



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Bruna Rodrigues Loureiro

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Novos alvos terapêuticos em *Giardia lamblia*: potencial aplicação de vesículas extracelulares”, referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Catarina Gonçalves e da Professora Doutora Maria do Céu Sousa, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2020



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Bruna Rodrigues Loureiro

Relatório de Estágio e Monografia intitulada "Novos alvos terapêuticos em *Giardia lamblia*: potencial aplicação de vesículas extracelulares", referentes à Unidade Curricular "Estágio", sob a orientação da Dra. Catarina Gonçalves e da Professora Doutora Maria do Céu Sousa e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2020

Eu, Bruna Rodrigues Loureiro, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2015227357, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Novos alvos terapêuticos em *Giardia lamblia*: potencial aplicação de vesículas extracelulares” 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, 24 de setembro de 2020.

Bruna Rodrigues Loureiro

(Bruna Rodrigues Loureiro)

Agradecimentos

Aos meus pais, pela confiança e apoio incondicional. Por me incentivarem a nunca desistir e por todos os valores transmitidos. São os verdadeiros responsáveis por todas as conquistas que alcancei até hoje.

À restante família, pela motivação, pela disponibilidade e pelo amor que sempre demonstraram.

A todos os meus amigos, por tornarem este percurso mais fácil e preenchido.

À equipa da Farmácia Alvim, pela simpatia, pela ajuda, por serem um exemplo de profissionalismo e dedicação e pela aprendizagem constante que me proporcionaram.

Às minhas orientadoras, Dra. Catarina Gonçalves e Professora Doutora Maria do Céu Sousa, pela disponibilidade, atenção e ajuda prestada.

À Faculdade de Farmácia, pela formação e crescimento e pelas amizades que levo para a vida.

E por fim a Coimbra, por estes 5 anos e pela saudade que fica!

Obrigada!

Índice

Parte I - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

| | |
|--|----|
| Lista de Abreviaturas | 7 |
| 1. Introdução..... | 8 |
| 2. Análise SWOT | 9 |
| 2.1. Pontos Fortes..... | 9 |
| 2.1.1. Delineamento do estágio | 9 |
| 2.1.2. Localização da Farmácia | 11 |
| 2.1.3. Horário de Funcionamento alargado | 11 |
| 2.1.4. Serviços prestados..... | 11 |
| 2.1.5. Pertencer a uma associação ou a um grupo de Farmácias | 12 |
| 2.1.6. Preparação de medicamentos manipulados | 13 |
| 2.1.7. 4 Digital Care..... | 13 |
| 2.1.8. Duração do estágio curricular | 14 |
| 2.2. Pontos Fracos | 15 |
| 2.2.1. Receitas manuais | 15 |
| 2.2.2. Suplementos..... | 15 |
| 2.2.3. Prescrições por DCI | 16 |
| 2.3. Oportunidades..... | 16 |
| 2.3.1. Formação contínua..... | 16 |
| 2.3.2. PharmaCard | 17 |
| 2.3.3. Proximidade de locais de venda de MNSRM..... | 17 |
| 2.3.4. Aconselhamento em determinadas áreas..... | 17 |
| 2.4. Ameaças | 18 |
| 2.4.1. Medicamentos esgotados..... | 18 |
| 2.4.2. COVID-19 | 18 |
| 3. Casos Práticos..... | 20 |
| 3.1. Caso Prático 1 | 20 |
| 3.2. Caso Prático 2 | 20 |
| 4. Conclusão..... | 21 |
| 5. Bibliografia..... | 22 |

Parte 2 - Monografia "Novos alvos terapêuticos em *Giardia lamblia*: potencial aplicação de vesículas extracelulares"

| | |
|-----------------------------|----|
| Lista de Abreviaturas | 24 |
| Resumo | 25 |
| Abstract..... | 26 |
| 1. Introdução..... | 27 |
| 2. Giardíase..... | 28 |

| | | |
|--------|--|----|
| 2.1. | Etiologia e epidemiologia..... | 28 |
| 2.2. | Ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i> | 29 |
| 2.3. | Alvos terapêuticos | 30 |
| 2.3.1. | Novos alvos terapêuticos | 31 |
| 3. | Vesículas extracelulares | 32 |
| 3.1. | Caracterização | 32 |
| 3.2. | Papel biológico | 36 |
| 3.3. | Vesículas extracelulares como biomarcadores de parasitoses | 37 |
| 3.4. | Biogénese de vesículas extracelulares em <i>Giardia lamblia</i> | 38 |
| 3.5. | Vesículas extracelulares como potencial alvo terapêutico na giardíase..... | 41 |
| 4. | Conclusão e perspectivas futuras | 43 |
| 5. | Bibliografia..... | 44 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i> | 30 |
| Figura 2 – Biogénese e libertação de exossomas..... | 34 |
| Figura 3 – Biogénese e libertação de exossomas em <i>G. lamblia</i> | 40 |

Parte I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

farmácia
ALVIM

Orientadora: Dra. Catarina Gonçalves

Lista de Abreviaturas

DCI – Denominação Comum Internacional

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats* (Pontos Fortes, Pontos Fracos, Oportunidades, Ameaças)

I. Introdução

Com o intuito de proporcionar aos alunos um contacto com a atividade profissional e como forma de solidificar os conhecimentos teóricos obtidos durante o curso, o plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) integra a realização de um estágio curricular em Farmácia Comunitária.

O estágio em Farmácia Comunitária é essencial, pois para além de permitir aos alunos contactar com a atividade profissional e realizar todas as atividades inerentes a esta profissão, permite-nos também pôr em prática e aprofundar todos os conhecimentos obtidos durante o curso e interagir com os utentes.

Os farmacêuticos, mais especificamente os farmacêuticos comunitários, são responsáveis por todas as atividades relacionadas com os medicamentos, desde a sua preparação, no caso de serem medicamentos manipulados, até à sua comercialização e farmacovigilância.¹ Nesse sentido, é da competência destes garantir a segurança, eficácia e qualidade dos medicamentos e que estes sejam dispensados com um bom aconselhamento farmacoterapêutico,¹ de modo que tenham a eficácia desejada.

O meu estágio em Farmácia Comunitária foi realizado na Farmácia Alvim, em Braga, sob a orientação da Dra. Catarina Gonçalves, entre janeiro de 2020 e julho de 2020. E o presente relatório, realizado através de uma análise SWOT, visa retratar a experiência vivenciada ao longo dos 6 meses que lá estagiei. A análise SWOT baseia-se em 4 pilares: os pontos fortes (*Strengths*) e os pontos fracos (*Weaknesses*) que são a componente interna, e as oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*) que são a componente externa.

2. Análise SWOT

Tabela I - Análise SWOT

| Dimensão Interna | | Dimensão Externa | |
|---|---------------------|---|------------------------|
| Pontos Fortes | Pontos Fracos | Oportunidades | Ameaças |
| Delineamento do estágio | Receitas manuais | Formação contínua | Medicamentos esgotados |
| Localização da Farmácia | Suplementos | PharmaCard | COVID-19 |
| Horário de Funcionamento alargado | Prescrições por DCI | Proximidade de locais de venda de MNSRM | |
| Serviços prestados | | Aconselhamento em determinadas áreas | |
| Pertencer a uma associação ou a um grupo de Farmácias | | | |
| Preparação de medicamentos manipulados | | | |
| 4 Digital Care | | | |
| Duração do estágio curricular | | | |

2.1. Pontos Fortes

2.1.1. Delineamento do estágio

O meu estágio na Farmácia Alvim foi delineado por etapas para facilitar a aprendizagem e para poder contactar e realizar todas as tarefas que um farmacêutico desempenha em farmácia comunitária. Estas funções vão muito para além do atendimento ao balcão, no entanto o atendimento ao balcão é o local onde o farmacêutico pode ter um papel de maior destaque pois é onde contacta com os utentes e pode fazer a diferença entre um bom aconselhamento – toma correta da medicação – eficácia do tratamento ou aconselhamento incompleto – incorreta toma da medicação – problemas na adesão e eficácia do tratamento.

Como nunca tinha estagiado na Farmácia Alvim, no primeiro dia de estágio fiquei a conhecer as instalações, alguns dos funcionários e conheci todos os serviços e áreas que existem na farmácia. Inicialmente comecei por dar entrada de encomendas. Para realizar esta tarefa, em primeiro lugar temos que indicar qual o nome do armazém ou do laboratório, de seguida temos que picar o código de barras/ código matrix de todos os produtos que vêm na

encomenda e à medida que vamos picando cada produto temos que verificar a respetiva validade e comparar esta com a que está na ficha do produto. Se a validade do produto que estamos a rececionar for inferior à que está na ficha do produto temos que alterar a validade, ficando assim a validade inferior registada na ficha. Para além da validade, temos que verificar se a quantidade rececionada coincide com a quantidade que foi faturada e no fim temos que verificar o preço de cada produto e a margem. Antes de concluir a receção da encomenda temos que confirmar se o preço final corresponde com o preço final registado na fatura. Depois de verificar tudo o que foi mencionado anteriormente e no caso de o valor coincidir podemos finalizar a receção da encomenda. Ao concluir a receção da encomenda, podemos imprimir as etiquetas dos produtos que são arrumados fora do balcão. Há medida que rececionamos os produtos vai aparecendo se estes estão reservados ou não, no caso de estarem reservados colocamos estes produtos de lado. No final vai aparecer todas as reservas dos produtos que demos entrada na encomenda e temos que satisfazer essas reservas e arrumar esses medicamentos nas estantes separando os produtos pagos dos não pagos. No caso de algum produto ser enviado por engano ou ter validade curta podemos proceder à sua devolução para os respetivos armazenistas. Para isso, vamos a gestão de devoluções colocamos os produtos e associamos os produtos à respetiva fatura, confirmamos os preços e finalizamos. Ao finalizar temos que avisar a autoridade tributária porque o produto tem que ter um guia de remessa. No fim imprimimos três exemplares da devolução, dois para acompanharem o produto e outro para ficar na farmácia. Posteriormente, os armazenistas ou enviam uma nota de crédito ou enviam os produtos.

Nas primeiras semanas de estágio para além da receção de encomendas, também repunha o *stock*, arrumava os produtos rececionados nos respetivos sítios, para me familiarizar com os locais onde estes se encontravam arrumados e assisti a alguns atendimentos ao balcão. Durante este período, também pude verificar a validade de diversos produtos, já que todos os meses é impressa uma ficha com os produtos cuja validade termina nos três meses seguintes, e por isso temos que verificar se essa validade que aparece no computador coincide com a do respetivo produto. No caso de a validade do produto terminar nos três meses seguintes temos que o retirar da farmácia e enviá-lo para o armazém.

Ao fim de 3 a 4 semanas de estágio, iniciei o atendimento ao balcão. Inicialmente acompanhada pela minha orientadora para me familiarizar com o programa e também para o caso de ter alguma dúvida e depois sozinha. Durante o atendimento, pude contactar com medicamentos psicotrópicos. Quando dispensamos um medicamento psicotrópico, temos que preencher uma ficha com o nome completo do utente e morada, com o nome completo do

adquirente, número e data de validade do cartão de cidadão e data de nascimento. No fim do atendimento são impressos 3 papéis iguais onde consta a idade e o nome do adquirente, a data e o nome do medicamento psicotrópico que foi dispensado. Estes papéis são guardados e até ao dia 8 de cada mês tem que ser enviado para o Infarmed o registo de todos os medicamentos psicotrópicos que foram vendidos no mês anterior. Antes de enviar este registo temos que conferir se a ficha de cada medicamento dispensado foi bem preenchida e caso a receita seja manual temos que digitalizar e anexar a receita à ficha do psicotrópico. O registo de venda de medicamentos psicotrópicos tem que ficar arquivado na farmácia durante 5 anos.

Esta aprendizagem por etapas fez com que eu fosse consolidando os conhecimentos adquiridos, o que me permitiu ganhar uma autonomia e responsabilidade crescente a cada novo dia de estágio.

