



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Rosana Max da Costa Nogueira

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Exossomas como Sistemas de Entrega de Fármacos na Área da Oncologia” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, da Dra. Ivone Rebelo e do Professor Doutor João Nuno Moreira e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Fevereiro de 2021



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Rosana Max da Costa Nogueira

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Exossomas como Sistemas de Entrega de Fármacos na Área da Oncologia” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Ivone Rebelo e do Professor Doutor João Nuno Moreira e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Fevereiro de 2021

## Declaração de Autoria

Eu, Rosana Max da Costa Nogueira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2015225917, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Exossomas como Sistemas de Entrega de Fármacos na Área da Oncologia” 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, 8 de fevereiro de 2021.

Rosana Max da Costa Nogueira

(Rosana Max da Costa Nogueira)

## **Agradecimentos**

---

Aos meus pais, agradeço a oportunidade de frequentar o ensino universitário. Em especial, é à minha mãe, e ao meu irmão, a quem devo o meu maior e mais sincero obrigado, por serem o meu apoio, a minha força e por fazerem o possível e o impossível para que eu seja feliz.

À restante família e conhecidos, obrigada por quererem o meu êxito.

Agradeço também às minhas melhores amigas de universidade, Ângela Mendes e Catarina Diogo, que desde o início caminharam comigo e com as quais construí uma amizade genuína e inabalável.

Aos meus amigos próximos – Beatriz Matias, Eduardo Branco, Filipa Roque, Flávio Correia, João Pedro Batista, Sofia Peito – aos afilhados e todos os outros, estou profundamente agradecida pelos momentos partilhados.

À Sandrinha e ao Israel, obrigada por serem a minha família em Coimbra. Ainda, agradeço às minhas colegas de casa destes últimos dois anos por me acolherem tão bem e pela oportunidade de conhecer-vos melhor. Em particular, à Ana Isabel e à Rita Simões, pela ligação especial.

Estou profundamente agradecida a todo o pessoal docente e não docente por me guiarem ao longo destes cinco anos. Em especial, ao Professor Doutor João Nuno Moreira e à equipa da Farmácia Monte Formoso, pelo apoio incondicional nesta fase final do curso.

A todos, desejo felicidade, saúde e sucesso.

“My point is that you do not need me or anyone else around to bring this new kind of light in your life. It is simply waiting out there for you to grasp it, and all you have to do is reach for it. The only person you are fighting is yourself and your stubbornness to engage in new circumstances.”

— **Christopher McCandless**

## ÍNDICE

### RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA

Lista de Siglas e Acrónimos .....	8
Introdução.....	9
1. Farmácia Monte Formoso (FMF).....	10
2. Análise SWOT.....	11
2.1. Pontos Fortes.....	12
2.2. Pontos Fracos.....	13
2.3. Oportunidades .....	15
2.4. Ameaças .....	20
Conclusão .....	22
Bibliografia.....	23
Anexo I – Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados.....	25
Anexo II – Quadro KAIZEN™ .....	28
Anexo III – Caso Clínico I .....	29
Anexo IV – Caso Clínico II.....	30
Anexo V – Caso Clínico III.....	31

### EXOSSOMAS COMO SISTEMAS DE ENTREGA DE FÁRMACOS NA ÁREA DA ONCOLOGIA

Lista de Siglas e Acrónimos .....	33
Abstract .....	35
Resumo .....	36
Nota Introdutória .....	37
1. Contextualização Histórica .....	37
2. Família De EVs .....	38
2.1. EXOs: Características Gerais e Composição .....	39
2.2. EXOs: Heterogeneidade Dentro Da Subfamília.....	40
2.3. EXOs: Biogénese e Secreção.....	41
2.4. EXOs: Funções.....	44
2.5. EXOs: Potenciais Aplicações Clínicas.....	45
3. Exossomas Como Sistemas De Entrega De Fármacos (EXO-DDS) .....	45
3.1. Seleção Da Célula De Origem.....	46
3.2. Isolamento e Purificação Dos EXOs.....	47
3.3. Eleição Da Carga a Inserir Nos EXOs.....	49

3.4. <i>Loading</i> De Moléculas Terapêuticas Em EXO-DDS.....	50
3.4.1. <i>Loading</i> De Moléculas Terapêuticas <i>In Vitro</i> ( <i>Loading</i> Exógeno).....	50
3.4.2. <i>Loading</i> De Moléculas Terapêuticas <i>In Vivo</i> ( <i>Loading</i> Endógeno).....	53
3.5. Administração Dos EXO-DDS .....	54
4. EXO-DDS Na Área Da Oncologia.....	54
4.1. EXO-DDS No Cancro Do Pulmão.....	55
4.2. EXO-DDS No Cancro Da Mama .....	56
5. Codiak BioSciences.....	57
5.1. engEx™ Platform .....	57
5.2. <i>Pipeline</i> .....	58
Considerações Finais .....	60
Bibliografia.....	61

# Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

FARMÁCIA MONTE FORMOSO – COIMBRA

## Lista de Siglas e Acrónimos

---

<b>COVID-19</b>	do inglês, <i>Coronavirus Disease 2019</i>
<b>DCI</b>	Denominação Comum Internacional
<b>FFUC</b>	Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
<b>FMF</b>	Farmácia Monte Formoso
<b>LAF</b>	Linha de Apoio ao Farmacêutico
<b>MICF</b>	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
<b>PIM</b>	Preparação Individualizada da Medicação
<b>SNS</b>	Serviço Nacional de Saúde
<b>SWOT</b>	do inglês, <i>Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats</i>

## Introdução

---

No começo, o farmacêutico surgiu como o especialista do medicamento. Isto significaria que o seu foco primordial seria o medicamento e tornar-se-ia o principal responsável pela correta preparação e distribuição de medicamentos à comunidade. Contudo, deverá ser observada a excelente preparação a que este profissional é submetido. Na verdade, ao longo da sua formação, o farmacêutico é dotado de um conjunto de conhecimentos técnicos e científicos que o tornam num profissional extremamente capaz a um nível multidisciplinar. Portanto, o farmacêutico ganha também o título de agente de saúde pública, pois para além de promover a prevenção e a cura de patologias, incentiva à promoção da saúde e fomenta o bem-estar da população. Assim, realinha o seu foco no “cidadão em geral e no doente em particular”, tornando-se o medicamento um dos meios deste novo objetivo (1).

De um modo geral, o exercício da prática farmacêutica poderá fazer-se notar em diversas áreas: desde a Farmácia de Oficina, a Farmácia Hospitalar, a Indústria Farmacêutica e a Distribuição Grossista de Medicamentos até às vertentes de Análises Clínicas, Ensino e Investigação. Este largo espectro de atividade veio afirmar a posição do farmacêutico entre as restantes profissões de saúde e enfatizar o impactante papel que tem na sociedade.

A Farmácia Comunitária é o ramo mais representativo da profissão, pelo que se torna necessária a execução de um Estágio Curricular. Este traduz uma importante oportunidade para a aplicação das bases adquiridas ao longo do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF). Ainda, promove o desenvolvimento de capacidades, conhecimentos e técnicas características da experiência profissional, que, ultimamente, auxiliará à transição para o mercado de trabalho.

O presente relatório tem como base o estágio, por mim efetuado, na Farmácia Monte Formoso (FMF) e pretende destacar os pontos fundamentais dessa experiência sob a forma de uma análise SWOT (do inglês, *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*).

## **I. Farmácia Monte Formoso (FMF)**

---

A FMF encontra-se na Rua Cidade de Halle, Lote 7/9, cave esquerda, em Coimbra. Iniciou a sua atividade em 1982 com Propriedade e Direção Técnica de Dr. António Afonso Oliveira Ramos e designação social de Farmácia Oliveira Ramos. Posteriormente, em agosto de 2012, sofreu alteração de Propriedade para Elizabete Alves Lopes Baptista e Direção Técnica de Dr. Gilberto Gonçalo Luís Gaio. A 29 de novembro de 2012 passou a designar-se, oficialmente, Farmácia Monte Formoso.

Relativamente ao espaço, a FMF dispõe apenas de um piso, bastante amplo. Possui uma área de atendimento ao público, constituída por três balcões e três gabinetes, onde se prestam variados serviços farmacêuticos. Ainda, detém um armazém, um laboratório e uma área de gestão equipada com a biblioteca (que contém toda a documentação obrigatória e de recurso auxiliar à prática da função). Todos estes espaços são fulcrais para o funcionamento diário da FMF, que se encontra aberta de segunda a sexta-feira, das 9h às 20h, e sábado das 9h às 14h.

Com uma pequena equipa detentora de um vasto conhecimento técnico e científico, união e intercomunicação adequada, a FMF tem como foco principal o utente, promovendo a correta dispensa de medicamentos e produtos de saúde, complementado com o devido aconselhamento farmacêutico. Para além disso, presta diversos serviços: preparação de medicamentos manipulados, preparação individualizada da medicação, administração de vacinas e medicamentos injetáveis, determinação de parâmetros bioquímicos e fisiológicos, preparação de serviços *online*, organização de rastreios e participação em estudos e projetos de intervenção comunitária.

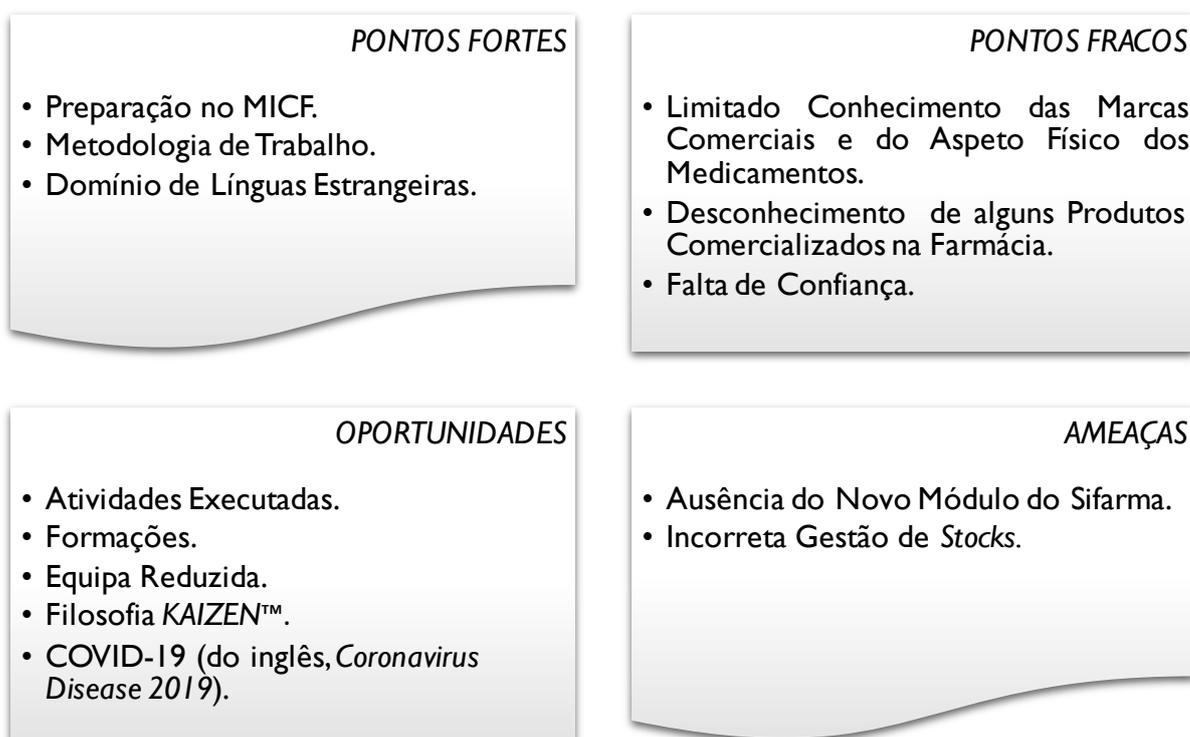
De 28 de maio de 2020 a 18 de setembro de 2020 realizei o meu estágio curricular na FMF, perfazendo um total de 670 horas, sob a orientação da Dra. Ivone Rebelo e acompanhada da restante equipa: Dr. Gilberto Gaio, Dra. Sara Pedro e Dr. Flávio Correia.

