



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Margarida Varandas Lindo

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Extracellular Vesicles and the Parasite-Host Interaction: *Giardia lamblia*, a case of study” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Inês Louro, do Dr. Diogo Luxo e da Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de 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

Margarida Varandas Lindo

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Extracellular Vesicles and the Parasite-Host Interaction: *Giardia lamblia*, a case of study” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, da Dra. Inês Louro, do Dr. Diogo Luxo e da Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de 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



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Eu, Margarida Varandas Lindo, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2014192163, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Extracellular Vesicles and the Parasite-Host Interaction: *Giardia lamblia*, a case of study” 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, 3 de setembro de 2019.

Margarida Varandas Lindo

(Margarida Varandas Lindo)

Agradecimentos

A ti Coimbra, que me ensinaste a dizer saudade.

À Faculdade de Farmácia e a todo o corpo docente, que de uma forma tão fulcral fez de mim a farmacêutica que a partir de agora sou.

À Professora Doutora Maria do Céu Sousa, pela docente exemplar, pelo ser humano que tanto admiro, pelo enorme apoio e confiança que depositou em mim para a elaboração desta monografia.

À BasePoint, pelo carinho, amizade e espírito de equipa, por tornarem o difícil simples e por diariamente demonstrarem que com dedicação e esforço tudo conseguirei alcançar.

À Farmácia Miranda que me fez apaixonar pela farmácia comunitária, pela amabilidade e apoio prestado durante os meses em que fui parte desta enorme equipa.

À Sofia, à Mariana e à Vanessa, pelo percurso de 5 anos que realizamos em conjunto.

Às minhas caloirinhas, Inês e Carolina, por serem tão especiais e por confiarem tanto em mim.

À Joana, a minha amiga das urgências, um dos acasos mais felizes deste percurso académico.

À Teresa, ao Eduardo e à Maria, os meus padrinhos e a minha família de praxe, pelo caminho feita até agora, os amigos que levo para a vida.

Ao Gabriel, ao Daniel e à Camila, os meus amigos de sempre, que mesmo longe foram uma constante no meu percurso académico.

À minha família, aos meus primos, que sempre foram uma força de revitalização, um apoio fundamental para saber desligar e despreocupar-me nos momentos certos, aos meus avós, que deviam ser eternos.

Ao Tiago, pela paciência, apoio e dedicação nesta jornada, porque sem ele esta história teria sido escrita de maneira muito diferente.

Ao meu irmão, sempre presente, que me ensinou a ser persistente, lutadora e me motivou diariamente para que este trabalho fosse espelho do meu empenho e dedicação.

Aos meus pais, os meus pilares, o meu chão, o meu teto. O ombro amigo mais requisitado, o colo mais procurado, o conselho mais requisitado. Os que fizeram de mim a pessoa que sou hoje. Amo-vos. Obrigada.

A todos, o meu mais sincero obrigado!

Parte I

Relatório de Estágio em Assuntos Regulamentares

Parte II

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Parte III

Monografia

Extracellular Vesicles and the Parasite-Host Interaction:

Giardia lamblia, a case of study

ÍNDICE

Parte I – Relatório de Estágio em Assuntos Regulamentares

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. ANÁLISE SWOT	10
2.1 Pontos Fortes	10
2.1.1. Equipa Técnica e sua Integração.....	10
2.1.2. Formações Internas.....	11
2.1.3. Tarefas Desempenhadas.....	12
2.1.4. Autonomia e Responsabilidade.....	13
2.1.5. Competências desenvolvidas.....	13
2.2. Pontos Fracos	14
2.2.1. Duração do Estágio	14
2.2.2. Trabalho Dependente de Clientes.....	14
2.3. Oportunidades	15
2.3.1. Realização de Estágio Curricular em Áreas Diversificadas	15
2.3.2. Aplicação de Conhecimentos Teóricos.....	15
2.4. Ameaças	17
2.4.1. Fraca Abordagem de Áreas Durante o MICF	17
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	18
4. BIBLIOGRAFIA	20

PARTE II – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

LISTA DE ABREVIATURAS.....	22
1. INTRODUÇÃO.....	23
2. ANÁLISE SWOT	24
2.1. Pontos Fortes	24
2.1.1. Localização e Horário de Funcionamento	24
2.1.2. Equipa de Trabalho e sua Integração.....	25
2.1.3. Tarefas desempenhadas.....	25
2.1.4. Autonomia e Responsabilidade.....	28
2.1.5. Importância do <i>robot</i> e <i>Cash Guard</i>	29
2.1.6. Utentes e Cartão de Fidelização	29
2.2. Pontos Fracos	30
2.2.1. Preparação de Medicamentos Manipulados.....	30
2.2.2. Descredibilização por Parte dos Utentes	30
2.2.3. Plano de Estudos do MICF.....	31
2.3. Oportunidades	31
2.3.1. SIFARMA 2000®	31

2.3.2. Dermocosmética, Veterinária e Suplementos Alimentares.....	32
2.3.3. Formação Contínua.....	32
2.4. Ameaças	33
2.4.1. Dificuldade da Interpretação de Receitas Manuais	33
2.4.2. Informação de Preços nas Guias de Tratamento	33
2.4.3. Medicamentos Esgotados.....	34
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
4. BIBLIOGRAFIA	36
5. ANEXO.....	38
Parte III – Extracellular Vesicles and the Parasite-Host Interaction: <i>Giardia lamblia</i>, a case of study	
LIST OF ABBREVIATIONS	42
RESUMO	44
ABSTRACT	45
1. INTRODUCTION	46
2. EXTRACELLULAR VESICLES.....	47
2.1. Biogenesis	48
2.2. Cellular Communication in Host-Parasite Interaction	50
3. <i>Giardia lamblia</i>	52
3.1. Immune Response.....	54
3.2. Extracellular Vesicles of <i>G. lamblia</i> and Parasite-Host Interaction	56
3.2.1. Microvesicles.....	57
3.2.2. Excretory-Secretory Vesicles.....	60
4. APPLICATIONS OF EXTRACELLULAR VESICLES	63
5. CONCLUSION.....	65
6. BIBLIOGRAPHY	66

Parte I

Relatório de Estágio em Assuntos Regulamentares

LISTA DE ABREVIATURAS

BasePoint: BasePoint Consulting Services

CIAV: Centro de Informação Anti-Venenos

CIR: Cosmetic Ingredient Review

CPNP: Cosmetic Products Notification Portal

DGS: Direção Geral de Saúde

ECHA: European Chemicals Agency

INFARMED, IP: Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.

MICF: Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MOS: Margin of Safety (Margem de Segurança)

PIF: Product Information File

SCCS: Scientific Committee on Consumer Safety

SED: Systemic Exposure Dose (Dose de Exposição Sistémica)

SWOT: *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

I. INTRODUÇÃO

Ao longo do meu percurso académico pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra rapidamente compreendi que o papel do farmacêutico não passa apenas pela farmácia comunitária, como o típico cidadão assume. Consciente de que esta é a área do setor farmacêutico que emprega mais profissionais, desde cedo que soube que gostaria de enveredar por outras áreas e compreender melhor o ciclo do medicamento. Ao longo dos meus cinco anos desenvolvi competências em vários âmbitos, sendo os Assuntos Regulamentares uma das áreas que me despertou maior curiosidade e interesse em aprofundar e aplicar conhecimentos. O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) prepara-nos justamente para a integração no mercado de trabalho nas variadas saídas profissionais, através da aquisição de uma grande diversidade de conhecimentos e a consciencialização para o facto de que a ação do farmacêutico não passa apenas pela farmácia comunitária, podendo ainda enveredar em especialidades como farmácia hospitalar, análises clínicas, indústria farmacêutica ou assuntos regulamentares.¹

É, então, no final de cinco anos que o aluno é integrado no mercado trabalho através da realização de estágios curriculares essenciais, não só para aplicar e adquirir novos conhecimentos, como também para integrar e adaptar-se ao funcionamento da atividade profissional que até aqui era desconhecida.

Assim, destaco o trabalho incansável da Faculdade de Farmácia em permitir aos seus alunos a melhor formação possível. Para além do estágio em farmácia comunitária e em farmácia hospitalar, esta criou protocolos com diversas entidades em diferentes áreas, permitindo, assim, a realização de outros estágios curriculares. É de louvar este tipo de protocolos que nos permitem alargar os nossos conhecimentos e experiência e ainda contactar com outras realidades, compreendendo assim, melhor, o papel do farmacêutico nos variados setores.

Perante a oportunidade de adquirir experiência noutras áreas e após contacto direto com a empresa, decidi realizar um estágio curricular numa empresa de consultoria, a BasePoint Consulting Services (BasePoint). Para além de satisfazer o meu interesse na área regulamentar, alargou os meus conhecimentos relativos à mesma no âmbito dos produtos cosméticos, um dos focos principais da empresa.

Finalizando, exponho o presente relatório, sobre a forma de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*), com vista à análise crítica da integração e da aprendizagem teórica à realidade profissional deste estágio. Orientado pela Dra. Inês Louro,

o estágio curricular realizou-se no período de 07 de janeiro a 29 de março de 2019, na consultora BasePoint Consulting Services, uma empresa sediada em Coimbra.

2. ANÁLISE SWOT

O objetivo do presente relatório é apresentar a minha experiência como estagiária na BasePoint, fazendo-o na forma de uma análise SWOT. Esta engloba duas dimensões permitindo uma análise das competências adquiridas e aspetos internos e externos da empresa que possam interferir na minha evolução e na prática do exercício profissional. A minha abordagem contemplará os pontos fortes (*Strengths*), os pontos fracos (*Weaknesses*), as oportunidades (*Opportunities*) e as ameaças (*Threats*) durante a realização de todo o estágio. Tentarei completar a minha análise com alguns exemplos práticos que possam reforçar os conhecimentos adquiridos e, se possível, melhorar a experiências dos futuros estagiários que tenham a oportunidade de estagiar nesta empresa:

2.1 Pontos Fortes

2.1.1. Equipa Técnica e sua Integração

A BasePoint Consulting Services é uma empresa de consultoria direcionada para o setor dos produtos cosméticos, dispositivos médicos, suplementos alimentares, biocidas e substâncias químicas, sediada no Edifício Fernão Magalhães em Coimbra. Com uma equipa composta por cinco elementos, jovem, dinâmica e competente, a minha integração e adaptação enquanto estagiária, aliados à minha capacidade de trabalho em equipa, foi simplificada.

Pelo facto de ser uma empresa pequena, tive a oportunidade de exercer várias funções e de trabalhar com todos os colaboradores. Embora focada maioritariamente em produtos cosméticos, integrei a rotina da equipa e cooperei com estes profissionais, de modo a adquirir conhecimentos diversificados e aproveitar ao máximo a experiência da equipa para esclarecer as minhas dúvidas e consolidar a minha aprendizagem, destacando, assim, este facto como um dos pontos fortes do meu estágio.

A equipa da BasePoint não é apenas composta por mestres em Ciências Farmacêuticas, mas também por uma jurista e licenciados em Farmácia Biomédica, permitindo-me assim um complemento diário de conhecimentos adquiridos. O facto de haver farmacêuticos na equipa facilitou o apoio prestado e conselhos transmitidos durante o estágio, uma vez que os mesmos reconhecem com facilidade as lacunas que um estudante do MICEF traz na sua formação.

Por fim, valorizo toda a atenção prestada, não só ao longo de todo o estágio, mas principalmente no primeiro dia e em todos aqueles em que me foi apresentada uma nova área

ou tarefa. Destaco o primeiro dia em que me foi exposto a estrutura de um Product Information File (PIF) para um produto cosmético, bem como todas as fichas técnicas e relatórios necessários para a elaboração do mesmo. Neste primeiro dia, tive contacto com o Regulamento (CE) n.º 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 30 de novembro de 2009², que rapidamente compreendi ser essencial e um guia para a elaboração do PIF, obtendo lá sempre as respostas necessárias para o mesmo. Foram-me apresentadas várias bases de dados, como o Cosing, o Cosmetic Ingredient Review (CIR), o Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) e o European Chemicals Agency (ECHA), ferramentas essenciais para a elaboração do PIF e, portanto, para a compreensão de todo o trabalho.

2.1.2. Formações Internas

Um dos pontos fortes do meu estágio, que permitiu o meu sucesso diário, prende-se com o facto de que antes de iniciar qualquer tipo de tarefa nova, recebi formações internas por parte dos colaboradores, facilitando a minha integração no ambiente de trabalho e nas várias tarefas.

Assim, no primeiro dia de estágio foi-me dada formação acerca de produtos cosméticos e explicações relativas ao Regulamento (CE) n.º 1223/2009² por parte do Dr. David Costa e da Dra. Inês Louro, conhecimentos estes que tentei preservar durante todo o estágio. Neste mesmo dia, recebi ainda uma formação sobre avaliação de rotulagem de produtos cosméticos por parte da Dra. Carmen Pinto. Para além disso, ainda aprendi a notificar um produto no portal CPNP, Cosmetic Products Notification Portal, um portal europeu, onde é necessário notificar os produtos cosméticos. A partir do momento em que o produto se encontra registado neste portal, não é necessária qualquer notificação adicional em outro estado-membro da União Europeia. Destaco ainda uma formação realizada no âmbito dos produtos Biocidas, na qual tive a oportunidade de aprender a registar um biocida que se encontre dentro do período transitório, através do Centro de Informação Antivenenos (CIAV) e da Direção Geral de Saúde (DGS).

Estas formações foram extremamente importantes e úteis, no meu ponto de vista, uma vez que me permitiam não só relembrar conhecimentos adquiridos durante o MICE, como também adquirir novas ferramentas que me possibilitaram uma mais fácil integração nas tarefas diárias da empresa. Aleado a estes fatores, o enorme sentido crítico que me é inerente, bem como o meu interesse constante por aprender, permitiram-me, assim, compreender os serviços prestados pela empresa e alcançar o êxito no meu estágio mais facilmente.

2.1.3. Tarefas Desempenhadas

Desde já começo por frisar que qualquer tarefa que desempenhei nesta empresa foi um ponto forte do meu estágio, uma vez que todas corresponderam à aquisição de novos conhecimentos e, conseqüentemente, ao enriquecimento da minha formação.

Após a integração na empresa, as minhas tarefas consistiram maioritariamente na elaboração de PIFs e avaliação de rotulagem de variados produtos cosméticos, tendo sempre como base de apoio a Decisão de Execução da Comissão de 25 de novembro de 2013 relativa a orientações para aplicação do Anexo I do Regulamento (CE) n.º 1223/2009.³

Durante esta atividade, destaco, novamente, a importância de saber interpretar o Regulamento (CE) n.º 1223/2008² e compreender a informação necessária para que um PIF esteja completo e que possa ser facilmente interpretado e clarificado quando solicitado pelas autoridades regulamentares, como o INFARMED. Primeiramente, a Dra. Inês Louro trata de recolher todas as informações relevantes para a elaboração de PIF. Após termos todas as informações necessárias, organiza-se toda a documentação e, juntamente com esta, é elaborado um ficheiro EXCEL que nos facilita o cálculo da concentração dos constituintes em cada ingrediente e no produto final, a Margem de segurança (MOS) e a dose exposição sistémica (SED), parâmetros essenciais para a avaliação da segurança do produto cosmético. O PIF é composto por uma parte A, mais descritiva onde se faz uma análise da composição qualitativa e quantitativa de cada ingrediente e dos seus constituintes. De seguida, é elaborada uma análise das características físico-químicas e estabilidade do produto acabado nas condições de utilização e de armazenamento razoavelmente previsíveis. Para além destas informações, é necessário analisar a qualidade microbiológica do produto final, as impurezas do produto cosmético e informações sobre o material de embalagem. Nesta parte é necessário incluir substâncias proibidas, provas da sua inevitabilidade técnica e ainda características relevantes do material de embalagem. Aqui, saliento a importância de saber interpretar as restrições de utilização dos vários ingredientes/ constituintes, incluídos nos Anexos do Regulamento (CE) n.º 1223/2009², em particular a interpretação da concentração de constituintes que podem ser alergénios e que a sua menção no rótulo poderá ser obrigatória. Posto isto, é necessário refletir sobre a utilização normal e razoavelmente previsível do produto cosmético, bem como a exposição ao mesmo (locais de aplicação, duração da exposição, área superficial de aplicação, etc.), através da consulta das THE SCCS NOTES OF GUIDANCE FOR THE TESTING OF COSMETIC INGREDIENTS AND THEIR SAFETY EVALUATION.⁴ Por fim, é fundamental fazer uma caracterização do perfil toxicológico das substâncias, os efeitos indesejáveis e outras informações relevantes sobre o produto. Nesta parte, pude colaborar na elaboração de uma

base de dados do perfil de toxicológico de ingredientes, dos quais eu própria realizei várias análises com total autonomia. Na última parte do PIF, a parte B, é necessário avaliar a segurança do produto cosmético e elaborar uma fundamentação científica e com base na informação exposta na parte A, bem como referir as advertências e instruções de utilização do produto cosmético.