2.1.2. Localização da Farmácia

A Farmácia Alvim está situada em Real, perto do centro da cidade de Braga. Por ser uma farmácia muito movimentada e de acesso simples permitiu-me contactar com pessoas de faixas etárias distintas, com necessidades e conhecimentos diferentes. Isso fez com que me familiarizasse com uma maior diversidade de medicamentos e outros produtos vendidos na farmácia e que me deparasse com situações que requereram aconselhamentos bastante díspares.

2.1.3. Horário de Funcionamento alargado

O horário de funcionamento da Farmácia Alvim é das 8h às 24h todos os dias da semana, incluindo feriados. Apesar de ter realizado o meu estágio quase sempre em dias úteis, o horário que realizei variou entre as 9h e as 20h, o que me permitiu perceber que ao longo do dia a afluência de pessoas e a diversidade de situações vai variando, havendo uma maior deslocação de utentes em determinadas horas do dia, sobretudo ao final do dia.

2.1.4. Serviços prestados

Na Farmácia Alvim são prestados diversos serviços tais como: consultas de nutrição, enfermagem, aromaterapia, naturopatia, ortopedia, entre outros. Estes serviços prestados vêm complementar a oferta que a farmácia tem para os seus utentes. A principal vantagem de ter estes serviços na farmácia é a garantia de qualidade dos mesmos. Além disso, estes serviços

fazem com que um maior número de utentes se desloquem à farmácia, permitem transmitir ao utente informações fidedignas que muitas vezes não são asseguradas noutros locais, tais como ervanárias, e vão permitir aos farmacêuticos aconselhar e vender os produtos que são prescritos nessas consultas.

A área da ortopedia é bastante complexa e por essa razão a Farmácia Alvim tem uma técnica especializada nesta área que é responsável pelos atendimentos relacionados com a ortopedia e que auxilia os farmacêuticos caso estes tenham alguma dúvida. Uma vez que esta área está em constante expansão e que é parte integrante da farmácia comunitária seria vantajoso adquirir os conhecimentos básicos em ortopedia durante o curso.

2.1.5. Pertencer a uma associação ou a um grupo de Farmácias

A Farmácia Alvim pertence a um grupo de Farmácias, constituído por mais duas farmácias (a Farmácia Martins e a Farmácia Gomes). O facto de pertencer a uma associação de farmácias traz imensos benefícios para a Farmácia Alvim, pois consegue ter descontos maiores nas encomendas e assim conseguir preços mais competitivos, em relação aos locais de venda de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM). Outra vantagem desta associação é que muitas vezes, quando falta algum medicamento ou qualquer outro produto na farmácia, conseguimos ver no programa se esse produto existe em *stock* nas outras farmácias. No caso de haver o produto na farmácia Gomes ou na farmácia Martins ligamos para essas farmácias e pedimos para reservar, depois uma pessoa da Farmácia Alvim fica responsável por ir buscar as reservas e trazer para a farmácia. Isto permite satisfazer o cliente mais rapidamente, porque muitas vezes esses medicamentos estão esgotados nos armazéns e/ou a entrega das encomendas pelos armazenistas poderia demorar mais tempo.

Dependendo das vantagens comerciais, as encomendas poderiam ser feitas em conjunto. Quando isso acontecia, a receção de encomendas era feita na Farmácia Alvim e depois separávamos o que tinha que ser enviado para cada uma das farmácias. Para isso, dávamos entrada de tudo o que veio na encomenda, verificávamos a validade, a quantidade e o preço, comparávamos com a nota de encomenda e no final procedia-se à Movimentação de *stock*. Para esse fim, criávamos uma nova ficha de saídas e colocávamos no assunto acertos para a Farmácia Gomes ou para a Farmácia Martins, conforme fosse o caso, depois púnhamos os produtos e a quantidade e imprimíamos uma folha que ia a acompanhar os produtos.

Ter estagiado na Farmácia Alvim permitiu-me conhecer a dinâmica e comunicação que existe entre as farmácias que pertencem ao mesmo grupo e perceber as vantagens que esta associação traz para as farmácias.

2.1.6. Preparação de medicamentos manipulados

Durante o meu estágio tive a oportunidade de assistir e participar na preparação de um medicamento manipulado. Os medicamentos manipulados não são prescritos frequentemente, no entanto quando não estão disponíveis preparações específicas e adequadas para tratar determinada situação patológica, o médico prescreve este tipo de medicamentos que posteriormente têm que ser preparados pelos farmacêuticos.

A Farmácia Alvim tem as condições requeridas para a preparação destes medicamentos, nomeadamente as instalações apropriadas, as matérias-primas, os formulários, os materiais e os procedimentos a seguir para proceder à preparação. Por isso no decorrer do estágio auxiliiei na preparação de Álcool a 70° saturado com ácido bórico, uma preparação com ação bacteriostática e fungicida para uso auricular, que pode ser utilizada para tratar eczemas, micoses auriculares, otites externas e otites médias crónicas. Após a preparação do medicamento manipulado, tive que preencher a ficha de preparação do medicamento manipulado. Nesta ficha tem que constar as matérias-primas utilizadas na preparação e as respetivas quantidades, o prazo de validade, as características organolépticas, as condições de armazenamento e tive que registar os cálculos do preço de venda do medicamento manipulado. Posteriormente, tive que assinar e colocar a data de preparação na ficha, para que de seguida esta possa ser arquivada com uma fotocópia da receita.

2.1.7. 4 Digital Care

A Farmácia Alvim utiliza como sistema informático o 4 Digital Care. Este programa permite realizar todas as tarefas subjacentes à atividade profissional em Farmácia Comunitária, nomeadamente receção de encomendas, devolução de produtos, movimentação de stocks entre farmácias, comunicação das vendas mensais de medicamentos psicotrópicos para o Infarmed, realização do atendimento ao público, loteamento das receitas manuais, deteção de interações e permite a criação de fichas para os clientes, podendo constar nesta ficha o nome, morada, número de contribuinte, o telefone e o registo de medicação. Para além disto, o 4 Digital Care permite que durante o atendimento ao público, possamos consultar o folheto informativo e o resumo das características dos medicamentos, permite consultar o stock dos

medicamentos e no caso de estes não existirem em *stock* podemos encomendar diretamente aos armazenistas. Se não tivermos um determinado produto podemos fazer uma reserva em nome do utente, entregando-lhe um documento com o nome do produto, a quantidade e se este se encontra pago ou não, para que este possa ser posteriormente levantado e pago, se for o caso. Por fim, este programa também permite consultar o registo de documentos, isto é bastante útil, uma vez que frequentemente os utentes não sabem quais os laboratórios dos medicamentos que costumam tomar habitualmente ou quais os suplementos ou outros produtos de venda livre que adquiriram na farmácia. Assim, através desta funcionalidade conseguimos saber quais os produtos que o utente comprou na farmácia.

Considero este programa uma mais-valia pois é um sistema informático simples e fácil de ser utilizado e permite que as tarefas sejam realizadas corretamente. Durante o curso, apenas aprendemos a trabalhar com o Sifarma2000[®], que é o programa que geralmente as farmácias usam em Portugal. Ao realizar o meu estágio na Farmácia Alvim fiquei a conhecer um programa informático novo e pude aprender a trabalhar com ele e assim aumentar o meu conhecimento.

2.1.8. Duração do estágio curricular

Como apenas realizei estágio em Farmácia Comunitária, a duração do meu estágio foi de 815 horas, tendo iniciado o mesmo em janeiro de 2020 e terminado no final de julho de 2020.

Considero a duração do estágio um ponto forte pelo facto de ter englobado 3 estações do ano. Isso permitiu-me contactar com diversas situações que exigiram aconselhamentos diferentes. Nos meses de Inverno, pude contactar, vender e aconselhar medicamentos, xaropes e pastilhas para o tratamento de gripes, constipações, tosse e dor de garganta, respetivamente. Enquanto que nos meses de primavera e verão pude aconselhar e vender protetores solares, pomadas e cremes para tratar queimaduras e picadas de insetos, repelentes, anti-histamínicos para tratar alergias, desparasitantes, entre outros.

Uma vez que as necessidades dos utentes vão variado consoante a altura do ano acho essencial que o estágio nos possibilite o contacto com um maior número e variedade de situações, de modo que possamos entrar no mercado de trabalho mais preparados e capazes de realizar com autonomia e confiança as funções subjacentes a esta profissão.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Receitas manuais

No decorrer do estágio pude contactar com diversas receitas manuais. Para validar uma receita manual temos que ter em atenção se a receita tem a vinheta do médico e a respetiva assinatura, se o nome do utente, o número de beneficiário e a entidade responsável estão escritos sem erros, também temos que verificar se a receita não vem rasurada e no caso de ter alguma rasura, se esta vem acompanhada com a rubrica do respetivo médico. Para além disso, temos que ter em atenção se o motivo pelo qual a receita manual foi passada vem assinalado e se esta se encontra dentro da validade. Depois de validarmos a receita temos que inserir o plano de participação no programa. Como existem diversos planos de participação, senti alguma dificuldade em saber qual o plano que se aplicava a determinada receita. Outra dificuldade que senti ao contactar com receitas manuais foi perceber o que vinha prescrito já que na maioria das vezes a caligrafia era quase ilegível.

2.2.2. Suplementos

Os suplementos não são um tema muito abordado, durante o curso, e quando chegámos ao estágio em farmácia comunitária deparámo-nos com uma grande variedade de suplementos com finalidades distintas. Cada vez mais, os utentes recorrem à suplementação alimentar, com o intuito de melhorar a sua qualidade de vida e prevenir o aparecimento de certas doenças e por isso, estes são muitas vezes utilizados para amenizar os sintomas e complicações que surgem com a idade. Com o surgimento da pandemia, um maior número de pessoas deslocou-se à farmácia para comprar suplementos para reforçar o sistema imunitário e para combater o cansaço físico e psicológico que surgiu devido ao confinamento provocado pela COVID-19. Como esta área está em constante expansão torna-se essencial que durante o MICF, sejam abordados com mais detalhe os suplementos, de modo que os alunos consigam conhecer a composição dos suplementos, para que servem e qual o mecanismo de ação de determinada planta que está presente na sua formulação, quais as suas vantagens e desvantagens em relação a outras que existem noutros suplementos e assim conseguir aconselhar da melhor forma possível as pessoas que procuram a nossa recomendação. Um maior conhecimento nesta área vai permitir aos alunos, enquanto futuros farmacêuticos, prestar um aconselhamento mais completo e conciso, em relação ao que é prestado nos pontos de venda livre onde estes suplementos também podem ser vendidos. O facto de se conseguir prestar um aconselhamento com maior confiança e conhecimento vai

contribuir para que cada vez mais os utentes recorram à farmácia para adquirir os seus suplementos em vez de adquiri-los em pontos de venda livre ou através da internet e assim sejam utilizados de forma correta e para a finalidade pretendida.

2.2.3. Prescrições por DCI

Nas receitas eletrónicas, os medicamentos vêm prescritos pela Denominação Comum Internacional (DCI) e normalmente estas receitas não vêm trancadas com a marca ou o laboratório de genérico que o doente costuma tomar. Se o utente não souber quais são os laboratórios dos medicamentos que costuma fazer e não tiver nenhum registo no programa da farmácia, torna-se difícil conseguir perceber quais os laboratórios de cada medicamento que a pessoa toma habitualmente.

Durante o estágio, esta situação aconteceu algumas vezes e por isso tive que ir buscar as caixas de vários genéricos para mostrar ao utente a ver se ele reconhecia qual o laboratório que costumava utilizar. No entanto, em doentes polimedicados isto torna-se impraticável já que para cada medicamento existem pelo menos 7 ou 8 laboratórios de genéricos. Perante esta situação e uma vez que o mercado de genéricos está em expansão seria benéfico que nas receitas, principalmente naquelas que pertencem a doentes polimedicados e que já fazem a medicação há muito tempo, viessem assinalados os respetivos laboratórios.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Formação contínua

Durante o meu estágio tive a oportunidade de assistir a várias formações sobre diversos temas, nomeadamente sobre suplementos, cosméticos e preparações de uso veterinário. As formações ocorriam durante o horário de funcionamento da farmácia e enquanto uma parte da equipa assistia à formação a outra parte assegurava o atendimento ao público e depois trocávamos. Estas formações foram bastante úteis pois permitiram-me adquirir um conhecimento mais detalhado sobre os produtos que eram comercializados na farmácia, o que posteriormente me ajudou no aconselhamento e venda dos mesmos, uma vez que consegui realizar atendimentos mais completos, mais persuasivos e com maior confiança.