## 2. Análise SWOT

---

A análise SWOT é uma ferramenta frequentemente utilizada no mundo empresarial para efetuar uma avaliação e reflexão críticas. Segundo esta ordem de ideias, esta análise pode ser aplicada em contexto laboral, explorando os Pontos Fortes (*Strengths*) e os Pontos Fracos (*Weaknesses*) do desempenho de um determinado colaborador, dando-lhe a oportunidade de manter ou melhorar, respetivamente, as suas ações e atitudes para o alcance do sucesso. Ainda, esta ferramenta analisa as Oportunidades (*Opportunities*) e as Ameaças (*Threats*) de situações externas que, fora do controlo da pessoa, impulsionarão ou dificultarão o sucesso da sua atividade (2).

De seguida, inicio a análise SWOT propriamente dita, relativamente ao período em que realizei o meu estágio curricular na FMF. Os tópicos enumerados no Esquema I serão, posteriormente, explorados com mais detalhe.



**Esquema I – Análise SWOT relativa ao estágio na FMF.** O presente diagrama reúne, de um modo bastante organizado e sucinto, os resultados da análise SWOT do estágio na FMF.

## 2.1. Pontos Fortes

---

- PREPARAÇÃO NO MICF

Nestes cinco anos em que estudei na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), absorvi uma grande variedade de conhecimentos, não só científicos e técnicos, mas também sobre determinadas capacidades de interação com os diversos doentes e profissionais com os quais me irei cruzar no futuro.

No que diz respeito à vertente técnica e científica, vários conceitos estiveram presentes durante todos os momentos do meu estágio, tais como classes farmacoterapêuticas, mecanismos de ação, possíveis interações, contraindicações e precauções especiais de utilização, valores de parâmetros bioquímicos, noção breve do Sifarma 2000<sup>®</sup>, boas práticas laboratoriais, condições de armazenamento de medicamentos, entre outros.

Relativamente às *soft skills* desenvolvidas, apliquei o algoritmo de atendimento (identificar o doente e respetiva patologia, efetuar perguntas exploratórias, inquirir sobre o que já tomou e quais os seus problemas de saúde) e procurei dirigir-me adequadamente ao utente, em relação ao meu tom de voz e postura, de modo a transmitir as informações essenciais sobre o tratamento e medicamentos tomados ao doente, garantindo sempre que se sente confortável para esclarecer quaisquer dúvidas e para confiar nos seus profissionais de saúde. Pus em prática o pensamento lógico e raciocínio crítico perante as diversas situações que chegavam à farmácia e validei as prescrições com que me deparava, pondo à prova os meus conhecimentos e detetando algum tipo de erro.

Todas estas bases foram extremamente úteis para uma adaptação rápida à realidade do trabalho, para a preparação de respostas às diversas situações com que me deparei e, de um modo geral, estar mais confiante e ter sucesso na minha prestação.

- METODOLOGIA DE TRABALHO

Vários fatores inerentes à minha ética de trabalho contribuíram para o meu sucesso e destaque neste estágio. Desde já, a capacidade de rápida integração na dinâmica da equipa, que me permitiu estar mais à vontade, mais confiante e suportada pelos meus colegas, ao longos das tarefas que realizei. Ainda, a minha responsabilidade, capacidade de organização e atenção detalhada permitiram-me aprender rapidamente; pró-atividade e agilidade tornaram-me mais autónoma nas tarefas que realizei; curiosidade e empenho incitaram-me a estudar e melhorar continuamente as minhas capacidades.

Assim, dei à minha equipa a confiança de que poderiam contar comigo para participar nos seus esforços. Por isso, desde o início me integraram nas reuniões de equipa, onde diferentes formas de pensar ajudam a alcançar uma melhor solução para a situação dos pacientes. Comunicávamos entre todos informações importantes de novas circulares ou atualizações de situações específicas de utentes. Discutíamos intervenções de aconselhamento farmacêutico menos intuitivas e estratégias de marketing melhoradas. Deste modo, a equipa cresce em união, suportada por uma excelente capacidade de comunicação e apoio mútuos, promovendo o melhor serviço aos utentes da FMF.

- **DOMÍNIO DE LÍNGUAS ESTRANGEIRAS**

Saber comunicar com os utentes é um passo fulcral na nossa profissão. Devido ao facto da FMF se situar nos arredores da rodoviária e da estação de comboios Coimbra-B, a afluência de estrangeiros na FMF é considerável.

O facto de dominar outras línguas, como o inglês e o espanhol, permitiu-me atender utentes estrangeiros, que não sabiam a língua portuguesa, deixando-os à vontade para explicarem a sua situação mais confortavelmente. Assim, alcançava uma melhor adesão à terapêutica pois conseguia transmitir adequadamente as informações necessárias, explicando pormenorizadamente o que tinham a fazer, como tomar a medicação prescrita e quais os cuidados a ter. Para além disso, reforçava a boa imagem da FMF, onde esta classe de utentes poderia estabelecer um porto seguro para esclarecer as suas dúvidas e sentirem-se menos deslocados.

Este contacto com diferentes realidades requer uma constante adaptação e penso que demonstrei estar à altura destes requisitos.

## **2.2. Pontos Fracos**

---

Em diversas situações senti que não estava totalmente preparada para dar resposta ao utente de forma confiante e segura.

- **LIMITADO CONHECIMENTO DAS MARCAS COMERCIAIS E DO ASPETO FÍSICO DOS MEDICAMENTOS**

Durante o MICF, os professores procuram abordar os fármacos pela Denominação Comum Internacional (DCI), evitando referir as marcas comerciais. Esta metodologia não é descabida, mas lança-nos no campo de batalha desamparados.

Ainda, Portugal é um dos países com maior taxa de iliteracia em saúde (3). Consequentemente, muitas vezes o utente não sabe para que serve o medicamento em causa, confunde a sua função farmacológica, desconhece a diferença entre marca e genérico e não tem noção da variedade de medicamentos existentes ou mesmo da panóplia de empresas produtoras de medicamentos. Então, normalmente pede o que necessita por um nome mal pronunciado/escrito ou pede por cor e aspeto físico.

Ora, a deficiente comunicação entre mim e o utente, que por muitas vezes não conseguir fazer entender que medicamento necessitava, gerava constrangimento e dificultava o atendimento, principalmente no estado inicial do meu estágio curricular. Apesar disso, aprendi a contornar a situação, não só pela gradual aprendizagem das marcas comerciais e respetivos princípios ativos (pela visualização e contacto diário com os medicamentos) mas também pela familiarização com o utente e a sua histórica clínica.

- **DESCONHECIMENTO DE ALGUNS PRODUTOS COMERCIALIZADOS NA FARMÁCIA**

A farmácia dispõe de um vasto e diversificado catálogo de produtos passíveis de serem comercializados, muito para além de medicamentos. São exemplos os produtos das áreas da dermocosmética, beleza e higiene, material de penso e primeiros socorros, higiene oral, veterinária, puericultura, suplementação e dietética, entre outros. Nestas três últimas, o meu conhecimento era limitado, não só pelo desconhecimento da existência de certos produtos, mas também pela falta de familiarização com os produtos existentes em *stock* na FMF. Isto levou a alguns constrangimentos durante os atendimentos onde estes produtos me eram solicitados, pela dificuldade no aconselhamento e resposta às questões efetuadas pelos utentes.

A equipa da FMF foi indispensável para me guiar durante estes atendimentos, dotando-me com novos conhecimentos e diversas técnicas para ir ao encontro da solicitação do utente. Com esta lacuna encontrei um ponto em que poderia melhorar, e com a prática, consegui aprender a dar resposta neste tipo de situações, apesar de ainda haver muitos produtos que desconheço e que necessitam do meu empenho no seu estudo.

- **FALTA DE CONFIANÇA**

A noção de que ainda tenho um longo percurso a percorrer, onde necessito de aprofundar os meus conhecimentos em vários tópicos para exercer um aconselhamento farmacêutico adequado e, com isso, tornar-me numa boa profissional, e a incapacidade de lidar com utentes mais difíceis, trazem à superfície a minha insegurança na minha posição como agente promotor

da saúde. Ainda, os pontos fracos anteriormente enumerados culminaram, em certos momentos, na falta de confiança nas minhas capacidades e conhecimentos. Consequentemente revelava falta de autonomia em atendimentos mais complicados, necessitando da intervenção/confirmação por parte dos farmacêuticos da equipa, tanto para alívio da minha consciência (de que fiz um bom trabalho), como para o alívio do utente, que vai para casa seguro das informações que lhe transmitiram.

Contudo, não querendo deixar os utentes inseguros com um atendimento constrangido, e apoiando-me na relação forte que estabeleci com os farmacêuticos da FMF, tentei colocar-me fora da minha zona de conforto, aventurando-me em atendimentos tanto quanto possível, de forma a reunir as ferramentas necessárias para transformar este ponto fraco num ponto forte.

### **2.3. Oportunidades**

---

- **ATIVIDADES EXECUTADAS**

Iniciei a minha atividade na conferência e receção de encomendas, e conseqüente arrumação dos respetivos produtos, o que permitiu fortalecer a minha familiarização com os medicamentos e produtos de saúde, o Sifarma 2000<sup>®</sup>, o espaço da farmácia e o modo de operação da FMF. Também participei em tarefas fundamentais ao bom funcionamento do serviço farmacêutico, como a gestão de *stocks* e validades e a realização de inventários.

Com o ganho de autonomia, experiência e integração na equipa, pude executar o aconselhamento farmacêutico e a dispensa de medicamentos e produtos de saúde, a preparação de encomendas *online*, a gestão de reservas, a gestão de devoluções, a realização de encomendas instantâneas e o contacto telefónico com armazenistas, fornecedores e utentes. Ainda, pude participar em atividades de maior responsabilidade como a verificação do receituário, a faturação no fim de cada mês e o fecho de caixa no fim de cada dia.

No que diz respeito à prestação de serviços, colaborei no Acompanhamento do Pé Diabético e Nutrição e na medição de parâmetros diversos, tais como pressão arterial, frequência cardíaca, glicémia, colesterol total e triglicéridos. Este tipo de intervenções permite, ao farmacêutico, um cuidado mais atento aos seus utentes, avaliando a eficácia e adesão terapêuticas. Ainda, possibilitam a deteção de qualquer sinal e/ou sintoma alarmante e a prestação de um aconselhamento adequado em cada situação, quer através de cuidados não farmacológicos, quer no encaminhamento para o médico sempre que necessário. O objetivo final será assegurar o bem-estar do utente e garantir que este conhece e sabe gerir a sua patologia.