Destaco, por fim, a importância da minha formação base nas tarefas que realizei e que me permitiram alcançar o sucesso no meu dia-a-dia e ultrapassar todos os desafios.

2.1.4. Autonomia e Responsabilidade

No decorrer do meu estágio, nas tarefas que desempenhei fui sentindo o apoio e constante incentivo por parte da equipa à realização das mesmas com autonomia. Embora em cada tarefa sentisse essa responsabilidade, foi-me sempre prestado o auxílio e supervisão dos meus trabalhos. Diariamente, foi sempre questionado em que fase do trabalho me encontrava, quais as dificuldades que estava a sentir e era-me prestada sempre ajuda. Quer a autonomia quer a responsabilidade foram bandeiras que procurei adquirir, uma vez que as considero fulcrais para o trabalho do futuro farmacêutico.

2.1.5. Competências desenvolvidas

Para além de todas as competências suprarreferidas que adquiri durante o estágio, não posso deixar de referir as competências técnicas que me foram transmitidas, aprimoradas e de que tão valiosamente me apropriei e apliquei na minha rotina.

Primeiramente, destaco as competências informáticas e todas as dicas que me foram transmitidas, que me permitiram economizar tempo de trabalho e, deste modo, ser mais eficiente. Devido à constante utilização do computador durante o meu estágio, as minhas competências nas várias ferramentas do Microsoft Office foram semanalmente progredindo, principalmente a nível do Microsoft Word®.

Paralelamente, e tendo em conta o contexto da empresa e a universalidade da língua inglesa, o domínio do inglês tornou-se crucial durante todos os trabalhos que realizei na BasePoint. O conhecimento da língua refletiu-se essencial aquando da pesquisa bibliográfica necessária, por exemplo, na elaboração do perfil toxicológico de um ingrediente, bem como na interpretação de certificados de análise e fichas técnicas de matérias-primas.

Para além disso, realço ainda o meu aperfeiçoamento a nível de pesquisa em bases de dados como o CIR, o SCCS e a ECHA, assim como no motor de busca da PubMed.

Iniciei o estágio com conhecimentos em todas estas vertentes, o que me permitiu uma adaptação mais rápida, contudo tenho consciência que no fim do estágio o meu domínio sobre as mesmas e a adequação destas ao contexto em que fui inserida é substancialmente maior, mais amplo e acompanhar-me-á durante todo o meu percurso profissional.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Duração do Estágio

O ponto fraco que destaco neste estágio foi, sem dúvida, a curta duração do mesmo, embora previsível, tendo em conta a duração obrigatória do estágio em farmácia comunitária.

Sendo um estágio de cariz opcional, numa empresa escolhida por mim, tentei reter o máximo de conhecimento possível nestes três meses, ganhar competências nesta área e compreender de alguma forma a realidade profissional. Contudo, pelo curto período que passei na BasePoint, dediquei-me sobretudo aos produtos cosméticos, não tendo oportunidade de ter contacto com as outras áreas em que a empresa se foca, como os dispositivos médicos, suplementos alimentares, etc.

Neste sentido, sinto que um estágio mais prolongado numa empresa como a BasePoint, iria criar a oportunidade de aprofundar mais conhecimentos, ficando com uma maior diversidade de conceitos, fundamentar mais competências e até preencher lacunas.

2.2.2. Trabalho Dependente de Clientes

O trabalho numa consultora depende dos serviços para os quais a empresa é contratada. Durante o meu estágio na BasePoint, integrei o trabalho diário da equipa, pelo que as tarefas que executei dependiam das necessidades dos clientes que recorriam aos serviços da BasePoint. Todo o trabalho era previamente calculado e organizado de acordo com a rapidez de resposta necessária e informações já recolhidas. Contudo, por vezes, foi necessário iniciar trabalhos sem ter todas as informações necessárias, pelo que as tarefas que realizava ficavam inacabadas e com notas dos vários setores com informação em falta e tópicos por preencher. Este tipo de trabalhos revelou-se, no entanto, desafiante, colocando-me diariamente à prova.

É importante referir que o trabalho na BasePoint foi sempre rigorosamente organizado, discutido em equipa e que estas situações foram raras. Também realço que a ausência de informação não se prendia com o facto de a empresa não as ter solicitado, mas sim devido a envios mais tardios das mesmas por parte das outras empresas.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Realização de Estágio Curricular em Áreas Diversificadas

O MICF prima por ser um curso muito extenso com uma polivalência enorme, no qual a exposição sobre as diversas saídas profissionais é autêntica e do conhecimento de todos os alunos. Contudo, há certas áreas que acabam por ter um foco menor, como é o caso dos produtos cosméticos.

O estágio realizado na BasePoint deu-me a oportunidade de conhecer, assim, melhor o mundo regulamentar dos produtos cosméticos, um domínio que é pouco explorado no MICF, onde adquirimos apenas conhecimentos essenciais ao nível do aconselhamento farmacêutico, dermofarmácia e a parte mais galénica. Assim, sinto que adquiri competências que me destacam e individualizam como futura profissional.

O facto de o trabalho na BasePoint ser focado em outros produtos que não o medicamento, como os cosméticos, os dispositivos médicos, suplementos alimentares, biocidas, substâncias químicas, foi decisivo na escolha do local para a realização do meu estágio. Apesar de o meu período de estágio na BasePoint ter sido curto, permitiu-me definir melhor os meus interesses profissionais e delinear os meus objetivos futuros.

No primeiro dia de estágio, aquando da minha receção, tive a oportunidade de opinar sobre a área pela qual demonstrava mais interesse. Embora também tivesse alguma curiosidade noutras áreas, como os suplementos alimentares, o meu plano de estágios acabou por ser focado na área dos produtos cosméticos, na qual demonstrei sempre muito interesse, espírito crítico e proatividade.

Realço aqui, novamente, a importância da Faculdade de Farmácia criar protocolos com diversas entidades que atualmente estejam envolvidas com o setor farmacêutico, permitindo-nos assim escolher e realizar estágios nas mais diversas saídas profissionais do curso e não apenas em Farmácia Comunitária. Estes tipos de estágios só são possíveis na Universidade de Coimbra, pelo que, enquanto futuros profissionais de saúde, destaca-nos e individualiza-nos dos restantes futuros farmacêuticos do país.

2.3.2. Aplicação de Conhecimentos Teóricos

O vasto plano do MICF permitiu-me adquirir bases essenciais e muitos conhecimentos nas diversas áreas científicas fundamentais para a minha carreira como farmacêutica.

De acordo com o trabalho realizado na BasePoint destaco a importância das áreas da cosmética e dos assuntos regulamentares, explorados nas unidades curriculares de “Dermofarmácia e Cosmética” e “Assuntos Regulamentares do Medicamento”, durante o 4º

ano e ainda a unidade curricular opcional que realizei no 5º ano, denominada “Gestão de Processos Regulamentares”. Estas unidades curriculares conferiram-me muitos conhecimentos teóricos, bem como um enquadramento geral destas áreas, tendo sido, então, cruciais para a minha integração nas tarefas executadas durante a minha passagem pela BasePoint. Destaco, por exemplo o facto de o contacto diário com normas e regulamentos não me ter sido tão dificultado, uma vez que estava já familiarizada com a estrutura e interpretação destes documentos.

É importante também referir a relevância da aplicação de conhecimentos adquiridos noutras áreas como a Toxicologia, a Química Orgânica e a Microbiologia, que facilitaram a elaboração dos PIFs dos vários produtos cosméticos que tive oportunidade de realizar.

Na BasePoint tive a oportunidade de aplicar os meus conhecimentos teóricos a casos reais e, assim, atualizar-me, uma vez que estas áreas se encontram em constante evolução e que mesmo após terminar o MICF, é fundamental para o farmacêutico manter-se atualizado e saber aplicar os novos conhecimentos às questões que surgem, numa perspetiva de auto-regulação.

Um bom exemplo, decorreu da avaliação de um produto capilar oxidante para as sobrancelhas. Este tipo de cosmético encontra-se na forma de um pó e, aquando da sua utilização, o profissional deve adicionar água para preparar o produto. Ora, ao adicionar água formam-se novos compostos, sendo essencial avaliar a segurança dos mesmos, uma vez que o consumidor não estará apenas em contacto com os ingredientes iniciais, mas também com os produtos da reação. O produto acabado é composto por peróxido, dois precursores e um acoplador. Estes compostos, ao reagir em meio básico formam moléculas coloridas que conseguimos concluir que seriam seguras para uso em produtos cosméticos e que não colocam em risco a segurança do consumidor. Para chegar a esta conclusão, senti necessidade de aplicar os meus conhecimentos de química orgânica, pelo que concluí que: os precursores reagem, individualmente, com o peróxido, formando uma quinonediimine que rapidamente reagirá com o acoplador, formando 2 compostos dímeros, devido à existência de apenas uma posição “para” livre no acoplador. Os compostos intermediários reagem tão rapidamente que não era expectável que se acumulassem no organismo.⁵ Por outro lado, a segurança de vários dímeros foi avaliada pelo SCCS e pelo CIR e foi possível extrapolar para os produtos finais da reação. Embora a genotoxicidade fosse uma preocupação, concluiu-se que os compostos, *in vivo*, não eram genotóxicos nem sensibilizantes cutâneos, sendo, por isso, seguros. Para além disso, a exposição e o tempo de contacto aos mesmos foram curtos, bem como a biodisponibilidade, sendo ainda necessário ter em consideração que o produto é apenas utilizado uma vez por mês, pelo que a frequência de utilização é muito pequena.^{6,7}

2.4. Ameaças

2.4.1. Fraca Abordagem de Áreas Durante o MIFC

Tendo em conta o pouco tempo que passei pela BasePoint, o meu foco de trabalho foram apenas os produtos cosméticos. Como já referido, para realizar o tipo de tarefas que me foram atribuídas era necessário ter presente conhecimentos adquiridos nas unidades curriculares de “Dermofarmácia e Cosmética” e “Assuntos Regulamentares do Medicamento”. Assim, considero que estas unidades curriculares são realmente importantes no plano de estudos do MIFC, contudo, o facto de não haver um maior aprofundamento destas acabou por se tornar uma desvantagem para mim.

Um bom exemplo, é o caso de nunca ter analisado o Regulamento (CE) n.º 1223/2009,² o qual me acompanhou diariamente na BasePoint e essencial para o trabalho na área regulamentar dos produtos cosméticos. Tal, deve-se ao facto de se tratar de um regulamento europeu, aplicável em toda a União Europeia. Tratando-se de um mercado único, a relevância da abordagem deste regulamento é tão importante quanto a legislação nacional, uma vez que os produtos cosméticos têm livre circulação no mercado europeu. Assim, assegurar a conformidade dos mesmos, não só de acordo com a legislação do nosso país, Decreto-Lei n.º 189/2008⁸, como também pela legislação da União Europeia, é fundamental no dia-a-dia das empresas que tratam da legalização destes produtos.

Apesar disso, sendo áreas tão abrangentes e tão específicas, o processo de aprendizagem não se pode prender pelo que aprendemos durante o curso, uma vez que estas áreas requerem muita atualização, estudo contínuo, experiência e interesse pela aprendizagem.

Considero, então, que deva ser ponderada a possibilidade de inclusão de temas da área regulamentar dos produtos cosméticos nestas unidades curriculares, proporcionando a aquisição de um leque de conhecimentos mais vasto e uma formação mais segura do estudante para a entrada no mercado desta área. Tendo o farmacêutico um papel cada vez mais relevante neste âmbito, é realmente importante colocar-nos na vanguarda do conhecimento e com bases para executar este tipo de trabalhos, sendo, por isso, uma ameaça de fácil ultrapassagem.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Terminado o presente relatório, gostaria de deixar o meu profundo agradecimento não só à Faculdade de Farmácia, pela oportunidade de realizar estágios curriculares noutras áreas, como também a toda a equipa da BasePoint pelo apoio prestado durante o estágio, a receção e a fácil integração na equipa e nas tarefas diárias da empresa, esperando ter correspondido a toda a confiança que foi depositada em mim e no meu trabalho.

Apesar da curta duração do estágio e da transmissão de conhecimentos ser uma constante, tentei reter o máximo de informação possível demonstrando sempre um profundo interesse pelo trabalho realizado e espírito de equipa, uma vez que a equipa da BasePoint prima pelo profissionalismo e rigor científico. Para além disso, qualquer aspeto menos positivo do meu estágio foram sempre ultrapassados e constituíram desafios e aprendizagens que levarei comigo para o meu futuro enquanto farmacêutica. Assim, foi possível proporcionar vivenciar experiências indispensáveis para o meu desenvolvimento profissional e pessoal e ainda a troca de sinergias entre mim, como estagiária, e os próprios profissionais da empresa.

De facto, a prática curricular e a minha formação base, bem como a dedicação e disciplina que me foram inerentes durante o estágio, envolveram valor e conhecimento de uma importância fundamental para a minha futura carreira profissional, abrindo um novo olhar para o futuro que poderá caminhar no sentido da construção de um novo projeto de vida e carreira profissional.

Um dos pontos fortes do estágio na BasePoint foi o facto de ter integrado a rotina diária da empresa, pelo que pude perceber a realidade profissional e adquirir um leque de conceitos e um conhecimento muito mais vasto sobre produtos cosméticos. Para além disso, compreendi a importância da área regulamentar noutros produtos de saúde, para além do medicamento, na certeza que as ferramentas adquiridas durante este estágio serão uma mais-valia no meu percurso profissional.

A realização deste estágio foi extremamente enriquecedora e importante para a minha formação, contribuindo para que no futuro possa ter uma melhor prestação no mercado de trabalho. Para além disso, a BasePoint encontra-se em processo de crescimento, pelo que a minha experiência foi muito mais completa e abrangente, bem como as premissas de necessidade de constante aprendizagem, ambição e competência ao mais alto nível, também se começaram a refletir em mim e no meu trabalho.

Devido à forte competitividade do mercado e a sua imposição, ao aumento da exigência regulamentar e ao aumento da vigilância por parte das autoridades regulamentares, acredito que estes estágios terão cada vez mais um papel fulcral para os estudantes finalistas.

Espero, então, que o presente relatório sirva como base para melhorar a experiência de estágios dos alunos do MICEF, bem como possa servir para alguma reflexão relativa ao plano de estudos do MICEF. Um curso que prima pela atualização e por se encontrar na vanguarda do conhecimento, que, porém, é já tão vasto e completo, pode ser aperfeiçoado de acordo com as exigências do mercado adequada à atualidade, para que assim os futuros farmacêuticos possam acabar os estudos com uma formação mais profissional, eficiente e de excelência.

4. BIBLIOGRAFIA

1. ASSEMBLEIA DA REPÚBLICA - **Decreto-Lei n.º131/2015, de 4 de setembro**, Diário da República: n.º173/2015, 1ªsérie, 2015. [Acedido a 10 de março de 2019]. Disponível em: <https://data.dre.pt/eli/lei/131/2015/09/04/p/dre/pt/html>
2. UNIÃO EUROPEIA - **Regulamento (CE) n.º1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de novembro de 2009 relativo aos produtos cosméticos**. Jornal Oficial da União Europeia. L 342 (30.11.2009) 59-209.
3. UNIÃO EUROPEIA - **Decisão de Execução da Comissão relativa a orientações para aplicação do anexo I do Regulamento (CE) n.º 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo aos produtos cosméticos**. Jornal Oficial da União Europeia. L 315 (25/11/2013) 82-105.
4. European Commission: The Scientific Committee on Consumer Safety - **The SCCS Notes Of Guidance For The Testing Of Cosmetic Ingredients And Their Safety Evaluation: 10th revision**. [Acedido a 10 de março de 2019]. Disponível em: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_224.pdf
5. European Commission: Scientific Committee On Consumer Products - **Opinion on Exposure to reactants and reaction products of oxidative hair dye formulations**. [Acedido a 25 de março de 2019]. Disponível em: https://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_032.pdf
6. European Commission: Scientific Committee on Consumer Safety - **Opinion On reaction products of oxidative hair dye ingredients formed during hair dyeing processes**. [Acedido a 25 de março de 2019]. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_037.pdf
7. Cosmetic Ingredient Review Expert Panel - **Chemistry of Hair Coloring**. [Acedido a 25 de março de 2019]. Disponível em: <https://www.cir-safety.org/supplementaldoc/presentation-chemistry-hair-coloring>
8. MINISTÉRIO DA SAÚDE - **Decreto-Lei n.º 189/2008, de 24 de setembro**, Diário da República: n.º 185/2008, 1ª série, 2008. [Acedido a 15 de março de 2019]. Disponível em: <https://data.dre.pt/eli/dec-lei/189/2008/09/24/p/dre/pt/html>

Parte II

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

LISTA DE ABREVIATURAS

FFUC: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

FM: Farmácia Miranda

GAU: Gabinete de Apoio ao Utente

MICF: Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MG: Medicamento Genérico

MNSRM: Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

MSRM: Medicamento Sujeito a Receita Médica

PVP: Preço de Venda ao Público

SWOT: *Strenghts, Weaknessess, Opportunities, Threats*

I. INTRODUÇÃO

O farmacêutico, cada vez mais, é o profissional de saúde que mais próximo se encontra da população, sendo as farmácias o primeiro local onde o utente se dirige. Na verdade, o farmacêutico não é apenas o especialista do medicamento, é também um agente da saúde pública, promotor do bem-estar do cidadão e da comunidade em geral.¹ A atual posição do farmacêutico no nosso país torna-o essencial e o único profissional capaz de aconselhar em situações de automedicação e de indicação farmacêutica, cedendo o fármaco adequado e minimizando reações adversas e interações medicamentosas. Para além disso, exerce o seu dever respeitando o uso racional do medicamento, fazendo-o sempre com sigilo, ética profissional e garantindo qualidade, segurança e eficácia aquando do ato da dispensa do medicamento. Assim, pode-se concluir que os pilares do exercício da profissão farmacêutica são a competência, independência, responsabilidade e sigilo profissional. Desta forma, é possível inferir sobre o valor do farmacêutico no dia-a-dia e na educação do cidadão.