2.3.2. PharmaCard

A Farmácia Alvim tem um cartão denominado PharmaCard que permite aos utentes acumular valor em cada compra que fazem na farmácia. O dinheiro acumulado em cartão pode ser descontado em qualquer compra que a pessoa faça e no dia de aniversário a pessoa ganha 2,5€ em cartão de prenda de aniversário. Assim, o PharmaCard contribui para a fidelização dos utentes e é uma estratégia que a farmácia adotou para gratificar os seus clientes. Além disso, é uma importante ferramenta pois permite registar a medicação que o cliente faz habitualmente, permitindo-nos conhecer o perfil do cliente e colocar observações de modo a evitar possíveis interações/reações adversas.

2.3.3. Proximidade de locais de venda de MNSRM

A Farmácia Alvim está localizada perto de um local de venda de MNSRM. O facto de estar perto de um local de venda de MNSRM, faz com que algumas pessoas se desloquem à farmácia apenas para saber e comparar os preços. No entanto, a proximidade com estes locais permite que nos diferenciemos dos mesmos pois quando vendemos estes produtos damos sempre um bom aconselhamento e tentámos esclarecer todas as dúvidas dos utentes. Isto faz com que os utentes prefiram adquirir estes produtos na farmácia pois sentem-se mais seguros e esclarecidos.

No decorrer do estágio tive a oportunidade de vender alguns produtos de venda livre e de aumentar o meu conhecimento acerca dos mesmos. Tive também a oportunidade de esclarecer e aconselhar os utentes em relação a estes produtos.

2.3.4. Aconselhamento em determinadas áreas

Com a realização do estágio curricular pode contactar com inúmeros produtos e marcas que desconhecia. Fiquei a conhecer diversas preparações de uso veterinário, as suas funções e quais as suas vantagens e desvantagens em comparação com outras que existem no mercado. Também fiquei a conhecer algumas marcas de dermocosmética, nomeadamente Apivita®, Martiderme® e Jowaé® e pude aprofundar o meu conhecimento sobre os produtos de dermocosmética das restantes marcas que já conhecia.

O aconselhamento na área de dermocosmética e na área de preparações de uso veterinário foi onde senti mais dificuldade durante o estágio. Cada vez mais as pessoas

deslocam-se à farmácia para adquirir estes produtos e colocam bastantes questões. Com a ajuda dos meus colegas consegui dar resposta às questões que me foram sendo colocadas por parte dos utentes e fui adquirindo e consolidando conhecimentos sobre estas áreas o que me permitiu realizar, dia após dia, um aconselhamento mais confiante e autónomo.

2.4. Ameaças

2.4.1. Medicamentos esgotados

No decorrer da realização do meu estágio curricular deparei-me com algumas situações em que os utentes se deslocavam à farmácia para adquirir a medicação que tomam habitualmente e esta se encontrar constantemente esgotada. Exemplos disso foi o Tolvon[®], o Victan[®], o Brintellix[®], o Elvanse[®], entre outros. Muitas vezes, os utentes mostraram desagrado pelo facto dos medicamentos se encontrarem esgotados e me questionavam quando é que voltávamos a ter os respetivos medicamentos, ao qual eu lhes respondia que quando estes se encontram esgotados não existe uma previsão de quando voltam a estar disponíveis no mercado. A inexistência de medicamentos genéricos impossibilitou que os utentes tomassem a sua medicação de forma contínua, o que fez com que alguns utentes tivessem que trocar de medicação já que não podiam estar tanto tempo à espera sem tomar os medicamentos.

Entre os medicamentos esgotados destaco o Tolvon[®], este medicamento é utilizado para o tratamento da depressão, pelo facto de se encontrar esgotado muitos utentes tiveram que substituir a toma do Tolvon[®] pela Mirtazapina, que também é um antidepressivo. O problema associado à troca de antidepressivos é que estes não têm efeito imediato, como é o caso da Mirtazapina que demora, normalmente, 1 a 2 semanas a ter efeito,² o que pode pôr em causa a adesão à terapêutica.

2.4.2. COVID-19

A pandemia provocada pela COVID-19 fez com que o estágio fosse suspenso durante um mês e meio. No período que antecedeu a suspensão do estágio, a farmácia teve que adotar medidas de segurança que permitissem manter o distanciamento entre os utentes e os funcionários da farmácia. A maioria dos atendimentos consistiam na venda de paracetamol, ibuprofeno e de suplementos para reforçar o sistema imunitário e as formações que estavam agendadas tiveram que ser suspensas por tempo indeterminado.

Quando retomei o estágio curricular, deparei-me com um ambiente bastante diferente do que havia quando tinha suspenso o estágio. A equipa estava a trabalhar por turnos, o uso de viseira ou de máscara era obrigatório e após cada atendimento tínhamos que desinfetar as mãos, o balcão e o multibanco. O sistema de senhas tinha sido retirado da farmácia, haviam apenas 3/4 balcões de atendimento em funcionamento e apenas podiam estar 2 pessoas à espera no interior da farmácia. A medição da glicémia, do colesterol e da tensão arterial foi suspensa, bem como os serviços de nutrição e de enfermagem, como medidas de contenção.

Pouco a pouco, os serviços foram voltando ao normal e por isso começamos inicialmente por voltar a medir a tensão arterial, posteriormente foi colocado o sistema de senhas e mais tarde foram retomadas as consultas de nutrição, enfermagem e naturopatia. No entanto, as formações continuaram suspensas, tendo havido apenas uma formação presencial.

A utilização de máscara, por vezes, dificultou a comunicação entre o utente e o farmacêutico, pois não se conseguia perceber o que os utentes diziam.

3. Casos Práticos

3.1. Caso Prático 1

Uma utente, do sexo feminino, vem à farmácia porque o sobrinho de 15 anos está com muita comichão nos olhos e já lhe doem os olhos de tanto coçar. Refere que o sobrinho tem os olhos bastante vermelhos mas a visão não foi alterada. Diz que a comichão começou no dia anterior mas não quer deixar passar muito tempo, visto que costuma ter muitas conjuntivites. Perante esta situação, questionei a utente se o sobrinho tinha acordado com remela no canto do olho, ao qual ela respondeu que não. Posto isto, e tendo em conta a sintomatologia apresentada podemos concluir que o sobrinho tem uma conjuntivite alérgica e por isso recomendei-lhe a utilização de Allergodil® em colírio, cujo princípio ativo é o cloridrato de azelastina, um anti-histamínico. Recomendei que aplica-se 1 a 2 gotas deste colírio de manhã e à noite e que no caso de utilizar lentes de contacto que deveria aplicar o colírio antes de colocar as lentes e aguardar 10 a 15 minutos até as voltar a colocar. Também recomendei à utente que o sobrinho limpasse os olhos com soro fisiológico e compressas de forma a auxiliar o tratamento.

3.2. Caso Prático 2

Uma utente, do sexo feminino, com cerca de 30 anos deslocou-se à farmácia com sintomatologia de uma infeção fúngica vaginal. Queixava-se de comichão na região perivaginal sem corrimento, vermelhidão e algum inchaço. A utente referiu que os sintomas tinham surgido no dia anterior mas como não passavam decidiu ir à farmácia. Perante esta situação expliquei à senhora que ela estava com uma infeção fúngica vaginal e que a sintomatologia que ela apresentava se devia a um desequilíbrio da flora vaginal. Recomendei-lhe que utiliza-se o Candiset®, cujo princípio ativo é o clotrimazol, um antifúngico. Uma vez que a infeção era externa disse-lhe para aplicar o creme de manhã e à noite na zona afetada durante 6 dias. Para complementar o tratamento sugeri que utiliza-se o gel de higiene íntima da Uriage Gyn-8, que como tem um pH de 8 vai ajudar a tratar os sintomas da inflamação, nomeadamente a comichão, vermelhidão e o inchaço. O gel de higiene íntima da Uriage Gyn-8 como tem pH de 8 não deve ser utilizado durante muito tempo pois pode alterar o pH da vagina, por isso recomendei que o utiliza-se apenas durante 6 dias. Por fim, informei a utente que, se após o tratamento, os sintomas persistirem ou piorarem deveria procurar aconselhamento médico.

4. Conclusão

O estágio curricular constitui a última etapa para a conclusão do MICF. Este permite aos estagiários colocar em prática todos os conhecimentos que foram adquirindo durante o curso e complementá-los com conhecimentos práticos que apenas se adquirem com a experiência.

O estágio realizado na Farmácia Alvim foi bastante intenso, o que me permitiu crescer tanto a nível pessoal como a nível profissional. Os 6 meses de estágio permitiram-me adquirir novos conhecimentos e constatar a importância e o valor desta profissão. Para nós farmacêuticos, enquanto profissionais de saúde, a aprendizagem é contante, e dia após dia, com o exercer da profissão, temos sempre a oportunidade de aperfeiçoar e melhorar o nosso conhecimento e desempenho. Com este estágio adquiri mais confiança e segurança e acho que estou melhor preparada para entrar no mercado de trabalho.

Sinto-me grata pelo meu primeiro contacto com a atividade profissional ter sido na Farmácia Alvim. Quero agradecer a toda a equipa da Farmácia Alvim pela simpatia, pela ajuda, pela disponibilidade e pela paciência que sempre tiveram comigo, todos contribuíram para a minha evolução durante este percurso. Por fim, quero deixar um agradecimento especial à Dra. Catarina Gonçalves, que foi quem me orientou durante o estágio. Obrigada por tudo!

5. Bibliografia

1. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS – **Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos**. [Acedido a 28 de junho de 2020]. Disponível na Internet: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/codigo_deontologico_da_of_4436676175988472c14020.pdf
2. INFARMED – **Resumo das Características do Medicamento, Mirtazapina Krka**. [Acedido a 28 de junho de 2020]; Disponível na internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>

Parte 2

Monografia

“Novos alvos terapêuticos em *Giardia lamblia*: potencial aplicação de vesículas extracelulares”

Orientadora: Professora Doutora Maria do Céu Sousa

Lista de Abreviaturas

AMEs - enzimas de metabolização da arginina, do inglês “Arginine Metabolic Enzymes”

CPs - proteases de cisteína, do inglês “Cysteine Proteases”

ESCRT - complexo de classificação endossômica responsável pelo transporte, do inglês “Endosomal Sorting Complex Responsible for Transport”

ESVs - vesículas específicas de enquistamento, do inglês “Encystation-specific Secretory Vesicle”

HSPs - proteínas de choque térmico, do inglês “Heat shock proteins”

ILVs - vesículas intraluminais, do inglês “Intraluminal Vesicles”

LBPA - ácido lisobisfosfatídico, do inglês “Lysobisphosphatidic Acid”

miRNA - micro RNA

mRNA - RNA mensageiro

MVBs - corpos multivesiculares, do inglês “Multivesicular Bodies”

MVs - microvesículas

OMS - Organização Mundial de Saúde

RE - Retículo Endoplasmático

SPP - peptídeos de sinal, do inglês “Signal Peptides”

VPs - Vesículas Periféricas

Resumo

A giardíase é uma patologia negligenciada que afeta anualmente entre 130 a 262 milhões de pessoas. Apesar da taxa de mortalidade ser baixa esta patologia causa uma taxa de morbidade elevada provocando um grande impacto socioeconómico e na saúde pública. As terapêuticas existentes para tratar a giardíase têm bastantes efeitos secundários e as taxas de reinfeção são bastante elevadas. Com o aparecimento de resistência aos fármacos, tornou-se essencial encontrar novos alvos terapêuticos e desenvolver novos fármacos para fazer face a esta parasitose. Nesse sentido surgiram as vesículas extracelulares que evidenciam ser alvos atraentes para o tratamento da giardíase. Estas vesículas parecem desempenhar funções essenciais nos parasitas, nomeadamente, na colonização das células alvo, na imunomodulação da resposta defensiva do hospedeiro e na comunicação entre os parasitas e o hospedeiro. Por poderem estar envolvidas em processos fundamentais para a sobrevivência de *Giardia*, as vesículas extracelulares têm potencial para virem a ser utilizados como alvo terapêutico na giardíase.