Também tive a oportunidade de acompanhar a Preparação Individualizada da Medicação (PIM), serviço que consiste na organização, num dispositivo com distintos compartimentos, das formas farmacêuticas sólidas orais apenas, de acordo com a posologia prescrita. Destinado a utentes em que se verifica uma não adesão não intencional, com origem em diversas situações (utentes que possuem esquemas terapêuticos complexos; utentes polimedicados de forma crónica; utentes com dificuldades cognitivas ou baixa autonomia, entre outros), procura, juntamente com a transmissão da informação adequada – escrita/pictogramas e oralmente –, a melhoria da adesão terapêutica e a utilização correta e racional do medicamento por parte desses utentes (4). Durante esta atividade pude familiarizar-me com o protocolo da PIM, constatando a importância da revisão da medicação aquando cada preparação, com o objetivo de detetar e prevenir interações medicamento-medicamento/alimento/suplemento, duplicações terapêuticas, incorreta dose ou posologia, inadequação terapêutica e necessidade terapêutica. Ainda, reconheci o valor de uma boa articulação entre o farmacêutico e os profissionais de saúde. Por exemplo, se o médico prescriptor realizar alterações na medicação de um determinado utente, esta deve ser imediatamente comunicada ao farmacêutico, para que a implementação deste serviço continue a ser efetiva.

Igualmente, pude auxiliar na Preparação de Medicamentos Manipulados<sup>1</sup>, uma vez que, em determinadas situações, o médico prescriptor prefere formulações que não existem no mercado para uma melhor adequação ao perfil fisiopatológico do utente. Colaborei na preparação, embalagem e rotulagem de alguns preparados officinais (**Anexo I**), praticando as minhas habilidades laboratoriais e relembrando as Boas Práticas de Laboratório. Além disso, aprendi a preencher as fichas de preparação dos medicamentos manipulados preparados, incluindo o cálculo do respetivo preço e observei o modo de gestão das matérias-primas e materiais de acondicionamento.

Relativamente a um universo bastante restrito de utentes que habitualmente se dirigem às farmácias, pude contactar com alguns utentes ostomizados e, portanto, colocar em prática os conhecimentos transmitidos pela Dra. Isabel Luz na unidade curricular de Indicação Farmacêutica. Na FMF, para além de prestarmos o serviço de cortar as placas de ostomia desses utentes, demonstramo-nos aptos para aconselhar sobre cada produto, sobre o estoma e a pele peri-estoma e sobre os cuidados a ter na alimentação e medicamentos. Além disso, mostramo-nos disponíveis a responder a qualquer dúvida do utente ou cuidador, num espaço mais reservado e onde se sentem mais seguros e menos vulneráveis, com referência a um

---

<sup>1</sup> “qualquer fórmula magistral ou preparado officinal preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico” (11).

profissional de saúde sempre que necessário. Atualmente estima-se que o número de pessoas ostomizadas ronda os 20 mil doentes a nível nacional (5), e a maioria sente-se estigmatizada, marginalizando-se da sociedade pela sua condição de saúde. É nossa função apoiá-los e fazê-los sentir parte de uma comunidade, referenciando-os para apoio psicológico ou associações de doentes ostomizados quando necessário.

No início do meu estágio curricular na FMF, pude ainda presenciar o funcionamento da Operação Luz Verde, que surgiu aquando a primeira vaga de COVID-19 em Portugal, e que permitiu a dispensa gratuita, através das farmácias comunitárias, de medicamentos de dispensa exclusiva em farmácia hospitalar. O objetivo deste serviço seria garantir a continuidade terapêutica destes utentes sem comprometimento da sua saúde, pois ao serem utentes mais fragilizados estaria a colocar-se em risco todas as vezes que se dirigissem às unidades de saúde durante esta pandemia. Ainda, foi uma forma de diminuir potenciais situações de contágio e auxiliar as forças hospitalares a focarem-se na fase difícil que o nosso país atravessava nos meses de abril e maio. Assim, pude observar o protocolo onde o farmacêutico responsável contactava o utente, que no nosso caso se dirigia à FMF, e lhe dispensava a respetiva medicação, de um modo adequado e confidencial. Ainda, acompanhei o registo informático e a comunicação à Linha de Apoio ao Farmacêutico (LAF) para notificação aos hospitais (6,7).

Já na fase final do estágio tive a oportunidade de presenciar a administração de medicamentos injetáveis, uma vez que a pandemia se encontrava num estado mais controlado. Assim, observei como se procedia ao registo da administração de medicamentos injetáveis no Sifarma 2000® e testemunhei como se procedia, desde que o utente entrava no gabinete até à sua saída: iniciar com um conjunto de questões antes da administração para averiguar algum tipo de reação alérgica e o estado geral do utente no momento, técnicas e cuidados na preparação, regras gerais na administração de vacinas, cuidados pós administração, nomeadamente a preparação para agir em caso de reação anafilática. Por último, fui sensibilizada para a importância de fomentar a autoavaliação do utente, a autogestão de reações adversas menores e a relevância de relatar problemas mais graves.

Por último, e a título de curiosidade, auxiliiei na recolha de dados para um estudo interno com termohigrómetros, com o objetivo de monitorizar a temperatura e humidade dos espaços da farmácia, de modo a garantir um ambiente ótimo ao armazenamento dos medicamentos e produtos de saúde.

Foram várias as tarefas e serviços executados ao longo do meu período de estágio na FMF que, por um lado, me providenciaram uma visão real, não só do funcionamento de uma farmácia, mas também do trabalho multidisciplinar de um farmacêutico. Por outro,

prepararam-me com variados conhecimentos e competências a nível profissional, para além de reforçarem a minha autonomia, espírito de equipa, pró-atividade e responsabilidade. No fundo, todas estas atividades foram realmente oportunidades para me deixarem melhor preparada para a minha futura vida profissional.

- **FORMAÇÕES**

A FMF é bastante proactiva na contínua preparação dos seus colaboradores, pelo que tive a oportunidade de assistir a algumas formações. Tendo em mente o atual estado pandémico (COVID-19), apenas uma dessas palestras foi presencial, lecionada por uma delegada de informação médica sobre oxigenoterapia. Não obstante, participei virtualmente, em duas formações, uma sobre a importância do sono e outra relativa a um produto destinado às onicomicoses. Complementarmente, tive acesso a diversas formações em formato físico, circulares e protocolos sobre inaladores em doenças pulmonares, produtos auditivos, produtos de higiene íntima, protocolos de preparação para o procedimento de colonoscopia, informações sobre a urticária crónica espontânea. Estas informações adicionais foram muito importantes para o enriquecimento dos meus conhecimentos e melhorar a minha prestação no aconselhamento farmacêutico.

A nossa profissão exige uma atualização contínua dos nossos conhecimentos e capacidades, pois a área da saúde está em constante evolução. Para tal, é importante a manutenção deste hábito, investindo na inscrição nos mais variados cursos e formações destinadas a melhorar o nosso serviço farmacêutico.

- **EQUIPA REDUZIDA**

O facto de a FMF ser composta por uma equipa pequena – e de apenas aceitar um a dois estagiários simultaneamente – torna-se numa oportunidade. A FMF depositou em mim uma forte confiança, integrando-me nas suas atividades como colaboradora da equipa.

A elevada união e espírito de equipa da FMF, juntamente com raciocínio e foco mútuos, permitem o estabelecimento de uma forte comunicação entre os seus membros. Esta comunicação é fulcral para o correto funcionamento das atividades farmacêuticas e um bom ambiente de trabalho. Isto transparece para os utentes uma forte imagem de confiança.

A mesma forma de trabalhar entre os diferentes farmacêuticos e o facto de ser a única estagiária na grande maioria do meu período de estágio, permitiu-me ter um ensino contínuo coerente, evoluindo mais rapidamente as minhas competências. Além disso, motivou-me a

aprender mais e a desenvolver autonomia, pois tinha mais oportunidade de exercer variadas funções por não ter outro colega com quem as partilhar.

- FILOSOFIA KAIZEN™

“KAIZEN™ é reconhecido mundialmente como um pilar importante da estratégia competitiva de longo prazo de uma organização” (8). No caso particular da FMF, a implementação desta filosofia pretende, com o contributo de todos os membros da equipa, criar um conjunto de hábitos e sistemas que permitam a otimização do funcionamento da farmácia e, conseqüentemente, do serviço farmacêutico. O objetivo é alcançar um estado de melhoria contínua para dedicar o máximo do tempo e recursos aos utentes.

Exemplificando, a FMF possui um armário com o *top* 10 de medicamentos mais vendidos junto da zona do balcão, de modo a minimizar o tempo de recolha da medicação necessária ao utente. Esta prática não só torna o atendimento mais rápido como também o torna mais eficaz, pois dedicamos mais tempo ao utente para o aconselhamento e o esclarecimento de qualquer dúvida.

Um outro exemplo da implementação da filosofia KAIZEN™ é a delegação das tarefas semanais e mensais pelos distintos colaboradores, resumidas num quadro presente na zona de gestão (**Anexo II**). Este quadro é organizado por cores para melhorar a perceção do estado de conclusão dessas mesmas tarefas. Ainda, cada colaborador tem um segundo responsável, caso o primeiro esteja ausente e, assim, não haja falha no sistema. Estas posições sofrem rotação pois é fulcral que todos os colaboradores saibam realizar todas as tarefas.

Além disso, a equipa da FMF procura realizar, sempre que possível, reuniões diárias. Nelas, pretendem transmitir todas as informações importantes e necessárias a um trabalho coerente, desde a transmissão de recados, trespasse de tarefas entre diferentes turnos, comunicação de alertas relativamente a atualizações ou a situações de utentes, conhecimento das campanhas em vigor e discussão dos objetivos mensais e respetivas estratégias para alcançá-los.

O testemunho da efetivação da filosofia KAIZEN™ despoletou em mim o exercício do espírito de equipa, comunicação, discussão de ideias e esforço conjunto em prol do mesmo objetivo, sendo uma mais-valia no meu estágio.

- COVID-19

Apesar de a pandemia ter provocado imensos efeitos negativos em distintas áreas, não podemos deixar de retirar, desta experiência, aspetos positivos.

Por um lado, colocou à prova a nossa capacidade de adaptação e reinvenção. Os farmacêuticos não baixaram os braços nem se renderam perante a adversidade, arranjando soluções para continuar a fazer mais pelos seus utentes e não os deixar prejudicados numa altura de maior necessidade. Exemplos disso são os atendimentos pelo postigo ou limitação do número de utentes na farmácia com as precauções necessárias, entregas ao domicílio aos utentes de maior risco e/ou infetados, investimento na prestação dos serviços farmacêuticos através de plataformas *online*, por *email* ou telefone, entre muitas outras intervenções.

Por outro lado, reforçou a ideia de que o farmacêutico tem um papel fundamental na prestação de cuidados de saúde e que poderá ser um grande aliado do Serviço Nacional de Saúde (SNS). Pelo contacto próximo que tem junto da população, o farmacêutico demonstrou ser relevante na disseminação de informação fidedigna sobre a pandemia, no ensino da correta utilização da máscara e na sensibilização para os hábitos de etiqueta respiratória. Ainda, é de destacar a distinta colaboração entre médicos e farmacêuticos no sucesso da Operação Luz Verde, mencionada anteriormente, que “Com apenas um mês de atividade, prestou assistência a um total de 8.306 utentes, envolvendo 1.980 farmácias comunitárias, 33 serviços farmacêuticos hospitalares e 15 associações de doentes” (9), sendo distinguida com o Prémio Saúde Sustentável 2020 (10). Mais ainda, os farmacêuticos portugueses proclamam, desde o início, a disponibilidade imediata para o auxílio à administração da vacina contra a COVID-19.

