 espécies de parasitas são capazes de infectar os seres humanos, dos quais cerca de 90 apresentam taxas de mortalidade associadas. Infelizmente estas infecções são negligenciadas, uma vez que ocorrem principalmente em regiões endêmicas com pobres condições sanitárias. ⁽¹⁾

Com a evolução que ocorreu no ramo da ciência foi possível obter evidências de que as VEs que são libertadas durante as infecções parasitárias influenciam tanto na intercomunicação entre parasitas como também na interação parasita-hospedeiro, sendo portanto um objeto de estudo bastante interessante. ⁽²⁾

As VEs são partículas envolvidas por uma bicamada lipídica, podendo ser libertadas por diversos organismos, desde protozoários unicelulares até mamíferos multicelulares. ⁽³⁾ São divididas em três categorias principais, os exossomos, as microvesículas (MVs) e corpos apoptóticos, com base no seu tamanho, biogênese e composição (Fig.1). Exossomos são as vesículas de menor tamanho, com origem endocítica que são libertados após a fusão de corpos multivesiculares (MVEs) com a membrana plasmática. As MVs, também denominadas como micropartículas (MPs) ou ectossomas, são mais heterogêneas, apresentando maior tamanho e são libertadas diretamente da membrana plasmática. Vesículas com tamanho superior a 1 µm são designadas por corpos apoptóticos, resultando de fragmentos de células mortas. ⁽⁴⁾

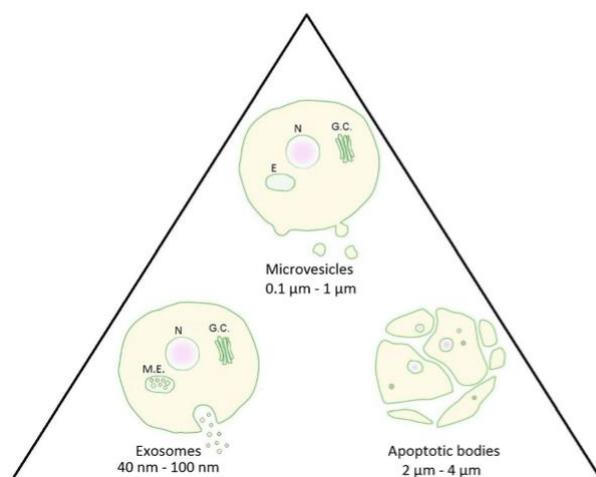


Figura 1 - Diagrama dos três grandes grupos de vesículas extracelulares, classificadas por origem e tamanho. ⁽⁴⁾

As VEs desempenham um papel importante na comunicação célula-célula, funcionando como veículos para moléculas e sinais biológicos. Além disso, contêm grandes quantidades de substâncias importantes como lipídios, ácidos nucleicos, pequenos metabolitos e uma grande variedade de proteínas que desempenham um papel importante em numerosos aspectos da interação parasita-hospedeiro, incluindo a patogênese e a evasão imune. ⁽⁵⁾

Várias espécies de parasitas, como helmintas e protozoários, têm a capacidade de libertar VEs que se fundem com as células do hospedeiro participando ativamente na resposta imunológica. Assim, as VEs poderão ser usadas como candidatos a vacinas e biomarcadores de diagnóstico inovadores, contribuindo para melhorar o controlo das doenças parasitárias em todo o mundo. ⁽⁶⁾

1.2 Biogénese da Vesículas Extracelulares

Apesar do número crescente de estudos sobre a biogénese das VEs, as vias moleculares envolvidas ainda não se encontram totalmente esclarecidas. Até agora, sabe-se que lípidos e proteínas associadas a membranas estão envolvidos na formação e secreção destas vesículas. ⁽⁷⁾

A formação dos exossomas começa nos endossomas iniciais após endocitose de material extracelular na membrana plasmática através da formação de vesículas intraluminais (VILs). As VILs são pequenas vesículas que podem conter RNA e proteínas do citosol, cujo seu agrupamento vai dar origem aos corpos multivesiculares (CMVEs), compartimentos intermediários e bem definidos. Uma vez formados, os CMVEs fundem-se com a membrana plasmática sendo as VILs posteriormente libertadas como exossomas (Fig. 2). ⁽²⁾ Um dos pontos-chave neste processo é o complexo de proteínas hetero-oligoméricas (ESCRT) necessárias para o transporte. Estas proteínas vão reconhecer cargas provenientes do citosol e promover sua inclusão nas VILs. Em termos biofísicos, os exossomas são equivalentes ao citoplasma, encontrando-se envolvidos por uma bicamada lipídica cujos domínios externos das proteínas transmembranares se encontram expostos ao ambiente extracelular. ⁽⁸⁾

As microvesículas fundem-se diretamente com a membrana plasmática ⁽⁷⁾, sendo que a sua formação é estimulada pelo aumento do cálcio intracelular, promovendo a abertura dos canais de potássio dependentes de cálcio e a ativação de proteases dependentes de cálcio. ⁽⁴⁾ Por fim, os corpos apoptóticos são formados pela condensação e segregação do núcleo, resultando numa posterior deterioração. ⁽⁹⁾

Contudo, a descrição dos múltiplos mecanismos envolvidos na biogénese das vesículas extracelulares ainda gera alguma confusão, surgindo dados recentes que indicam novas moléculas importantes, além das ESCRT, associadas a este mecanismo. ⁽⁷⁾

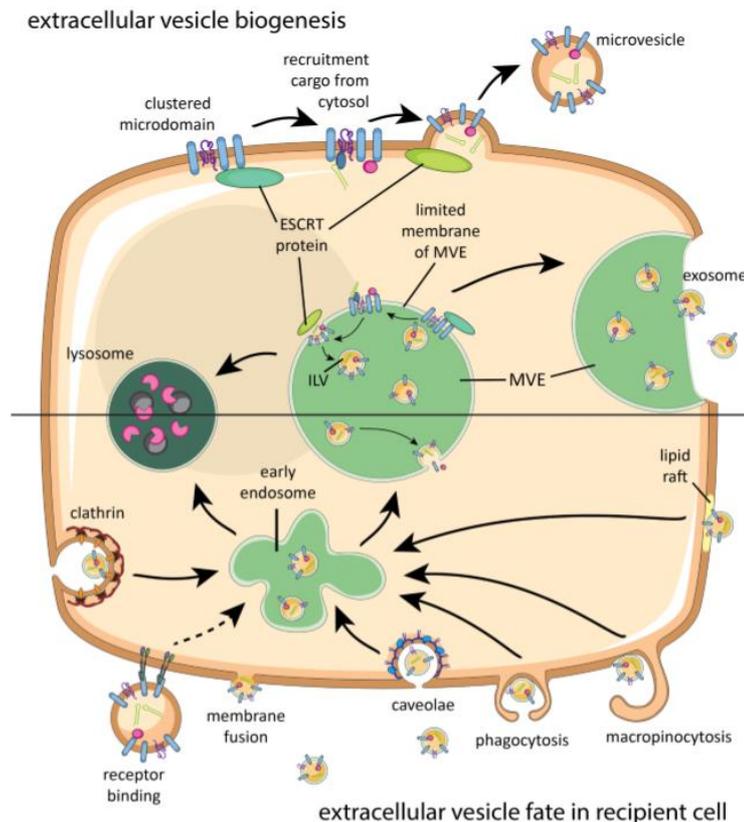


Figura 2 - Representação esquemática da biogênese de microvesículas e exossomas (parte superior). As VEs libertadas podem interagir com a célula receptora através de vários mecanismos: via ligação ao receptor, fusão ou várias vias de internalização (parte inferior). Após endocitose, as VEs poderão ser degradadas em lisossomas ou dar origem a MVEs com VILs endógenas. ⁽⁷⁾