Palavras-chave: Giardíase, *Giardia lamblia*, alvos terapêuticos, vesículas extracelulares, novos alvos terapêuticos.

Abstract

Giardiasis is a neglected disease that affects 130 to 262 million people. Although the mortality rate is low, this pathology causes a high morbidity rate, causing a great socioeconomic and public health impact. Existing therapies to treat giardiasis have many side effects and the rates of re-infection are quite high. With the emergence of resistance to antiparasitic drugs, it has become essential to find new therapeutic targets and develop new drugs to deal with this parasitosis. In this sense, extracellular vesicles emerged, which prove to be attractive targets for the treatment of giardiasis. These vesicles seem to perform essential functions in the parasites, namely, in the colonization of the target cells, in the immunomodulation of the host's defensive response and in the communication between the parasites and the host. Because they can be involved in fundamental processes for the survival of *Giardia*, extracellular vesicles have the potential to be used as a therapeutic target in giardiasis.

Keywords: Giardiasis, *Giardia lamblia*, therapeutic targets, extracellular vesicles, new therapeutic targets.

I. Introdução

As infecções parasitárias intestinais afetam anualmente milhões de pessoas em todo o mundo, permanecendo como um problema global que põem em causa a saúde humana^{1,2}. Estas parasitoses causam um maior impacto nos países mais pobres, onde o número de mortes e de pessoas infetadas é bastante superior^{1,2}. No entanto nestes países as doenças provocadas pelos parasitas continuam a ser negligenciadas^{1,2}.

As parasitoses entéricas encontram-se muitas vezes associadas à pobreza, uma vez que a falta de condições habitacionais, tais como a ausência de saneamento, o acesso restrito à água potável, a superlotação e a escassez de higiene favorecem a disseminação destes organismos^{2,3,4}. A transmissão dos parasitas intestinais ocorre habitualmente pela via fecal-oral, através da ingestão de alimentos e água contaminados, bem como pelo contacto com solos e fómites contaminados². Estes parasitas são responsáveis por um elevado número de doenças gastrointestinais, que podem causar desnutrição, atraso no crescimento, obstrução intestinal, deficiência de proteínas e comprometimento cognitivo, provocando um grande impacto socioeconómico e na saúde pública^{2,3}.

Os fármacos existentes para tratar as parasitoses intestinais têm bastantes efeitos secundários e exigem planos de administração complexos, fazendo com que os gastos sejam mais elevados e ocorram falhas na adesão ao tratamento. Para além disso, o aparecimento de resistência aos medicamentos antiparasitários faz com que seja imprescindível descobrir novos alvos terapêuticos e encontrar novas terapêuticas que sejam eficazes, simples e que estejam ao alcance de todos, de forma a reduzir a morbidade e o número de infetados, dando uma melhor qualidade de vida às pessoas, principalmente aquelas que vivem em países em desenvolvimento^{2,4,5,6,7}.

Assim, esta monografia faz uma revisão sobre as terapêuticas que existem atualmente para a giardíase e das suas limitações, bem como sobre novos alvos terapêuticos que estão a ser estudados, dando destaque particular ao papel das vesículas extracelulares do parasita.

2. Giardíase

2.1. Etiologia e epidemiologia

A giardíase é uma infecção parasitária intestinal causada por *Giardia lamblia* (*G. lamblia*)⁸. Este protozoário também conhecido como *Giardia duodenalis* (*G. duodenalis*) ou *Giardia intestinalis* (*G. intestinalis*), destaca-se dos outros parasitas entéricos pela sua elevada prevalência, quer em países ricos, quer em países mais pobres, surgindo em diferentes situações socioambientais^{4,9}.

No século XVII, Anton van Leeuwenhoek descreveu pela primeira vez *G. lamblia*, enquanto analisava as suas fezes diarreicas ao microscópio^{10,11}. Este parasita é um protozoário eucariota unicelular flagelado da ordem Diplomonadida, família Hexamitidae e do género *Giardia*^{9,12,13}.

Quanto à sua morfologia, *G. lamblia* apresenta duas formas distintas: o trofozoíto e o quisto. O trofozoíto é piriforme, tem simetria bilateral, dois corpos parabasais, oito flagelos livres, um disco ventral e dois núcleos sem nucléolos¹³. Os oito flagelos e o disco ventral do trofozoíto têm um papel importante na colonização do trato gastrointestinal, pois são os flagelos que lhe conferem mobilidade e é através do disco ventral que o parasita adere às células intestinais. Estas características do citoesqueleto também são essenciais para a divisão celular (divisão binária assexuada) garantindo, assim, a sobrevivência do parasita⁶. O quisto é ovoide, tem 4 núcleos, flagelos intracitoplasmáticos e possui uma parede quística, permitindo a sua sobrevivência no meio exterior durante semanas a meses^{10,14}.

Apesar de ser um parasita eucariota, *G. lamblia* não possui mitocôndrias, peroxissomas nem nucléolos. O citoplasma contém grânulos ribossómicos e de glicogénio, vacúolos lisossómicos e um aglomerado de membranas que se assemelham ao complexo de Golgi¹⁰. Este parasita pode colonizar o trato gastrointestinal de humanos e de animais e por isso a sua transmissão pode ocorrer de pessoa para pessoa, de animal para pessoa ou através de alimentos e água contaminados^{4,10}.

Este protozoário liga-se à superfície apical das células do epitélio intestinal provocando lesão nas células epiteliais, apoptose dos enterócitos e aumento da permeabilidade intestinal, através do comprometimento de enzimas e de junções celulares¹⁵. O aumento de permeabilidade pode ser responsável pelo desenvolvimento da diarreia^{4,6,15}. Para além disso, as alterações celulares modificam a absorção de nutrientes provocando a síndrome de má absorção e, conseqüentemente, afetar o crescimento e o desenvolvimento cognitivo da

criança⁶. As infecções provocadas por este protozoário raramente levam à morte, sendo frequentemente crônicas e assintomáticas⁴. No entanto, a giardíase pode provocar modificações fisiopatológicas intestinais e extraintestinais que se mantêm após a infecção ter sido tratada, o que pode afetar profundamente a qualidade de vida^{15,16}. Na fase aguda da doença pode haver dor abdominal, enjoos, vômitos, diarreia, cansaço excessivo, flatulência e redução de peso^{4,9,17}.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a giardíase é uma patologia negligenciada, com mais de 200 milhões de pessoas parasitadas a nível mundial e com 130-262 milhões de novas infecções por ano¹⁸. A giardíase prevalece nos países onde a pobreza é maior, com uma incidência de 20 a 30%, enquanto que nos países desenvolvidos a incidência é de 2 a 7%⁴.

2.2. Ciclo de vida de *Giardia lamblia*

G. lamblia tem um ciclo de vida dimórfico, apresentando duas formas distintas: o quisto infeccioso que sobrevive em ambientes inóspitos e o trofozoíto responsável pela infecção e patologia. O hospedeiro mamífero, homem e animais, ingere água ou alimentos contaminados com quistos, que no estômago a pH ácido iniciam o processo de excitação¹⁹. Quando alcançam o intestino delgado, o parasita sai do quisto sob a forma de trofozoíto e adere às vilosidades intestinais através do disco ventral^{11,19}. A adesão do trofozoíto às células intestinais é essencial para que ocorra divisão celular e conseqüentemente a colonização^{11,13}. Dependendo dos sinais ambientais específicos (pH, sais biliares, oxigénio) a que o parasita é exposto no intestino, pode ocorrer divisão celular ou iniciar-se o processo de enquistamento²⁰. O enquistamento é induzido quando os trofozoítos são arrastados para o intestino grosso, formando-se quistos infecciosos que são expelidos nas fezes do hospedeiro (Figura I)^{19,21}. Contudo, na fase aguda da infecção devido ao trânsito intestinal aumentado podem ser encontrados trofozoítos em fezes diarreicas¹³.

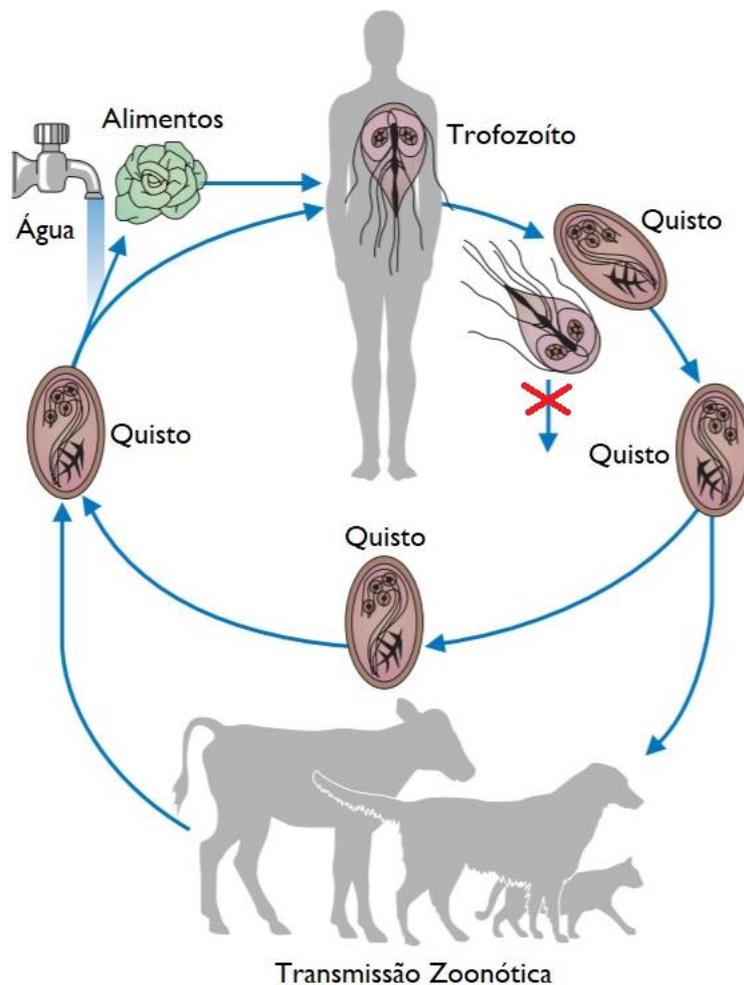


Figura 1 – Ciclo de vida de *Giardia lamblia* (Adaptado de KAYSER, F. H., et al., 2005) ²¹.

2.3. Alvos terapêuticos

O tratamento da giardíase baseia-se fundamentalmente no uso de nitroimidazóis, sobretudo metronidazol, e de benzimidazóis, nomeadamente de albendazol e mebendazol^{7,16,22}.

O metronidazol é um pró-fármaco que é ativado na ausência de oxigénio e pela ação de enzimas do protozoário formando-se radicais nitrosos que se ligam ao DNA do trofozoíto. Esta ligação induz a fragmentação do DNA com conseqüente morte do parasita por apoptose celular^{16,23}. A ocorrência de regulação negativa ou de mutações nas enzimas que vão ativar o fármaco são as principais causas do aparecimento de resistência ao metronidazol¹⁶. Apesar da elevada taxa de êxito de tratamento, o metronidazol provoca cefaleias, fraqueza, vômitos e é potencialmente mutagénico e cancerígeno¹⁸.

O albendazol e o mebendazol impedem a polimerização da tubulina que é uma proteína fundamental do citoesqueleto de *G. lamblia*^{24,25,26}. Esta proteína está presente nos microtúbulos e estes têm um papel basilar em vários processos que são importantes para a sobrevivência

do parasita, nomeadamente na divisão, adesão, mobilidade, transporte e enquistamento/excistação. Portanto, alterações na tubulina inviabilizam os microtúbulos impossibilitando a sobrevivência do parasita²⁶.

Quando os nitroimidazóis e os benzimidazóis não são eficazes existem outras alternativas terapêuticas, nomeadamente a nitazoxanida, paromomicina, quinacrina, cloroquina e a furazolidona^{9,27,28}.

Se os medicamentos anti-giardiais não forem eficazes isoladamente, podem ser administrados em associação²⁹. Nesse caso, normalmente associam-se medicamentos que atuam em alvos distintos, de modo a evitar que ocorram resistências cruzadas²⁹.