#### **2.4. Ameaças**

---

- **AUSÊNCIA DO NOVO MÓDULO DO SIFARMA**

O Sifarma é um dos programas informáticos utilizado nas farmácias para exercerem as suas funções. De momento estão a funcionar duas versões: o Sifarma 2000® e o Novo Módulo de Atendimento que ainda se encontra em desenvolvimento mas já em experimentação nas farmácias aderentes.

Durante este estágio familiarizei-me apenas com o Sifarma 2000® nas diversas tarefas que realizei. Por isso, acredito que, por não ter tido contacto com o novo módulo, que consta ser mais intuitivo mas suficientemente diferente para necessitar de algum treino, me coloca em desvantagem perante os colegas que já o utilizaram, uma vez que quando iniciar a minha carreira farmacêutica levarei o meu tempo a adaptar-me ao novo *layout*.

De forma a colmatar esta desvantagem, inscrevi-me no curso de iniciação ao Novo Módulo de Atendimento promovido pela Escola de Pós-Graduação em Saúde e Gestão, concluído em abril de 2020.

- INCORRETA GESTÃO DE STOCKS

A gestão de *stocks* é um passo fundamental para o bom funcionamento da farmácia. Deve ser muito criteriosa pois existem muitos medicamentos com o mesmo princípio ativo no mercado. O *stock* deve conter o mínimo de medicamentos possível, para garantir a rotatividade do produto, mas em quantidade suficiente para satisfazer as necessidades dos utentes.

Na FMF deparei-me com duas situações que traduziam uma má gestão dos *stocks*. Por um lado, um número insuficiente de determinados medicamentos e produtos de saúde. Diariamente havia utentes que não conseguiam levar para casa a medicação necessária para a manutenção da sua saúde. Por outro lado, a existência de *stocks* errados, estando indicado no Sifarma 2000® um número distinto da contagem física. Estas situações tornam o atendimento desconfortável e caótico, havendo utentes extremamente insatisfeitos.

Pessoalmente, tive utentes inseguros e duvidosos das minhas capacidades pois acreditavam que seria falha da minha parte, quando os informava, erradamente, que tinha o produto solicitado disponível, não o tendo, afinal. Tal resultava, uma vez mais, no constrangimento do atendimento e insegurança por parte do utente. Contudo foi uma boa oportunidade para desenvolver uma melhor capacidade de comunicação.

## Conclusão

---

O Estágio Curricular é uma vertente necessária do MICF. Ao longo da nossa formação vamos arrecadando um conjunto abrangente de vários conhecimentos, mas estes só poderão ser de valor se os soubermos aplicar num contexto prático.

Durante o meu tempo na FMF vivi momentos de orgulho por saber aplicar os meus conhecimentos, momentos de decepção por me sentir impotente, umas vezes em simultâneo, outras em alternância. A transição para o mercado de trabalho é assustadora, uma vez que rapidamente nos sentimos desamparados. É por isso que esta oportunidade existe, para ser a nossa “bicicleta com rodinhas”.

Com a realização do estágio na FMF pude construir uma visão real da dinâmica de uma farmácia e, com isso, refletir se será nesta área que quero tornar visível a minha presença. Ora, o segundo ensinamento é que o estágio serve para “testar as águas”, providenciando-nos com uma ideia geral de uma (ou algumas) das diversas componentes que constituem o universo de atuação do farmacêutico.

Por último, todas as atividades e situações em que me envolvi na FMF ofereceram-me competências e conhecimentos específicos da experiência profissional, que serão a base para o crescimento e desenvolvimento da minha carreira farmacêutica. Contudo, não menos importante, o Estágio Curricular é, acima de tudo, um momento de reflexão. O farmacêutico tem um papel excecional e insubstituível na sociedade, mas para dar o seu melhor, tem de ser o seu melhor. Ao ser estagiária na FMF e, com os seus farmacêuticos, formar uma equipa, pude reconhecer não só os meus pontos fortes, mas principalmente os meus pontos fracos, as minhas falhas e inseguranças. Fez-me reconhecer que tenho um longo caminho a percorrer, tanto como cidadã, como profissional. No futuro, espero poder abordar estes aspetos com uma mentalidade de crescimento, onde os insucessos têm potencial de se tornarem sucessos, para que possa transformar-me, gradualmente, na melhor versão de mim mesma e, conseqüentemente, tornar-me numa farmacêutica consciente e ativa.

Na FMF pude experimentar, errar, aprender, aplicar, conseguir. Tive uma experiência bastante proveitosa, rodeada por uma equipa exemplar à qual estou verdadeiramente grata.

## Bibliografia

---

- (1) PITA, J.R., BELL, V. – **A Farmácia em Portugal nos Últimos 30 Anos: algumas reflexões sobre a farmácia de oficina ou comunitária.** Debater a Europa. (2016) 197–215
- (2) VLADOS, C. – **On a Correlative and Evolutionary SWOT Analysis.** Journal of Strategy and Management. 12, 3. (2019) 347–363
- (3) PEDRO A. R., AMARAL O., ESCOLVAL A. – **Literacia em saúde, dos dados à ação: tradução, validação e aplicação do Health Literacy Survey em Portugal.** Revista portuguesa de saúde pública. 34, 3 (2016) 259–275
- (4) ORDEM DOS FARMACÊUTICOS. – **Norma Geral – Preparação Individualizada da Medicação (PIM).** N° 30–NGE–00–010–02. (2018): (1–21). (s.d.). [Acedido a 29 de janeiro de 2021]. Disponível em: [https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/norma\\_pim\\_vfinal\\_30\\_nge\\_00\\_010\\_02\\_1834827175bf58d479434f.pdf](https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/norma_pim_vfinal_30_nge_00_010_02_1834827175bf58d479434f.pdf)
- (5) ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DE OSTOMIZADOS. – **A Associação Portuguesa de Ostomizados.** (s.d.). [Acedido a 30 de janeiro de 2021]. Disponível em: <https://www.apostomizados.pt/pt/content/2-associacao/13-apo>
- (6) ORDEM DOS MÉDICOS. – **“Operação Luz Verde”: medicamentos hospitalares vão chegar de forma mais fácil aos doentes.** (s.d.). [Acedido a 27 de janeiro de 2021]. Disponível em: <https://ordemdosmedicos.pt/operacao-luz-verde-medicamentos-hospitalares-va-chegar-de-forma-mais-facil-aos-doentes/>
- (7) ORDEM DOS FARMACÊUTICOS. – **Questões frequentes sobre a entrega de medicamentos hospitalares.** (s.d.). [Acedido a 27 de janeiro de 2021]. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/noticias/questoes-frequentes-sobre-a-entrega-de-medicamentos-hospitalares/>
- (8) KAIZEN INSTITUTE. – **O que é KAIZEN™.** (s.d.). [Acedido a 29 de janeiro de 2021]. Disponível em: <https://pt.kaizen.com/o-que-e-kaizen.html>
- (9) ORDEM DOS FARMACÊUTICOS. – **Operação Luz Verde chegou a mais de oito mil doentes.** (s.d.). [Acedido a 27 de janeiro de 2021]. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/noticias/operacao-luz-verde-chegou-a-mais-de-oito-mil-doentes/>
- (10) FERNANDES, I. – **Dispensa de medicamentos hospitalares nas farmácias premiado.** (s.d.). Revista Saúde. [Acedido a 30 de janeiro de 2021]. Disponível em:

<https://www.revistasauda.pt/noticias/Pages/Projecto-de-dispensa-de-medicamentos-hospitalares-nas-farmacias-premiado.aspx>

(11) MINISTÉRIO DA SAÚDE. – **Portaria N°594/2004, de 2 de junho** – Diário da República n° 129/2004, 1ª Série B de 2004–06–02. n° 594. (2004): (3441–3445). (s.d.). [Acedido a 30 de janeiro de 2021]. Disponível em: [http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/portaria\\_594-2004.pdf/d8b8cac3-3250-4d05-b44b-51c5f43b601a](http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/portaria_594-2004.pdf/d8b8cac3-3250-4d05-b44b-51c5f43b601a)

(12) INFARMED. – **Resumo das Características do Medicamento – Otoceril**. (s.d.). [Acedido a 4 de janeiro de 2021]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>

# Anexo I – Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados

FARMÁCIA MONTE FORMOSO

Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados

Página 1 de 3

Medicamento: Vaselina e enxofre a 7%

Por em substância(s) ativa(s): 100 g (ml ou unidades) contém 7 g (ml) de enxofre

Data de preparação: 16/06/2020

Forma farmacéutica: Pomada

Quantidade a preparar: 100 g

Numero do lote: 007/20

Matérias-primas	Lote nº	Origem	Farmacopeia	Quantidade para 100 g (ou ml, ou unidades)	Quantidade calculada	Quantidade pesada	Rubrica do Operador e data	Rubrica do Supervisor e data
Vaselina sólida	12-086511	Labchem		93	93 g	93,342 g	 16/06/2020	 16/6/20
Enxofre	13998	JMS		7	7 g	7,039 g	 16/06/2020	 16/6/20

Preparação	Rubrica do Operador
Limpar o material e álcool a 70°	
Pesar as matérias-primas	
Pulverizar o enxofre em almofariz de porcelana	
Incorporar aos pesos, por espatulação, o enxofre na vaselina sólida	
Espatular até obter uma pomada com aspeto homogêneo.	
Colocar em bolar de plástico adequada e rotular	
Limpar e assumar o material.	

**Embalagem**

Tipo de embalagem: Bolão de plástico

Capacidade do recipiente: 100 g

Material de embalagem	Nº do lote	Origem
<u>Caixa plástica</u>		<u>Plural</u>

Operador: 

de utilização e Condições de conservação

Condições de conservação:

Conservar à temperatura ambiente.

Operador: @

Prazo de utilização:

1 mês após preparação.

Operador: @

Inspeção

ENSAIO	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADO	Rubrica do Operador
Cor	Amarilla	Conforme	@
Odor	Característico do xuxufe	Conforme	@
Aspetto	Homogéneo	Conforme	@

Aprovado

Rejeitado

Supervisor: [Assinatura]

16/6/20

Nome, morada e telefone do doente

[Redacted]

Nome do prescriptor

[Redacted]

Observações

[Redacted]



## Anexo II – Quadro KAIZEN™

**Top Right List:**

- 1) Cascares - Quase 20%
- 2) Cascares - 20%
- 3) Papeles Esplotados!
- 4) O que é...?
- 5) Problemas de Saúde!

**Top Center:** A Família de Saúde Portuguesa é uma comunidade que junta de qualidade a nível de serviços (qualidade, com mais eficiência)

**Top Left:**

- Panela grupo - 36 (5/2021)
- Panela 84 → 49 (5/2021)

**Center:** Área de comunicação

**Right Side:** Foco (grid of blue and red sticky notes)

**Bottom Right:** Recados

**Bottom Left:** Grid of sticky notes with names: SARA, FIDEL, FLÁVIO, FIDEL.

**Bottom Center:**

- → →
- James
- Michael
- Blip

**Bottom Right (Recados):**

- Sobre de casa...
- Calha 640
- Arroz
- Liga Superde Serviço + vida

### **Anexo III – Caso Clínico I**

Utente idosa, fidelizada na FMF há muitos anos. Entra na farmácia para efetuar o levantamento de uma unidade de Clonazepam, fármaco que toma habitualmente para a auxiliar a dormir.