Ao fim de quatro anos e meio de estudo teórico e prático, o aluno do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) é inserido em contexto real, nas farmácias portuguesas, de forma a pôr em prática todo o conhecimento adquirido. Este estágio permite-nos crescer profissional e pessoalmente, desenvolvendo, assim, competências para ser um futuro farmacêutico digno e competente. Para além disso, consciencializa-nos para o facto de que o farmacêutico tem um papel fulcral na adesão à terapêutica e prevenção de doenças, duas das metas desta profissão.

Escolhi a Farmácia Miranda (FM), na Mealhada, para realizar o meu estágio curricular, não só devido ao seu movimento e localização estratégica, como também pelo reconhecimento do bom aconselhamento prestado pela equipa técnica enquanto utente da FM e residente na Mealhada.

Finalizando, exponho o presente relatório, sobre a forma de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*), com vista à análise crítica da integração e da aprendizagem teórica à realidade profissional deste estágio. Orientado pelo Dr. Diogo Luxo, em conjunto com toda a equipa técnica, o estágio curricular realizou-se no período de 1 de abril a 26 de julho de 2019, na FM, sediada na Mealhada.

2. ANÁLISE SWOT

O objetivo do presente relatório é apresentar a minha experiência como estagiária na Farmácia Miranda, fazendo-o na forma de uma análise SWOT. Esta engloba duas dimensões permitindo uma análise das competências adquiridas e aspetos internos e externos da empresa que possam interferir na minha evolução e na prática do exercício profissional. A minha abordagem contemplará os pontos fortes (*Strengths*), os pontos fracos (*Weaknesses*), as oportunidades (*Opportunities*) e as ameaças (*Threats*) durante a realização de todo o estágio. Tentarei completar a minha análise com alguns exemplos práticos que possam reforçar os conhecimentos adquiridos e, se possível, melhorar a experiência dos futuros estagiários que tenham a oportunidade de estagiar nesta empresa:

2.1. Pontos Fortes

2.1.1. Localização e Horário de Funcionamento

A FM situa-se na rua Dr. José Cerveira Lebre, no centro da Mealhada, uma cidade que por ser pequena e ter o seu comércio concentrado, coloca esta farmácia num local de destaque e estrategicamente posicionada face ao utente. Assim, a heterogeneidade de utentes e a sua elevada afluência deve-se ao facto de que em seu redor encontram-se várias clínicas dentárias e oftalmológicas, uma extensão de saúde, um hospital, comércio local, escolas e restauração. Desta forma, pude contactar com utentes de todas as idades (jovens a idosos) e com vários graus de literacia, permitindo realizar atendimentos bastante diversificados e personalizados. Aleado a um serviço de saúde pública de excelência que procurei executar, considero que este foi um dos pontos fortes do meu estágio, na medida em que cada dia foi de constante aprendizagem pessoal e profissional.

Outro ponto forte do meu estágio na FM, que se alia à sua localização, é o horário de funcionamento da mesma. A FM encontra-se de serviço alternado com a outra farmácia da cidade, funcionando, portanto, 24 horas nessa semana, e na outra semana estende o seu horário das 8:30 às 20 horas, funcionando ainda ao sábado. Desta forma, a população ativa, estando mais disponível nesses horários alargados, desloca-se à farmácia, criando um elevado número de casos reais diversificados.

O facto de a outra farmácia da Mealhada se situar bastante perto não foi um fator negativo no meu estágio, uma vez que o serviço de excelência prestado na FM bem como o espírito inovador, que também me foi inculcido, permitem a fidelização de um enorme número de utentes na mesma.

2.1.2. Equipa de Trabalho e sua Integração

Um dos pontos fortes que mais destaque no meu estágio na FM é, sem dúvida, a equipa técnica, que desde o primeiro dia procurou orientar-me e auxiliar-me no dia-a-dia.

De acordo com orientações estabelecidas pelo Decreto-Lei n.º307/2007², a equipa da FM é composta pelo diretor técnico, cinco farmacêuticos, duas técnicas de farmácia e um responsável pelo *back office* da farmácia. Cada um dos elementos da equipa colaborou sempre no meu processo de aprendizagem, ajudando-me a aplicar os conhecimentos adquiridos durante os quatro anos e meio de formação mais teórica e a superar as dificuldades sentidas diariamente. Na FM cada elemento tem as suas tarefas individualizadas e bem distintas que culminam na maximização das potencialidades de cada um de forma a atingir-se uma maior rentabilidade de cada vertente. Desta forma, qualquer dúvida que me surgia, era mais fácil de solucionar, uma vez que sabia a que profissional me dirigir de acordo com as minhas dúvidas e necessidades.

Assim, trata-se de uma equipa bastante completa e experiente, que me acompanhou todos os dias, para que rapidamente me sentisse integrada, confiante e autónoma. O facto de nos primeiros dias ter a presença de um dos elementos sempre a acompanhar-me, permitiu-me facilitar a interação com os utentes e aprender a prestar um serviço de excelência. Enquanto futura profissional de saúde, a equipa da FM contribuiu para o meu desenvolvimento pessoal e profissional, incentivando-me a ser autónoma, responsável e ensinando-me diariamente a prestar um serviço de excelência e a consolidar os meus conhecimentos previamente adquiridos.

2.1.3. Tarefas desempenhadas

Outro ponto forte que destaque no meu estágio é, sem dúvida, a diversidade de tarefas que pude desempenhar. Na verdade, a FM está habituada a receber estagiários já há vários anos, pelo que já existe um plano definido, que nos permite executar as várias tarefas diárias e colaborar com toda a equipa.

Tendo em conta que o trabalho de um farmacêutico numa farmácia comunitária não se prende apenas com o atendimento ao público, realizei tarefas como o Armazenamento e Receção de Encomendas, compreendendo o impacto para a farmácia de uma boa gestão das encomendas, e, por conseguinte dos *stocks*; Serviços Farmacêuticos de Promoção de Saúde (exemplo, análise de parâmetros bioquímicos), Dinamização do Espaço e Preparação Individual da Medicação, que de seguida abordarei detalhadamente.

Armazenamento e Receção de encomendas

Uma das primeiras fases do meu estágio prendeu-se com a receção e posterior armazenamento das encomendas. Desta forma, pude começar a familiarizar-me com os vários produtos, marcas, associar os nomes comerciais aos princípios ativos e recordar as indicações terapêuticas e dosagens dos mesmos. Nesta fase pude contactar e executar encomendas diárias, geridas pelo SIFARMA 2000®, que vão de encontro com os *stocks* máximos e mínimos de cada produto, encomendas instantâneas, de produtos que estão em falta, e encomendas diretas aos laboratórios. Tive ainda a oportunidade de compreender a diferença entre um preço de venda à farmácia e o P.V.P (preço de venda ao público), o impacto das margens de lucro, a problemática dos medicamentos esgotados e lidar com diferentes distribuidoras farmacêuticas nacionais. Pude ainda compreender que os *stocks* devem ser compatíveis com as necessidades dos utentes da farmácia, de forma a que o investimento tenha rentabilidade.

De seguida procedia-se ao armazenamento dos produtos, sendo esta etapa fulcral para a rapidez do atendimento e para a gestão de *stocks*. Desta forma, os produtos são organizados de modo a serem facilmente localizados e segundo o princípio “*first expire, first out*”, de forma a escoar primeiro os produtos com prazo de validade mais curto. Este processo era facilitado devido à existência de um *robot* que, pelas suas dimensões, armazena praticamente todos os medicamentos sujeitos (MSRM) e não sujeitos a receita médica (MNSRM). Assim, só tinha de armazenar produtos com dimensões demasiado pequenas ou demasiado grandes ou produtos com dimensões/formas que não são compatíveis com o *robot*.

Serviços farmacêuticos de promoção de saúde

São vários os serviços farmacêuticos prestados na FM, desde consultas de nutrição, podologia até à medição de parâmetros bioquímicas e tensão arterial no Gabinete de Apoio ao Utente (GAU).³ Foi nesta fase do estágio que comecei a ter um contacto maior com os utentes da FM, ao comunicar com os mesmos no GAU, onde se cria um ambiente mais privado e permite-nos comunicar mais à vontade. Neste espaço, pude não só praticar as minhas técnicas de medição da tensão arterial, glicémia e colesterol total, como também contribuir para a consciencialização da importância de uma mudança de estilo de vida, através da alteração hábitos alimentares e prática de exercício físico. Durante o estágio adquiri competências que me permitiram um maior enfoque no utente e aprimoraram as minhas técnicas de comunicação, através das quais comecei a detetar que muitas vezes alguns valores mais alterados se deviam a uma não aplicação de medidas não farmacológicas e a não adesão à terapêutica. No entanto, é também de notar que existe uma crescente preocupação por parte do utente em querer alterar o seu estilo de vida, sendo que nessa altura a minha opinião

era sempre solicitada. Sendo, uma equipa bastante proativa, destaco ainda o facto de no mês de maio, o “mês do coração”, terem sido realizados rastreios gratuitos como forma de promoção para a saúde e alerta para as doenças coronárias.

Atendimento ao público

O atendimento ao público foi, sem dúvida, a tarefa que realizei durante mais tempo e que se revelou, também, a tarefa mais difícil de executar. Desde cedo que a observação do atendimento por parte da equipa da FM me foi incentivado, pelo que passei algumas horas ao lado dos mesmos a familiarizar-me com o programa, com o discurso a ter com os utentes e a interpretar as receitas médicas. Nesta fase inicial fui incentivada a manter um espírito crítico perante as várias prescrições médicas, aprendi a trabalhar com o módulo de atendimento do SIFARMA 2000[®], que, na realidade, é bastante fácil e intuitivo, e fui elucidada quanto às perguntas essenciais a realizar durante o ato do aconselhamento farmacêutico.

Posteriormente, quando comecei a sentir algum à vontade, comecei a fazer os atendimentos acompanhada e só mais tarde executei esta tarefa sozinha, na certeza de que sempre que precisasse de ajuda, poderia solicitá-la.

Nesta fase, compreendi a importância de manter um espírito crítico aquando da análise de uma receita médica, quer a nível científico, quer a nível dos seus aspetos legais. Entendi a necessidade de explicar a importância da adesão à terapêutica e de alertar para a importância de cumprir com as indicações prestadas pelo médico ou pelo farmacêutico para que o medicamento possa ter o seu devido efeito terapêutico. Por exemplo, aquando da dispensa de um antibiótico alertava para o facto da necessidade de tomar a medicação sempre às mesmas horas e até ao fim da embalagem ou escrevia nas embalagens a posologia correta. Mais ainda, verifiquei que existem grupos farmacológicos que são prescritos em grandes quantidades como os anti-inflamatórios não esteroides, colírios, estatinas, inibidores da bomba de prótons ou até benzodiazepinas e que sempre alertei para os cuidados especiais a ter durante a toma deste tipo de medicamentos.

Para além da dispensa de receitas médicas, muitas foram as situações em que os utentes procuraram um aconselhamento farmacêutico. Nestes casos, primeiramente tentava recolher informações sobre a pessoa à qual se destinava o aconselhamento (exemplo, a idade da mesma, medicamentos que toma, patologias, ...). De seguida, analisava os sinais e sintomas apresentados e descritos, gravidade e duração dos mesmos, seguindo, então por três caminhos: aconselhamento de medidas não farmacológicas, caso não houvesse necessidade de introduzir um MNSRM, introdução de um MNSRM, apresentando várias opções, tendo em conta a relação benefício-risco-custo e explicava a posologia que considerava mais segura e

eficaz ou, por fim, se se tratasse de uma situação mais complicada aconselhava o utente a dirigir-se ao médico, de forma a que fosse analisada a situação mais pormenorizadamente. Caso cedesse o MNSRM, procurei sempre seguir o princípio do uso racional do medicamento, explicar corretamente a posologia de modo a haver adesão à terapêutica e no fim pedia sempre ao utente que voltasse à farmácia e que desse um *feedback* da resposta ao tratamento.

Quer a nível científico como intelectual, o processo de atendimento revelou-se um desafio diário que procurei sempre melhorar, tentando assimilar o que me era ensinado de novo, aplicar os meus conhecimentos previamente adquiridos e mostrar interesse e empatia para com o utente que tinha à minha frente, adaptando-me a cada caso.

Dinamização e Gestão do espaço

Para além de excelentes profissionais e face à forte competitividade do mercado, os profissionais da FM procuram organizar o espaço da farmácia de forma acolhedora, com boa visibilidade e sinalização dos vários setores, marcas e produtos. Para além disso, a montra é reformulada regularmente, atualizando a população acerca das promoções a decorrer e ainda as prateleiras destinadas às campanhas promocionais apresentavam acentuada rotatividade. Mais ainda, os utentes que apresentavam cartão de fidelização da FM, e que tínhamos autorização para tal, recebiam frequentemente mensagens personalizadas a informar das novas campanhas, de acordo com as suas necessidades. Pude frequentemente colaborar na elaboração das montras e dos lineares e aplicar os meus conhecimentos de *marketing* e organização e gestão farmacêutica, pelo que considero que esta atividade também foi um ponto forte do meu estágio.

2.1.4. Autonomia e Responsabilidade

No decorrer do meu estágio, nas tarefas que desempenhei fui sentindo o apoio e constante incentivo por parte da equipa à realização das mesmas com autonomia. Embora em cada tarefa sentisse essa responsabilidade, foi-me sempre prestado o auxílio e supervisão dos meus trabalhos. Por exemplo, destaco o facto de ter realizado individualmente a Preparação Individual da Medicação para os utentes que necessitavam deste serviço. A FM proporcionava este encargo através do qual se organiza a medicação dos utentes semanalmente, utilizando caixas para medicação ou blisters descartáveis. A informação encontrava-se organizada por utente, bem como as caixas de medicamentos dos mesmos, sendo apenas necessário proceder ao enchimento das mesmas. No entanto, caso sentisse alguma dificuldade com algum tratamento de algum utente pude sempre contar com o apoio da equipa da FM. Quer a

autonomia quer a responsabilidade foram bandeiras que procurei adquirir, uma vez que as considero fulcrais para o trabalho do futuro farmacêutico.

2.1.5. Importância do *robot* e *Cash Guard*

A FM possui dois sistemas de tecnologia que permitem rentabilizar o tempo do atendimento: um *robot* e um *Cash Guard*.

O *robot* permite o armazenamento de uma grande quantidade de medicamentos e está ligado ao sistema SIFARMA 2000[®], sendo que a entrada dos mesmos é dada por um elemento da FM e a sua saída é feita de acordo com a validade do mesmo: “*first in, first out*”. Para além de ser uma forma de rentabilizar o espaço da farmácia e de controlar as validades dos medicamentos, evita que se façam erros aquando do atendimento ao nível de dosagens ou até mesmo troca do medicamento. Assim, considero-o um ponto forte do meu estágio pois permitiu-me ganhar tempo com o utente durante o atendimento que de outra forma seria gasto a procurar o medicamento correto, minimizando o risco de ceder o medicamento errado.

Ainda, a FM possui um sistema *Cash Guard* que armazena todos os lucros feitos diariamente e regista todos os movimentos feitos por cada colaborador. Assim, esta tecnologia é um ponto forte do meu estágio ao facilitar os trocos e devoluções durante o atendimento e permitir-me facilitar o cálculo da minha caixa no fim do dia.

2.1.6. Utentes e Cartão de Fidelização

Um dos pontos fortes que ainda realço no meu estágio na FM foi, sem dúvida, a diversidade de utentes. Embora seja maioritariamente a população idosa que frequenta a FM, polimedicados e utentes com doenças crónicas, também são muitos os utentes de outras faixas etárias, desde recém-nascidos, a crianças e adultos, que estão fidelizados a esta farmácia. Para além disso, o horário alargado permite que a mesma seja frequentada noutros horários por indivíduos que se encontrem a trabalhar e só possam deslocar-se ao fim de semana ou ao fim do dia. Deste modo, a heterogeneidade da população contribuiu para que o meu processo de aprendizagem fosse contínuo e que quase diariamente surgissem situações novas.