1.3 Composição das Vesículas Extracelulares

As VEs contêm inúmeras biomoléculas, incluindo proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos. A sua composição proteica varia dependendo do organismo de origem, do seu estado fisiológico/patológico e até mesmo do local da célula de origem, portanto as VEs apresentam composições distintas entre si. ⁽²⁾ No entanto, são várias as proteínas comuns como por exemplo: tetraspaninas 51, Hsp70, bem como outras que participam na formação e transporte das vesículas, tal como a ESCRT, um complexo de proteínas indispensável para a libertação dos exossomas. ⁽¹⁰⁾

Devido às diferentes origens, o conteúdo protéico das MVs e dos exossomas vai ser distinto, sendo que as primeiras possuem um maior conteúdo de proteínas com modificação pós-tradução tais como glicoproteínas e fosfoproteínas. ⁽¹⁰⁾

Os lípidos são incontestavelmente um componente essencial das membranas. Geralmente, as VEs são enriquecidas em lipídios como a esfingomielina, a fosfatidilserina e o colesterol, quando comparados com as membranas plasmáticas e outras membranas intracelulares.⁽⁸⁾ No entanto, tal como ocorre nas proteínas, também o conteúdo lipídico varia.⁽²⁾ Vários estudos revelaram que as VEs possuem cerca de 2 a 3 vezes mais colesterol e fosfatidilserina relativamente às suas células de origem. Além disso, a quantidade de esfingomielina nas VEs é também superior o que permite adquirir uma maior rigidez.⁽¹⁰⁾

Foi ainda demonstrado que as VEs possuem grandes quantidades de mRNA e miRNA, estando também presente, contudo em menores quantidades, RNAs não-codificantes. No entanto, sabe-se que o conteúdo de RNA difere tanto em quantidade quanto em composição, dependendo da origem e ambiente celular ⁽⁸⁾, por exemplo as VEs derivadas de células cancerígenas contêm mais RNA total comparando com VEs derivadas de células normais.⁽¹⁰⁾

1.4 Aplicações clínicas das VEs

Desde a descoberta das VEs, na década de 1980, diversos estudos têm sido realizados com o intuito de descobrir quais as suas funcionalidades e propriedades. No entanto, o interesse nas VEs derivadas de parasitas ainda é relativamente recente e, portanto, ainda há muito a ser explorado em relação às suas aplicações.⁽¹¹⁾

Todos os tipos de células podem excretar VEs, podendo encontrar-se em diferentes tipos de fluidos corporais como a saliva, o sangue, a urina, o LCR e até mesmo no leite. Inicialmente as VEs foram consideradas um sistema de eliminação de resíduos, contudo com os estudos já realizados, foi possível verificar e confirmar o seu papel na comunicação parasita-hospedeiro e parasita-parasita demonstrando assim múltiplas aplicações.⁽¹¹⁾

Estudos que investigam as aplicações dos exossomas provenientes de parasitas concentraram-se principalmente no diagnóstico e tratamento de doenças parasitárias. Os exossomas possuem várias vantagens importantes como biomarcadores de diagnóstico, incluindo a sua estrutura estável, alto conteúdo no plasma e composição alternativa sob diversas condições.⁽¹¹⁾

Além disso, as VEs podem auxiliar no diagnóstico de doenças malignas, uma vez que as VEs contêm uma variedade de receptores capazes de reconhecer moléculas específicas tumorais e conseguem transportá-las entre as células para mediar a comunicação intercelular. Algumas dessas moléculas específicas podem ser utilizadas como biomarcadores de diagnóstico para vários cancros como o do pulmão, da mama, da próstata e do ovário.

Infelizmente na prática clínica ainda não existe a aplicação das VEs no diagnóstico de infecções causadas por parasitas. ⁽¹¹⁾

Os exossomas libertados pelos parasitas e células hospedeiras possuem propriedades imunomoduladoras, o que promoveu estudos sobre as suas aplicações clínicas no tratamento de doenças. Atualmente, essas aplicações envolvem principalmente a proteção contra tumores. Por exemplo, foi demonstrado que os exossomas derivados de células dendríticas podem estimular as respostas imunes dos pacientes e promover a erradicação do melanoma. ⁽¹¹⁾

O crescente interesse e procura pela evolução pode levar a novas aplicações medicinais para as VEs, como por exemplo a produção de vacinas utilizando as VEs como veículos para a imunização. Além disso, devido aos seus efeitos anti-inflamatórios, os exossomas podem ser potenciais fármacos imunossupressores. ⁽²⁾

2. Protozoários Flagelados

Os protozoários flagelados pertencem ao Reino Protista, Sub-Reino Protozoa e Filo Sarcocystophora. São parasitas unicelulares e eucariotas, não possuem parede celular sendo a maioria parasitas heterotróficos, aeróbios e não realizam a fotossíntese.

Morfologicamente apresentam um ou vários flagelos responsáveis pela mobilidade e também pela captação de estímulos externos. Apresentam um núcleo de um só tipo envolvido por uma película rígida, sendo que se reproduzem assexuadamente por divisão binária.

São vários os parasitas flagelados que são patogênicos para o ser humano, destacam-se: *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania spp.* ⁽¹²⁾

2.1 *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis é o agente etiológico da tricomoníase, a doença sexualmente transmissível (DST) não-viral mais comum no mundo, com uma estimativa de cerca de 276 milhões de novos casos por ano, afetando com maior prevalência as mulheres sexualmente ativas. ⁽¹³⁾

Morfologicamente apresenta-se sob a forma de trofozoíto, constituído por 4 flagelos livres e 1 flagelo aderente ao corpo celular (membrana ondulante), apresentando também um grande núcleo ovóide. Apesar de não possuir mitocôndrias, apresenta grânulos densos que

podem ser vistos ao microscópio óptico, os hidrogenossomos. Sendo um organismo anaeróbio facultativo, desenvolve-se bem na ausência de oxigênio, num intervalo de pH compreendido entre 5 e 7,5 e temperaturas entre os 20°C e 40°C, conseguindo assim adaptar-se ao meio hostil que encontra no trato vaginal. ⁽¹⁴⁾

2.1.1 Tricomoníase

Sendo um parasita extracelular que reside no trato urogenital, a adesão de *T. vaginalis* às células epiteliais é fundamental para a colonização e estabelecimento da infecção. ⁽¹⁵⁾ A tricomoníase apresenta uma ampla variedade de manifestações clínicas, sendo que os sinais e sintomas dependem das condições individuais (por exemplo os níveis hormonais), da virulência e do número de parasitas infectantes. Embora a infecção assintomática seja comum, múltiplos sintomas podem surgir tanto em homens como em mulheres. ⁽¹⁴⁾

Nas mulheres, *T. vaginalis* afeta principalmente o epitélio escamoso do trato genital levando à ocorrência de diversas patologias como vaginite, cervitite e uretrite. Para além disso, pode também induzir partos prematuros, sendo que as lesões locais induzidas pelo parasita aumentam o risco de adquirir HIV. ⁽¹³⁾ A prevalência e o espectro da doença nos homens são bem menos caracterizados. Contrariamente ao que ocorre nas mulheres, a infecção é maioritariamente assintomática, não sendo portanto tão relevante a nível clínico. Quando sintomática, podem desenvolver uretrites, epididimites ou ainda prostatites. ⁽¹⁴⁾