Apesar da variedade terapêutica, muitos dos fármacos utilizados para tratar a giardíase têm uma baixa eficácia e têm efeitos adversos o que diminui a adesão à terapêutica¹⁹. Adicionalmente, a resistência tem vindo a aumentar e as taxas de reinfeção são elevadas, fazendo com que seja crucial encontrar novos alvos terapêuticos e desenvolver novos fármacos para o combate a esta parasitose^{6,9,16,19}.

2.3.1. Novos alvos terapêuticos

Com o objetivo de alcançar terapêuticas mais eficazes têm sido pesquisados novos alvos terapêuticos. A escolha de um alvo terapêutico é um processo determinante, pois este tem que ter um papel basilar no parasita, de modo que a sua inibição impossibilite a sua sobrevivência²².

Entre os novos alvos terapêuticos salienta-se a enzima glicolítica triosefosfato isomerase de *G. lamblia*⁹. Esta enzima está envolvida no metabolismo fermentativo do parasita, que é a sua única fonte de obtenção de energia⁹. Deste modo, alterações nas enzimas glicolíticas podem levar à morte deste protozoário por esgotamento da fonte energética⁹. A triosefosfato isomerase é inativada através da alteração química da cisteína 222, alteração que pode ser conseguida através de compostos tiol-reativos. Existem evidências de que os trofozoítos de *G. lamblia* morrem quando há redução da expressão da triosefosfato isomerase⁹. Alguns medicamentos já existentes no mercado, com outras indicações clínicas, têm sido estudados no sentido de avaliar a atividade anti-giardial⁹. Tudo indica que o dissulfiram e os inibidores da bomba de prótons conseguem alterar a cisteína 222 do parasita inativando a triosefosfato isomerase de *G. lamblia* sem danificar a enzima humana similar⁹.

Outra enzima glicolítica que pode vir a ser um alvo terapêutico é a frutose 1,6-bifosfato aldolase, que está também envolvida no metabolismo fermentativo de *G. lamblia*²². Existem evidências de que os trofozoítos não sobrevivem quando o gene codificante da enzima não é transcrito²². Adicionalmente, a frutose 1,6-bifosfato aldolase do parasita difere da enzima homóloga humana, com estruturas e mecanismos enzimáticos diferentes, presumindo-se que seja possível inibir a enzima do parasita sem danificar a enzima do hospedeiro²². Assim, têm sido pesquisados compostos com potencial para inibir a frutose 1,6-bifosfato aldolase. No entanto, os estudos estão numa fase inicial e ainda não foi encontrado nenhum fármaco com capacidade para inibir esta enzima.

As vesículas extracelulares destacam-se como um potencial novo alvo terapêutico, uma vez que constituem um meio de comunicação entre células participando não só em diversas respostas do sistema imunitário mas também na transferência de informação intercelular. Por esta razão, as vesículas extracelulares podem estar envolvidas na patogenicidade da giardíase, apresentando potencial para virem a ser excelentes alvos terapêuticos³⁰.

3. Vesículas extracelulares

3.1. Caracterização

No decorrer da apoptose ou da ativação celular, praticamente todos os tipos de células libertam vesículas extracelulares³¹. Estas vesículas possuem uma forma esférica, são rodeadas por uma membrana com dupla camada de lípidos, contêm várias macromoléculas como ácidos nucleicos, proteínas, hidratos de carbono, lípidos e moléculas de adesão e podem ser encontradas em diversos fluidos biológicos^{31,32,33}.

As vesículas extracelulares são sintetizadas e libertadas quer pelos hospedeiros quer pelos agentes patogénicos, nomeadamente vírus, bactérias, fungos e parasitas^{33,34}. Estas vesículas têm, no mínimo, três formas de comunicar com as células recetoras: podem manter-se ligadas à membrana da célula desencadeando processos de sinalização devido à interação com o recetor celular; podem ser internalizadas por endocitose mediada por recetor; ou podem fundir-se com a membrana da célula recetora^{30,35}. Desta comunicação é possível que resulte uma alteração da função da célula que recebe a vesícula³⁶.

Tendo em conta o tamanho e a biossíntese, as vesículas extracelulares podem ser divididas em 3 grupos: exossomas, microvesículas (MVs) e corpos apoptóticos (Tabela 1)³².

Tabela I – Classificação das vesículas extracelulares em função do tamanho e da biossíntese³².

| Vesículas Extracelulares | | | |
|---------------------------------|------------------|--|---------------------------|
| Classificação | Exossomas | Microvesículas | Corpos apoptóticos |
| Tamanho | 40 a 120 nm | 50 a 1000 nm | 500 a 2000 nm |
| Dimensão | Pequena | Média | Grande |
| Biossíntese | Endossomas | Membrana plasmática de células normais | Células em apoptose |

Os exossomas descobertos nos anos 80 numa preparação de reticulócitos, são as vesículas extracelulares com um tamanho mais reduzido e têm origem nos endossomas^{30,32,33}. Os endossomas resultam do processo de endocitose, que é o mecanismo pelo qual a célula destrói os recetores que estão à sua superfície, e através da invaginação da membrana vão formar corpos multivesiculares (MVBs)^{32,33}. A maioria dos MVBs fundem-se com os lisossomas de forma a degradar as proteínas que estão dentro das suas vesículas intraluminais (ILVs). No entanto, alguns podem fundir-se com a membrana citoplasmática libertando os exossomas para fora da célula através do processo de exocitose (Figura 2)^{32,33}.

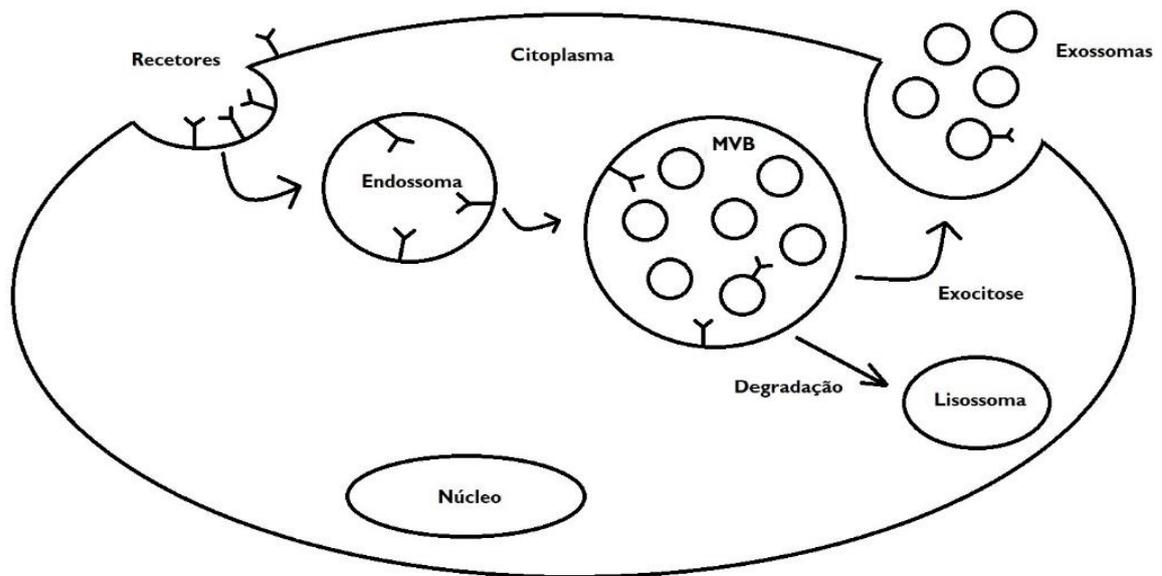


Figura 2 – Biogênese e liberação de exossomas. A endocitose de receptores que estão à superfície da célula origina endossomas e estes por invaginação da sua membrana vão produzir corpos multivesiculares (MVBs). A maioria dos MVBs funde-se com os lisossomas degradando as proteínas que estão no seu interior. Uma pequena quantidade de MVBs funde-se com a membrana plasmática libertando os exossomas para fora da célula através do processo de exocitose^{32,33}.

Estudos sugerem que a síntese e liberação de exossomas depende, no mínimo, de três processos independentes e característicos da célula, nomeadamente a presença de um complexo de classificação endossômica responsável pelo transporte (ESCRT), um mecanismo dependente de ceramida, e outro da presença de tetraspaninas³⁷. Até ao momento, o mecanismo mediado por ESCRT foi o mais estudado. ESCRT compreende quatro complexos multiproteicos que são formados por proteínas citosólicas que se agrupam de forma sequencial³⁷. Estes 4 complexos multiproteicos são direcionados para a membrana dos endossomas através da interação com a ubiquitina, com a clatrina e entre si³⁷. Os complexos ESCRT-0, ESCRT-I e ESCRT-II têm a capacidade de reconhecer e de se unir à ubiquitina, enquanto que o complexo ESCRT-III é responsável pelas etapas finais do processo de produção de ILVs³⁷. Antes das ILVs serem libertadas da membrana do endossoma a ubiquitina é removida por uma enzima denominada desubiquitinase e posteriormente os complexos são desfeitos pelo AAA + -ATPase Vps4. Por fim, as ILVs são libertadas formando-se o MVB³⁷. Um outro mecanismo envolvido na síntese e liberação de exossomas depende da ceramida que é sintetizada pela esfingomielinase neutra 2. Na ausência de ceramida ocorrem deformações na membrana do endossoma e conseqüentemente a formação de ILV fica comprometida, interferindo com a síntese e liberação de exossomas³⁷. Por último, a presença de

tetraspaninas também influencia a libertação de exossomas³⁷. As tetraspaninas são proteínas transmembranares que comunicam com diversas proteínas sinalizadoras. Estudos apontam que a carência de tetraspaninas compromete a libertação de exossomas³⁷.

O conteúdo dos exossomas altera-se consoante o local e do tipo de células que os produzem, bem como o estado em que a célula se encontra (estado patológico / fisiológico)³³. Porém, existem algumas proteínas que estão presentes em todos os exossomas nomeadamente a Tsg101 e a ALIX, que estão envolvidas na formação do MVB, a Hsp70 e Hsp90 que são proteínas de choque térmico, diversas tetraspaninas que participam na adesão do exossoma à célula alvo, GTPases e anexinas que intervêm no transporte e fusão de membranas, integrinas e proteínas RAB que controlam a ligação e a fusão dos exossomas com a célula recetora, e proteínas que estão envolvidas na formação e transporte dos exossomas, como é o caso da proteína que se liga ao ácido lisobisfosfatídico (LBPA)^{33,38,39}. Em relação ao conteúdo lipídico, geralmente os exossomas possuem uma quantidade superior de fosfatidilserina, colesterol, esfingomiéline e gangliosídeos quando comparado com as membranas celulares e intracelulares³³. A presença de biomoléculas características de determinados tipos de células ou patologia nos exossomas vai permitir determinar qual o tipo de célula que lhe deu origem ou a presença de uma doença³³.

Um outro tipo de vesículas extracelulares são as MVs³². Identificadas em 1967, estas vesículas têm uma dimensão intermédia entre os exossomas e os corpos apoptóticos e são formadas através da libertação de prolongamentos da membrana plasmática^{30,32,39}. Quando as células são sujeitas ao *stress* oxidativo ou hipoxia há um aumento de cálcio intracelular o que vai provocar modificações específicas nas células, levando a uma libertação acentuada de MVs³⁹. No decorrer da sua síntese, as MVs também designadas por ectossomas, integram RNA mensageiro (mRNA), proteínas citosólicas e micro RNA (miRNA) da célula mãe³⁹. Na maioria das vezes, as MVs têm um tamanho superior ao dos exossomas, no entanto quando são isoladas de fluídos biológicos o tamanho das MVs pode ser idêntico ao dos exossomas³⁹.

Por último, os corpos apoptóticos são libertados a partir da membrana citoplasmática de células em morte celular e são as vesículas com maior dimensão³². Este tipo de vesículas é heterogéneo, em tamanho e em aspeto, e possui no seu interior organelos celulares, ácidos nucleicos, lípidos, proteínas, quimiocinas e moléculas de adesão³⁹. Tanto os corpos apoptóticos como as MVs possuem fosfatidilserina na parte externa da bicamada lipídica³⁹. Para além da fosfatidilserina a membrana plasmática dos corpos apoptóticos também contém proteínas e lípidos da célula que lhe deu origem³⁹.