Aquando o acesso à receita eletrónica no Sifarma 2000<sup>®</sup>, reparo que o que se encontra prescrito é Clonazepam de 2 mg. Comparando com o histórico de vendas em nome da utente, deteto que costuma ser-lhe prescrito Clonazepam 0,5 mg. Perante este dilema, questiono a utente, com termos leigos, se sabe qual a dosagem que costuma fazer e qual a dose. Em resposta, refere que habitualmente leva o Clonazepam 0,5 mg e que toma dois comprimidos ao deitar. Ao aceder à receita da última venda, verifico que o que a utente diz é verdade. Questiono, então, se o médico prescritor sugeriu alguma alteração durante a consulta. A utente declara que não, que era apenas uma consulta para adquirir uma nova receita. Acrescenta que a consulta foi por telefone (recordar que esta situação ocorreu durante a pandemia), que “o médico perguntou quanto tomava e eu disse-lhe dois”. Portanto, há evidências de que o médico se poderá ter equivocado, pois ao questionar de forma aberta sobre a dosagem a utente interpretou como o número de comprimidos.

A fim de esclarecer a situação, contactámos o médico prescritor. O mesmo confirma a existência de um lapso no sistema, reenviando outra receita à utente, agora correta. Assim, pudemos prosseguir com a cedência da dosagem correta à utente.

Este caso salienta a o papel fulcral do farmacêutico no acompanhamento atento aos utentes e destaca a importância de uma boa interligação entre os diferentes profissionais de saúde.

## Anexo IV – Caso Clínico II

Em meados de agosto, um rapaz adolescente, acompanhado pelo fisioterapeuta do clube ao qual pertence, entra na farmácia para obter “algo” para o seu olho.

À primeira vista é notório o evidente edema do olho direito, já com uma certa dificuldade em abri-lo. Ao pedir para observar o olho mais de perto, denota-se o início da formação de pequenas vesículas tanto na pálpebra superior como na pálpebra inferior, sem sinal de vermelhidão da córnea. Olho esquerdo sem sinais de infeção.

Questionado se experiencia dor, fotossensibilidade, lacrimejo, excreção de fluidos, alterações na visão, apenas responde afirmativamente à primeira opção. Ainda, pergunto se tem alguma outra sintomatologia, se tomou ou utilizou algo que não é habitual, se já teve algo semelhante e se mais algum colega de equipa foi afetado. O rapaz responde que não, que “não sabe como aconteceu”. O fisioterapeuta acrescenta que evoluiu de forma rápida, daí a sua preocupação em pedir uma opinião.

O simples facto de existir dor numa afeção ocular implica o encaminhamento para o médico. Portanto, e com o conhecimento da farmacêutica, redirecionámos o utente para as urgências, para o correto diagnóstico e tratamento imediato. Não lhe dispensámos nenhum produto para alívio do edema ou da dor, com o intuito de evitar mascarar os sinais e sintomas, e conseqüente influência do diagnóstico.

### **Anexo V – Caso Clínico III**

Utente entra na farmácia, queixando-se de sentir o ouvido entupido e, por isso, não ouve muito bem. Ao ser questionada se é só num ouvido, responde que sim. Ainda, nega qualquer dor ou libertação de fluidos. Observando a orelha, não aparenta sinais de vermelhidão, edema ou afeção cutânea.

Aconselho um produto que auxilia a remoção do cerúmen, com a indicação de colocar 3 a 5 gotas por dia, durante 2 a 5 dias. Relativamente à administração, recomendo amornar o produto com as mãos antes da aplicação e manter a cabeça inclinada após a instilação das gotas. Ainda, no fim deverá tapar o canal auditivo com um pouco de algodão embebido em vaselina (12). Antes de finalizar o atendimento, sugiro que marque uma consulta com o seu médico, caso não observe melhoras após a aplicação do produto que leva consigo durante o tempo recomendado.

Utente regressa uns dias depois, agradecendo a amabilidade e atenção prestadas, informando que a sintomatologia experienciada tinha passado e, portanto, já se encontrava bem.

Exossomas como Sistemas  
de Entrega de Fármacos  
na Área da Oncologia

MONOGRAFIA

## Lista de Siglas e Acrônimos

---

<b>ALIX</b>	do inglês, <i>Programmed Cell Death-6 Interacting Protein</i>
<b>APC</b>	Célula Apresentadora de Antígenos – do inglês, <i>Antigen Presenting Cell</i>
<b>BASP-I</b>	do inglês, <i>Brain Acid Soluble Protein I</i>
<b>BHE</b>	Barreira Hematoencefálica
<b>DDS</b>	Sistema de Entrega de Fármacos – do inglês, <i>Drug Delivery Systems</i>
<b>ESCRT</b>	do inglês, <i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
<b>ESE</b>	Endossomas Primários – do inglês, <i>Early-Sorting Endosome</i>
<b>EVs</b>	Vesículas Extracelulares
<b>EXO-DDS</b>	Exossomas como Sistemas de Entrega de Fármacos
<b>EXOs</b>	Exossomas
<b>HER2</b>	do inglês, <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
<b>ILVs</b>	Vesículas Intraluminais – do inglês, <i>Intraluminal Vesicles</i>
<b>iRNAs</b>	do inglês, <i>Interfering Ribonucleic Acids</i>
<b>ISEV</b>	Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares – do inglês, <i>International Society of Extracellular Vesicles</i>
<b>IEVs</b>	Vesículas Extracelulares de Maiores Dimensões – do inglês, <i>large Extracellular Vesicles</i>
<b>LSE</b>	Endossomas Secundários – do inglês, <i>Late-Sorting Endosome</i>
<b>miRNA</b>	Micro RNA
<b>MVBs</b>	Corpos Multivesiculares – do inglês, <i>Multivesicle Bodies</i>
<b>NEDD4</b>	do inglês, <i>Neuronal Precursor Cell-Expressed Developmentally Downregulated 4</i>
<b>PTGFRN</b>	do inglês, <i>Prostaglandin F2 Receptor Inhibitor</i>
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>sEVs</b>	Vesículas Extracelulares de Menores Dimensões – do inglês, <i>small Extracellular Vesicles</i>
<b>shRNAs</b>	do inglês, <i>Short hairpin Ribonucleic Acids</i>
<b>SIMPLE</b>	do inglês, <i>Small Integral Membrane Protein of Lysosomes and Late Endosomes</i>

<b>siRNAs</b>	do inglês, <i>Small Interfering Ribonucleic Acids</i>
<b>SNAREs</b>	do inglês, <i>Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Protein Receptor</i>
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>TSG101</b>	do inglês, <i>Tumor Susceptibility 101</i>

## **Abstract**

---

Exosomes are structures with a diameter between 30 and 100 nm, naturally released from cells and abundant in all tissues and fluids. They are composed of proteins, lipids and nucleic acids. Initially, it was thought that they had no important function. However, currently they are of great interest to most researchers due to their predominant role in intercellular communication.

Therefore, clinical applications have been studied extensively, and this monograph focuses essentially on exosomes as drug delivery systems in oncology. For this, it is important to understand its advantages in relation to other nanoparticles and to understand the complex engineering process for functionalization and targeting to cells.

Finally, it was intended to observe the applicability of these concepts coming to life. Codiak BioSciences, a pioneer in the development of therapies involving exosomes, have developed a patented production process – the engEx™ Platform – to optimize the transformation of exosomes into therapies for diseases that currently have no treatment/have a low success rate.

**Keywords:** Exosomes; Extracellular Vesicles; Cancer; Drug Delivery Systems; Loading; Targeting.

## Resumo

---

Os exossomas são estruturas com um diâmetro compreendido entre 30 a 100 nm, naturalmente libertados das células e presentes em todos os tecidos e fluidos. São compostos por proteínas, lípidos e ácidos nucleicos. Inicialmente, pensava-se que não tinham nenhuma função importante. No entanto, atualmente são alvo de grande interesse por parte da maioria dos investigadores devido ao seu papel preponderante na comunicação intercelular.

Assim sendo, as aplicações clínicas têm vindo a ser estudadas afincadamente sendo que esta monografia foca-se essencialmente nos exossomas como sistemas de entrega de fármacos na oncologia. Para isso, é importante entender as suas vantagens em relação a outras nanopartículas e perceber o complexo processo de engenharia para funcionalização e *targeting* para as células-alvo, com diminuição dos efeitos *off-target*.

Por fim, pretendeu-se observar a aplicabilidade destes conceitos ganhar vida. A Codiak BioSciences, empresa pioneira no desenvolvimento de terapias envolvendo exossomas, desenvolveu um processo de produção patenteado – a engEx™ Plataforma – para otimizar a transformação dos exossomas em terapias destinadas a doenças que atualmente não têm tratamento/taxa de sucesso reduzida.

**Palavras-chave:** Exossomas; Vesículas Extracelulares; Cancro; Sistemas de Entrega de Fármacos; *Loading*; *Targeting*.

## Nota Introdutória

---

O cancro é uma patologia de incidência global. De um modo geral, nos últimos anos tem-se vindo a registar uma elevação da taxa de incidência de tumores, nomeadamente pelo aumento da esperança média de vida (Serviço Nacional de Saúde, n.d.).

Sendo uma patologia extremamente complexa e heterogénea entre os seus diversos subtipos, o desenvolvimento de terapias com suficiente eficácia e reduzida toxicidade em tecidos saudáveis é extremamente difícil. Atualmente, as opções terapêuticas em vigor são limitadas e nem sempre são totalmente eficazes. Surge então a necessidade de estabelecimento de novas abordagens de modo a tentar ultrapassar este obstáculo.

Os Exossomas (EXOs), pequenas vesículas libertadas pela maioria das células, têm demonstrado, num vasto leque de artigos, serem suficientemente inovadores para poderem ser a nova arma terapêutica no combate ao cancro. Por um lado, pela sua competência em veicular moléculas terapêuticas com comprovada eficiência, eficácia e segurança. Por outro, pela possibilidade de manipulação laboratorial, dotando-as com capacidades de *targeting* para determinada célula-alvo com redução de efeitos adversos *off-target*.

A presente monografia tem como objetivo estudar aprofundadamente as diversas técnicas de manipulação e produção dos EXOs como Sistemas de Entregas de Fármacos (DDS, do inglês *Drug Delivery Systems*). Para além disso, tem como finalidade perceber em que situação se encontra a investigação e desenvolvimento de medicamentos contendo Exossomas como Sistemas de Entrega de fármacos (EXO-DDS), particularmente pela Codiak BioSciences.

## I. Contextualização Histórica

---

Os EXOs pertencem a uma família de estruturas denominadas Vesículas Extracelulares (EVs), cujas evidências primordiais remontam à Teoria da Pangénese, da autoria de Charles Darwin, na qual alude à existência de gémulas, estruturas que partilham características com as EVs hoje conhecidas (Liu & Chen, 2018). Particularizando, e no que diz respeito aos EXOs, uma primeira abordagem a este tipo de EVs poderá ser encontrada num artigo de Peter Wolf (1967), onde destaca um material derivado das plaquetas, mas delas distinto, ao qual deu o nome de *platelet dust* (Wolf, 1967). Mais tarde, em 1981, Trams *et al.* procederam à primeira descrição dos EXOs (Trams *et al.*, 1981), enquanto Dvorak *et al.* documentaram a presença de EXOs não só em cultura de células (*in vitro*) mas também em ascites tumorais (*in vivo*) (Dvorak *et al.*, 1981). Ora, podemos então compreender que as EVs não são um tópico novo. Inicialmente considerados lixo celular – pela sua simplicidade, pequenez e função desconhecida – os EVs permaneceram inexplorados (Margolis & Sadovsky, 2019). Recentemente, com o

reconhecimento da sua potencialidade na comunicação intercelular, os EVs têm suscitado distinta curiosidade por parte dos investigadores e cientistas de todo o mundo (Cocucci & Meldolesi, 2015).