A principal via de contágio da tricomoníase são as relações sexuais, portanto a prática das mesmas de uma forma segura, assim como o aconselhamento e educação sexual são a principal medida preventiva a adotar no combate à infeção e a outras DSTs. A educação sanitária, assim como a não partilha de roupa interior são também outra medida preventiva. ⁽¹⁴⁾

Para além da prevenção, o controlo da infeção é outra medida essencial. Este controlo passa pelo tratamento dos indivíduos infetados, sendo de extrema importância a realização de um diagnóstico laboratorial em todas as pessoas sintomáticas. ⁽¹⁷⁾ Além disso, os homens, sejam eles sintomáticos ou assintomáticos, cuja parceira se encontre infetada devem realizar tratamento. ⁽¹⁸⁾

2.1.2 Resposta imunológica à infecção e estudos com VEs

As doenças infecciosas causadas por agentes patógenos são ainda um problema em todo o mundo. Apesar das grandes melhorias na área da saúde, vários desafios permanecem para prevenir ou erradicar estas doenças. No sentido de sobreviverem e se replicarem, os parasitas desenvolveram inúmeras estratégias para conseguirem “escapar” às respostas imunes do hospedeiro. Da mesma forma, o sistema imunológico do hospedeiro também é equipado de uma gama diversificada de funções efetoras para combater a infecção por parasitas e os danos subsequentes.⁽¹⁹⁾

O protozoário *T. vaginalis* inicia um processo inflamatório grave, induzindo a produção de óxido nítrico (NO) por parte de macrófagos activados, interleucina-6 (IL-6), IL-8, IL-10, e TNF- α pelas células imunes do hospedeiro.⁽²⁰⁾

Apesar das graves consequências associadas à doença da tricomoníase, pouco se sabe sobre os fatores parasitários envolvidos na ligação do parasita às células epiteliais do hospedeiro. Recentemente demonstrou-se que exossomas funcionam como mediadores na interação parasita-hospedeiro, interferindo na resposta imunológica contra *T. vaginalis*.⁽¹³⁾

A adesão às células epiteliais é o primeiro passo para o parasita causar a infecção no hospedeiro. Os exossomas libertados por *T. vaginalis*, promovem a sua aderência às células epiteliais do trato genital, fornecem moléculas reguladoras e promovem ainda a modulação da função imune do hospedeiro.⁽²⁰⁾

No sentido de comparar a resposta inflamatória e o curso da infecção, foi realizado um estudo, onde se utilizaram camundongos infetados com o parasita e alguns que foram submetidos a um pré-tratamento com VEs de *T. vaginalis*.⁽²⁰⁾ Verificou-se um aumento na síntese de NO, o que permitiu concluir que os exossomas libertados por *T. vaginalis* são capazes de ativar os macrófagos. Observou-se ainda, que as VEs induziram um aumento significativo (cerca de 15 vezes mais) na expressão de IL-10, um aumento ligeiro (duas vezes mais) nos níveis de expressão de IL-6 e de TNF- α e ainda provocaram uma diminuição da expressão da IL-8.⁽⁴⁾

Como se verificou que o pré-tratamento com as VEs modificou o perfil de citocinas em camundongos infectados, foi investigado o efeito dessas vesículas em dois eventos que poderiam suportar o seu papel na modulação da resposta imune: a sobrevivência do parasita e a inflamação vulvar durante o processo de infecção.

Os resultados obtidos mostraram que o parasita permaneceu vivo na vagina do camundongo durante os 16 dias após a infecção tanto nos animais pré-tratados como naqueles que não receberam qualquer tratamento. Em relação à inflamação, foi possível

concluir que os camundongos pré-tratados exibiram menor inflamação vulvar em comparação com camundongos não tratados. A produção de IL-10 foi marcadamente diferente daquela produzida em camundongos não tratados ao 8º dia após a infecção. Além disso, os níveis de IL-13 em camundongos infectados apresentaram-se baixos nos primeiros dias após a infecção por *T. vaginalis* sendo que, após o 6º dia os níveis aumentaram, contrariamente ao observado nos animais pré-tratados, cujos valores permaneceram relativamente baixos durante o curso da infecção.

Em conclusão, a inflamação vulvar e o edema são consideravelmente reduzidos pelo pré-tratamento com VEs. Além do mais, as diferenças observadas nos níveis de citocinas demonstraram que as VEs de *T. vaginalis* possuem um papel imunomodulador, participando na resposta imune, permitindo melhorar o processo inflamatório. ⁽²⁰⁾

2.2 *Leishmania spp.*

A leishmaniose é uma doença parasitária causada por parasitas do género *Leishmania*, destacando-se: *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi* e é transmitida através de vetores flebotomíneos do género *Lutzomyia*. Causa cerca de 2 milhões de novas infecções por ano, sendo endémica em 88 países. Apesar da sua elevada incidência, a leishmaniose continua a ser uma doença negligenciada porque ocorre principalmente em países em desenvolvimento e regiões pobres. ⁽²⁾

O parasita pode apresentar-se sob duas formas morfológicamente distintas: a amastigota, e a promastigota. A amastigota desenvolve-se no sistema mononuclear fagocitário do hospedeiro mamífero, é arredondada ou oval e não possui flagelo livre, representando assim o estadió de diagnóstico. A forma promastigota, desenvolve-se no intestino do vector, é alongada, flagelada e móvel, representando a forma infectante para os hospedeiros vertebrados. ⁽²¹⁾

2.2.1 Leishmaniose

Existem três formas principais da doença: leishmaniose cutânea (LC) (podendo ser difusa), leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose mucocutânea.

A forma mais grave é a LV durante a qual os parasitas invadem as vísceras, localizando-se preferencialmente no sistema macrofágico do baço, fígado, medula óssea e órgãos linfóides. ⁽²²⁾ A fase inicial da infecção caracteriza-se pelo aparecimento de um nódulo endurecido no local da picada, perda de apetite, palidez e febre, sendo que, no decorrer da

infecção surgem novas manifestações como a anemia, esplenomegalia, entre outras. A evolução da doença pode ser rápida, levando o doente à caquexia e morte (semanas a alguns meses) ou assumir um curso crónico (anos). A LV pode surgir como uma doença oportunista, podendo provocar co-infecção com HIV onde a esperança média de vida é cerca de 12 meses. ⁽²¹⁾

A LC pode apresentar-se sob três formas distintas: lesão única, situada na face, tendo cura espontânea (1 a 2 anos), lesão seca, ou seja, as úlceras aparecem alguns meses após o primeiro contacto com o parasita ou então pode desenvolver a forma crónica, onde ocorrem diversas recidivas e é de difícil tratamento. Por fim, na leishmaniose mucocutânea, o parasita “ataca” irreversivelmente a pele e as mucosas, causando lesões cutâneas múltiplas e grandes. Para além de apresentar uma evolução crónica, a cura espontânea é raríssima e as recidivas são frequentes, mesmo com tratamento. ⁽¹⁾

Apesar da elevada taxa de virulência, existem medidas que permitem minimizar os efeitos causados pela infecção. A prevenção passa pela protecção individual, sendo o uso de repelentes bastante importante. Infelizmente, ainda não existe nenhuma vacina aprovada que possibilite a prevenção da leishmaniose. O controlo é outra medida essencial para preservar a saúde pública, sendo essencial identificar todos os reservatórios animais existentes, eliminar o vetor causador da infecção e ainda proceder ao tratamento dos indivíduos infectados interrompendo assim a propagação da infecção. É também essencial alertar a população para não doar sangue durante 2 anos após o regresso, caso tenham visitado países endémicos de *Leishmania*. ⁽²¹⁾