Embora os mecanismos de síntese e libertação dos três tipos de vesículas extracelulares sejam diferentes, é complicado diferenciá-los após serem libertados pelas células³⁹. Ainda não há marcadores moleculares ou propriedades físicas específicas que permitam diferenciar inequivocamente as MVs dos exossomas³⁹.

3.2. Papel biológico

Diversos organismos e tipos de células são capazes de libertar vesículas extracelulares que estão envolvidas em vários processos fisiológicos e fisiopatológicos⁴⁰. A primeira função que foi atribuída às vesículas extracelulares foi a degradação de resíduos celulares. No entanto, hoje sabe-se que estas vesículas também participam na regulação de genes, na troca de informação entre células, nas vias de sinalização e são responsáveis por equilibrar o metabolismo celular^{30,31,32,41,42}. Para além de participar nestes processos, várias funções fisiológicas foram atribuídas a estas vesículas entre as quais se destacam a sua capacidade de estimular células T e a capacidade de modificar as propriedades biológicas das células recetoras^{36,40}. Dependendo do seu conteúdo, as vesículas extracelulares podem modular as células vizinhas e podem desencadear respostas antitumorais através do estímulo do sistema imunitário^{40,42}. Contudo, estas vesículas também podem ser responsáveis pelo aparecimento de metástases e de recaídas em doentes com cancro, uma vez que as vesículas extracelulares provenientes de células tumorais modulam o sistema imunitário, propiciam a coagulação e a formação de novos vasos o que vai facilitar o desenvolvimento do tumor³⁶.

Dos diferentes tipos de vesículas extracelulares destacam-se os exossomas que participam em diversos processos biológicos como na maturação dos reticulócitos, na apoptose celular, na apresentação de antígenos, na transferência de agentes infecciosos e RNAs, na libertação de proteínas, na inflamação, na coagulação e na síntese de vasos sanguíneos novos^{41,43}. Os exossomas tanto podem inibir como auxiliar os diversos processos biológicos³⁵. Eles parecem intervir na manutenção do equilíbrio celular, através da eliminação do DNA citoplasmático prejudicial das células³⁹.

Nos parasitas, as vesículas extracelulares têm um papel importante na patogenicidade, estando envolvidas no estabelecimento da infeção no hospedeiro, na variação da resposta imunitária e na disseminação dos agentes infecciosos^{30,33,35,43}. As vesículas extracelulares constituem um dos elementos primordiais do parasita no contacto com as células alvo, intervêm na comunicação e na troca de genes entre agentes patogénicos e facilitam a interação entre o parasita extracelular e o hospedeiro^{35,41,43}. Estas vesículas transportam e protegem a

cargo do parasita, garantindo que esta chegue ao local alvo intacta e seja posteriormente captada e incorporada pelas células do hospedeiro^{30,31,35}.

As vesículas extracelulares tanto podem resultar da resposta imunológica do hospedeiro contra um agente infeccioso, como podem ser libertadas pelos agentes patogénicos com o objetivo de modular a resposta imunológica do hospedeiro³⁵. Assim, a libertação de vesículas extracelulares tanto pode ser favorável para o hospedeiro como pode ser favorável para o parasita⁴¹. As parasitoses causam *stress* às células do hospedeiro fazendo com que estas secretem exossomas que vão ativar células do sistema imunitário, nomeadamente células B, células T, células NK, monócitos e macrófagos para combater a infeção⁴¹. No entanto, os parasitas através da libertação de vesículas extracelulares podem facultar antígenos às células apresentadoras de antígenos e alterar a resposta imunológica⁴¹. Por exemplo, os exossomas com *Leishmania* GP63 podem provocar a apoptose de determinadas células do sistema imunitário do hospedeiro e impedir a ativação de células T⁴¹. Outro exemplo é a alteração da resposta imunológica provocada pelas vesículas dos parasitas através da modificação da síntese de citocinas pelos macrófagos do hospedeiro^{35,43}.

3.3. Vesículas extracelulares como biomarcadores de parasitoses

Como referido anteriormente, as vesículas extracelulares, incluindo os exossomas, podem ser libertadas por qualquer tipo de célula⁴¹. Atualmente sabe-se que estas vesículas contêm na sua composição proteínas, lípidos e ácidos nucleicos específicos que podem vir a ser utilizados como biomarcadores moleculares de infeção e constituir um método aplicável ao diagnóstico de parasitoses⁴¹.

As vesículas libertadas, quer pelos parasitas quer pelos hospedeiros, contêm biomoléculas características da célula que lhes deu origem e podem ser encontradas em diversos fluídos biológicos, incluindo o sangue, urina, saliva, leite materno, líquido cefalorraquidiano e expetoração^{33,41,44}. Pelo facto destas vesículas conterem biomoléculas características do estado em que as células mãe se encontram, podem ser utilizadas também para avaliar, de forma não invasiva, a reação do parasita a medicamentos e também para classificar os diferentes estádios das parasitoses³⁰. Por exemplo na malária, a severidade da patologia está associada com a quantidade de vesículas extracelulares no plasma. Por conseguinte, podemos utilizar estas vesículas para avaliar a evolução de patologias e do seu tratamento⁴⁴.

A utilização de vesículas extracelulares como biomarcadores poderá ser útil em várias parasitoses, nomeadamente na esquistossomose⁴⁵. Atualmente os métodos de diagnóstico utilizados para detetar esta parasitose consistem em testes serológicos e na identificação de ovos nas fezes e na urina⁴⁵. Contudo, estes testes apresentam algumas limitações⁴⁵. O exame às fezes e à urina apresenta uma sensibilidade reduzida enquanto que os testes serológicos, apesar de possuírem uma sensibilidade superior, não conseguem detetar uma reinfeção nem avaliar a eficácia da terapêutica⁴⁵. Devido a estas limitações têm sido realizados estudos com o objetivo de desenvolver um método com elevada sensibilidade e especificidade e com capacidade de detetar a eficácia do tratamento⁴⁵. Tudo indica que o isolamento de vesículas extracelulares presentes no soro de pessoas infetadas por *Schistosoma mansoni* e a posterior deteção de miRNA do parasita poderá ser um método de diagnóstico fiável⁴⁵. Estudos sugerem que este método apresenta uma sensibilidade elevada e que tem a capacidade de avaliar a eficácia da terapêutica⁴⁵. Para além disso, o miRNA é estável e é característico do género *Schistosoma*⁴⁵. Cada espécie deve ter sequências de miRNA características e por isso esta abordagem poderá ser aplicável na deteção de várias parasitoses⁴⁵. De facto, estudos sugerem o potencial uso de vesículas extracelulares no diagnóstico da malária, leishmaniose, ascariíase e tripanossomose⁴⁵.

As vesículas extracelulares têm características que sustentam o seu potencial como biomarcadores de diagnóstico, nomeadamente o facto de apresentarem uma estrutura estável, da sua quantidade e composição variarem sob circunstâncias distintas e estarem presentes em abundância no plasma^{41,46}. Por sua vez, a utilização de biomoléculas como biomarcadores de diagnóstico, nomeadamente miRNA e determinadas proteínas, não apresentam um potencial tão elevado para virem a constituir um método de diagnóstico pois possuem uma estabilidade menor^{41,46}.

No entanto, é necessário realizar mais estudos no âmbito dos parasitas para que se consiga conhecer melhor a síntese, as características e o conteúdo das vesículas dos diferentes parasitas, de modo a que seja possível desenvolver um método fiável com elevada sensibilidade e especificidade com potencial aplicação ao diagnóstico destas infeções⁴¹.

3.4. Biogénese de vesículas extracelulares em *Giardia lamblia*

A síntese e libertação de vesículas extracelulares é um mecanismo biológico que é comum às diversas espécies e tem sido conservado no decorrer da evolução constituindo uma via de comunicação entre os parasitas e os seus hospedeiros³⁷.

O parasita *G. lamblia* sofreu uma evolução redutiva e por isso tem um sistema de endomembranas elementar em comparação com outros parasitas, pois não possui sistema endossômico/lisossômico, nem complexo de Golgi, nem peroxissomas, nem mitocôndrias^{15,21,47}. Em alternativa, este parasita tem vesículas periféricas (VPs) que desempenham o papel do endossoma e do lisossoma em simultâneo³⁷. O mecanismo pelo qual este parasita secreta e transporta proteínas ainda não está bem esclarecido¹⁵. No entanto, estudos sugerem que as proteínas libertadas por este protozoário estejam envolvidas na patogenicidade¹⁵. Exemplos são as proteases de cisteína (CPs) e as enzimas que metabolizam a arginina (AMEs). As CPs estão envolvidas na adesão do parasita às células intestinais e na degradação de anticorpos, citocinas pró-inflamatórias e proteínas da matriz extracelular¹⁵. As AMEs competem pela obtenção de arginina com as células do hospedeiro, conseguindo captar mais arginina do que as células do hospedeiro e consequentemente a síntese de citocinas pelas células dendríticas e a multiplicação celular são inibidas¹⁵. Assim, com este bloqueio da divisão celular, o óxido nítrico, que é um composto nocivo para este parasita, não é sintetizado¹⁵.

G. lamblia possui três organelos celulares essenciais que podem ser distinguidos facilmente: os mitossomas que estão dispersos por todo o citoplasma; as VPs também denominadas como compartimentos endossômicos/lisossômicos, que são componentes celulares endocíticos especializados e responsáveis pela absorção de nutrientes; e o retículo endoplasmático (RE) que participa no metabolismo do parasita²¹. Para além destes organelos, *G. lamblia* também contém vesículas específicas de enquistamento (ESVs) que têm características semelhantes ao complexo de Golgi e têm a função de controlar a libertação dos constituintes da parede do quisto²¹. As ESVs e as VPs são componentes celulares simples e são responsáveis, respetivamente, pela transmissão e pela reprodução do parasita num novo hospedeiro²¹. Uma vez que *G. lamblia* não possui complexo de Golgi, a libertação e o transporte de proteínas do parasita ocorre diretamente do RE para a membrana plasmática ou para componentes celulares tais como as VPs²¹. Ao contrário do que ocorre na maioria dos seres eucariotas, neste parasita não há maturação dos componentes celulares dos endossomas nas VPs²¹.

Evidências sugerem que um dos mecanismos pelo qual *G. lamblia* secreta e transporta proteínas envolva vesículas extracelulares uma vez que o parasita liberta AMEs e outras proteínas que não têm peptídeos de sinal (SPP)¹⁵. Recentemente, um estudo demonstrou que *G. lamblia* liberta MVs que interferem na aderência dos trofozoítos e na estimulação de células dendríticas¹⁵. Este parasita também produz vesículas com dimensão, conteúdo, forma e densidade semelhante a exossomas, apesar de não possuir uma via endo-lisossomal clássica³⁷.

As vesículas extracelulares libertadas por este protozoário parecem conter miRNA e proteínas entre as quais se destacam as proteínas de choque térmico (HSPs), especificamente a Hsp90. A Hsp90 participa na adaptação, diferenciação e proteção de *G. lamblia* contra os mecanismos de defesa do hospedeiro, tendo a capacidade de detetar e reagir às alterações ambientais⁴⁸.

Como já foi referido, tudo indica que a libertação de exossomas pelas diferentes células dependa no mínimo de três processos independentes e característicos da célula, nomeadamente, a presença de um complexo de classificação endossómica responsável pelo transporte (ESCRT), um mecanismo dependente de ceramida e a presença de tetraspanina³⁷. Contudo, *G. lamblia* possui um ESCRT reduzido, não possui tetraspaninas e é incapaz de sintetizar ceramida de novo³⁷. Este parasita parece possuir um mecanismo único de síntese de vesículas semelhantes a exossomas³⁷. Estudos sugerem que os exossomas são sintetizados nos vacúolos periféricos e que a sua produção e libertação está dependente da ceramida e das proteínas Vps4a e Rab 11 associadas a ESCRT³⁷. A proteína Rab 11 participa na diferenciação e na divisão celular e parece estar envolvida na comunicação entre o RE e os vacúolos periféricos³⁷. As proteínas Rab 1 e Rab 2 a/b parecem estar envolvidas na exocitose dos exossomas (Figura 3)³⁷.