## 2. Família De EVs

---

Segundo a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV), entendem-se por EVs quaisquer “partículas naturalmente libertadas de células, delimitadas por uma bicamada lipídica e sem capacidade de replicação, isto é, que não possuem um núcleo funcional” (Théry *et al.*, 2018). Notoriamente, este termo é extraordinariamente amplo, escondendo em si uma vasta família de estruturas membranares que diferem num diverso conjunto de características, entre elas o tamanho, a composição, a origem celular, a biogénese e a função biológica (Margolis & Sadovsky, 2019). De um modo geral, poder-se-á classificar as EVs em três grupos maioritários, baseados na biogénese e no tamanho (Szabo & Momen-Heravi, 2020):

⇒ Microvesículas – estruturas formadas pelo fenómeno de brotamento (em inglês, *budding*) a partir da membrana plasmática e cujo diâmetro se encontra entre 100 e 1000 nm;

⇒ Vesículas Apoptóticas ou Corpos Apoptóticos – estruturas que derivam da desintegração da membrana plasmática aquando um processo de apoptose celular (em inglês, *blebbing*, termo intimamente associado à apoptose celular). O seu diâmetro varia entre 100 e 2000 nm ou 1000 e 5000 nm, consoante se fale de vesículas apoptóticas ou corpos apoptóticos, respetivamente. Os últimos, para além da evidente superioridade ao nível do tamanho, apresentam fragmentos de organelos celulares no seu interior;

⇒ Exossomas – estruturas obtidas pela via endossomal. São as EVs mais pequenas, com um diâmetro compreendido entre 30 e 100 nm e o seu processo de formação encontrar-se-á intimamente explanado no subtópico “EXOs: Biogénese e Secreção”.

Curiosamente, existem outras classificações para a família de EVs. No entanto, é importante referir que não existindo transparência na definição de marcadores específicos estabelecidos entre cada tipo de EVs<sup>2</sup>, a ISEV recomenda o emprego de “termos operacionais” relativos a características físicas (tamanho, diâmetro ou densidade), composição bioquímica e origem celular (Théry *et al.*, 2018). Exemplificando, tendo por base a característica “tamanho”, utilizar

---

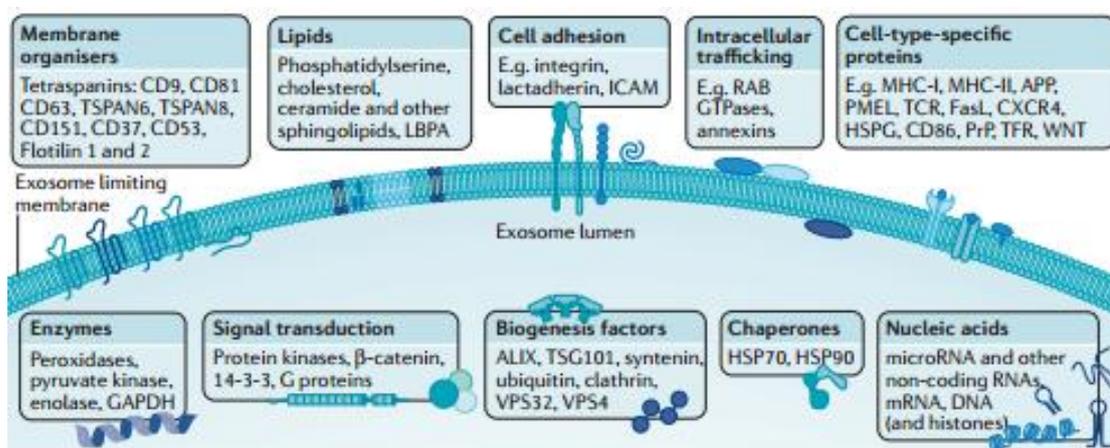
<sup>2</sup> Kowal *et al.* concluíram que determinados marcadores exossomais, tais como moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade ou Proteínas do Choque Térmico 70 estão presentes em todos os tipos de EVs (Kowal *et al.*, 2016).

o termo “sEVs” para EVs de menor dimensão e o termo “IEVs” para EVs de maior dimensão, por forma a distingui-las.

## 2.1. EXOs: Caraterísticas Gerais e Composição

Tal como as restantes EVs, os EXOs têm origem na maior parte das células<sup>3</sup> e são ubíquos, isto é, encontram-se tanto em circulação como nos diversos microambientes celulares (Lim & Kim, 2019).

No que diz respeito à sua composição, os EXOs apresentam, de um modo geral, proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, quer na membrana citoplasmática, quer no seu interior. A **Figura I** apresenta com maior detalhe os diversos tipos de moléculas que estão presentes nos EXOs e a sua localização na estrutura vesicular (Van Niel et al., 2018).



**Figura I – Composição detalhada de um EXO.** Os EXOs são constituídos, geralmente, por proteínas, lípidos e ácidos nucleicos. É importante destacar que a sua composição é variável, pois dependerá da célula de origem (Wen et al., 2019), das condições fisiológicas (Diaz et al., 2016) e da influência do ambiente circundante. Invariavelmente, estas diferenças na composição influenciarão a função dos EXOs e ajudarão no processo de distinção entre as diversas EVs (Kibria et al., 2018). **Adaptado de Niel et al. (2018).**

**Legenda:** ALIX (do inglês, *Programmed Cell Death-6 Interacting Protein (PDCD6IP)/ALG-2 Interacting Protein*), APP (do inglês, *Amyloid Precursor Protein*), CXCR4 (do inglês, *C-X-C Motif Chemokine Receptor 4*), DNA (do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*), FasL (do inglês, *Fas Ligand*), GAPDH (do inglês, *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), HSP (do inglês, *Heat Shock Protein*), HSPG (do inglês, *Heparan Sulfate Proteoglycan*), ICAM (do inglês, *Intercellular Adhesion Molecule*), LBPA (do inglês, *lysobisphosphatidic acid*), MHC (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*), PMEL (do inglês, *Premelanosome Protein*), PrP (do inglês, *Prion Protein*), RNA (do inglês, *Ribonucleic Acid*), TCR (do inglês, *T-Cell Receptor*) TFR (do inglês, *Transferrin Receptor*), TSG101 (do inglês, *Tumor Susceptibility 101*), VPS (do inglês, *Vacuolar Protein Sorting*).

**Nota 1:** alguns estudos demonstram que alguns miRNA se encontram em maior quantidade nos EXOs em comparação com a célula de origem. No entanto, menos do que uma cópia por EXO (Chevillet et al., 2014).

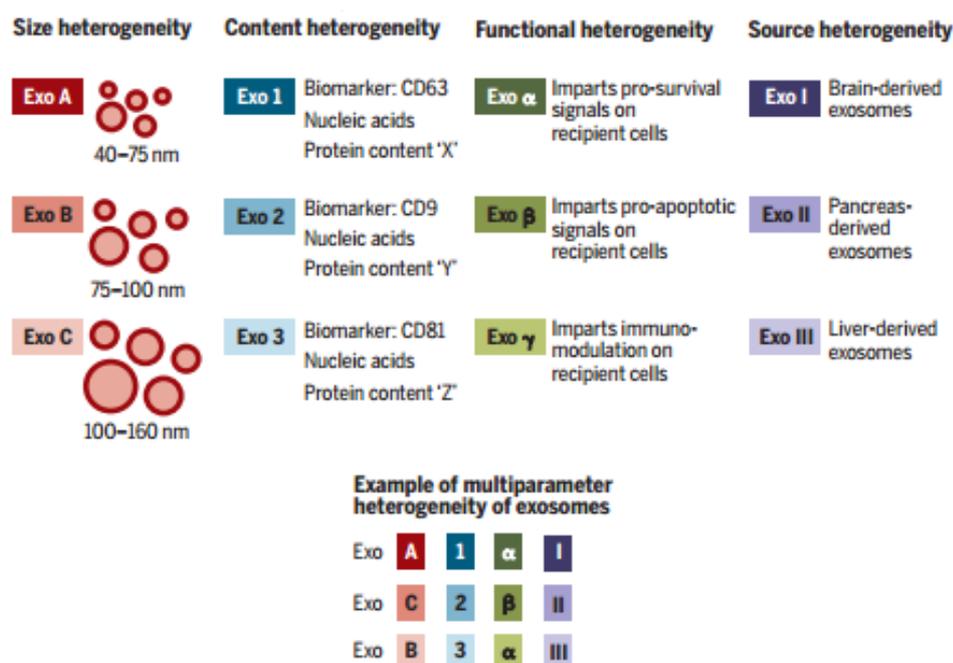
**Nota 2:** as tetraspaninas CD63, CD81 e CD9 são vastamente utilizadas como marcadores exossomais (Johnsen et al., 2014).

<sup>3</sup> A título de curiosidade, a mesma célula poderá produzir várias EVs (Dreyer & Baur, 2016).

Para conhecimento complementar, a *Vesiclepedia* (Pathan *et al.*, 2019) e a *ExoCarta* (Keerthikumar *et al.*, 2016) são bases de dados que reúnem informações que concernem à composição de EVs e EXOs, respetivamente.

## 2.2. EXOs: Heterogeneidade Dentro Da Subfamília

Os EXOs poderão demonstrar diferenças ao nível de vários parâmetros, tais como tamanho, conteúdo, função e origem celular – **Figura 2** (Kalluri & LeBleu, 2020).

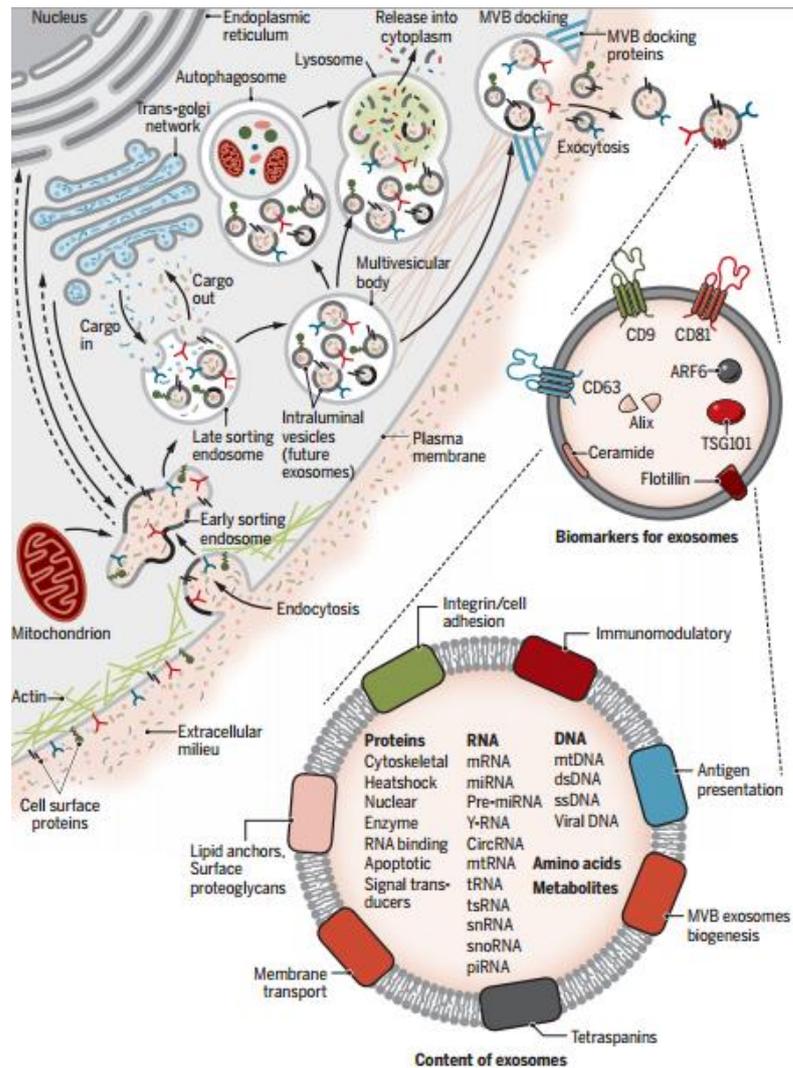


**Figura 2 – Heterogeneidade entre EXOs.** A variedade de combinações entre os diferentes parâmetros referidos anteriormente tornam relevante o estudo e conhecimento dos diversos subtipos de EXOs. **Adaptado de Kalluri e LeBleu (2020).**

Em dois estudos distintos (Zhang *et al.*, 2018; Jeppesen *et al.*, 2019), os respetivos investigadores provaram a existência de heterogeneidade exossomal ao identificarem subclasses de EXOs distintas. Reportaram as proteínas que eram características de cada grupo, evidenciando não só as diferenças entre eles mas também a falta de transparência dos marcadores exossomais geralmente predefinidos. Ainda, num estudo de Chen *et al.* foi evidenciada a secreção de EXOs distintos, consoante a zona de secreção na célula em estudo (Chen *et al.*, 2016).