2.2.2 Resposta imunológica à infecção e estudos com VEs

A resposta imunitária é iniciada no local de entrada do parasita através das CD e dos macrófagos, onde as formas promastigotas de *Leishmania* são interiorizadas por um processo denominado por fagocitose. Os parasitas são então reconhecidos pelos fagócitos através das PAMPs que interagem com receptores de reconhecimento de patógenos, por exemplo os receptores TLRs expressos nos fagócitos. A interação TLR com as PAMPs desencadeará a ativação de fatores de transcrição envolvidos na ativação de genes que codificam diversas citocinas e promovem a síntese de outras moléculas. Uma vez dentro do fagócito mononuclear, os promastigotas sofrem alterações bioquímicas e metabólicas, dando origem à forma intracelular obrigatória, a amastigota. Por sua vez, as formas amastigotas de *Leishmania* desenvolveram mecanismos para “escapar” à ação dos macrófagos. ⁽²³⁾

São vários os mecanismos anti-ímunes e as estratégias de evasão imunitária existentes em *Leishmania*. Um deles é a presença de proteases de superfície (MSP, também denominada GP63) nos exossomas. A GP63 é uma metaloprotease dependente de zinco codificada por um conjunto de genes pertencentes a três classes de msp, cujos mRNAs são diferencialmente expressos em diferentes estágios da vida do parasita. ⁽²²⁾ Estas proteases constituem um fator de virulência promovendo a sobrevivência do parasita tanto intracelular como extracelularmente, através da modulação das vias de sinalização, resistência à lise mediada pelo complemento e ainda a inibição da produção de iNOS, NO, TNF- α e IL-12, bloqueando assim a resposta Th1 (Fig. 3). ⁽⁷⁾

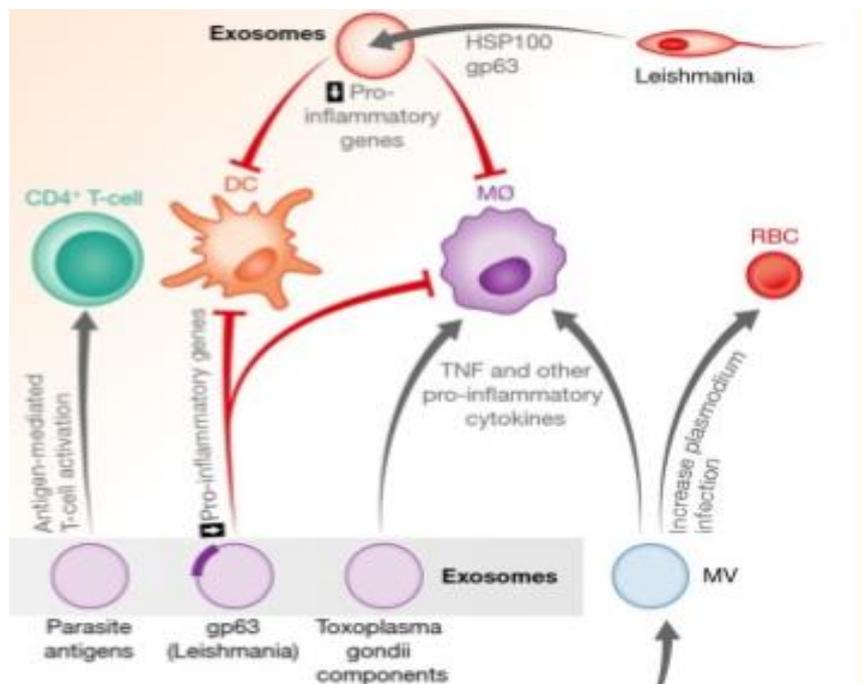


Figura 3 – Representação esquemática da modulação da resposta imune por exossomas durante a infecção por *Leishmania*. ⁽⁸⁾

Outro mecanismo de sobrevivência está relacionado com as LPG, lípidos presentes na membrana, que inibem a fusão do fagossoma ao lisossoma, promovendo a sobrevivência do parasita e a liberação dos seus fatores de virulência (Fig. 4). As anti-oxidases também desempenham um papel importante na medida em que contrariam a ação dos macrófagos (*burst oxidativo*). ⁽²²⁾

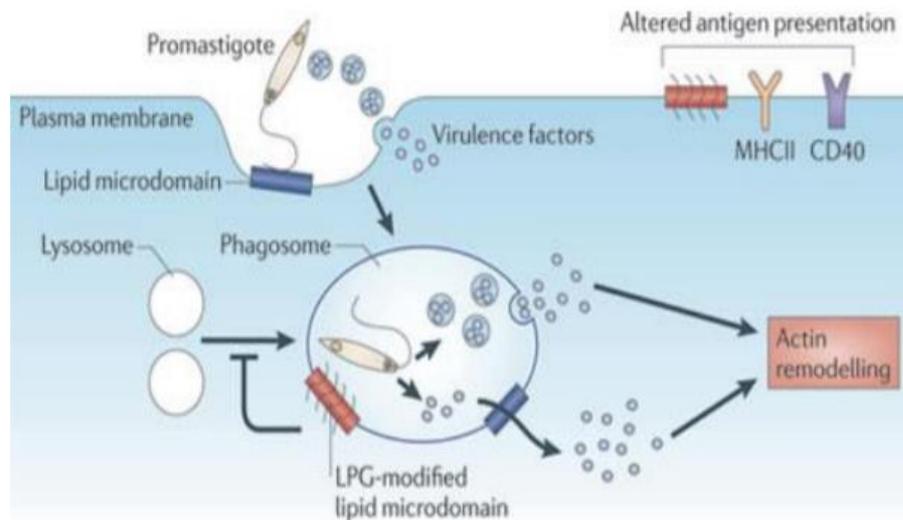


Figura 4 – Representação esquemática da modulação da resposta imune por exossomas durante a infecção por *Leishmania*. ⁽²⁴⁾

Os exossomas de *Leishmania* podem influenciar fortemente a sinalização e função dos macrófagos, mostrando-se pró-inflamatórios e com capacidade de recrutar neutrófilos para o local da infecção, exacerbando a resposta inflamatória. Além disso facilitam a produção de IL-10 e diminuem a ativação do TNF- α , inibindo consequentemente a resposta imune do monócito ao IFN- γ . As células dendríticas são reguladas negativamente pelos exossomas, apresentando uma diminuição na produção de algumas citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-12. ⁽²⁾

3. Parasitas Esporozoários

Estes microrganismos pertencem ao Reino Protista, Sub-Reino Protozoa e Filo Apicomplexa ⁽²⁵⁾ um filo grande e com diversos parasitas unicelulares. ⁽¹⁾

Apresentam um ciclo de vida complexo, passando por vários estádios ao longo do seu desenvolvimento, para além disso não possuem estruturas orientadas para a locomoção, ocorrendo esta por meio de deslizamento. Uma outra característica destes parasitas é o tipo de reprodução, neste caso é assexuada e por esporulação, onde uma única célula se divide numerosas vezes, dando origem a vários núcleos em que cada um deles é isolado por uma membrana, formando assim vários esporos a partir da célula inicial. Na maioria dos esporozoários, há uma alternância entre estádios sexuais e assexuais no ciclo vital.