Sendo a satisfação do utente uma das máximas da FM, a criação do cartão de fidelização tornou-se essencial no dia-a-dia da farmácia, em particular para o utente que frequenta este espaço de saúde com bastante frequência. Qualquer utente pode aderir ao cartão e, após a dispensa de receitas médicas, um valor simbólico de “visita à farmácia” é acumulado no cartão, enquanto que em produtos de cosmética, suplementos alimentares, puericultura, etc. o valor

acumulado corresponde a uma percentagem do preço que o utente pagou. O dinheiro acumulado no cartão pode ser descontado em qualquer altura em todo o tipo de produtos, exceto MSRM. Pude fazer este desconto várias vezes, bem como criar cartões, o que me introduzia num novo sistema informático, com o qual aprendi a trabalhar. Assim, para além das novas ferramentas com que me familiarizei, considero um ponto forte o facto de ter conseguido contribuir para a satisfação do utente ao fazer-lhe um desconto na sua compra.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Preparação de Medicamentos Manipulados

Um dos pontos fracos que destaco no meu estágio na FM foi o facto de praticamente não ter realizado medicamentos manipulados. De facto, a evolução da indústria farmacêutica faz com que o número de pedidos deste tipo de medicamentos que chega à farmácia seja cada vez mais reduzida. Enquanto estive na FM realizei apenas uma solução de Álcool a 70% boricado à saturação⁴ utilizado devido ao seu efeito antisséptico e desinfetante para tratar otites externas.

Considero, então, um ponto fraco não ter tido a oportunidade de preparar mais medicamentos manipulados e com outras formulações galénicas.

2.2.2. Descredibilização por Parte dos Utentes

Ao longo dos anos, a FM tem recebido vários estagiários, pelo que a presença dos mesmos na farmácia não é estranha aos utentes. Na maioria das vezes, os utentes tentavam ajudar-me, referindo o número da ficha para mais rapidamente consultar os seus dados ou até mesmo alertando-me para o facto de possuírem planos de complementaridade com o Serviço Nacional de Saúde.

Contudo, nem todos os utentes se sentem à vontade para ser atendidos por um estagiário que, portanto, é uma pessoa mais inexperiente. Assim, por vezes, alguns utentes solicitaram ser atendidos por um membro efetivo, ou até mesmo um farmacêutico em específico, negando o atendimento por parte da estagiária que não os conhece há um muito tempo.

Por fim, apenas gostaria de frisar que tal aconteceu poucas vezes, sendo que pude realizar diversos atendimentos, onde muitas vezes a minha opinião e aconselhamento foi solicitado, demonstrando, por parte do utente, confiança em mim, enquanto futura profissional de saúde.

2.2.3. Plano de Estudos do MICF

O plano curricular do MICF da FFUC prima pela diversidade de conteúdos lecionados, que nos garante a aquisição de uma enorme diversidade de conhecimentos aplicáveis em várias áreas essenciais para a nossa carreira enquanto farmacêuticos. Contudo, com o decorrer do meu estágio verifiquei algumas lacunas no mesmo.

Enquanto estagiária, fui diariamente confrontada com várias áreas sobre as quais sentia bastante dificuldade em aconselhar, devido à falta de conhecimentos que tinha sobre as mesmas. Destaco as áreas dos produtos de dietética e suplementos alimentares, afeções ginecológicas e oftalmológicas, dermofarmácia e cosmética e ainda veterinária. Para além disso, considero de extrema importância a unidade curricular de Dispositivos Médicos, que, por ser opcional, não tive oportunidade de frequentar, sendo, portanto, os meus conhecimentos a nível de adesivos, material ortopédico, seringas, etc. muito reduzido.

Assim, destaco a necessidade em alargar e especificar conhecimentos nestas áreas, sendo interessante a resolução de casos práticos dentro destas temáticas que possam retratar a realidade do dia-a-dia nas farmácias comunitárias.

2.3. Oportunidades

2.3.1. SIFARMA 2000®

O SIFARMA 2000®, desenvolvido pela Glintt, é o programa mais utilizado nas farmácias portuguesas.⁵ Por este motivo e pelas suas diversas funcionalidades, considero que este programa foi uma oportunidade no meu estágio na FM. O SIFARMA não nos permite apenas realizar um atendimento de uma forma simplificada e intuitiva: permite realizar encomendas instantâneas e diárias e ainda rececioná-las, controlar os *stocks*, analisar históricos de compras e vendas. Para além disso, este programa informático possui uma componente científica enorme, associada a cada produto como as suas indicações terapêuticas, posologia e doses, contraindicações, interações medicamentosas, grupo farmacoterapêutico, etc.

Uma vez que no início do estágio tinha bastante dificuldade em associar nomes comerciais a princípios ativos, esta ferramenta foi um auxílio imprescindível. Mais ainda, contribuiu para relembrar diversos conteúdos e alertar para os mesmos durante o atendimento, altura em que seria fulcral e penoso se me esquecesse de algum detalhe sobre o medicamento que estava a dispensar. Sendo o sistema mais utilizado nas farmácias portuguesas, considero então que o contacto com esta ferramenta é uma mais valia para o meu futuro enquanto farmacêutica.

2.3.2. Dermocosmética, Veterinária e Suplementos Alimentares

O plano curricular do MICF é bastante extenso e completo, contudo, o universo das farmácias comunitárias acarreta um conjunto de áreas bastante amplo e sobre as quais durante a minha formação teórica foi impossível de aprofundar alguns conceitos.

Uma das oportunidades do meu estágio foi sem dúvida o facto de poder adquirir novos conhecimentos em dermocosmética, veterinária e suplementos alimentares, uma vez que a FM possuía grandes lineares destas áreas, com várias marcas e produtos. Este tipo de produtos foram diariamente solicitados durante os atendimentos que realizei, pelo que inicialmente sentia uma grande dificuldade em aconselhá-los. Com o auxílio da equipa técnica da FM, algum estudo e esforço para reter o máximo de informação possível, comecei a conseguir aconselhar várias marcas e produtos com alguma confiança e destreza.

Desta forma, pude contactar e conhecer melhor os produtos destes âmbitos, facilitando-me a associação e aplicação dos conhecimentos teóricos adquiridos à realidade.

2.3.3. Formação Contínua

A FM prima diariamente pela sua atualização, aquisição de novos produtos e realização de formações individuais e em grupo para que o farmacêutico possa relembrar conhecimentos e estar a par das últimas novidades dentro da nossa área.

Desta forma, durante o meu estágio acompanhei a equipa da FM em formações externas e internas, que considero uma oportunidade do meu estágio. Destaco, assim, formações realizadas de diversas indústrias e/ou gamas de produtos como Alès Groupe® (gama completa da LIERAC®), Bayer® (produtos de uso veterinário), Norgine® (Doença do intestino Irritável: Gelsectan®), Medela® (gama completa), GSK® (produtos de higiene oral), Fresenius Kabi® (Fresubin®: “terapêutica nutricional adaptada a cada doente”).

Estas formações permitiram-me recordar alguns conhecimentos do ponto de vista científico (indicações terapêuticas, mecanismos de ação, ...) e conhecer diversos produtos de diferentes marcas que eram diariamente solicitados na FM, bem como as últimas novidades no mercado. Para além disso, contribuíram para o aprimoramento das minhas técnicas de venda, quer *cross-selling* quer *up-selling*.

2.4. Ameaças

2.4.1. Dificuldade da Interpretação de Receitas Manuais

Atualmente, a grande maioria das receitas que chega às farmácias são receitas eletrônicas, pelo que as receitas manuais representam uma fatia das receitas aviadas muito pequena.⁶

A grande vantagem das receitas eletrônicas é o facto de após inserir os códigos de acesso da mesma, obtemos a informação de todos os medicamentos prescritos e número de embalagens, os planos de comparticipação já vêm inseridos e o sistema ainda alerta para a validade da prescrição. Por outro lado, uma prescrição manual implica total responsabilidade do farmacêutico, que tem de verificar o número de saúde do utente, tem de inserir o plano de comparticipação correto, verificar as vinhetas e ainda confirmar se a receita está correta/incorrecta ou até incompleta (máximo de quatro embalagens por receita).

Enquanto estagiária, inicialmente, foi bastante difícil interpretar este tipo de receitas, tarefa que acaba por ser dificultada pela caligrafia das mesmas e que me levou a solicitar ajuda várias vezes para conseguir fazer uma correta dispensa dos medicamentos. Com alguma experiência, e após realizar este processo várias vezes, comecei a ficar mais confiante e a ultrapassar esta dificuldade, podendo assim ser mais eficiente e colaborar na correta terapêutica do utente.

2.4.2. Informação de Preços nas Guias de Tratamento

Durante o meu estágio, enquanto farmacêutica, a minha prestação foi posta em causa diversas vezes, sendo um dos motivos mais frequentes o preço dos medicamentos.

Na guia de tratamento, os utentes são informados do preço máximo que o medicamento em questão lhes deverá custar, no entanto esse valor refere-se ao preço do medicamento mais barato, que por vezes nem se quer está comercializado. Estes casos, geram dúvidas e desconfianças por parte do utente, que não compreende porque está a pagar mais pelo mesmo. Tentei sempre explicar e esclarecer o utente, que na grande maioria das vezes compreendia, contudo, esta tarefa tornava-se bastante difícil em utentes mais idosos, o que acaba por prejudicar a relação que deve existir entre o farmacêutico e o utente.

Ainda, quando havia uma alteração de preço, e se esta implicasse um aumento do preço do medicamento, gerava-se uma revolta no utente mais idoso que acaba por culpabilizar a farmácia, dificultando o resto do meu atendimento.

2.4.3. Medicamentos Esgotados

No decorrer do meu estágio curricular, foram vários os medicamentos que se encontravam esgotados, o que acabou por se tornar uma ameaça do meu estágio.

Dois dos casos mais marcantes que apresentei prendem-se com o Lasix[®] e o Adalat[®]. No primeiro caso, o medicamento composto por Furosemida, indicado para o tratamento de edema (de origem cardíaca, hepática ou renal) ou hipertensão arterial⁷ tinha como alternativa os vários medicamentos genéricos (MG) disponíveis. No caso do Adalat[®], composto por Nifedipina e indicado para a angina de peito crónica estável e para a hipertensão arterial⁸, o único MG disponível acabou por também esgotar. Assim, no primeiro caso aconselhei sempre o utente a levar o MG, contudo por ser genérico ainda existe muito o preconceito de que se trata de um medicamento de baixa qualidade e que, por isso, não fará o mesmo efeito. Nestes casos, restava-me apenas aconselhar a que o utente falasse com o médico para que o medicamento fosse substituído. No caso da Nifedipina, ficava apenas com esta última opção.

Estas situações acabam por causar um enorme descontentamento no utente e prejudicaram o meu atendimento, criando, assim, uma desvalorização do papel do farmacêutico e até do próprio medicamento por parte do utente.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No decorrer do meu estágio na FM pude reforçar a minha ideia pré-existente de que o farmacêutico assume um papel fundamental na sociedade. De facto, é nas farmácias que são feitas as primeiras avaliações, que se transmite a importância de praticar um estilo de vida saudável e da prevenção de doenças. São muitas as vezes em que o utente vê no farmacêutico uma pessoa da sua confiança, que o procura não só para os seus problemas do dia-a-dia, mas também em busca de algumas respostas, dúvidas ou simplesmente conversar com alguém, quando não têm um familiar ou amigo com quem o fazer. Deste modo, revela-se de extrema importância que o farmacêutico mantenha o espírito de estudante ativo e que invista diariamente na sua formação e atualização, não só a nível científico como também comercial. Mais ainda, considero fundamentais os serviços farmacêuticos personalizados, de forma a criar uma melhor relação utente-farmacêutico, bem como para promoção de saúde pública.

Durante o meu estágio na FM, vivi e experienciei a realidade farmacêutica na sua plenitude: a desvalorização do farmacêutico e banalização do medicamento, a gratidão de pequenos gestos e a confiança colocada em mim e no farmacêutico no geral, a complexidade de trabalhar numa farmácia, cooperar com uma equipa enorme e, ainda, ser capaz de contactar e moldar-me a um leque tão diversificado de utentes, que aguardam sempre total dedicação e exigência da nossa parte.

Considero, e enalteço, a importância desta unidade curricular, que corresponde ao culminar de quatro anos e meio teóricos que são postos em prática numa só unidade curricular. Compreendi a importância de continuar a investir na minha formação enquanto farmacêutica e atualizar-me para que se possa fazer um aconselhamento de excelência. Pelo valor pessoal e profissional, por toda a aprendizagem por que passei, considero que esta unidade curricular deveria fazer parte de todos os anos do MICE, ideia que pretendo ainda reforçar pelo facto de este relatório apresentar pontos fortes e oportunidades marcantes e pontos fracos ou ameaças facilmente ultrapassáveis.

Deixo, por fim, um enorme agradecimento à equipa da FM, que me envolveu na sua rotina, ensinou-me tudo o que estava ao seu alcance e me fez apaixonar pelo dia-a-dia da farmácia comunitária. A troca de sinergias e ideias permitiram-me vivenciar experiências de tamanho incalculável que contribuíram certamente para o meu desenvolvimento profissional e pessoal. Termino o meu estágio na certeza que estou preparada para o meu futuro enquanto farmacêutica e com as ferramentas certas para vingar no meu futuro.

4. BIBLIOGRAFIA

1. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **Código deontológico da Ordem dos Farmacêuticos**. [Acedido a 01 de julho de 2019]. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/a-ordem-dos-farmaceuticos/regulamentos/>
2. MINISTÉRIO DA SAÚDE - **Decreto-Lei n.º 307/2007 de 31 de agosto**, Diário da República: nº168/2007, 1ª série, 2007. [Acedido a 01 de julho de 2019]. Disponível em: <https://data.dre.pt/eli/dec-lei/307/2007/08/31/p/dre/pt/html>
3. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **Boas Práticas Farmacêuticas para a farmácia comunitária (BPF)**. Conselho Nacional da Qualidade. 3ª Edição. 2009. [Acedido a 01 de julho de 2019]. Disponível em: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/boas_praticas_farmaceuticas_para_a_farmacia_comunitaria_2009_20853220715ab14785a01e8.pdf
4. DRUGS.COM - **Boric Acid**. [Acedido a 11 de agosto de 2019]. Disponível em: <https://www.drugs.com/search.php?searchterm=boric+acid>
5. GLINTT - **SIFARMA – Desenvolvido por e para Farmacêuticos. 90% das Farmácias em Portugal usam o SIFARMA**. [Acedido a 11 de agosto de 2019]. Disponível em: <https://www.glintt.com/pt/o-que-fazemos/ofertas/SoftwareSolutions/Paginas/Sifarma.aspx>
6. INFARMED, I.P. - **Normas relativas à prescrição de medicamentos e produtos de saúde**. (2014). [Acedido a 11 de julho de 2019]. Disponível em: http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/Normas_Prescri%C3%A7%C3%A3o_20151029.pdf/bcd0b378-3b00-4ee0-9104-28d0db0b7872
7. INFARMED, I.P. - **Resumo das Caraterísticas do Medicamento Lasix® 40 mg, Comprimidos**. [Acedido a 11 de agosto de 2019]. Disponível em: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=4904&tipo_doc=rcm
8. INFARMED, I.P. - **Resumo das Caraterísticas do Medicamento Adalat CR® 30 mg, Comprimidos libertação modificada**. [Acedido a 11 de agosto de 2019]. Disponível em: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=99&tipo_doc=rcm
9. INFARMED, I.P. - **Resumo das Caraterísticas do Medicamento Procto-Glyvenol 50 mg/g + 20 mg/g Creme rectal**. [Acedido a 11 de agosto de 2019]. Disponível em: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=7131&tipo_doc=rcm

10. INFARMED, I.P. - **Resumo das Caraterísticas do Daflon 500 500 mg comprimidos revestidos por película.** [Acedido a 11 de agosto de 2019]. Disponível em: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=2302&tipo_doc=rcm
11. INFARMED, I.P. - **Resumo das Caraterísticas do Imodium Rapid 2 mg Comprimidos orodispersíveis.** [Acedido a 11 de agosto de 2019]. Disponível em: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=4444&tipo_doc=rcm
12. INFARMED, I.P. - **Resumo das Caraterísticas do medicamento Dioralyte, pó para solução oral.** [Acedido a 11 de agosto de 2019]. Disponível em: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=2677&tipo_doc=rcm
13. DGAMV. - **Resumo das Características do Medicamento – Seresto coleira.** [Acedido a 12 de agosto de 2019]. Disponível em: <http://medvet.dgav.pt/RCM/Index/5467>

5. ANEXO

No presente anexo, serão descritos alguns casos reais de aconselhamento farmacêutico nos quais tive de aplicar os meus conhecimentos teóricos à realidade durante um atendimento, aconselhando MNSRM, outros produtos de saúde e medidas não farmacológicas.