### 2.3. EXOs: Biogênese e Secreção

De um modo geral, a formação de um EXO inicia-se com uma primeira invaginação da membrana citoplasmática, dando origem a uma estrutura denominada endossoma primário (do inglês, *Early-Sorting Endosome* – ESE), rica em proteínas de superfície e moléculas extracelulares solúveis. Posteriormente, os ESEs transformam-se em endossomas secundários (do inglês, *Late-Sorting Endosomes* – LSEs) pela invaginação da membrana endossomal (segunda invaginação da membrana citoplasmática). De notar que o Complexo de Golgi e o Retículo Endoplasmático poderão influenciar a composição destas estruturas. Os LSEs passam a denominarem-se Corpos Multivesiculares (do inglês, *Multivesicle Bodies* – MVBs), quando contêm um número definido de vesículas intraluminais (do inglês, *Intraluminal Vesicles* – ILVs) (Kalluri & LeBleu, 2020).



**Figura 3 – Processo de biogênese de EXOs, pormenor da sua composição e principais marcadores.** Aqui é possível visualizar a dupla invaginação da membrana citoplasmática, com criação de MVBs contendo os futuros EXOs, cujo destino será destruição ou libertação dos EXOs recém-formados no espaço extracelular. Relativamente à composição dos EXOs, é possível observar um desenho do seu aspeto característico. Ainda, é dada ênfase à localização celular das moléculas que o constituem (lípidos, proteínas e ácidos nucleicos) e destaque dos principais marcadores exossomais. **Adaptado de Kalluri e LeBleu (2020).**

**Legenda:** ALIX (do inglês, *Programmed Cell Death-6 Interacting Protein (PDCD6IP)/ALG-2 Interacting Protein*), ARF6 (do inglês, *ADP-ribosylation factor 6*), DNA (do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*), RNA (do inglês, *Ribonucleic Acid*), TSG101 (do inglês, *Tumor Susceptibility 101*).

Na etapa de *loading*<sup>4</sup> das moléculas para os ILVs (e respetiva formação) intervêm vários mecanismos. Por um lado, temos processos dependentes do ESCRT (do inglês, *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*), uma família de proteínas organizada em quatro complexos (ESCRT-0 a ESCRT-III) e componentes acessórios, como a ALIX (do inglês, *Programmed Cell Death-6 Interacting Protein*) e a VPS4 (do inglês, *Vacuolar Protein Sorting*). Inicialmente, ESCRT-0 é responsável por sequestrar moléculas ubiquitinadas para a membrana endossomal, seguido da ação dos ESCRT-I/II, que provocam a invaginação da membrana endossomal, carregando para o interior as moléculas sequestradas. O ESCRT-III forma uma estrutura em espiral e a ATPase VPS4 é responsável pela cisão, formando-se o ILV (Bebelman *et al.*, 2018). Adicionalmente, há evidências de que uma proteína membranaar que possui cadeias de sulfato de heparano – sindecano – interage com a maquinaria ESCRT, fundando outro método. Heparanasas clivam as cadeias de sulfato de heparano do sindecano, facilitando a organização desta proteína em aglomerados. Nesta nova organização, a ligação à sintetina (proteína solúvel multivalente) é estimulada. Ora, como a sintetina detém a capacidade de se ligar a ALIX, estabelece-se, assim, um elo entre o sindecano e a maquinaria ESCRT (Hessvik & Llorente, 2018).

Por outro lado, temos processos independentes do ESCRT, onde ceramidas<sup>5</sup>, tetraspaninas<sup>6</sup> e a SIMPLE (do inglês, *Small Integral Membrane Protein of Lysosomes and Late Endosomes*) estão envolvidos. A ceramida parece contribuir por meio de dois processos: 1) a esfingomielina é hidrolisada pela esfingomielinase (nSMAse-2) em ceramida, a qual promove a formação de microdomínios no exterior da membrana endossomal, que provocam uma curvatura espontânea da mesma, facilitando a invaginação destas moléculas; 2) a ceramida, ao ser metabolizada, forma esfingosina-1-fosfato que ativa o respetivo recetor, incitando as moléculas para o interior das ILVs. As tetraspaninas atuam num mecanismo semelhante, interagindo entre si e com outras proteínas transmembranares e/ou citosólicas, formando microdomínios que serão posteriormente invaginados para o interior dos MVBs, formando ILVs (Van Niel *et al.*, 2018). Relativamente à SIMPLE, o seu mecanismo de ação ainda não está completamente esclarecido. Contudo, parece envolver a ligação da SIMPLE com TSG101 (do

---

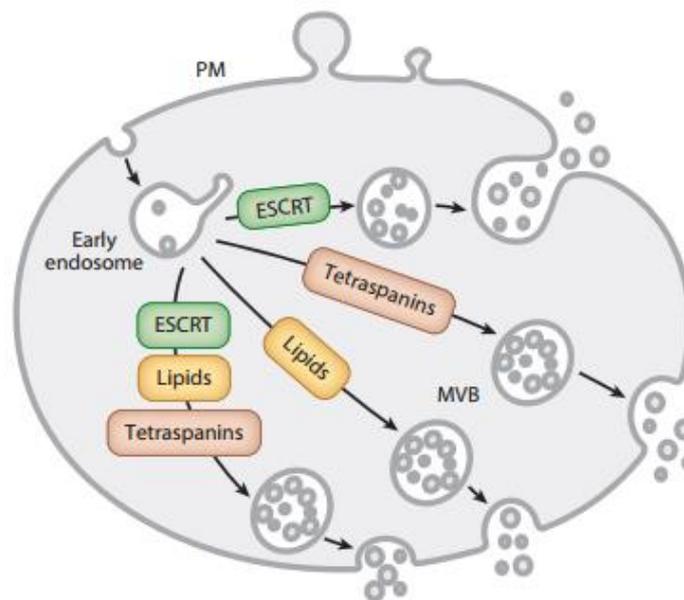
<sup>4</sup> Loading engloba a encapsulação e acoplamento de moléculas de interesse (no interior e/ou na superfície do EXO, respetivamente).

<sup>5</sup> Lípido que consiste na combinação de esfingosina com um ácido gordo (Kumari, 2018).

<sup>6</sup> Família de proteínas transmembranares que possuem quatro domínios: dois pequenos domínios N- e C- no citoplasma e dois domínios no espaço extracelular. Existem trinta e três tetraspaninas humanas, das quais a CD9, a CD63 e a CD81 constituem importantes biomarcadores exossomais (Gorain *et al.*, 2019; Kalluri & LeBleu, 2020).

inglês, *Tumor Susceptibility 101*), ou NEDD4 (do inglês, *Neuronal Precursor Cell-expressed Developmentally Downregulated 4*) (Colombo et al., 2014).

De notar que aqui surge uma grande dúvida: atuarão os distintos mecanismos separadamente, formando cada um deles um tipo de MVB com ILVs iguais, isto é, diferentes subpopulações de ILVs com cargas distintas? Ou atuarão concomitantemente, cada maquinaria destinada para moléculas específicas, formando MVBs com ILVs mistos? Provavelmente será uma fusão destas duas possibilidades, estando dependente da célula envolvida (Colombo et al., 2014; Van Niel et al., 2018).



**Figura 4 – Loading do conteúdo das ILVs.** Vários mecanismos ESCRT-dependente e ESCRT-independente são responsáveis pelo *loading* das moléculas que farão parte dos futuros EXOs. Mais estudos são requeridos no sentido de compreender a sua dinâmica de intervenção. **Adaptado de Colombo et al. (2014).**

**Legenda:** ESCRT (do inglês, *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*), MVB (do inglês, *Multivesical Body*), PM (do inglês, *Plasmatic Membrane*).

No que diz respeito ao destino dos MVBs, as evidências atuais sobre as condições que determinam o seu destino são escassas (Bebelman et al., 2018). Os MVBs podem fundir-se com autofagossomas ou diretamente com lisossomas, o que resulta na sua destruição. Alternativamente, poderão fundir-se com a membrana citoplasmática da célula, libertando os ILVs para o exterior como EXOs (Kalluri & LeBleu, 2020). Para que isto aconteça, tem de ocorrer primeiramente um *trafficking* anterógrado dos MVBs, isto é, a sua deslocação em direção à membrana citoplasmática, seguido de um processo de *docking*. Nesta etapa os componentes do citoesqueleto (nomeadamente as cinesinas) e as Rab GTPases têm um papel fundamental. Posteriormente, pela ação fulcral das SNAREs (do inglês, *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*), ocorrerá a fusão da membrana dos MVBs com a

membrana citoplasmática. Finalmente, as ILVs são libertadas no espaço extracelular, sendo agora denominadas EXOs (Bebelman *et al.*, 2018; Mathieu *et al.*, 2019).

Em suma, a biogénese de EXOs é um processo extremamente complexo. Fatores internos (tipo de célula e moléculas a serem incorporadas nos ILVs) e fatores externos (hipoxia e malnutrição celular)(Hessvik & Llorente, 2018; McAndrews & Kalluri, 2019) obrigarão a célula a regular o processo de biogénese, que afetará conseqüentemente, a quantidade e o subtipo de EXOs secretados. Ainda, foram estudadas intervenções que afetam o funcionamento e dinâmica das maquinarias de *loading* do conteúdo dos EXOs, pontos fulcrais na regulação da biogénese, para perceber o seu impacto na geração, composição e secreção dos EXOs (Colombo *et al.*, 2013; Villarroya-Beltri *et al.*, 2016; Van Niel *et al.*, 2018; Mathieu *et al.*, 2019).

## 2.4. EXOs: Funções

---

Após secreção, os EXOs vão atuar na célula-alvo. Os mecanismos envolvidos neste processo ainda não estão completamente caracterizados, mas implicam, num passo inicial, o *targeting* da célula-alvo. De seguida, ocorre a interação entre os EXOs e a célula-alvo, que poderá ser específica (mediada por recetores) ou inespecífica. Por fim, sucede-se a entrega da carga (à superfície ou por internalização), instigando na célula uma alteração, que poderá ser fisiológica ou fenotípica. Assim, os EXOs passam a ser os grandes protagonistas da ciência e inovação da atualidade pois exercem um papel extraordinariamente relevante na comunicação intercelular (Bebelman *et al.*, 2018; Lim & Kim, 2019; Mathieu *et al.*, 2019).