Dentro desta classe de parasitas destacam-se: *Plasmodium*, com várias espécies causadoras da malária e *Toxoplasma gondii*. ⁽²⁶⁾

3.1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii, agente etiológico da toxoplasmose, é um parasita intracelular obrigatório tendo sido descrito pela primeira vez em 1908. Apesar da maioria dos pacientes não apresentar sintomas clínicos, *T. gondii* é um parasita oportunista em indivíduos imunodeprimidos. Além disso, a infecção em mulheres grávidas pode provocar danos graves no feto ou até mesmo o aborto. ⁽²⁾ Sabe-se que aproximadamente um terço da população se encontra infetado por este parasita e que a prevalência da infecção tem tendência a aumentar com a idade e no 3º trimestre da gravidez. ⁽³⁾

Ao longo do seu ciclo de vida apresenta três formas morfológicas distintas: taquizoíto, ooquisto e quisto (Fig. 5). ⁽²⁷⁾ O primeiro representa a forma invasiva resultante da reprodução assexuada, observa-se durante a fase aguda da infecção e multiplica-se muito rapidamente nas células nucleadas do hospedeiro. O ooquisto resulta da reprodução sexuada, podendo apresentar-se na sua forma imatura (não infetante) ou na sua forma infetante (ooquisto esporulado). Por fim, os quistos, encontram-se normalmente na retina, cérebro, músculo esquelético e cardíaco e contêm no seu interior bradizoítos (formas assexuadas). ⁽¹⁶⁾

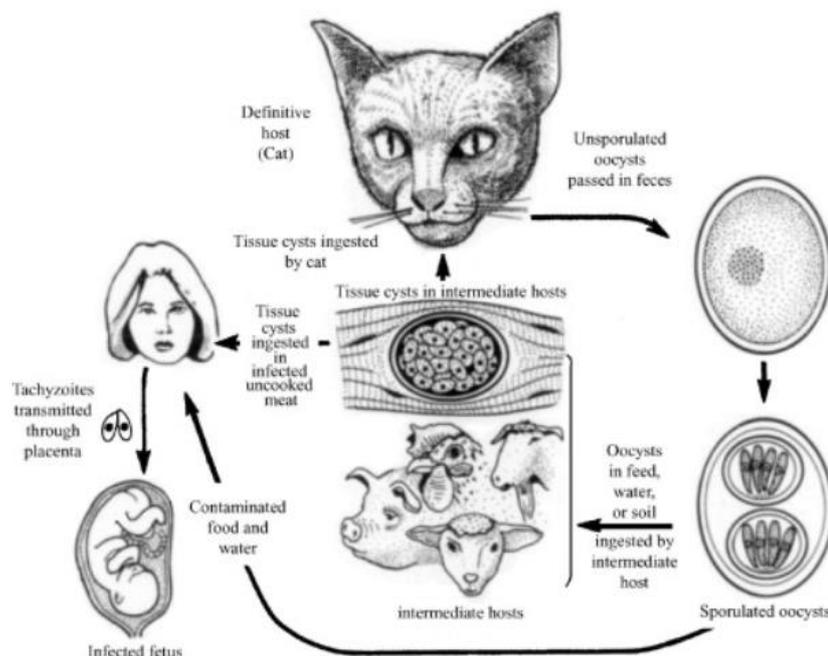


Figura 5 – Ciclo biológico de *T. gondii*. Os oocistos não esporulados são excretados nas fezes dos gatos, tornando-se infetantes após a esporulação em meio ambiente. Os hospedeiros intermediários são infectados após ingerirem água ou material vegetal contaminado com oocistos. Logo após a ingestão, os oocistos transformam-se em taquizoítos, migram depois para os tecidos onde evoluem para bradizoítos no interior do quisto. ⁽¹⁶⁾

3.1.1 Toxoplasmose

Clinicamente, a infecção por *T. gondii* pode apresentar diversas formas, como por exemplo a forma ganglionar, a mais comum nas crianças em idade pré-escolar e escolar, provocando cefaleias, dor abdominal, náuseas, vômitos, entre outros. A forma cerebrosplinal que se caracteriza por convulsões, linfadenopatias e sinais encefálicos, e ainda existe a forma ocular, generalizada e exantemática. Contudo, uma das formas mais problemáticas da doença resulta quando é adquirida durante a gravidez, dando origem a uma infecção congénita. A infecção congénita ocorre apenas quando uma mulher é infetada pela primeira vez durante a gravidez. Quando a infecção é adquirida durante o primeiro trimestre da gravidez, os sintomas são mais graves, destacam-se as alterações oculares e neurológicas. ⁽¹⁶⁾

A infecção provocada pelo parasita *T. gondii* é amplamente prevalente tanto em humanos como em animais. Uma vez que a principal via de transmissão da toxoplasmose é a via oral, são várias as medidas que podem ser implementadas no sentido de minimizar a propagação da infecção, como por exemplo: na alimentação, todos os frutos e legumes devem ser bem lavados; a carne deve ser bem cozinhada para eliminar potenciais quistos, assim como todos os utensílios que contactam com carne crua devem ser bem lavados; no jardim devem ser sempre utilizadas luvas, uma vez que o solo pode estar contaminado com ooquistos. No caso dos gatos, estes devem ser alimentados preferencialmente com alimentos secos e enlatados e a caixa de areia deve ser limpa todos os dias para evitar a acumulação de ooquistos excretados nas suas fezes. As grávidas, sendo um grupo de risco, devem ter especial atenção e seguir todas as ações preventivas mencionadas anteriormente. ⁽¹⁶⁾

3.1.2 Resposta imunológica à infecção e estudos com VEs

Uma vez que a principal via de infecção por *T. gondii* é a oral, o parasita chega ao intestino e encontra inúmeras barreiras físicas e químicas que precisa de ultrapassar para provocar infecção. Para tal acontecer é necessário que ocorra uma proliferação inicial do parasita e que o mesmo consiga atravessar o epitélio intestinal e posteriormente disseminar-se para os tecidos mais profundos. Nos últimos anos, vários estudos revelaram que várias espécies de parasitas, incluindo *T. gondii*, libertam VEs quando contactam com o hospedeiro. Estas VEs possuem diversas funções fisiológicas e estão envolvidas em atividades biológicas cruciais. ⁽²⁷⁾

Quando ocorre um primeiro contacto com o hospedeiro, o parasita *T. gondii* excreta diversos exossomas que vão atuar em várias células efectoras, modulando a resposta imunitária. As células dendríticas infetadas vão também elas libertar exossomas, induzindo uma resposta protetora contra a infeção, promovendo a proliferação de esplenócitos com aumento de citocinas Th1, como IL-2 e redução da expressão de citocinas Th2, como por exemplo IL-4, IL-5 e IL -10. Respostas imunitárias efetivas, onde há uma grande produção de citocinas Th1 protegem o hospedeiro de contrair uma infeção grave, demonstrando assim o potencial da utilização de exossomas derivados de CD na preparação de vacinas contra *T. gondii*. Para além disso, as CD provocam uma forte resposta humoral, levando a um aumento da produção de anticorpos séricos e IgA. ⁽²⁷⁾

Os exossomas derivados de *T. gondii* vão promover a ativação de macrófagos, havendo uma produção aumentada de IL-12, sendo esta essencial para a produção de IFN- γ pelas células NK, e aumenta também a produção de TNF- α , que vai atuar em sinergia com a IL-12 otimizando a produção de IFN- γ . Por sua vez, quando os macrófagos são ativados pelo IFN- γ produzem NO, molécula citotóxica que promove a degradação do triptofano (essencial para o crescimento do parasita) inibindo, assim, a replicação de *T. gondii* ou até promovendo a sua destruição. ⁽²⁸⁾