Caso I: Uma utente dirige-se à farmácia com queixas de dor e apresentava algum desconforto, suspeitando do aparecimento de uma hemorroida.

Após algumas questões, pude concluir que se tratava de uma hemorroida externa, sem sangue, que provocava dor, desconforto e prurido à utente.

Comecei por lhe falar da importância da ingestão de água e fibras, de forma a que as fezes amolecem e não piorassem quer os sintomas descritos quer a hemorroida.

De seguida, aconselhei um creme retal, o PROCTO-GLYVENOL[®] 50mg/g + 20mg/g, indicado para o tratamento de hemorroidas internas e externas. Este creme é composto por Tribenosido, um constituinte com capacidade de reduzir a permeabilidade capilar e melhorar o tónus vascular e Cloridrato de Lidocaína, um anestésico local que alivia os sintomas de dor, prurido e ardor. Informei, por fim, que o creme deve ser aplicado duas vezes por dia, de manhã e à noite até os sintomas diminuírem.⁹

Para além disso, aconselhei a usar toalhetas de higiene húmidas Hemofarm Plus[®], compostas por hamamélia, castanha-da-índia e aloé vera e que são aconselhadas para a limpeza da zona anal aquando da presença de hemorroidas e/ou fissuras anais. A substância ativa hamamélia apresenta propriedades anti-inflamatórias, anti-hemorragicas, venotónicas e adstringentes, a castanha-da-índia tem indicação para a insuficiência venosa e anti-inflamação e, por fim, o aloé vera apresenta capacidade cicatrizante e regeneradora.

Por fim, considerei relevante ainda a toma de Daflon 500[®]. Este medicamento é composto por bioflavonoides, que, de acordo com a posologia correta, tem indicação terapêutica na crise hemorroidária. Os bioflavonoides vão ter uma ação sobre o sistema vascular de retorno, diminuindo a distensibilidade venosa e reduzindo a esteasse venosa e vão atuar ainda ao nível da microcirculação, normalizando a permeabilidade capilar e reforçando a resistência capilar.¹⁰

Caso 2: Utente, apressado e aflito, dirige-se à farmácia queixando-se de diarreia e dor abdominal e solicita um Imodium[®] para que possa ir trabalhar.

Inicialmente, a toma do Imodium[®] seria desaconselhada, contudo, optei por questionar o utente se apresentava sinais de vómitos, sangue nas fezes ou pus, febre ou dor de estômago. Uma vez que o utente respondeu negativamente a todas as questões, optei por lhe ceder o Imodium Rapid 2mg comprimido orodispersível[®]. Este medicamento, cujo princípio ativo é a Lorepamida, está indicado em casos de diarreia aguda e crónica, atuando na redução do peristaltismo propulsivo, permitindo o aumento do tempo do trânsito intestinal. Este composto aumenta o tónus do esfíncter anal, reduzindo a incontinência e a sensação de urgência. Alertei ainda para o facto de se tratar de um comprimido orodispersível e que por isso deve ser dissolvido na boca através da saliva e que seria necessário tomar 2 comprimidos de imediato e de seguida 1 comprimido após cada dejeção.¹¹

De seguida, aconselhei o utente a manter uma boa ingestão de líquidos para hidratar e repor eletrólitos. Para auxiliar, aconselhei a toma de Dioralyte[®], um pó para solução oral composto por Glicose, Cloreto de sódio, Cloreto de potássio e Citrato dissódico. Estes compostos estimulam a absorção de água e eletrólitos e previnem a desidratação na diarreia. Informe o utente que deveria ingerir 1 ou 2 saquetas após cada dejeção, de acordo com a gravidade, dissolvendo a mesma em água.¹²

Por fim, aconselhei o senhor a consultar o médico caso os sintomas não passassem em 2/3 dias.

Caso 3: Um utente entra na farmácia e procura por um desparasitante para o cão. Afirma que costuma usar pipetas de acordo com a sua correta aplicação (de 4 em 4 semanas), contudo o seu animal apresenta sempre muitas pulgas e coça-se bastante, começando já a aparecer feridas na pele.

Primeiramente, expliquei ao utente que mesmo após a desparasitação, se o ambiente não estiver limpo, podem ficar ovos depositados que acabam por entrar novamente em contacto com o animal e infestá-lo. Assim, seria essencial começar por dar um banho ao animal com um champô próprio para eliminação de pulgas e ovos.

De seguida, sugeri uma coleira Seresto[®] como alternativa, uma vez que se trata de um dispositivo diferente. Esta coleira é composta por dois princípios ativos, a imidaclopride e a flumetrina e oferece uma proteção de 8 meses. A primeira substância é ativa contra pulgas adultas e estádios larvares e piolhos enquanto que o segundo componente tem efeito sobre larvas e carraças adultas.

Ainda, alertei para o facto de que a coleira poderia perder o efeito em contacto com a água, pelo que seria de evitar e para além disso, que em alguns animais poderia ser necessário associar a coleira a outro desparasitante externo, como as pipetas.

Parte III

Monografía

Extracellular Vesicles and the Parasite-Host Interaction:

Giardia lamblia, a case of study

LIST OF ABBREVIATIONS

ADI: Arginine Deaminase

CWP: Cyst Wall Protein

DC: Dendritic cell

ER: Endoplasmic Reticulum

ESCRT: Endosomal Sorting Complex Responsible for Transport

ESP: Excretory-Secretory Products

ESV: Encystation-specific Secretory Vesicle

ET: Extracellular Trap

EV: Extracellular Vesicle

GLAM-I: *G. lamblia* adherence molecule-I

HSP: Heat Shock Protein

IL: Interleukine

ILV: Intraluminal Vesicles

INF: Interferon

MET: Macrophage Extracellular Trap

MHC: Major Histocompatibility Complex

miRNA: microRNA

mRNA: Messenger RNA

MV: Microvesicle

MVB: Multivesicular Bodies

NET: Neutrophil Extracellular Trap

NO: Nitric Oxide

OCT: Ornithine Carbamoyltransferase

PV: Peripheral vesicle

ROS: Reactive Oxygen Species

SNARE: Soluble NSF Attachment protein Receptor

Taglin: Trypsin-activated *G. lamblia* lectin

TGF- β : Transforming Growth Factor Beta

TNF: Tumour Necrosis Factor

VSP: Variant specific Surface Protein

RESUMO

As vesículas extracelulares (EVs) classificam-se em três grupos de acordo com o seu tamanho, capacidade de sedimentação e mecanismo de libertação: corpos apoptóticos, microvesículas (MVs) e exossomas. Estas vesículas são meios de comunicação intercelular e induzem funções específicas de acordo com a sua composição e origem celular.

Assim, é expectável que estas vesículas possam ter 3 aplicações diferentes a nível terapêutico: como biomarcadores, uma vez que derivam da célula de origem e no seu interior o conteúdo encontra-se estável e pode circular longas distâncias; em vacinas uma vez que conseguem apresentar antigénios e induzir resposta das células T; como veículos por ser possível funcionarem como sistemas de entrega de fármacos e armazenarem genes, proteínas patogénicas e até o próprio agente patogénico.

Tendo em consideração que as infeções parasitárias continuam a ser uma preocupação mundial, descobrir novos tratamentos apresenta-se como um foco importante de estudo, em especial nos parasitas intestinais, como *Giardia lamblia*, onde a resistência a fármacos atuais, particularmente ao metronidazol, é evidente.

O mecanismo imunológico com papel de maior relevo na resposta a *G. lamblia* é o sistema imune inato, composto por múltiplos fatores e células específicas. A resposta adaptativa é maioritariamente organizada por células T CD4+ (resposta Th1, Th2 e Th17), contudo as células T CD8+ parecem também participar na eliminação de *G. lamblia*.

O flagelado *G. lamblia* liberta vesículas secretoras durante o enquistamento que contêm proteínas da parede quística essenciais para a formação do quisto. Quanto à interação parasita-hospedeiro, foram detetadas microvesículas (MVs) durante o processo de adaptação do parasita ao ambiente intestinal e que potenciam a adesão ao epitélio intestinal do hospedeiro. Estas MVs são ainda capturadas pelas células dendríticas, participando na resposta imunológica do hospedeiro.

O papel das EVs de *G. lamblia* na interação parasita-hospedeiro não está completamente estudado, no entanto é evidente que devem ser objeto de futuros estudos. Esta revisão contempla os pontos-chave atualmente relacionados com as EVs e, em particular, as EVs de *G. lamblia*.

Palavras-chave: Vesículas extracelulares, *Giardia lamblia*, Microvesículas, Vesículas secretoras, Interação parasita-hospedeiro, Imunidade.

ABSTRACT

Extracellular vesicles (EVs) are classified in three major groups according to their size, sedimentation ability and releasing pathways: apoptotic bodies, microvesicles (MVs) and exosomes. These vesicles are a mean of intercellular communication and induce specific functions, according to its composition and cell of origin.

Thus, it is expected that these vesicles may be applicable to therapy in 3 different ways: as biomarkers, since they are released from the cell of origin and their content is stable and may circulate long distances; in vaccines owing to the fact they can present antigens and induce a T cell response; as vehicles because they can function as drug delivery systems and carry genes, pathogenic proteins and even the pathogen itself.

As the parasitic infections continue to be a worldwide concern, finding a new treatment has become one of the focus nowadays, especially in what relates to intestinal parasites, like *Giardia lamblia*, where the resistance to the current drugs, like metronidazole, is evident.

The immunological mechanism that plays the main role in responding to *G. lamblia* is the innate immune system, composed by multiple factors and specific cells. The adaptive response is mainly orchestrated by CD4⁺ T cells (Th1, Th2 and Th17 response), however CD8⁺ T cells also seem to play a role in overcoming giardiasis.

In the case of *G. lamblia*, it is known that this flagellate releases secretory vesicles, during the encystation process, carrying cyst wall proteins essential to create the cyst form. Concerning the parasite-host interaction, microvesicles (MVs) were detected during the process of adaptation of the parasite to the intestinal environment and enhance the adhesion to the host intestinal epithelium. These MVs are still captured by dendritic cells (DC), also contributing to the host immune response.

The study of EVs in this interaction is not completely known, nevertheless it is evident, that the EVs of this parasite should be object of study. This review addresses key points currently related to EVs and, in particular, EVs of *G. lamblia*.

Keywords: Extracellular vesicles, *Giardia lamblia*, Microvesicles, Secretory vesicles, Parasite-host interaction, Immunity.

I. INTRODUCTION

Even after so many years of technological and pharmaceutical evolution, the parasitic infections continue to be a worldwide scientific focus.¹ The parasite infections affect 12% of the world population mostly children between 5 and 14 years old. One-sixth of the world is ill by protozoa and helminthic infections and 200 million people are infected by intestinal parasites.^{2,3,4}

The intestinal parasitic infections are mainly described in Sub Saharan African, like Ethiopia (27.7-95%), Central Sudan (90%), Rwanda (50%) and others, like Asia and Latin America.^{2,4} This kind of parasites provoke mainly acute diarrhoea, although in the most severe situations they may cause intestinal bleeding, malabsorption of nutrients and destruction of the cells. The most prevalent parasites in these situations are *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia*.^{2,3,5}

Nowadays the possibility of using Extracellular Vesicles (EVs) as a new way to reduce parasitic infections is starting to revolutionize the history of parasitology. The lack of hygiene and the emerge resistance to antiparasitic agents¹ is creating new concerns, hence in the latest years it has begun to be explored EVs in order to understand how these vesicles are secreted and how they interact with the host so that we can find new approaches to avoid parasitic infections.^{5,6}

EVs have been divided in three major groups, based on their size: exosomes (<100 nm), microvesicles (100 nm–1 µm) and apoptotic bodies (>2 µm).⁷ While the apoptotic bodies from different origins have similar biogenesis, exosomes and microvesicles biogenesis depend on the intra and extracellular environment and the stimuli that cause the release of vesicles. These vesicles transport different contents like lipids, proteins, nucleic acids and metabolites that function as communication signals to the neighbour cells. It is important to notice that these vesicles are secreted from different cells, in different physiological stages under different conditions.^{8,9}

The present work aims to illustrate the latest news and achievements about these extracellular vesicles: how they interact in the human body and how the human body responds to these particles. In the first part, some information will be given about the biogenesis and the role EVs can play. The second part will be focused on protozoa, namely *Giardia lamblia*, and their interaction with the host (parasite-host interaction).

2. EXTRACELLULAR VESICLES

Although there is already a consensus about the EVs, in the beginning there was a big group of different terms: microparticles, secretory vesicles, microvesicles, ectosomes, exosomes, etc., depending on their origin and properties.^{8,10} These vesicles carry different compounds: proteins, lipids, nucleic acid, metabolites and also receptors, antigens and bioactive molecules which are released by different cells like blood, tumour, epithelial, endothelial and embryonic cells.^{8,11} These biomolecules enable communication with cells in the neighbourhood, inducing for example tumour progression, immunotolerance, invasion, angiogenesis and metastasis.^{1,10,11} It is expected to be found in body fluids specific vesicles in high concentrations related to cancer, acute and chronic inflammatory diseases, like atherosclerosis or diabetes mellitus.^{7,11}

According to the first International Society of Extracellular Vesicles in 2012, these particles, enclosed by a lipid bilayer¹², were gathered in three groups according to their size, sedimentation ability and releasing pathways.¹³ Apoptotic bodies were considered all particles sized superior to 2 μm and pelleted at 2000-10.000 \times g, a very heterogenous group. Microvesicles are ranged from 100 nm to 1 μm and pelleted at 10.000 -20.000 \times g. The smallest particles are the exosomes: that have a size inferior to 100 nm and pelleted at $>$ 10.000 \times g.^{1,14,15} The isolation of these particles can be done by differential centrifugation and size exclusion chromatography.^{16,17} Because the content is so diverse, it is extremely important to characterize it to understand which particle we are exactly isolating.¹⁴ In order to do so, the best way to do it is by Western blot, to detect proteins, nanoscale techniques and electron microscopy.^{17,18}

More recently, it has been found EVs, named oncosomes, shedding from the plasma membrane of some tumour cells, with a size up to 10 μm . It is relevant to emphasize that there is scientific evidence that the releasing of these vesicles may not be limited to tumour cells. These type of EVs cannot be distinguished from the others EVs by its size but from their cargo. These EVs represent populations of vesicles considered tissue-specific EVs while apoptotic bodies, MVs and exosomes are cell-derived EVs. The discovery of these particles suggests that the family of extracellular vesicles will always continue to increase.^{9,11}

The study of EVs in parasitic infections showed that they are a way of communication between cells and the type of vesicles vary depending on the stage of the parasite life cycle. Regarding protozoa parasites, it is known that they have sophisticated mechanisms to escape the immune response. This way, these parasites assemble an immunomodulatory response by

Extracellular Vesicles and the Parasite-Host Interaction: *Giardia lamblia*, a case of study secreted soluble proteins. For example, *Trypanosoma cruzi* secretes mucins that are involved in the suppression of active T cell immune responses. Also, EVs have been described as part of an unrecognized mechanism that protects the components that come from one cell and, after the fusion of the membranes (from the exosome and the host cell), are integrated in the cytoplasm of the receptor cell.⁶

Concerning the parasite-host interaction, EVs can be divided in two groups: the ones released from the parasite and the ones released from the host cells.¹⁵ For example, parasites like *Trichomonas vaginalis* or helminths, that are extracellular parasites, secrete EVs; human cells that are infected by intracellular parasites, like *Plasmodium falciparum* or *Leishmania spp.*, also secrete EVs.¹⁵

2.1. Biogenesis

Firstly, it is important to refer that EVs are released from distinct cells in different ways.⁸ While the apoptotic bodies are related to the apoptosis mechanism, exosomes and MVs are released from all cells by different mechanisms. However, all three mechanisms depend on the stimuli received.^{8,10} Although exosomes are formed by multivesicular bodies (MVB) inside the endosomal membrane compartment and then exocytosed, the microvesicles are secreted by a calcium-dependent mechanism from the plasma membrane.⁷ In Figure I it is schematically represented the release of microvesicles, exosomes and apoptotic bodies and in table II it is summed up all the mechanisms.

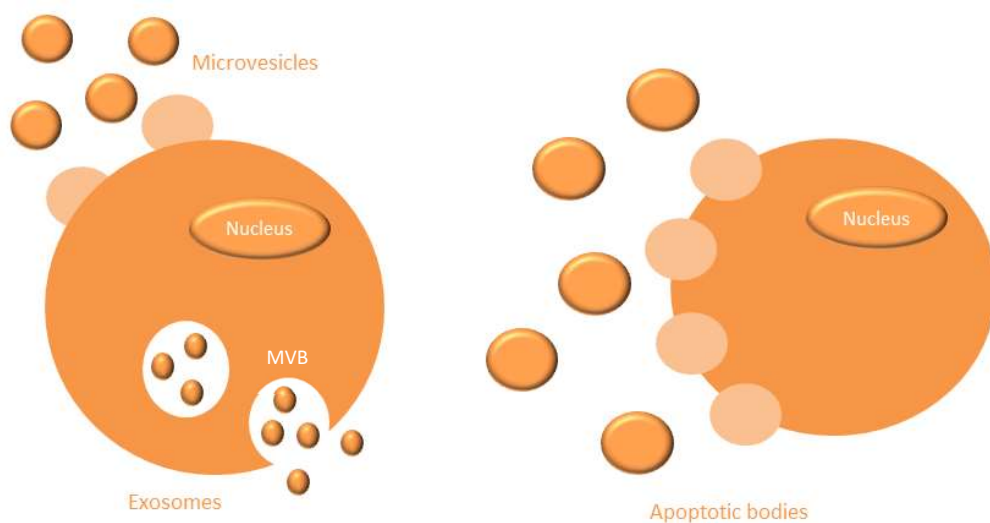


Figure I - Schematic representation of Extracellular Vesicles. On the left, it is represented the release of microvesicles and exosomes. On the right, it is represented an apoptotic cell and its residual apoptotic bodies.