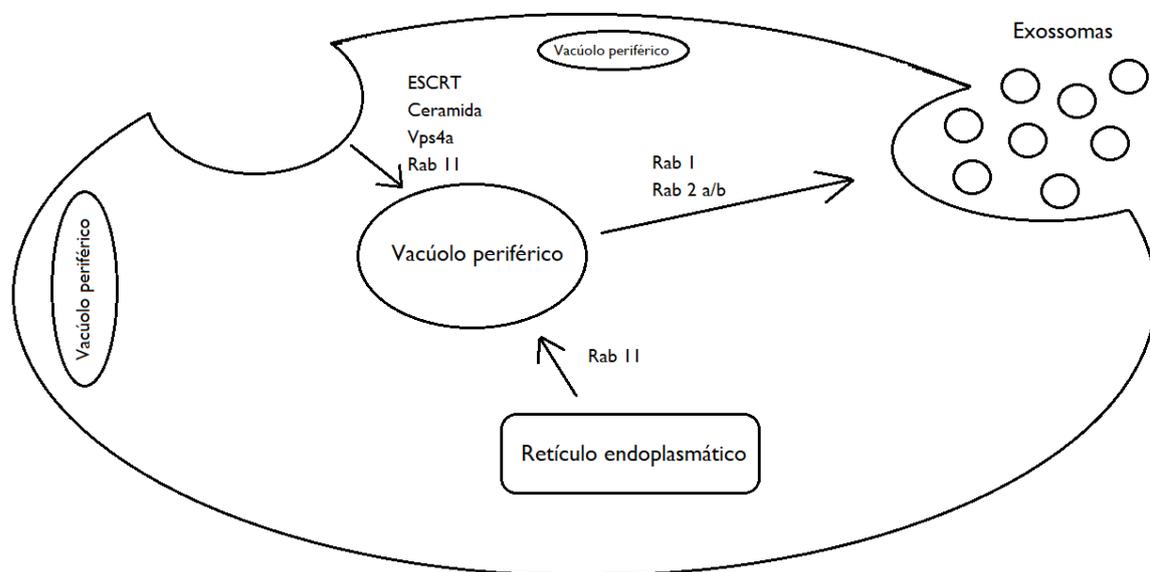


Figura 3 - Biogénese e libertação de exossomas em *G. lamblia*³⁷. A síntese de exossomas ocorre nos vacúolos periféricos e a sua produção e libertação está dependente da ceramida e das proteínas Vps4a e Rab 11, que são transportadas para o interior dos vacúolos periféricos através do complexo de classificação endossómica (ESCRT). As proteínas Rab 1 e Rab 2 a/b parecem estar envolvidas na libertação de exossomas e a proteína Rab 11 participa na comunicação entre o retículo endoplasmático e os vacúolos periféricos³⁷.

Estudos demonstram que o aumento de cálcio intracelular estimula a liberação de vesículas extracelulares por parte de *G. lamblia* e que a ativação de células dendríticas imaturas in vitro ocorre na presença de grandes quantidades de microvesículas³⁷. Através da liberação destas vesículas *G. lamblia* parece conseguir alterar a sinalização celular, modular a resposta imunológica e modificar a síntese de citocinas pró-inflamatórias³⁷. As citocinas pró-inflamatórias são sintetizadas pelo hospedeiro com o intuito de controlar a infecção parasitária, limitando a proliferação, a invasão e a permanência do parasita no hospedeiro⁴⁸.

A biogênese de vesículas extracelulares em *G. lamblia* é um tema recente e que está sob investigação³⁷. Apesar de já ter havido grandes avanços em relação a este tema, ainda não são completamente conhecidos quais os mecanismos e que componentes celulares estão envolvidos na formação destas vesículas³⁷. No entanto, o estudo mais detalhado destas vesículas permitirá descobrir qual o seu conteúdo, quais os mecanismos subjacentes à sua biogênese e quais os processos biológicos e patológicos em que estão envolvidas³⁷.

3.5. Vesículas extracelulares como potencial alvo terapêutico na giardíase

Uma vez que as vesículas extracelulares constituem uma via para troca de informações específicas entre células, elas podem constituir um potencial alvo para diversas abordagens terapêuticas, nomeadamente na vacinação contra agentes patogénicos, nas terapias antitumorais, no transporte e entrega de fármacos e em terapias regenerativas e que modulam o sistema imunológico⁴⁰. Nos parasitas extracelulares, por serem um dos primeiros constituintes a entrar em contacto com as células do hospedeiro e por puderem estar envolvidas na sua patogenicidade, as vesículas extracelulares são um alvo atractivo^{30,33,35,43}.

Como referido anteriormente, o conteúdo das vesículas extracelulares pode alterar a expressão de genes nas células recetoras, pode auxiliar os parasitas na evasão à resposta imunitária do hospedeiro e pode melhorar a fixação dos parasitas às células alvo, exacerbando a colonização e o número de células atingidas pelo parasita⁴⁹. Assim, bloquear a síntese e liberação de vesículas extracelulares dos parasitas pode constituir um potencial alvo terapêutico⁵⁰.

G. lamblia é um parasita não invasivo e os mecanismos pelos quais ele provoca doença ainda não estão completamente esclarecidos. No entanto, pensa-se que o parasita e o hospedeiro interajam através da secreção de determinadas proteínas que podem ser responsáveis pela progressão da infecção. Essas proteínas vão interferir no metabolismo celular do parasita e do hospedeiro, podendo também alterar a resposta imunológica deste último.

Algumas das proteínas parasitárias depois de libertadas vão ser captadas pelas células hospedeiras, provocando alterações nestas células, nomeadamente nas proteínas de sinalização imunológica e no ciclo celular o que pode levar ao seu bloqueio e consequentemente à morte da célula hospedeira. Os produtos secretores e excretos de *G. lamblia* provocam alterações patológicas nas células intestinais e promovem a produção de anticorpos específicos contra glicoproteínas intestinais comprometendo assim a absorção e secreção das células do intestino¹⁵. Evidências suportam que a lesão das células epiteliais do intestino e a modificação da resposta imunológica do hospedeiro provocada pelos trofozoítos de *G. lamblia* esteja relacionada com a libertação de diversas proteínas e de vesículas extracelulares³⁷.

Estudos sugerem que na ausência de colesterol as vesículas extracelulares de *Giardia* não são libertadas e que a aderência do parasita às células intestinais do hospedeiro fica comprometida. Portanto, a inibição da libertação de vesículas extracelulares pode inviabilizar a sobrevivência do parasita no hospedeiro⁵¹. A utilização destas vesículas pode vir a ter um impacto positivo no tratamento da giardíase. Contudo, são necessários mais estudos pois os mecanismos de patogenia subjacentes a esta parasitose ainda não estão totalmente esclarecidos e ainda não estão identificados os fatores de virulência^{15,40}. Simultaneamente, o conhecimento existente sobre as vesículas extracelulares sintetizadas e libertadas por *G. lamblia* ainda é escasso e por isso os mecanismos subjacentes à sua biogênese e libertação ainda não estão bem definidos^{15,40,49}.

4. Conclusão e perspectivas futuras

As parasitoses, incluindo a giardíase, continuam a ser um problema global que põem em causa a saúde humana, sobretudo nos países mais pobres⁴¹. No decorrer da evolução os parasitas foram contactando com diversos hospedeiros de várias espécies distintas, desenvolvendo diversas estratégias de sobrevivência⁴¹. Assim, é fundamental ampliar continuamente o conhecimento sobre os parasitas de modo a desenvolver novas abordagens para o tratamento das parasitoses⁴¹.

Atualmente as terapêuticas que existem para tratar a giardíase são limitadas, induzem efeitos adversos e estão associadas ao aparecimento de resistência. Assim, torna-se urgente encontrar novos alvos terapêuticos e desenvolver novos fármacos para combater esta parasitose^{26,31,38,40}. Neste sentido surgiram as vesículas extracelulares como alvos atraentes para o tratamento da giardíase^{15,37}. *G. lamblia* parece ter um mecanismo de síntese de vesículas extracelulares peculiar e estas parecem desempenhar papéis fulcrais na sobrevivência deste parasita. Portanto, a inibição da síntese destas vesículas pode constituir uma nova estratégia no controlo da giardíase. Contudo, pelo facto de os estudos sobre vesículas extracelulares ainda estarem a emergir pouco se sabe sobre as suas funções e biogénese em *G. lamblia*⁴⁹. A realização de mais estudos permitirá descobrir todas as funções, tanto fisiológicas como patológicas, das vesículas extracelulares, bem como quais os mecanismos que estão subjacentes à giardíase e quais os fatores de virulência que estão envolvidos na indução da infeção^{15,40,49}.

5. Bibliografía

1. VILLAMIZAR, X., HIGUERA, A., HERRERA, G., VASQUEZ-A, L. R., BUITRON, L., MUÑOZ, L. M., GONZALEZ-C, F. E., LOPEZ, M. C., GIRALDO, J. C., RAMÍREZ, J. D. - **Molecular and descriptive epidemiology of intestinal protozoan parasites of children and their pets in Cauca, Colombia: a cross-sectional study.** BMC infectious diseases, 190 (2019).
2. MARDU, F., YOHANNES, M., TADESSE, D. - **Prevalence of intestinal parasites and associated risk factors among inmates of Mekelle prison, Tigray Region, Northern Ethiopia, 2017.** BMC infectious diseases, 406 (2019).
3. SEGUÍ, R., MUÑOZ-ANTOLI, C., KLISIEWICZ, D. R., OISHI, C. Y., KÖSTER, P. C., DE LUCIO, A., HERNÁNDEZ-DE-MINGO, M., PUENTE, P., TOLEDO, R., ESTEBAN, J. G., CARMENA, D. - **Prevalence of intestinal parasites, with emphasis on the molecular epidemiology of *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp., in the Paranaguá Bay, Brazil: a community survey.** Parasites & vectors, 11 (2018).
4. NUNES, B. C., PAVAN, M. G., JAEGER, L. H., MONTEIRO, K. J. L., XAVIER, S. C. C., MONTEIRO, F. A., BÓIA, M. N., CARVALHO-COSTA, F. A. - **Spatial and Molecular Epidemiology of *Giardia intestinalis* Deep in the Amazon, Brazil.** PloS one, 11 (2016).
5. LIN, A., ERCUMEN, A., BENJAMIN-CHUNG, J., ARNOLD, B. F., DAS, S., HAQUE, R., ASHRAF, S., PARVEZ, S. M., UNICOMB, L., RAHMAN, M., HUBBARD, A. E., STEWART, C. P., COLFORD, J. M. JR., LUBY, S. P. - **Effects of Water, Sanitation, Handwashing, and Nutritional Interventions on Child Enteric Protozoan Infections in Rural Bangladesh: A Cluster-Randomized Controlled Trial.** Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 67 (2018) 1515-1522.
6. NOSALA, C., DAWSON, S. C. - **The Critical Role of the Cytoskeleton in the Pathogenesis of *Giardia*.** Current clinical microbiology reports, 2 (2015) 155-162.
7. CAPPARELLI, E. V., BRICKER-FORD, R., ROGERS, M. J., MCKERROW, J. H., REED, S. L. - **Phase I Clinical Trial Results of Auranofin, a Novel Antiparasitic Agent.** Antimicrobial agents and chemotherapy, 61 (2017).
8. AW, J. Y. H., CLARKE, N. E., MCCARTHY, J. S., TRAUB, R. J., AMARAL, S., HUQUE, M. H., ANDREWS, R. M., GRAY, D. J., CLEMENTS, A. C. A., NERY, S. V. - ***Giardia duodenalis***

infection in the context of a community-based deworming and water, sanitation and hygiene trial in Timor-Leste. Parasites & vectors, 12 (2019).

9. CASTILLO-VILLANUEVA, A., RUFINO-GONZÁLEZ, Y., MÉNDEZ, S. T., TORRES-ARROYO, A., PONCE-MACOTELA, M., MARTÍNEZ-GORDILLO, M. N., REYES-VIVAS, H., ORIA-HERNÁNDEZ, J. - **Disulfiram as a novel inactivator of Giardia lamblia triosephosphate isomerase with anti-giardial potential.** International journal for parasitology: Drugs and drug resistance, 7 (2017) 425-432.