Além disso, os exossomas contêm recetores capazes de reconhecer padrões moleculares associados ao agente patogénico (PAMPs), como por exemplo, os receptores Toll-like (TLRs).⁽²⁾ Os TLRs têm um papel importante no desencadeamento inicial da resposta imune contra *T. gondii*, sendo responsáveis pela sinalização intracelular e recrutamento da molécula MyD88. Esta molécula é responsável pela retransmissão de sinais para dentro da célula do hospedeiro, induzindo a produção de IL-12 por leucócitos, macrófagos e células dendríticas. ⁽²⁸⁾

Com o intuito de se obter mais informações relativamente à função das VEs de *T. gondii* no sistema imunitário e qual o impacto das suas propriedades biofísicas e biológicas no organismo, foram realizados estudos em camundongos. ⁽⁴⁾

Verificou-se que os níveis de IL-12, TNF- α e IFN- γ se encontravam significativamente altos nos grupos de camundongos que receberam exossomas de *T. gondii* quando comparados com os níveis do grupo controlo, enquanto que os níveis de IL-10 diminuíram substancialmente. Além disso, a percentagem de células CD8+ no baço de camundongos foi superior nos animais que se encontravam imunizados. Contudo, não houve uma diferença significativa na percentagem relativa às células T CD4+ entre os vários grupos.

Verificou-se, ainda, que os camundongos imunizados com exossomas de *T. gondii* exibiram um tempo de sobrevivência prolongado (cerca de 23 dias) quando comparado ao

tempo dos não imunizados, que apenas sobreviveram durante 8 dias após a infecção. No entanto, nenhuma das vacinas proporcionou proteção completa contra a infecção, uma vez que todos os camundongos imunizados morreram. ⁽³⁾

Contudo, o potencial dos exossomos de *T. gondii* deve ser objeto de estudo, dada a sua capacidade de modular a ativação de macrófagos e desencadear respostas imunes, para além de promover uma proteção parcial contra a infecção aguda em camundongos. Sugerindo assim, que os exossomas possam ser considerados futuros candidatos no combate contra a toxoplasmose. ⁽³⁾

3.2 *Plasmodium spp.*

A malária é uma doença parasitária comum causada por *Plasmodium*. É considerada um problema global de saúde pública, presente em mais de 100 países, sendo a África o continente mais afetado. ⁽²⁾

Plasmodium é um parasita intracelular obrigatório, é constituído por um só núcleo e possui um complexo apical. Os estádios móveis, esporozoítos ou merozoítos, são os que invadem as células, sendo que a sua mobilidade é por deslizamento. Apresenta um ciclo de vida complexo, podendo reproduzir-se sexualmente por singamia ou assexuadamente. ⁽²⁹⁾

São cinco as espécies de *Plasmodium* responsáveis pela malária: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e ainda *P. knowlesi*, sendo que o período de incubação varia conforme a espécie infetante, podendo variar entre 7 a 40 dias. ⁽¹⁾

A infecção por *Plasmodium* é normalmente transmitida aos seres humanos através da picada do mosquito fêmea *Anopheles*, existindo também outras vias de transmissão como a sanguínea, através de transplantes hepáticos ou ainda a transmissão acidental (agulhas). ⁽¹⁾

Através do uso extensivo de medidas de precaução e dos vários medicamentos antimaláricos disponíveis no mercado conseguiu-se diminuir drasticamente a morbidade e mortalidade associadas à doença, contudo, a malária continua a ser a doença que mais mortes causa todos os dias. ⁽²⁾

3.2.1 Malária

Após a picada, o parasita desenvolve-se silenciosamente no fígado antes de atingir a corrente sanguínea, onde os parasitas da malária invadem e se replicam nos glóbulos vermelhos do hospedeiro.⁽¹⁾

No início da infecção aparecem sintomas como dores de cabeça e musculares, fadiga e náuseas, evoluindo posteriormente para o acesso febril (arrepios, febre e suores). Com o progresso da infecção surgem novos sintomas, nomeadamente a hepatomegalia, anemia e problemas neurológicos. As crianças e lactentes, juntamente com as mulheres grávidas, são os grupos mais problemáticos, onde a malária se torna mais grave e mortal.⁽²⁹⁾

A malária cerebral é uma das formas clínicas mais graves da doença, sendo responsável por cerca de 80% das mortes causadas pela infecção. Os sintomas podem variar consideravelmente, por vezes sugere um processo de encefalite ou de meningite, outras vezes lembra alcoolismo ou epilepsia. Caracteriza-se essencialmente pela ocorrência de encefalopatia difusa com perda de consciência, cuja evolução pode ser rápida ou gradual.⁽²⁹⁾

Apesar das elevadas taxas de prevalência e virulência da malária, são várias as medidas preventivas que podem ser adotadas. Uma das principais causas da ocorrência da infecção está relacionada com as viagens a países endémicos. Visto que ainda não existe nenhuma vacina disponível no mercado que permita combater a doença, torna-se essencial tomar as medidas preventivas necessárias quando se realizam viagens a esses países, como por exemplo a proteção contra as picadas dos mosquitos através do uso de repelentes e ainda realizar medicação preventiva.⁽²⁹⁾

3.2.2 Resposta imunológica à infecção e estudos com VEs

Na última década, a pesquisa sobre as funções das VEs na malária expandiu drasticamente. Estudos sobre os vários tipos de vesículas, de origem parasitária e humana, revelaram papéis importantes das VEs na patogénese e suscetibilidade da doença, bem como na comunicação célula-célula e respostas imunes.⁽⁵⁾

O mecanismo de proteção da vacina RTS,S contra a malária baseia-se na imunidade mediada por células, na qual o parasita, após atingir o fígado, desencadeia uma resposta imunitária (Fig. 6). Verificou-se que as células apresentadoras de antígenos do fígado respondem à presença estranha do parasita, estimulando a produção de IL-12 por parte das CD. Esta estimulação vai fazer aumentar os níveis celulares de CD4+ Th1 e células NK, levando à produção de IFN- γ . O IFN- γ , por sua vez, induz os hepatócitos infectados a

produzir o NO, que subsequentemente destrói o parasita e os glóbulos vermelhos infectados. Além disso, o equilíbrio entre IL-2, IL-10, IL-12 e IFN- γ resulta numa resposta inflamatória que contribui para a imunidade pré-eritrocítica. Estudos demonstraram que camundongos com baixos níveis de células T CD4 + desenvolveram parasitemia muito alta e foram incapazes de controlar a infecção comparativamente aos camundongos com níveis elevados de células T CD4 +, que desenvolveram parasitemia leve, o que indica o papel importante desempenhado por estas células na imunidade eritrocítica. ⁽³⁰⁾