The apoptotic bodies are formed during the programmed cell death (apoptosis). During the apoptosis, the cell condensate and the cytoskeleton collapses, the nuclear envelope disassembles and the chromatin condensates. These events lead to the cell fragmentation, where some membrane-enclosed fragments are formed, the so-called apoptotic bodies.^{10,19}

Exosomes are released by exocytosis via a secretory pathway. In the intracellular endosome, proteins and lipids are gathered in MVB. The MVB produce intraluminal vesicles (ILVs), later called exosomes, which mature and fuse with the plasma membrane. The exosome is, then, exocytosed and act through various body fluids.¹⁸ The process of fusion into the plasma membrane, is mediated by the endosomal sorting complexes required for transport: the Endosomal Sorting Complex Responsible for Transport (ESCRT).^{12,20} This is considered the main mechanism, nevertheless it has been reported some ESCRT- independent mechanisms, related to the production of ceramide in oligodendroglia cell line or the presence of tetraspanin CD63 in the exosomes, which mediates the ILV formation. Also, the presence of tetraspanin CD8 in other studies suggest that the excretion of exosomes might be cell type-specific.¹² More, when the MVB is formed, the cytoskeleton will help the fusion with the plasma membrane. To do this process, Soluble NSF Attachment protein Receptor (SNARE) proteins and switch proteins like the Rab GTPases will help regulating the traffic. These last ones are responsible for vesicle formation, trafficking, tethering and fusion steps. The evidence of the presence of these proteins in exosomes has been confirmed by the presence of Rab5, Rab11, Rab27 and Rab35, particularly.¹² In table I is summed up the different functions of each RAB GTPases.

Due to the fact that exosomes have been found in so many cells it has started to be considered a very well preserved cell-cell communication mechanism through the years.¹².

Table I - The various functions of the Rab GTPase in helping the secretion of exosomes (Adapted from ^{12,18})

Rab GTPases	Function
Rab11	MVB fusion
Rab35	MVB docking to the plasma membrane in oligodendroglia cells
Rab27	MBV docking to the plasma membrane in cancer cells

In contrast, MVs come from a calcium-dependent mechanism and are secreted by the plasma membrane. This mechanism seems to be an innate property of most cells based on the increasing of calcium in the cytoplasm. When a stimulus or a cell damage lead to the increase of calcium, a mechanism activates the cleavage of the actin cytoskeleton by calpain mediator. Then, the flippase and floppase, proteins responsible for the movements of lipids in the

membrane, are inhibited and the scramblase, an ATP independent protein responsible for the distribution of lipids in the membrane, is activated. This enzyme will transport the phospholipids negatively charged from the inner leaflet to the outer leaflet of the plasma membrane. This process leads to the secretion of the MVs with phosphatidylserine exposure.^{8,21} It is also described that stress increases the levels of MVs. These particles are then release in order to reduce the calcium in cell injuries.²¹

While the exosomes are enriched by proteins like Heat-Shock Proteins (HSP), and Major Histocompatibility Complex (MHC) class I and II and share many common components, the MVs reflect the cellular state of the cell or the region of the plasma membrane and can transfer great amounts of molecular particles to other cells.^{1,22}

The biogenesis of EVs is summed up in table II.

Table II - Simple description of the biogenesis of extracellular vesicles

Extracellular vesicle	Mechanism	Reference
Apoptotic bodies	Apoptosis	10,19
Exosomes	Endosomal pathway	8,12,18,20
Microvesicles	Calcium-dependent	8,21

2.2. Cellular Communication in Host-Parasite Interaction

The release of EVs has started to be recognised as a new mechanism of cell-cell communication.²² Since they can be found in many body fluids like urine, serum, amniotic fluid and breast milk, cells are able to adjust the behaviour of other cells, due to the fact that they pass information via proteins, nucleic acids and lipids.⁸

Proteomic studies showed that the secreted products by cells are mainly biomolecules like glycoproteins and EVs, important components in the extracellular material.²² The release of the EVs is triggered by agonists or a physical or chemical stress stimulus like oxidative stress, hypoxia or even the contact with the host cell. Therefore, the EVs will communicate with cells by transmitting signals parasite to parasite, parasite to host and host to the environment. It is then obvious that the release of EVs is part of the parasite and the host response.^{23,24} An example of this cellular communication is what occurs in protozoan infection. In order to create an infection, the protozoa have to infect/interact with the host cells to complete their life cycle. To infect the cell one of the mechanisms to avoid the immune system is the release of EVs.²¹

Exosomes have the ability to allow an intercellular communication and to induce specific functions, according to its composition and cell of origin. They can secrete proteins, present antigens, modulate the immune system, etc. They carry conserved parasite-specific information, such as RNA, proteins and nucleic acids, and during infections they can secrete to the host cells pathogen-derived molecules.^{1,17}

MVs can bind to cells by receptor-ligand interaction, then fuse with the target cell and release their content in the cytoplasm of the cell. They are considered the “micro RNA (miRNA) transporter” since most extracellular miRNA is found inside these vesicles and it can regulate gene expression.²⁴ miRNA is a disease marker, and contributes to drug resistance because of its ability to change receptors, transporters, etc. and diminish its sensibility. So, their role in the parasite-host interaction is important and relevant in future studies.¹⁷ Also, the MVs are enriched in coding and non-coding RNA, chromosomal and mitochondrial DNA, proteins etc. Because of the lipid membrane of the MV, the messenger RNA (mRNA) and the miRNA seem to be stable inside vesicles and protected from the RNase digestion.²⁴ The latest investigations showed DNA exchange between other microorganisms and protozoa and the various studies on *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* have concluded that it can also be an exchange of information between host and parasites. Thus, MVs can transfer nucleic acid, protected from harm and, afterwards, deliver it to the host cells.²⁴

The function of each EVs is different in each environment and can be distinct depending on the parasite who secreted it.^{1,21} The secretome is quite heterogeneous when comparing species, so its characterization may be the key to understand the connection and the products released by the cells.²¹

In the table III we can see some of the latest functions described for EVs in different protozoa parasites, such as *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*, *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi*. EVs of *G. lamblia* can help the parasite in two different stages of its life cycle: during infection, by promoting the adhesion to the epithelium or during the encystation process.^{25,26} Exosomes from *Trichomonas vaginalis*, increase the parasite adherence and it was proven that the adhesion wasn't so effective when vesicles were absent, revealing that exosomes are a key factor in the attachment of this parasite to host cells.^{27,28} In *Leishmania donovani* it was mainly discovered exosomes with the ability of transferring proteins and delivering molecules to macrophages and MVs of *Trypanosoma cruzi*, were found with the ability to secrete antigens and increase parasite resistance.²¹

Table III - The functions of the parasite extracellular vesicles in the host cell

Parasite	Extracellular vesicles	Function	Reference
<i>Extracellular protozoa</i>			
<i>Giardia lamblia</i>	Microvesicles Exosomes	Adhesion of the parasite	21,26
	Encystation-specific secretory vesicles	Encystation	25,29
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Exosomes	Adhesion of the parasite Immunomodulation	21,27,28
<i>Intracellular protozoa</i>			
<i>Leishmania donovani</i>	Exosomes	Transfer proteins Delivery of molecules to macrophages Modulate monocyte cytokine response	21,24
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Microvesicles, Exosomes	Secretion of antigens	21,24
	Microvesicles	Increases parasite resistance Increases infection	

3. *Giardia lamblia*

Giardia lamblia belongs to the protozoa kingdom, Phylum metamonada, the flagellate group. Its habitat is the duodenal and jejunal epithelium and can provoke irritation and inflammation in the intestine which leads to diarrhoea/dysentery. Its infection is mainly asymptomatic that's why people infected can spontaneously recover in 10-14 days. According to the WHO, *Giardia* is “the most wide- spread protozoan-diarrhoeal disease”.⁵

This parasite is distributed worldwide.^{4,30} It is spread via faecal-oral and the infective form is the cyst, so it is intimately related to poor sanitary conditions. The infective form can be found in water, uncooked vegetables or fruits.⁵

The parasite has two development forms: the trophozoite, capable of colonizing the intestine, and the cyst, the survival form that is excreted in the faeces and responsible for the transmission of the parasite (Fig. II).⁵

To infect the host, the parasite must be able to attach to host cells. In order to do so, the trophozoite has a ventral disk with the ability to attach to the intestinal epithelium as a clasping or suction-like mechanism. The adherence is also helped by adhesins, the trypsin-activated *G. lamblia* lectin (taglin) and *G. lamblia* adherence molecule-I (GLAM-I).⁵ This last

one is responsible for the avidity of the parasite to the enterocyte whereas the taglin is responsible for the first contact.⁵ After the adhesion, the parasite takes advantage of the host nutrients by pinocytosis, however it only penetrates the epithelium if a mucosal injury is present.³¹ This parasite provokes enteropathies, derived from the protein-losing of the mucosa, causing foul-smelling, watery diarrhoea, abdominal cramps, flatulence, and steatorrhea.^{5,31,32}

To detect the parasite, the diagnostic procedure is the microscopic examination, antigen detection (Immunofluorescence assays and Enzyme immunoassays) and culture. The samples are mainly faecal specimens to find faecal antigens, but also duodenal aspirates can be used. Nowadays, the molecular diagnosis, as Polymerase Chain Reaction (PCR) techniques, have an important role in identifying gene sequences.⁵

The first line treatment is metronidazole, a nitroimidazole drug. Its nitro groups are reduced by nitroreductases, creating cytotoxic compounds, and then disrupt the parasite DNA, inhibit metabolism of glucose and interfere with mitochondrial function.⁵ Nevertheless, it was demonstrated by *in vitro* and *in vivo* studies that this parasite developed resistance to metronidazole. The thiazolides and paramomycin can also be a choice.⁵

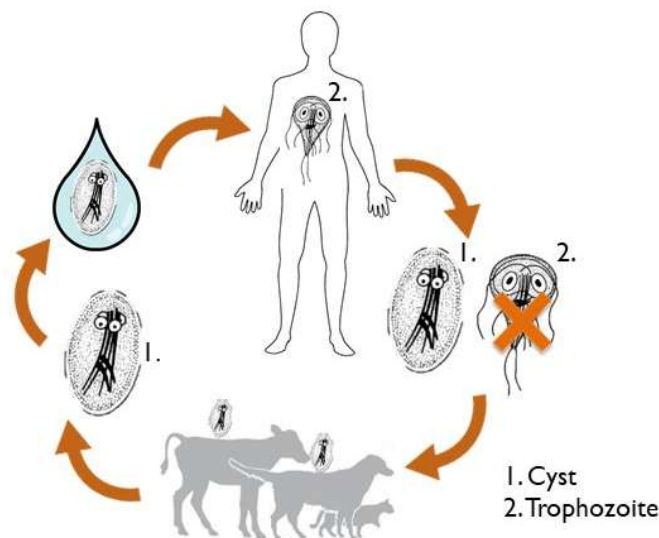


Figure II- Schematic representation of the life cycle of *Giardia lamblia*.

3.1. Immune Response

The main mechanism that responds to *G. lamblia* infection is the innate immune system. The trophozoite stimulates the production of IL-8 which triggers the release of neutrophils and these stimuli may be affected by MVs.²¹ However, not only neutrophils are released in response to the infection, but also dendritic cells, macrophages and epithelial cells, which start a quick response against the parasite. The adaptive immune response also has a role to play. Nevertheless, it is important to emphasize that *G. lamblia* surface antigens can vary in order to avoid the human defences.⁵

Innate immunity

The innate system, a nonspecific line of defence against the parasite and other pathogens, is quick in producing a response against the parasite.³³ The mucus stimulated by the digestive enzymes and the peristaltic movements impedes the parasite to access the epithelium.³³ Secondly, antimicrobial peptides that are small peptides produced by epithelial cells, can reduce the viability of the trophozoite, specially the paneth cell-derived defensins (cryptidins) 2 and 3, the neutrophil defensin NP-2 and the cathelicidin indolicidin.³³

Nitric oxide (NO) is also produced by epithelial and immune cells and it has immunomodulatory and cytotoxic activity. It inhibits the excystation of the cyst and induces a cytostatic effect on trophozoites. It is also studied that the neuronal NO has a role in gastrointestinal transit and motility, so its absence will lead to the delay of the parasite clearance. NO is formed by the presence of L-arginine and NO synthases and it is responsible for apoptosis in the intestinal epithelial cells during the infection.^{32,33}

It has also been described an important role of the microbiota, particularly *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*,³³ in limiting the growth of the parasite as they compete for same resources.^{32,34} They release inhibitory factors and also contribute to the preservation of the integrity of the gut during the infection.³³ In addition, it has been recently found that the microbiota can stimulate CD8+ T cells during the adaptive response and release IL-10 which consecutively leads to the increase of IgA.³²

Macrophages are found in high concentrations in the gut and they can induce an inflammatory response. The latest discoveries have found a new mechanism associated with the release of extracellular traps (ET) by macrophages. It is known that ET, formed by a fibre of chromatin, connect with bacterial peptides and proteins like elastase, lactoferrin and gelatinase. The first traps identified were the neutrophil extracellular trap (NET), which were

Extracellular Vesicles and the Parasite-Host Interaction: *Giardia lamblia*, a case of study also able to capture fungi and bacteria. It was also found an antimicrobial ET, associated to macrophages (MET), with bactericidal activity which is activated by NADPH oxidase.³⁵

Recently, it was found that protozoa can induce the formation of these METs, and *G. lamblia* infection, in particular, triggers the expulsion of ET which can trap the parasite and kill it. This MET is mainly made by DNA bonded with granular proteins and the DNA (and also the hole MET) have a nuclear origin.³⁵ The myeloperoxidase is the key point of the formation of the ETs because it activates the decondensation of chromatin, the main step of its genesis. This enzyme when attached to the DNA can bind to the trophozoites and kill them. It was also discovered that this mechanism is NADPH oxidase-dependent and that is generated by the production of Reactive Oxygen Species (ROS) from macrophages when stimulated by trophozoites. This ROS will also activate lipid peroxidation and increase membrane permeability. ROS are activated by the increase of calcium in the inflammatory process and then will help in the formation of ETs.³⁵

Some cells also have a role in the innate response: the neutrophil infiltration has been identified in mice; activation of eosinophils by IL-5 leading to enterocytic desquamation;²⁶ and mast cells combined with NO induce peristalsis and contribute to the survival of B-cells, leading to the activation of IgA.³³

Finally, the maturation of dendritic cells (DC) increases the expression of cytokines, like IL-6, IL-12, Tumour Necrosis Factor alpha (TNF- α) and cell surface CD80, CD86 and MHC II cells.^{12;33}

Another current study tested the role of DC in the inflammatory process and discovered that DCs can capture the microvesicles rapidly. MVs can bind to early endosome associated proteins (EEA-1) and then aggregate, originating sac-like compartments. Consequently, the DC is activated, matured, easily showed by the upregulation of the CD25, and internalise the MVs in the endosomal compartment. Besides that, the studies showed a vast T cell proliferation which means that MVs have a big capacity of activating DCs. This mechanism shows the role of the endocytic pathway in the internalization of MVs.²⁶

Adaptive immunity

The adaptive immunity response to *G. lamblia* has been described in human during a second infection and it was identified antigen-specific CD4+ T cells (Th1, Th2 and Th17 responses), the release of cytokines, including IL-6, TNF- α , IFN- α , IL-4 and IL-17, and the production of specific IgA or IgG antibodies against parasite antigens. While, IgA can be found

Extracellular Vesicles and the Parasite-Host Interaction: *Giardia lamblia*, a case of study in breast milk and saliva, IgG can be found in serum. Although, both can be used as markers of diagnostic of infection, IgA are not strictly necessary to control *G. lamblia* infections.^{33,36}

It is also clear that during the infection levels of CD4+ T cell are high, however when decreased it might lead to chronic giardiasis. Although the mechanism of action is poorly understood, it is known that T cells can help B-cell activation, maturation and differentiation in order to produce new immunoglobulins and eliminating the parasite. CD4+ T cells have an important role in the release of INF- α , IL-6 and B-cells antibody production.^{33,37} Yet, T cells response can cause damage in the apical membrane of the enterocytes during this type of infection.³³ Svard and his team in 2011, studied the reactivity of *G. lamblia* 5 years after an infection and they concluded that CD4+ T-cell activation drives a long-term immune response against this parasite.³⁷