10. ADAM, R. D. - **Biology of Giardia lamblia.** Clinical microbiology reviews, 14 (2001) 447-475.

11. BROWN, J. R., SCHWARTZ, C. L., HEUMANN, J. M., DAWSON, S. C., HOENGER, A. - **A Detailed Look at the Cytoskeletal Architecture of the Giardia lamblia Ventral Disc.** Journal of structural biology, 194 (2016) 38-48.

12. CHAGAS, C. R. F., GONZALEZ, I. H. L., SALGADO, P. A. B., RODRIGUES, B., RAMOS, P. L. - **Giardia Spp., Ten Years of Parasitological Data in the Biggest Zoo of Latin America.** Annals of Parasitology, 65 (2019) 35-51.

13. THOMPSON, R. C. A., ASH, A. - **Molecular epidemiology of Giardia and Cryptosporidium infections.** Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases, 40 (2016) 315-323.

14. MIDLEJ, V., PENHA, L., SILVA, R., SOUZA, W., BENCHIMOL, M. - **Mitosomal chaperone modulation during the life cycle of the pathogenic protist Giardia intestinalis.** European Journal of Cell Biology, 95 (2016) 531-542.

15. MA'AYEH, S. Y., LIU, J., PEIRASMAKI, D., HÖRNAEUS, K., LIND, S. B., 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 (2017).

16. HENNESSEY, K. M., SMITH, T. R., XU, J. W., ALAS, G. C. M., OJO, K. K., MERRITT, E. A., PAREDEZ, A. R. - **Identification and Validation of Small-Gatekeeper Kinases as Drug Targets in Giardia lamblia.** PLoS neglected tropical diseases, 10 (2016).

17. MENINGHER, T., BOLES LAVSKY, D., BARSHACK, I., TABIBIAN-KEISSAR, H., KOHEN, R., GUR-WAHNON, D., BEN-DOV, I. Z., SIDI, Y., AVNI, D., SCHWARTZ, E. - **Giardia Lamblia miRNAs as a New Diagnostic Tool for Human Giardiasis.** PLoS neglected tropical diseases, 13 (2019).

18. ABRAHAM, R. J., ABRAHAM, S., STEVENS, A. J., PAGE, S. W., MCCLUSKEY, A., TROTT, D. J., O'HANDLEY, R. M. - **Aminoguanidines: New leads for treatment of *Giardia duodenalis* infection.** International journal for parasitology. Drugs and drug resistance, 10 (2019) 38-44.
19. FINK, M. Y., SINGER, S. M. - **The Intersection of Immune Responses, Microbiota and Pathogenesis in Giardiasis.** Trends in parasitology, 33 (2017) 901-913.
20. WAMPFLER, P. B., TOSEVSKI, V., NANNI, P., SPYCHER, C., HEHL, A. B. - **Proteomics of Secretary and Endocytic Organelles in *Giardia lamblia*.** PloS one, 9 (2014).
21. KAYSER, F. H., BIENZ, K. A., ECKERT, J., ZINKERNAGEL, R. M. – **Medical Microbiology.** 1ª Edição. New York : Thieme, (2005). ISBN 1-58890-245-5
22. MÉNDEZ, S. T., CASTILLO-VILLANUEVA, A., MARTÍNEZ-MAYORGA, K., REYES-VIVAS, H., ORIA-HERNÁNDEZ, J. **Structure-based identification of a potential non-catalytic binding site for rational drug design in the fructose 1,6-biphosphate aldolase from *Giardia lamblia*.** Scientific reports, 9 (2019).
23. INFARMED. **Resumo das Características do Medicamento, Metronidazol Generis.** [Acedido a 25 de março de 2020]. Disponível na internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=634522&tipo_doc=rcm
24. INFARMED. **Resumo das Características do Medicamento, Zentel.** [Acedido a 25 de março de 2020]. Disponível na internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=9424&tipo_doc=rcm
25. INFARMED. **Resumo das Características do Medicamento, Pantelmin.** [Acedido a 25 de março de 2020]. Disponível na internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=6632&tipo_doc=rcm
26. GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ, F., PALOMO-LIGAS, L., HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, J. M., PÉREZ-RANGEL, A., AGUAYO-ORTIZ, R., HERNÁNDEZ-CAMPOS, A., CASTILLO, R., GONZÁLEZ-POZOS, S., CORTÉS-ZÁRATE, R., RAMÍREZ-HERRERA, M. A., MENDOZA-MAGAÑA, M. L., CASTILLO-ROMERO, A. - **Curcumin alters the cytoskeleton and microtubule organization on trophozoites of *Giardia lamblia*.** Acta Tropica, 172 (2017) 113-121.
27. MÜLLER, J., HEMPHILL, A., MÜLLER, N. - **Physiological aspects of nitro drug resistance in *Giardia lamblia*.** International journal for parasitology. Drugs and drug resistance, 8 (2018) 271-277.

28. ORDÓÑEZ-MENA, J. M., MCCARTHY, N. D., FANSHAW, T. R. - **Comparative efficacy of drugs for treating giardiasis: a systematic update of the literature and network meta-analysis of randomized clinical trials.** *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 73 (2018) 596-606.
29. CARTER, E. R., NABARRO, L. E., HEDLEY, L., CHIODINI, P. L. - **Nitroimidazole-refractory giardiasis: a growing problem requiring rational solutions.** *Clinical microbiology and infection*, 24 (2018) 37-42.
30. TWU, O., JOHNSON, P. J. - **Parasite Extracellular Vesicles: Mediators of Intercellular Communication.** *PLOS Pathogens*, 10 (2014).
31. FU, H., HU, D., ZHANG, L., TANG, P. - **Role of extracellular vesicles in rheumatoid arthritis.** *Molecular Immunology*, 93 (2018) 125-132.
32. SAMPAIO, N. G., CHENG, L., ERIKSSON, E. M. - **The role of extracellular vesicles in malaria biology and pathogenesis.** *Malaria Journal*, 16 (2017).
33. SCHOREY, J. S., CHENG, Y., SINGH, P. P., SMITH, V. L. - **Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions.** *EMBO reports*, 16 (2015) 24-43.
34. SZATANEK, R., BAJ-KRZYWORZEKA, M., ZIMOCZ, J., LEKKA, M., SIEDLAR, M., BARAN, J. - **The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization.** *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (2017).
35. COAKLEY, G., MAIZELS, R. M., BUCK, A. H. - **Exosomes and Other Extracellular Vesicles: The New Communicators in Parasite Infections.** *Trends in parasitology*, 31 (2015) 477-489.
36. BECKER, A., THAKUR, B. K., WEISS, J. M., KIM, H. S., PEINADO, H., LYDEN, D. - **Extracellular vesicles in cancer: cell-to-cell mediators of metastasis.** *Cancer cell*, 30 (2016) 836-848.
37. MOYANO, S., MUSSO, J., FELIZIANI, C., ZAMPONI, N., FRONTERA, L. S., ROPOLO, A. S., LANFREDI-RANGEL, A., LALLE, M., TOUZ, M. C. - **Exosome Biogenesis in the Protozoa Parasite *Giardia lamblia*: A Model of Reduced Interorganellar Crosstalk.** *Cells*, 8 (2019).
38. DONG, G., FILHO, A. L., OLIVIER, M. - **Modulation of Host-Pathogen Communication by Extracellular Vesicles (EVs) of the Protozoan Parasite *Leishmania*.** *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9 (2019).

39. MERCHANT, M. L., ROOD, I. M., DEEGENS, J. K. J., KLEIN, J. B. - **Isolation and characterization of urinary extracellular vesicles: implications for biomarker discovery.** *Nature Reviews Nephrology*, 13 (2017) 731-749.
40. LENER, T., GIMONA, M., AIGNER, L., BÖRGER, V., BUZAS, E., CAMUSSI, G., CHAPUT, N., CHATTERJEE, D., COURT, F. A., DEL PORTILLO, H. A., O'DRISCOLL, L., FAIS, S., FALCON-PEREZ, J. M., FELDERHOFF-MUESER, U., FRAILE, L., GHO, Y. S., GÖRGENS, A., GUPTA, R. C., HENDRIX, A., HERMANN, D. M., HILL, A. F., HOCHBERG, F., HORN, P. A., DE KLEIJN, D., KORDELAS, L., KRAMER, B. W., KRÄMER-ALBERS, E. M., LANER-PLAMBERGER, S., LAITINEN, S., LEONARDI, T., LORENOWICZ, M. J., LIM, S. K., LÖTVALL, J., MAGUIRE, C. A., MARCILLA, A., NAZARENKO, I., OCHIYA, T., PATEL, T., PEDERSEN, S., POCSFALVI, G., PLUCHINO, S., QUESENBERRY, P., REISCHL, I. G., RIVERA, F. J., SANZENBACHER, R., SCHALLMOSER, K., SLAPER-CORTENBACH, I., STRUNK, D., TONN, T., VADER, P., VAN BALKOM, B. W. M., WAUBEN, M., ANDALOUSSI, S. E., THÉRY, C., ROHDE, E., GIEBEL, B. - **Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials – an ISEV position paper.** *Journal of extracellular vesicles*, 4 (2015).
41. WU, Z., WANG, L., LI, J.; WANG, L., WU, Z. - **Extracellular Vesicle-Mediated Communication Within Host-Parasite Interactions.** *Frontiers in Immunology*, 9 (2019) 1-16.
42. GAVINHO, B., ROSSI, I. V., EVANS-OSES, I., INAL, J., RAMIREZ, M. I. - **A New Landscape of Host-Protozoa Interactions Involving the Extracellular Vesicles World.** *Parasitology*, 145 (2018) 1521-1530.
43. OLMOS-ORTIZ, L. M., BARAJAS-MENDIOLA, M. A., BARRIOS-RODILES, M., CASTELLANO, L. E., ARIAS-NEGRETE, S., AVILA, E. E., CUÉLLAR-MATA, P. - **Trichomonas vaginalis exosome-like vesicles modify the cytokine profile and reduce inflammation in parasite-infected mice.** *Parasite Immunology*, 39 (2017).
44. BABATUNDE, K. A., MBAGWU, S., HERNÁNDEZ-CASTAÑEDA, M. A., ADAPA, S. R., WALCH, M., FILGUEIRA, L., FALQUET, L., JIANG, R. H. Y., GHIRAN, I., MANTEL, P. Y. - **Malaria infected red blood cells release small regulatory RNAs through extracellular vesicles.** *Scientific reports*, 8 (2018).
45. MENINGHER, T., LERMAN, G., REGEV-RUDZKI, N., GOLD, D., BEN-DOV, I. Z., SIDI, Y., AVNI, D., SCHWARTZ, E. - **Schistosomal MicroRNAs Isolated From Extracellular Vesicles in Sera of Infected Patients: A New Tool for Diagnosis and Follow-up of Human Schistosomiasis.** *The Journal of Infectious Diseases*, 215 (2017) 378-386.

46. KHOSRAVI, M., MIRSAMADI, E. S., MIRJALALI, H., ZALI, M. R. - **Isolation and Functions of Extracellular Vesicles Derived from Parasites: The Promise of a New Era in Immunotherapy, Vaccination, and Diagnosis.** International Journal of Nanomedicine, 15 (2020) 2957-2969.
47. KONRAD, C., SPYCHER, C., HEHL, A. B. - **Selective Condensation Drives Partitioning and Sequential Secretion of Cyst Wall Proteins in Differentiating Giardia lamblia.** PLoS pathogens, 6 (2010).
48. 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
49. MARTI, M., JOHNSON, P. J. - **Emerging roles for extracellular vesicles in parasitic infections.** Current Opinion in Microbiology, 32 (2016) 66-70.
50. VERDERIO, C., GABRIELLI, M., GIUSSANI, P. - **Role of sphingolipids in the biogenesis and biological activity of extracellular vesicles.** Journal of Lipid Research, 59 (2018) 1325-1340
51. EVANS-OSES, 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 (2017) 131-142.