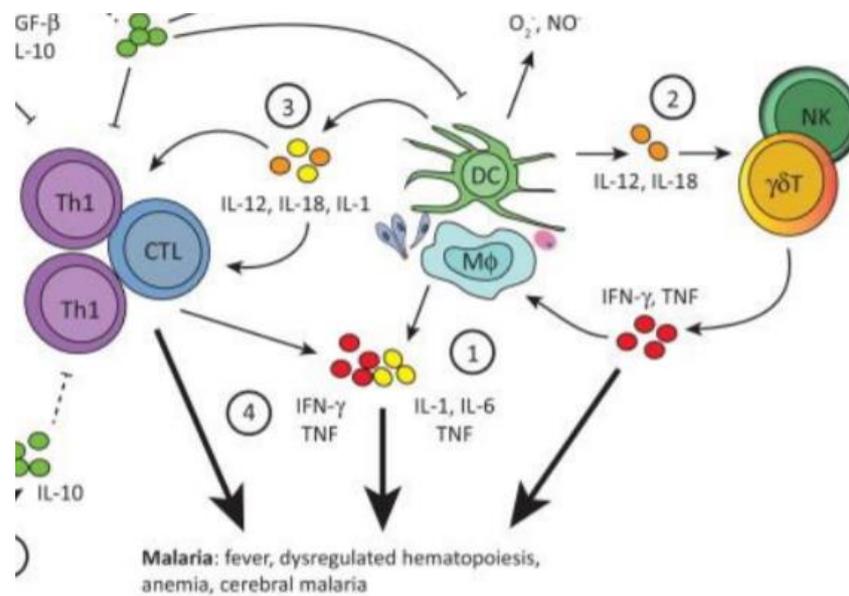


Figura 6 - Representação esquemática da resposta imunitária desencadeada pela vacina contra a malária. ⁽³¹⁾

As células NK são células imunes importantes na proteção contra a malária. Descobriu-se que as células NK que respondem aos glóbulos vermelhos infectados com malária apresentam níveis mais elevados de um receptor de reconhecimento de patógenos, o MDA5. Este receptor é ativado por pequenas vesículas libertadas pelos eritrócitos infectados. ⁽³²⁾

Na malária, a libertação de VEs por diferentes células foi descrita em modelos murinos e em infecções humanas. Diferentes estudos demonstraram que os níveis circulantes de VEs aumentam durante infecções provocadas pelos parasitas *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*. Nesses estudos, os níveis de VEs circulantes correlacionaram-se com as manifestações clínicas típicas da malária como febre e disfunções cerebrais, sugerindo um papel importante das VEs na patogénese da doença. ⁽¹⁾

Os estudos iniciais das VEs na malária centraram-se no papel das MVs no curso da infecção. Observou-se que níveis aumentados de MVs estavam presentes em pacientes com malária cerebral grave, podendo assim concluir que esses níveis se correlacionam com a gravidade da doença. Outro elemento importante relacionado com a suscetibilidade à doença, é o transportador ABCA1, modulador da presença de fosfatidilserina, um lípido presente na camada externa da membrana das MVs. Quando o gene ABCA1 é eliminado, a ação das MVs fica comprometida e, portanto, há uma maior proteção contra a malária cerebral.⁽⁵⁾ Estes resultados permitiram demonstrar a associação existente entre as MVs e a malária cerebral, podendo futuramente dar origem a um novo biomarcador e/ou terapia alternativa para a doença.⁽¹⁾ Os exossomas também foram descritos no contexto da infecção por *Plasmodium*. Foi demonstrado que os exossomas derivados de eritrócitos infectados continham proteínas de origem hospedeira e parasitária e tinham um papel na modulação das respostas imunes. Verificou-se ainda que os eritrócitos infetados produzem cerca de 10 vezes mais VEs que os não infetados, sendo que estas vesículas apresentam fortes propriedades inflamatórias, induzindo a produção de citocinas em macrófagos, ativam neutrófilos e aumentam a sua taxa de migração. Estes dados demonstram que os exossomas derivados de eritrócitos poderão ser explorados como potenciais vacinas.⁽¹⁾

O desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a malária é de grande interesse global, contudo devido à complexidade do ciclo de vida do parasita, variação antigénica e à grande redundância de proteínas na superfície, o seu desenvolvimento permanece um desafio. Embora muitos antígenos tenham sido avaliados como potenciais vacinas antimaláricas, o seu sucesso foi reduzido. A vacina RTS,S é a única atualmente aprovada, contudo a sua eficácia demonstrou ser limitada. Existe um interesse crescente em utilizar as VEs como sistemas de entrega, assim, uma vacina combinada contendo os principais antígenos candidatos, administrada por MVs/VEs tem o potencial de ser a melhor estratégia de vacinação contra a malária.⁽⁵⁾

Conclusão

Inicialmente considerados como subprodutos do metabolismo celular, sabe-se agora que as VEs atuam como mediadores na transmissão de diversos sinais biológicos. Durante milhares de anos, os parasitas conseguiram desenvolver ciclos de vida complexos, onde a comunicação intercelular é essencial, comunicação essa que envolve as VEs. ⁽¹⁾

Estudos mostraram que as VEs desempenham um papel importante, estando envolvidos na comunicação intercelular, sinalização e regulação gênica, permitindo a modulação da resposta imune do hospedeiro. ⁽¹¹⁾ Além disso, representam uma ferramenta promissora de entrega terapêutica, atuando como portadores bioativos de inúmeras moléculas secretoras, como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e também material genético. ⁽⁴⁾ No entanto, atualmente os estudos são limitados pela falta de consenso de definições e protocolos para a identificação, isolamento e análise de VEs de diferentes origens celulares e tecidulares. ⁽²⁾

A exploração do uso racional dos exossomas e das microvesículas pode levar a grandes avanços medicinais, dado o seu papel promissor como novos agentes terapêuticos e também como biomarcadores de diagnóstico. ⁽⁴⁾ O potencial uso das VEs em vacinas tem sido objeto de estudo alargado. Dada a capacidade destas vesículas transportarem diversos materiais biológicos, estas podem ser também usadas como possíveis sistemas de entrega de agentes terapêuticos. ⁽¹¹⁾

No entanto, ainda não está claro quais os papéis que as VEs podem desempenhar durante a infecção ativa em humanos e quais os efeitos globais que exercem sobre o hospedeiro, sendo portanto necessário, mais estudos para a aplicação de VEs em estratégias terapêuticas e de vacinação. ⁽³³⁾

Referências Bibliográficas

1. MARCILLA, A., MARTIN-JAULAR, L., TRELIS, M., MENEZES-NETO, A., OSUNA, A., BERNAL, B., FERNANDEZ-BECERRA, C., ALMEIDA, I.C., DEL PORTILLO, H.A. - **Extracellular vesicles in parasitic diseases.** *Journal of Extracellular Vesicles.* 3 (2014). doi: 10.3402/jev.v3.25040.
2. WU, Z., WANG, L., LI J, WANG L., WU Z., Sun X. - **Extracellular Vesicle-Mediated Communication Within Host-Parasite Interactions.** *Frontiers in Immunology.* 9:3066 (2019). doi: 10.3389/fimmu.2018.03066.
3. LI, Y., LIU, Y., XIU, F., WANG, J., CONG, H., HE, S., SHI, Y., WANG, X., LI, X., ZHOU, H. - **Characterization of exosomes derived from *Toxoplasma gondii* and their functions in modulating immune responses.** *International Journal of Nanomedicine.* . 2018:13 467–477. doi: 10.2147/IJN.S151110.
4. EVANS-OSES, I., REICHEMBACH, L., RAMIREZ, M. - **Exosomes or microvesicles? Two kinds of extracellular vesicles with different routes to modify protozoan-host cell interaction.** *Parasitol Res* (2015) 114:3567–3575. doi: 10.1007/s00436-015-4659.
5. SAMPAIO, N. G., CHENG, L., ERIKSSON, E. M. - **The role of extracellular vesicles in malaria biology and pathogenesis.** *Malaria Journal.* 16:245 (2017). doi: 10.1186/s12936-017-1891-z.
6. COAKLEY, G., MCCASKILL, J., BORGER, J., SIMBARI, F., ROBERTSON, E., MILLAR, M., HARCUS, Y., MCSORLEY, H., MAIZELS, R., BUCK, A. - **Extracellular Vesicles from a Helminth Parasite Suppress Macrophage Activation and Constitute an Effective Vaccine for Protective Immunity.** *Cell Rep.* (2017) 19:1545–57. doi: 10.1016/j.celrep.2017.05.001.
7. KUIPERS, M. E., HOKKE, C. H., SMITS, H. H., HOEN, E. N. M. - **Pathogen-Derived Extracellular Vesicle-Associated Molecules That Affect the Host Immune System: An Overview.** *Frontiers in Microbiology.* 9:2182 (2018). doi:10.3389/fmicb.2018.02182.