In addition, it has been studied the role of Th17 cells in the clearance of the parasite. IL-17 has been identified firstly in spleen cells and lymph node cells, and later, their role during *G. lamblia* infection was studied. Th17 cells were found in the lamina propria, where IL-17 is produced.³⁶ This interleukin is mainly identified 2 weeks after the infection, showing that not only the innate response is Th17 cell-independent but also that IL-6 and Transforming Growth Factor Beta (TGF- β), produced during the innate phase, are responsible for the enhancement of Th17 cells in the adaptive response. To eliminate the parasite, it is necessary: the receptor, IL-17A-R, to connect to the IL-17 and hematopoietic cells to mediate the action of the cytokine. Thus, IL-17 has a protective role of the mucosa and epithelial barriers, preventing the attachment of *G. lamblia* to the mucosa by releasing pro-inflammatory cytokines, releasing IgA in the intestine, stimulating neutrophils and secreting antimicrobial peptides.^{36,38}

The response of CD8+ T-cell is also detected during giardiasis where it impairs disaccharidases, causing gut damage. So, the adaptive response is a combination of these two types of T-cells: CD8+T-cell contributes to the immunopathology of giardiasis and CD4+ T-cell plays a role in the elimination of the parasite.³³

3.2. Extracellular Vesicles of *G. lamblia* and Parasite-Host Interaction

In order to support their reproduction, survival and transmission, the parasites developed different strategies to avoid the immune system: antigen variation, immune inactivation, immunosuppression, etc. and it seems that the MVs, in particularly, have proven to have a key role in the parasite-host interaction.²⁴

Regarding *G. lamblia*, EVs and the parasite-host interaction are not completely understood. It is well established that the protozoa release secretory vesicles during the encystation process²⁵ and recently the release of MVs were also identified in the process of adaptation of the parasite to the environment in order to escape the immune system.²⁶

Extracellular parasites use EVs to protect cargo and move it easily to the host cells in order to deliver proteins, manipulate the host cell response and help increasing the adherence to the epithelial cells.^{6,24,27} Also, EVs have a role in the virulence because they can carry specific RNA and are able to escape the immune system due to the absence of specific signal sequences in some secretory proteins. This way, they can affect the target cells.¹⁵

Additionally, when released, EVs can trigger the innate immune system and alter the phenotype and function of immune cells. This is the main reason why describing the secretome is so important to understand *G. lamblia* infection and perhaps finding another route of control and prevention.²²

3.2.1. Microvesicles

According to the genetic characterization of *G. lamblia* there are seven assemblages identified, although only assemblage A and B infect humans.⁴ During the parasite-host interaction, the parasite produces different Excretory-Secretory Products (ESP) composed by secreted proteins (in assemblage A 76 and in the assemblage B just 45), released-surface proteins and EVs. ESPs can have different functions: changing gene expression, secretion, signalling, metabolism and immune responses in intestinal epithelium cells. Also, the EVs found in ESPs, in particularly MVs, might carry protein with no signal sequence peptides, which indicates that some proteins can be secreted inside EVs.³⁹

The MVs in *G. lamblia* seem to be formed by the fragmentation of large encystation-specific secretory vesicles (ESV) followed by a process of exocytosis.²⁵

Recently, the discover of MVs as part of the infection process as shown to be a key role in escaping immune system responses and to avoid nucleases from body fluids.²⁴

MVs are used as a mechanism to resist the changes of osmolarity and pH, inherent to the intestine, during the infection.⁸ It is established that cells around pH 7 increase the concentration of calcium, mobilized by calpain, leading to the inhibition of the flippase and activation of the scramblase, in order to guarantee the integrity of the lipid membrane and the formation of MVs.²⁶ Also, it is known that lack of cholesterol in the lipid membrane will

Extracellular Vesicles and the Parasite-Host Interaction: *Giardia lamblia*, a case of study compromise the release of MV, which might disable the attachment of the parasite to the host membrane. The cholesterol can stimulate and improve the connection between the parasite and host cells, leading to the attachment of the parasite.^{26,40} The release of MVs can bring physical properties to the lipid membrane of the trophozoite (like the increase of a supposed molecule-receptor ligation) and trigger the adhesion of the *Giardia lamblia* to host cells. It is known that in conditions similar to the duodenum, factors like the release of bile and pH 9, leads to the change of trophozoite to cyst form and the release of MVs decreases.²⁶

It is also known that when the *G. lamblia* interacts with cells it alters the genes expression and leads to transcriptional changes. This interaction is responsible for the release of metabolic enzymes like arginine deaminase and enolase. These components may be inside MVs, revealing that MVs content can disable host immune factors.²⁶ Actually, there is one theory that suggests that the malabsorption and the diarrhoea provoked by the parasite in the intestine converge these two aspects: the release of metabolic enzymes and consecutively the disruption of the cell.¹

In order to understand the interaction, it is really important to do proteomic analysis of MVs, particularly to understand the difference in the two stages of *Giardia* life cycle: trophozoite stage and trophozoite induced to cyst form.

Although just 11 proteins in the active trophozoite stage were identified, in the induced cyst form 80 proteins were identified. These proteins could be categorized in cytoskeleton, membrane and transport, metabolic enzymes, nuclear proteins, surface proteins, chaperones and others (Table IV). They were also found to be similar to the proteins found in the cyst form secretome.²⁶

Table IV - Examples of proteins identified in MVs of the trophozoite and in induced cyst forms of *Giardia lamblia* by proteomic analysis, (Adapted from ²⁶)

Form		Protein
Trophozoite		rRNA Alpha-tubulin Arginine Deaminase (ADI) and Ornithine Carbamoyl Transferase (OCT)
Trophozoite induced to cyst form	Cytoskeleton	Beta tubulin, Alpha tubulin Giardin Actin related protein
	Membrane and transport	Phospholipid-transporting ATPase Kinesin-like protein
	Metabolic Enzymes	Phosphatidylinositol transfer protein Kinase, NEK Enolase-a
	Nuclear Proteins	Histone H3 e H4 Reverse transcriptase/endonuclease
	Surface proteins	Variant specific Surface Protein (VSP)
	Chaperones	Cytosolic Heat Shock Protein (HSP) 70
	Other	Ribosomal protein Zinc finger domain protein

We can verify that cyst and trophozoite forms carry some important proteins to guarantee the survival of the species and to regulate the infection:

- the tubulin, which is part of the cytoskeleton;¹⁵
- the VSP, which have a role in the pathogenesis.¹⁵ VSPs are rich in cysteine proteins and play an important role in the coverage of trophozoite which will create the perfect conditions to evade the immune system.^{29,31,39} The antigenic variation is controlled by the interference RNA, which leads to the expression of different VSPs.³³ At the time of infection only one VSP is expressed, however it has been described more 270 types, which are associated with enhanced virulence. It has been showed as well that arginine deaminase has a significant participation in antigenic variation because it is one of the responsible for the of VSPs modification,^{3,31}
- the HSP70, important to the folding and unfolding of proteins, regulating the aggregation and aiding in transport of proteins.^{15,26} The HSP permits the survival of the cell under stress conditions and stimulates the immune system. The HSP70 specifically has also been described in association with ESV.^{17,33} Besides that, HSP 90 has been identified in EVs of

G. lamblia and it has a role in protecting the parasite against the low levels of pH and oxygen reactive species;¹⁷

- the giardin is important as well, as it induces the production of anti-*Giardia* antibodies (IgA and IgG) and creates protection against a new infection.³³ The suction mechanism to attach to the microvilli of the epithelium is also possible by the presence of this protein;³¹
- the ADI is a relevant virulence factor since it stimulates the production of ATP and its depletion generates the secretion of cytokines by dendritic cells.³³ ADI and OCT are part of a strategy to escape the NO defence mechanism owing to the fact that both compete for the same substrate: the arginine, the amino acid responsible for the production of NO;^{3,39}
- the enolase is an enzyme that participates in the glycolysis pathway. This enzyme is crucial as the production of ATP is essential for the parasite survival and virulence;^{3,17,33}
- cysteine proteases, like cathepsin B-like protein. These proteins, in acidic environment and correctly folded, promote the cleavage of the microvillus protein villin, degrade IL-8, reduce the inflammation, compromise the normal flora and inhibit the intestinal pathogens. These proteins can destroy the junctional complexes and pass the epithelial barrier.^{31,39,41} The degradation of IL-8 that will lead to the decrease of neutrophils and the ability to maturate other cytokines show the immunomodulatory potential and attenuation of inflammation.⁴⁰ These proteins were identified in structures like the endoplasmic reticulum (ER) and in vesicle-like structures.⁴¹

3.2.2. Excretory-Secretory Vesicles

Under adverse conditions, *G. lamblia* has the ability to change to a resistance form, the cyst that is responsible for the dissemination of the parasite. During the encystment process many morphological changes occur, in particularly the formation of the cyst wall.³⁰

The encystation process is stimulated by the pH and the release of the bile in the duodenum.⁴² This process can be summarized in three different steps: the induction of the encystation, where the trophozoite loses its typical pyriform shape and the flagella are internalized; synthesis and transport of cyst wall components via a regulated mechanism; and gathering of the extracellular wall.²⁹ When the pH elevates and bile is released, the trophozoite changes to the cyst form and during this process the release of Encystation Specific Vesicles (ESVs) is easily seen by microscopy.⁴² Also the deprivation of nutrients and cholesterol can be a key factor in the encystment. The cholesterol deprivation inhibits the cholesterol receptor

Extracellular Vesicles and the Parasite-Host Interaction: *Giardia lamblia*, a case of study and the cascade of signalization, like PKA and ERK1 which activates the phosphorylation.⁴³ This process stimulates factors inside the nucleus, like Gal-lectin, leading to the formation of early and late ESVs from the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus.³⁰

ESVs in *G. lamblia* are a type of secretory vesicles enriched in cyst walls components, essential to create the cyst wall, which are released by exocytosis near the cell membrane.^{25,29,30}

It is established that the two layers of the cyst wall are formed by a homopolymer glycan and three cyst wall proteins (CWPs) with N- and O-glycosylation potential, and characterized by a matrix enriched in carbohydrates.^{29,43,44} The CWPs, formed during the encystation, and the cyst wall itself, allow the parasite to survive in fresh water, to survive during the route through the stomach of the new host and contribute to the biogenesis of ESVs.^{43,44,45} Currently, three CWPs are recognized, the CWP 1-3, however it has been documented a fourth one, the trophozoite Variant specific Surface Protein (VSP), the VSPH7, a transmembrane protein in encysting trophozoites. CWPs are easily identified by their ability to link between them by disulfide and isopeptide bonds.⁴⁴ CWPs are enriched in leucin, which has an important role in the formation of the ESVs. Firstly, these proteins interact by their terminals in order to aggregate, a process mediated by leucin which facilitates the interaction protein/protein. Also, CWP2 has a terminal enriched in cysteine that contributes to the aggregation of CWPI and CWP3 and regulates the biogenesis of ESVs. This step is crucial to the formation of the ESVs, as the interaction between different CWPs is necessary to form the ESV. Then, the maturation of these particles is caused by the interaction of lipid membrane receptors and ESVs.^{43,45}

The secretory pathway of the ESVs is a regulated mechanism that can be induced by the arising of calcium, linked to the protein *G. lamblia* granule-specific, localized in the lumen of the ESVs. This protein might be associated with a discharge of calcium, important factor in the formation of the cyst wall. Touz and colleagues (2002) observed that the inhibition of this protein inhibits the formation of the cyst but not the biogenesis of the ESV nor the CWP expression.⁴⁶

Because of the absence of a real Golgi complex in this parasite, these vesicles were many years ago considered the cisternae of the Golgi, as a Golgi-like mechanism is visible during the encystation.^{25,29} As Lanfredi-Rangel and colleagues (2003) stated “ESV arise from modified ER cisternae”. That means that the ESV are formed by a secretory pathway in the ER or by a modified ER with the participation of the cisternae of the Golgi complex.^{29,30,44,45} Gottig and his team (2006) identified the presence of the VSP in the ER. They noticed that during the

encystment this VSP moved to the plasmatic membrane and the aggregation of CWP2 to the others CWPs was, then possible. When the VSP was expressed in the ER, this protein could inhibit the aggregation of the CWPs, a crucial step in the formation of the ESV.⁴⁵

Given what is previously mentioned, it was concluded that the ESV arise from clefts, a structure dilated from the ER cisternae, contiguous to the rough ER and its content is similar to the dense material found in the clefts.²⁹ It is also stated that this process is induced by COPII-dependent export.⁴⁴ Firstly, the cleft is empty. After 6 hours it is easily seen the dilatation of the ER, caused by the dense material occupied inside the cleft. This process might be the initial formation of the ESVs with accumulation of CWPs.^{43,44} The CWPs are confined to the nuclear envelope, unable to leave the ER. While the protein brefeldin A keeps CWPs inside the envelope, chaperones have the role of aggregate and fold the CWPs correctly.^{45,46} It is also found in the membrane of ESVs ribosomal proteins which have a role in the production of large amounts of CWPs.⁴⁴ After 12 hours, it was identified the appearance of the cyst wall and encysting cells labelled by ceramide. In the initial stage, activity of glucose-6-phosphatase was present, although while the clefts were filled with CWPs and the ESVs were developed, that activity was lost, suggesting a decrease in the uptake of glucose and oxygen (Figure III).³⁰

After the ESV is formed, it migrates to the peripheral regions to be secreted before the formation of the cyst wall. Vacuoles found in this place fuse with the ESVs or permits the traffic between the cell periphery and ESVs. In these peripheral vesicles (PVs) it was clear the processing of the CWP2 by cysteine proteinase,^{29,46} early found in ESV. Besides this, in an early phase of encystation, it was found CWPI and CWP2 in PVs, showing that they might function as retrieval of prematurely secreted CWP.²⁹ In conclusion, the inhibition of CWPs can inhibit the formation of large ESVs.⁴⁵ Also, the formation of the ESV isn't a organelle-associated factors mechanism but mainly an accumulation of cargo.⁴⁴

Finally, ESVs can fuse with the plasma membrane to release their content. The contiguity of both layers might indicate an exocytosis course, explaining the possible fusion. This is a continuous process, depending on the maturation of the ESV and the proximal distance to the docking place in the membrane.²⁵

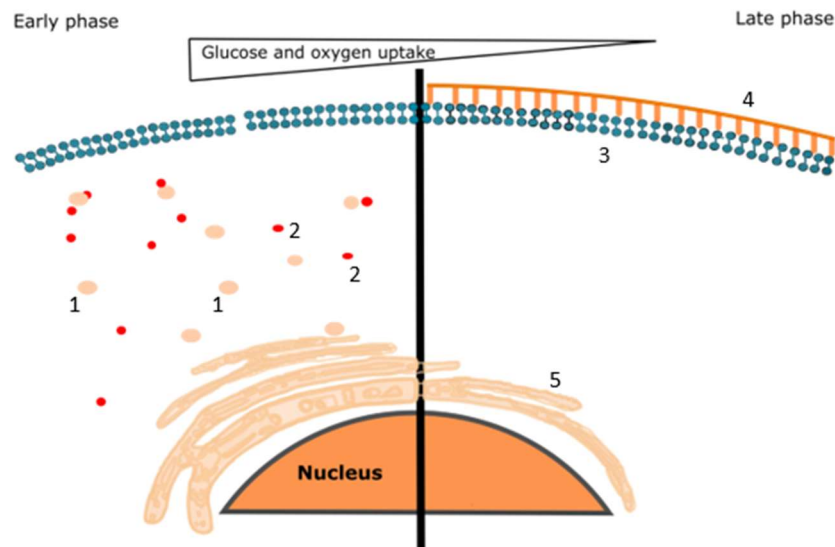


Figure III - Schematic representation of the encystation process in *Giardia lamblia*: 1 - Excretory-Secretory Vesicle; 2 - Peripheral Vesicles; 3 - Plasma membrane; 4 - Cyst Wall Components; 5 - Endoplasmic Reticulum

The ESVs are characterized for being prominent vesicles carrying cyst antigens which go to the cyst wall during the encystation, revealing the existence of a regulatory pathway in the cyst wall formation.²⁵ Their content seems to be homogeneous and not fibrillar, kind of electron-dense granules and it is morphologically large and irregular. Some studies also revealed that the CWPs aggregate inside the ESV and have a role in the interaction between the lipid membrane, specially the CWP2, and that interaction leads to the reorganization of the cholesterol domains and immature granules.^{29,45} These ESVs are easily seen by the black deposits made by the reaction between them and the osmium tetroxide (OsO_4), since they are osmiophilic.²⁵

4. APPLICATIONS OF EXTRACELLULAR VESICLES

The study of EVs in parasitic infections is a recent matter of the past few years. EVs can be used as diagnostic markers due to its stable structure, high content in plasma, easy access, abundance under adverse conditions and because they are derived from the parasite and host cells.^{1,9,12,47} Yet, it is known, for example, that the miRNA can be used as biomarker as most of these nucleic acids are found inside these vesicles.²¹ Currently these particles are already helping in diagnosing tumours, however the study of them in parasitic infection is not fully understood, as the investigations on this topic focus on biogenesis of the vesicles, molecular mechanisms, fusion and budding.^{1,12,47}

The use of EVs to produce immunization via a vaccine can be the next step, as the connection between the vesicle and cells from the immune system seems to be more efficient in creating a T-cell response. In order to do so, the study of the EVs DC-derived, would be interesting, since DCs are able to secrete EVs with MHC II antigens and produce an adaptive response. This way, EVs will work as vehicles and enhancers of the immunogenicity of antigens.²¹ Another advantage is the fact that inside the EVs, proteins are more stable and can move easily through body fluids, creating a more efficient exchange of antigens between cells of the immune system.^{12,21} Because of the presence of EVs, protozoa can start proinflammatory effect by increasing the production of specific interleukins, which lead to an immunosuppressive environment. Therefore, they could work as adjuvants.²¹

Another possible study for EVs and parasitic infection would be by exploring the loading capability of the vesicles.^{48,49} EVs have a big biocompatibility with the host and can carry different cargo long distances, avoiding phagocytosis or degradation by macrophages. Nano-size particles that have magnetic properties can have impact in the uptake of loaded EVs. Due to this skill, nanoparticles could encapsulate antiprotozoal drugs with magnetic properties, which will be charged inside MVs and delivered. Plus, exosomes have the ability of carrying the entire pathogen and related components, like nucleic acids (gene therapy) (Figure IV).^{21,34,49} Also, the development of CRISPR/CAS9 incorporated in exosomes is becoming more successful in tumours as these vesicles represent a new and more stable vehicle of these technology (that has been a limitation). Hence, the idea of creating a mechanism with this type of system for parasite infections is starting to be considered. The CRISPR/CAS could be transported inside EVs, and when inside suppress specific pathogenic genes. This way it would be possible to decrease the incidence of infection and help understand the parasite-host interaction.²¹



Figure IV - Schematic representation of exosomes working as drug delivery in parasitic infection.

In conclusion, EVs can be explored at least in three different ways: as biomarkers, therapeutics or vaccines (Table V).

Table V - The application of extracellular vesicles and its strategies. (Adapted from ²¹)

Applications/Strategies	
Biomarkers	Kits
Therapeutics	Drug loaded
Vaccines	EVs engineering

5. CONCLUSION

Until 3 of April of 2019, more than 43 countries had published articles concerned the EVs, which represents an increase in the research about the function, application and interaction of these particles. EVs, namely MVs, exosomes and apoptotic bodies, can be found in different body fluids carrying different content, like proteins, nucleic acids, lipids , etc.¹⁸ Thus, the next step in therapeutics might be the understanding of these EVs and how to use them in diagnosis, prevention and treatment in several diseases.⁷

As parasitic infections occur mainly in developing countries, it is important to find low-cost strategies to deal these diseases.²¹ Concerning *G. lamblia* EVs, by now little is known. During the adherence of the trophozoite to the intestinal epithelium, the release of MVs was identified as an helping factor to the adherence and the infection.²⁶ In addition, secretory vesicles were identified during the encystment, as a key factor in the formation of the cyst wall.³⁰

Because *G. lamblia* is a cosmopolitan parasite, it is clear the need of new investigations focused on giardiasis and host-parasite interaction, in order to develop new therapies.¹ Also, the study of the excystment might be crucial, once this process is responsible for the pathogenicity and survival of the parasite and it has not been deeply studied.³⁰

Definitely, the path to follow in the study of EVs and the parasite-host interaction is hard and long. The resistance to anti-parasitic drugs is deploying the need of new strategies in order to control the parasite,⁵ so EVs seem to be a new target in drug delivery and in finding a new vaccine. Also, its abundance can be used as a biomarker to detect the disease earlier and to prevent its dissemination.^{12,21} If these achievements have the expected success, this type of applications could be used in other parasitic infections, as well as in the study of this interaction between host and different parasites. Therefore, it might be a good scientific investment, as long as it is adapted to each situation.

6. BIBLIOGRAPHY

1. WU, Z.; WANG, L.; LI, J.; WANG, L.; WU, Z. - **Extracellular Vesicle-Mediated Communication Within Host-Parasite Interactions**. *Frontiers in Immunology*. 9:3066 (2019) 1–16.
2. HAILEGEBRIEL, T. - **Prevalence of intestinal parasitic infections and associated risk factors among students at Dona Berber primary school, Bahir Dar, Ethiopia**. *BMC Infectious Diseases*. 17:362 (2017) 1–8.
3. CERTAD, G.; VISCOGLIOSI, E.; CHABÉ, M.; CACCIÒ, S. M. - **Pathogenic Mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia***. *Trends in Parasitology*. 33:7 (2017) 561–576.
4. YAOYU, F.; XIAO, L. - **Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis**. *Clinical Microbiology Reviews*. 24:1 (2011) 110–140.
5. MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. - **Medical Microbiology**. 7th Edition. 2013. ISBN 978-0-323-08692-9.
6. COAKLEY, G.; MAIZELS, R. M.; BUCK, A. H. - **Exosomes and Other Extracellular Vesicles: The New Communicators in Parasite Infections**. *Trends in Parasitology*. 31:10 (2015) 477–489.
7. WANG, B.; XING, D.; ZHU, Y.; DONG, S.; ZHAO, B. - **The State of Exosomes Research: A Global Visualized Analysis**. *BioMed Research International*. 2019, (2019) 1–10.
8. DEOLINDO, P.; EVANS-OSES, I.; RAMIREZ, M. I. - **Microvesicles and exosomes as vehicles between protozoan and host cell communication**. *Biochemical Society Transactions*. 41:1 (2013) 252–257.
9. JAISWAL, R.; SEDGER, L. M. - **Intercellular vesicular transfer by exosomes, microparticles and oncosomes - Implications for cancer biology and treatments**. *Frontiers in Oncology*. 9:125 (2019). 1–27.
10. RACK, J. - **Microparticles in Cancer**. Thieme Medical Publishers. 36:8 (2010) 888–906.
11. TATISCHEFF, I. - **Dictyostelium: A Model for Studying the Extracellular Vesicle Messengers Involved in Human Health and Disease**. *Cells*. 8:225 (2019) 1–17.
12. SCHOREY, J. S.; CHENG, Y.; SINGH, P. P.; SMITH, V. L. - **Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions**. *EMBO reports*. 16:1 (2015) 24–43.
13. INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXTRACELLULAR VESICLES - **International**

society for extracellular vesicles [Acedido a: 27 janeiro de 2019]. Disponível em: <http://www.isev.org/>

14. LÄSSER, C. - **Exosomes in diagnostic and therapeutic applications: biomarker, vaccine and RNA interference delivery vehicle**. Expert Opinion on Biological Therapy. 15:1 (2015) 103–117.
15. TWU, O.; JOHNSON, P. J. - **Parasite Extracellular Vesicles: Mediators of Intercellular Communication**. PLoS Pathogens. 10:8 (2014) 1–3.
16. RAMIREZ, M. I.; DEOLINDO, P.; MESSIAS-REASON, I. J.; ARIGI, E. A.; CHOI, H.; ALMEIDA, I. C.; EVAN-OSSES, I. - **Dynamic flux of microvesicles modulate parasite-host cell interaction of *Trypanosoma cruzi* in eukaryotic cells**. Cellular Microbiology. 19:4 (2017) 1–15.
17. NAWAZ, M.; MALIK, M. I.; HAMEED, M.; ZHOU, J. - **Research progress on the composition and function of parasite-derived exosomes**. Acta Tropica. 196, (2019) 30–36.
18. CRENSHAW, B. J.; SIMS, B.; MATTHEWS, Q. L. - **Biological Function of Exosomes as Diagnostic Markers and Therapeutic Delivery Vehicles in Carcinogenesis and Infectious Diseases**. Nanomedicines. 1, (2019) 1–32.
19. ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. - **Molecular Biology of THE CELL**. 5th editio ed. 2008. ISBN 978-0-8153-4106-2.
20. SAHA, N.; DUTTA, S.; DATTA, S. P.; SARKAR, S. - **The minimal ESCRT machinery of *Giardia lamblia* has altered inter-subunit interactions within the ESCRT-II and ESCRT-III complexes**. European Journal of Cell Biology. 97:1 (2018) 44–62.
21. GAVINHO, B.; ROSSI, I. V.; EVANS-OSSES, I.; INAL, J.; RAMIREZ, M. I. - **A new landscape of host-protozoa interactions involving the extracellular vesicles world**. Parasitology. 145:12 (2018) 1521–1530.
22. EVANS-OSSES, I.; REICHEMBACH, L. H.; RAMIREZ, M. I. - **Exosomes or microvesicles? Two kinds of extracellular vesicles with different routes to modify protozoan-host cell interaction**. Parasitology Research. 114:10 (2015) 3567–3575.
23. WANG, J.; SUN, X.; ZHAO, J.; YANG, Y.; CAI, X.; XU, J. - **Exosomes: A Novel Strategy for Treatment and Prevention of Diseases**. Frontiers in Pharmacology. 8:300 (2017) 1–13.
24. BARTENEVA, N. S.; MALTSEV, N.; VOROBYEV, I. A. - **Microvesicles and intercellular communication in the context of parasitism**. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 3:49 (2013) 1–11.

25. BENCHIMOL, M. - **The release of secretory vesicle in encysting *Giardia lamblia***. FEMS Microbiology Letters. 235:1 (2004) 81–87.
26. EVANS-OSSES, I.; MOJOLI, A.; MONGUIÓ-TORTAJADA, M.; MARCILLA, A.; ARAN, V.; AMORIM, M.; INAL, J.; BORRÀS, F. E.; RAMIREZ, M. I. - **Microvesicles released from *Giardia intestinalis* disturb host-pathogen response in vitro**. European Journal of Cell Biology. 96:2 (2017) 131–142.
27. TWU, O.; MIGUEL, N. DE; LUSTIG, G.; STEVENS, G. C.; VASHISHT, A. A.; WOHLSCHLEGEL, J. A.; JOHNSON, P. J. - ***Trichomonas vaginalis* Exosomes Deliver Cargo to Host Cells and Mediate Host:Parasite Interactions**. PLoS Pathogens. 9:7 (2013) 1–15.
28. OFIR-BIRIN, Y.; REGEV-RUDZKI, N. - **Extracellular vesicles in parasite survival**. Science. 363:6429 (2019) 817–818.
29. LANFREDI-RANGEL, A.; ATTIAS, M.; REINER, D. S.; GILLIN, F. D.; SOUZA, W. DE - **Fine structure of the biogenesis of *Giardia lamblia* encystation secretory vesicles**. Journal of Structural Biology. 143:2 (2003) 153–163.
30. LACLETTE, J. P.; AGUILAR-DI, H.; CARRERO, J. C.; ARGUELLO-GARCIA, R.; MORALES-MONTOR, J. - **Cyst and encystment in protozoan parasites : optimal targets for new life-cycle interrupting strategies ?**. Trends in Parasitology. 27:10 (2011) 450–458.
31. ECKMANN, L. - **Mucosal defences against *Giardia***. Parasite Immunology. 25:5 (2003) 259–270.
32. ALLAIN, T.; AMAT, C. B.; MOTTA, J. P.; MANKO, A.; BURET, A. G. - **Interactions of *Giardia* sp. with the intestinal barrier: Epithelium, mucus, and microbiota**. Tissue Barriers. 5:1 (2017) 1–16.
33. LOPEZ-ROMERO, G.; QUINTERO, J.; ASTIAZARÁN-GARCÍA, H.; VELAZQUEZ, Carlos - **Host defences against *Giardia lamblia***. Parasite Immunology. 37:8 (2015) 394–406.
34. COELHO, C. H.; SINGER, S. M. - **Recent advances in the *Giardia*–host relationship reveal danger lurking behind the smile**. PLOS Neglected Tropical Diseases. 12:9 (2018) 1–4.
35. LI, L.; LI, X.; LI, G.; GONG, P.; ZHANG, X.; YANG, Z.; YANG, J.; LI, J. - **Mouse macrophages capture and kill *Giardia lamblia* by means of releasing extracellular trap**. Developmental and Comparative Immunology. 88, (2018) 206–212.
36. DANN, S. M.; MANTHEY, C. F.; LE, C.; MIYAMOTO, Y.; GIMA, L.; ABRAHIM, A.; CAO, A. T.; HANSON, E. M.; KOLLS, J. K.; RAZ, E.; CONG, Y.; ECKMANN, L. - **IL-17A**

- promotes protective IgA responses and expression of other potential effectors against the lumen-dwelling enteric parasite *Giardia*.** *Experimental Parasitology*. 156, (2015) 68–78.
37. HANEVIK, K.; KRISTOFFERSEN, E.; SVARD, S.; BRUSERUD, O.; RINGQVIST, E.; SØRNES, S.; LANGELAND, N. - **Human cellular immune response against *Giardia lamblia* 5 years after acute giardiasis.** *Journal of Infectious Diseases*. 204:11 (2011) 1779–1786.
 38. GRIT, G. H.; COPPERNOLLE, S. VAN; DEVRIENDT, B.; GEURDEN, T.; DREESEN, L.; HOPE, J.; VERCRUYSSSE, J.; COX, E.; GELDHOF, P.; CLAEREBOUW, E. - **Evaluation of cellular and humoral systemic immune response against *Giardia duodenalis* infection in cattle.** *Veterinary Parasitology*. 202:3–4 (2014) 145–155.
 39. MA'AYEH, S. Y.; LIU, J.; PEIRASMAKI, D.; HÖRNAEUS, K.; BERGSTRÖM LIND, S.; GRABHERR, M.; BERGQUIST, J.; SVÄRD, S. G. - **Characterization of the *Giardia intestinalis* secretome during interaction with human intestinal epithelial cells: The impact on host cells.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 11:12 (2017) 1–41.
 40. BUI, T. M.; MASCARENHAS, L. A.; SUMAGIN, R. - **Extracellular vesicles regulate immune responses and cellular function in intestinal inflammation and repair.** *Tissue Barriers*. 0:0 (2018) 1–14.
 41. LIU, J.; MA, S.; PEIRASMAKI, D.; LUNDSTRÖM, B.; HELLMAN, L.; SVÄRD, S. G. - **Secreted *Giardia intestinalis* cysteine proteases disrupt intestinal epithelial cell junctional complexes and degrade chemokines.** *Virulence*. 9:1 (2018) 879–894.
 42. GILLIN, F. D.; BOUCHER, S. E.; ROSSI, S. S.; REINER, D. S. - ***Giardia lamblia*: the roles of bile, lactic acid, and pH in the completion of the life cycle in vitro.** (1989) 164–174.
 43. LAUWAET, T.; DAVIDS, B. J.; REINER, D. S.; GILLIN, F. D. - **Encystation of *Giardia lamblia*: A model for other parasites.** *Curr Opin Microbiol*. 10:6 (2009) 554–559.
 44. WAMPFLER, P. B.; TOSEVSKI, V.; NANNI, P.; SPYCHER, C.; HEHL, A. B. - **Proteomics of Secretory and Endocytic Organelles in *Giardia lamblia*.** *PLoS ONE*. 9:4 (2014) 1–19.
 45. GOTTIG, N.; ELÍAS, E. V.; NORES, M. J.; SOLARI, A. J.; TOUZ, M. C.; LUJÁN, H. D.; LUJA, H. D. - **Active and Passive Mechanisms Drive Secretory Granule Biogenesis during Differentiation of the Intestinal Parasite *Giardia lamblia*.** *The Journal of Biological Chemistry*. 281:26 (2006) 18156–18166.

46. TOUZ, M. C.; GOTTIG, N.; NASH, T. E.; LUJAN, H. D. - **Identification and characterization of a novel secretory granule calcium-binding protein from the early branching eukaryote *Giardia lamblia*.** The Journal of Biological Chemistry. 277:52 (2002) 50557–50563.
47. LAKHAL, S.; WOOD, M. J. A. - **Exosome nanotechnology: An emerging paradigm shift in drug delivery: Exploitation of exosome nanovesicles for systemic in vivo delivery of RNAi heralds new horizons for drug delivery across biological barriers.** BioEssays. 33:10 (2011) 737–741.
48. BUNGGULAWA, E. J.; WANG, W.; YIN, T.; WANG, N.; DURKAN, C.; WANG, Y.; WANG, G. - **Recent advancements in the use of exosomes as drug delivery systems.** Journal of Nanobiotechnology. 16:81 (2018) 1–13.
49. ZHANG, W.; JIANG, X.; BAO, J.; WANG, Y.; LIU, H.; TANG, L. - **Exosomes in pathogen infections: A bridge to deliver molecules and link functions.** Frontiers in Immunology. 9:90 (2018) 1–12.