8. SCHOREY, J., CHENG, Y., SINGH, P., SMITH, V. - **Exosomes and other extracellular vesicles in host–pathogen interactions.** EMBO reports. Volume 16, Issue 1, (2015), 24-43. doi: 10.15252/embr.201439363.
9. TORRÓ, L., MOREIRA, L., OSUNA, A. - **Extracellular Vesicles in Chagas Disease: A New Passenger for an Old Disease.** Frontiers in Microbiology. 9:1190 (2018). doi: 10.3389/fmicb.2018.01190.
10. ZABOROWSKI, M., BALAJ, L., BREAKFIELD, X., LAI, C. – **Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study.** BioScience. Volume 65, Issue 8, (2015), 783-797. doi: 10.1093/biosci/biv084.
11. TWU, O., Johnson P. J. - **Parasite Extracellular Vesicles: Mediators of Intercellular Communication.** 10(8): e1004289 (2014). doi:10.1371/journal.ppat.1004289.
12. YAEGER, G. R., - Chapter 77 Protozoa: **Structure, Classification, Growth, and Development.** Baron S. Medical Microbiology, 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
13. NIEVAS, Y., COCERES, V., MIDDLEJ, V., SOUZA, W., BENCHIMOL, M., PEREIRA-NEVES, A., VASHISHT, A., WOHLSCHLEGEL, J., JOHNSON, P., MIGUEL, N. - **Membrane-shed vesicles from the parasite *Trichomonas vaginalis*: characterization and their association with cell interaction.** Cellular and Molecular Life Sciences. 75:2211–2226 (2018). doi: 10.1007/s00018-017-2726-3.
14. SCHWEBKE, J., BURGESS, D. – **Trichomoniasis.** Clin Microbiol Rev. 17(4) (2004) 794 – 803. doi: 10.1128/CMR.17.4.794-803.2004.
15. CAMPOS, J., SOARES, R., RIBEIRO, K., ANDRADE, A., BATISTA, W., TORRECILHAS, A. C. - **Extracellular Vesicles: Role in Inflammatory Responses and Potential Uses in Vaccination in Cancer and Infectious Diseases.** Journal of Immunology Research. Volume 2015, (2015). doi.org/10.1155/2015/832057.

16. HILL, D., DUBEY, J. P. - ***Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention.** Clinical Microbiology and Infection. Volume 8, Issue 10, (2002), 634-640. doi: 10.1046/j.1469-0691.2002.00485.x.
17. KISSINGER, P., - ***Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues.** BMC Infect Dis. 15: 307 (2015). doi: 10.1186/s12879-015-1055-0.
18. MACIEL, G., TASCA, T., CARLI, G., - **Aspectos clínicos, patogênese e diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, vol. 40, n. 3 (2004), 152-160, ISSN 1678-4774. doi:10.1590/S1676-24442004000300005.
19. HAKUR, A., MIKKELSEN, H., JUNGENSEN, G., - **Intracellular Pathogens: Host Immunity and Microbial Persistence Strategies.** Journal of Immunology Research. 1356540 (2019). doi: 10.1155/2019/1356540.
20. OLMOS-ORTIZ, L. M., BARAJAS-MENDIOLA, M. A., BARRIOS-RODILES, M., CASTELLANO, L. E., ARIAS-NEGRETE, S., AVILA, E. E., CUÉLLAR-MATA, P. - ***Trichomonas vaginalis* exosome- like vesicles modify the cytokine profile and reduce inflammation in parasite- infected mice.** Parasite Immunology. (2017). doi:10.1111/pim.12426.
21. GUERRERO, E., CEDILLO, M., ESMENJAUD, J., ARENAS, R. – **Leishmaniasis: a review.** F1000 Research. (2017). doi: 10.12688/f1000research.11120.1.
22. MARSHALL, S., KELLY, P., SINGH, B., POPE, R., KIM, P., ZHANBOLAT, B., WILSON, M., YAO, C. - **Extracellular release of virulence factor major surface protease via exosomes in *Leishmania infantum* promastigotes.** Parasites & Vectors. (2018). doi: 10.1186/s13071-018-2937-y.
23. FREITAS, J., PINHEIRO, D. - **Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a *Leishmania spp.*** Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias. 105, (2010), 573 – 576.
24. DESJEUX, P. – **Focus: Leishmaniasis.** Nature Reviews Microbiology. Volume 2, (2004). doi: 10.1038/nrmicro981.

25. MÔES, L., FAVARON, P., ANUNCIACÃO, A., MIGLINO, M. – ***Toxoplasma gondii* e gestação: características da toxoplasmose, sinais clínicos, diagnóstico e a importância da doença na saúde pública – Revisão.** Revista Científica de Medicina Veterinária, Garça SP, v.13, n.25, (2015) 1-17. ISSN:1679-7353.
26. LEVINE D. – **Sporozoa.** AccessScience. McGraw-Hill Education (2014). doi:10.1036/1097-8542.648400.
27. WANG, J., ZHANG, N., LI, T., HE, J., ELSHEIKHA, H., ZHU, X. - **Advances in the Development of Anti-*Toxoplasma gondii* Vaccines: Challenges, Opportunities, and Perspectives.** Volume 35, Issue 3, (2019), 239-253. doi: 10.1016/j.pt.2019.01.005.
28. DENKERS, E. Y. - **Toll-like receptor initiated host defense against *Toxoplasma gondii*.** J. Biomed. Biotechnol., v. 2010, 1-7 (2010).
29. COLLINS, W., JEFFERY, G. – ***Plasmodium malariae*: Parasite and Disease.** American Society for Microbiology. (2007), 579–592. doi: 10.1128/CMR.00027-07.
30. SSMAGANDA, A., GIDDAM, A., ZAMAN, M., SKWARCZYNSKI, M., TOTH, I., STANICIC, D., GOOD, M. – **Introduction of *Plasmodium* – Specific Immune Responses Using Liposome-Based Vaccines.** Frontiers in Immunology. (2019). doi: 10.3389/fimmu.2019.00135.
31. MAIER, A., MATUSCHEWSKI, K., ZHANG, M., RUG, M. – ***Plasmodium falciparum*.** Trends in Parasitology. Volume 35, Issue 6, (2019), 481-482. doi: 10.1016/j.pt.2018.11.010.
32. YE, W., CHEW, M., HOU, J., LAI, F., LEOPOLD, S., LINN LOO, H., GHOSE, A., DUTTA, A., CHEN, Q., OOI, E., WHITE, N., DONDORP, A., PREISER, P., CHEN, J. – **Microvesicles from malaria-infected red blood cells activate natural killer cells via MDA5 pathway.** PLOS pathogens. (2018). doi: 10.1371/journal.ppat.1007298.
33. MARTI, M., JOHNSON, P. - **Emerging roles for extracellular vesicles in parasitic infections.** Current Opinion in Microbiology. Volume 32, 27208506, 66-70. (2016). doi: 10.1016/j.mib.2016.04.008.