Na doença oncológica, os EXOs provocam, de um modo geral, efeitos negativos. Exemplificando, vários estudos demonstram que determinados EXOs despoletam neoplasias e metástases (Elmageed *et al.*, 2014; Melo *et al.*, 2014; Fong *et al.*, 2015) ou promovem a sobrevivência tumoral e a resistência aos tratamentos quimioterápicos (Sansone *et al.*, 2017; Binenbaum *et al.*, 2018). Felizmente também há evidências de atividade antitumoral, tal como explorado no estudo de Plebanek *et al.* (Plebanek *et al.*, 2017).

Além disso, os EXOS também exercem o seu papel noutras áreas como, por exemplo, no parto (Menon, Debnath, *et al.*, 2019; Menon, Dixon, *et al.*, 2019; Sheller-Miller *et al.*, 2019), na resposta imunitária (Cheng & Schorey, 2019), em patologias pulmonares (Genschmer *et al.*, 2019), em doenças neurodegenerativas (Soria *et al.*, 2017; Yuan & Li, 2019), em enfermidades cardíacas (Mayourian *et al.*, 2018), no metabolismo (Castaño *et al.*, 2018), na homeostase celular (A. Takahashi *et al.*, 2017), entre outras.

No tópico “EXO-DDS Na Área Da Oncologia”, será explorado mais aprofundadamente as funções dos EXO-DDS no cancro.

## 2.5. EXOs: Potenciais Aplicações Clínicas

---

Com todos estes novos conhecimentos sobre os EXOs, o seu valor clínico começou a ser explorado. Percebeu-se que estas vesículas têm utilidade nos campos de diagnóstico (pela exploração do conteúdo exossomal e estabelecimento de biomarcadores), terapia (pelas suas funções intrínsecas ou pela possibilidade de manipulação, tornando-se veículos de entrega de moléculas ativas), prognóstico e monitorização clínica (Lim & Kim, 2019).

De um modo geral, os EXOs são explorados para uma vasta área de patologias, entre elas o cancro, as doenças neurológicas e afeções imunológicas. Particularizando, os EXOs vieram revolucionar o diagnóstico do cancro. O estudo do conteúdo genómico e proteómico de células, DNA e EXOs tumorais circulantes (técnica denominada biópsia líquida) permite gerar informação mais detalhadas sobre um determinado cancro, comparativamente à biópsia usualmente utilizada, que muitas vezes não faz jus à complexidade desta patologia (Palmirotta *et al.*, 2018).

Ainda, relativamente à aplicação terapêutica, e a título de exemplo, num estudo feito por Saari *et al.*, EXOs derivados de células tumorais prostáticas foram modificados de forma a levar no seu interior Paclitaxel, observando-se um aumento da citotoxicidade deste fármaco (Saari *et al.*, 2015). Em seguida iremos analisar detalhadamente de que forma surgem os EXOs como veículos de material terapêutico e as etapas mais importantes na sua engenharia.

## 3. Exossomas Como Sistemas De Entrega De Fármacos (EXO-DDS)

---

Inicialmente utilizaram-se lipossomas, nanopartículas e polímeros como DDS<sup>7</sup>. Pretendia-se obter melhores resultados em determinados parâmetros (como a solubilidade, estabilidade ou eficácia) de moléculas que outrora foram consideradas em modelos terapêuticos mas que não obtiveram sucesso (Das *et al.*, 2019). Apesar de bem-sucedidas, a formação de *protein corona*<sup>8</sup> e opsonização<sup>9</sup> conduziam a uma rápida *clearance* e conseqüente redução do tempo de circulação na corrente sanguínea. Ainda, aquando a adsorção das proteínas à superfície das vesículas artificiais, verificavam-se alterações conformacionais e funcionais nelas, responsáveis por episódios de toxicidade (Peng *et al.*, 2013).

---

<sup>7</sup>São quaisquer tipo de tecnologias que permitem a entrega de determinadas moléculas terapêuticas, segundo libertação controlada e/ou vectorização para alvos (sub)celulares específicos (National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering, n.d.).

<sup>8</sup>Fenómeno caracterizado pela revestimento da vesícula artificial pelas proteínas plasmáticas, perdendo a sua identidade e provocando uma modificação da resposta biológica (Peng *et al.*, 2013).

<sup>9</sup> Adsorção de proteínas denominadas opsoninas na superfície da vesícula artificial, marcando-a para colheita pelo sistema fagocitário (Peng *et al.*, 2013).

Os EXOs, pelas características e funções anteriormente enumeradas, tornam-se a nova aposta como DDS. Ohno *et al.* analisam a utilização de EXOs como veículos de terapias de substituição baseadas em miRNA em vários cânceros (Ohno *et al.*, 2013). Ainda, Malhotra *et al.* corroboram a superioridade da tecnologia DDS com exossomas *versus* a simples entrega de moléculas na célula através de recetores membranares (Malhotra *et al.*, 2016). Apesar dos EXOs possuírem uma estrutura semelhante às vesículas artificiais, apresentam variadas vantagens sobre as últimas. Os EXOs mostram-se mais biocompatíveis pela sua origem endógena e não provocam citotoxicidade nem ativação da resposta imunológica, ao contrário das vesículas artificiais (Rosas *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2017; Mendt *et al.*, 2018). Ainda, os EXOs apresentam a capacidade de atravessar capilares fenestrados pelo seu reduzido tamanho. Particularmente, Yang *et al.* descrevem a capacidade de exossomas com origem em células endoteliais cerebrais e células de glioblastomas entregarem terapia antitumoral em células cerebrais, atravessando a Barreira Hematoencefálica (BHE), conhecida por ser um grande obstáculo no desenvolvimento de terapias (Yang *et al.*, 2015). Num estudo efetuado por Kamerkar *et al.*, os EXOs demonstraram ser mais eficientes e mais eficazes que os lipossomas, nas mesmas condições de *loading* (Kamerkar *et al.*, 2017). Além disso, os EXOs apresentam longos períodos de circulação: por um lado por possuírem um potencial zeta praticamente nulo, não agregando com as proteínas circulantes; por outro, pela capacidade de evasão das células do sistema imune (por exemplo, pela presença da proteína CD47 na sua estrutura (Kamerkar *et al.*, 2017)). Os EXOs possuem um citoesqueleto deformável, intensificando a sua integridade, resistência e *uptake* pelas células recetoras. Também têm a capacidade de aceder à rede de nanotúbulos da célula, entregando a sua carga no sítio-alvo a um nível mais profundo (Hood, 2016). Finalmente, os EXOs têm a capacidade de se dirigirem a um determinado tipo de células-alvo, baseado no tipo de tetraspaninas que estão presentes na sua estrutura (Rana *et al.*, 2012).

De seguida, são apresentados e explorados os passos a ter em conta na obtenção de EXO-DDS.

### 3.1. Seleção Da Célula De Origem

---

Como referido anteriormente, os EXOs são produzidos pela grande maioria das células e encontram-se biodistribuídos praticamente em todos os fluidos corporais. A sua composição reflete a célula-mãe que lhe deu origem, pelo que EXOs de diferentes origens detêm características distintas e, portanto, funções e resultados diferenciados (Liao *et al.*, 2019). Para além de EXO-DDS com garantida eficácia e segurança, é decisiva, nesta etapa, a produção numerosa, reprodução à escala industrial, custo-efetividade e eficiência de *loading*. São

vulgarmente utilizadas como células produtoras de EXOs as HEK<sup>10</sup> (Rosas *et al.*, 2016), as células estaminais mesenquimais (R. C. Lai *et al.*, 2012; Mendt *et al.*, 2018), as células dendríticas (Romagnoli *et al.*, 2015), as células imortalizadas – todavia, poderão ter tendência carcinogénica – (R. C. Lai *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2017), plantas (ClinicalTrials.gov, n.d.), frutas (Q. Wang *et al.*, 2015) e alimentos – surpreendentemente, EXOs derivados do leite aparentemente apresentam sozinhos alguma atividade anti-inflamatória, antitumoral e antiproliferativa (Munagala *et al.*, 2016, 2017).

Igualmente, as células tumorais são extensamente utilizadas para produção de EXOs terapêuticos. Num estudo efetuado por Morishita *et al.*, a co-entrega, em células apresentadoras de antígenos (APC), de EXO derivados de células tumorais (que apresentam antígenos tumorais da célula de origem) com um imunoestimulador, aumenta significativamente a capacidade das APC em apresentar antígenos tumorais, induzindo uma resposta imunológica específica e potente para aquele tumor (Morishita *et al.*, 2016). Um estudo muito semelhante por Mahaweni *et al.* corrobora a afirmação anterior (Mahaweni *et al.*, 2013). Contudo, a utilização destes EXOs deverá ser sujeita a um intenso escrutínio, pois há possibilidade de originar fenómenos de tumorigénese, como reprogramação de células normais adjacentes a células tumorais, angiogénese, metástase e imunossupressão (Harris *et al.*, 2015; Morishita *et al.*, 2016; Whiteside, 2016).

Assim, é importante conhecer que características são pretendidas para o DDS em desenvolvimento para assegurar a seleção ideal da célula de origem produtora desses EXOs.

### **3.2. Isolamento e Purificação Dos EXOs**

---

O primeiro passo exige a colheita da matriz onde se encontram os EXOs. Os objetivos incluem separar os EXOs de outros componentes da matriz, aos quais chamaremos contaminantes (isolamento) e separar os EXOs de outras EVs ou nos seus subtipos, consoante a rigorosidade do estudo (purificação) (Théry *et al.*, 2018). Para efetuar o isolamento e purificação dos EXOs existem diversos métodos, cada um com as suas vantagens e desvantagens (Li *et al.*, 2017).

A ultracentrifugação diferencial é o método tradicionalmente utilizado. Porém, possui como desvantagens a co-precipitação dos EXOs a isolar e purificar com contaminantes e a disrupção não transitória da integridade da membrana exossomal. Esta dificuldade poderá ser

---

<sup>10</sup> Linha celular constituída por células renais pertencentes a um embrião humano.

ultrapassada com a utilização de um gradiente de sucrose, juntamente com uma etapa de ultracentrifugação (Gupta *et al.*, 2018).

Outro método conhecido é a cromatografia de exclusão de tamanhos, com a separação precisa dos conteúdos consoante o tamanho. A sua grande vantagem é a menor probabilidade de deformação definitiva dos EXOs, recorrentemente observada na centrifugação. *Beads* heteroporosas encontram-se no interior da coluna e retêm os contaminantes de menor tamanho. Os EXOs, como possuem um tamanho superior aos poros das *beads*, eluem primeiramente. Em contrapartida, esta técnica requer muito tempo para decorrer (Das *et al.*, 2019).

A separação imunológica é também utilizada, tirando partido dos biomarcadores conhecidos dos EXOs, como as tetraspaninas CD9, CD63 e CD81. Utilizando *beads* que apresentam na sua superfície anticorpos dirigidos às proteínas mais conhecidas dos EXOs, é possível um isolamento direto, a partir do sobrenadante da cultura de células produtoras de EXOs. É um método mais simples, pois requer menor manuseamento da amostra e passível de ser automatizado com técnicas de imunoensaio (KW & Kierulf, 2015).

A filtração permite a separação dos EXOs dos restos celulares e contaminantes, baseada no tamanho. É um método bastante rápido, mas que implica perdas por retenção nos poros dos filtros (Grant *et al.*, 2011).

Curiosamente, surgem Kits pré-fabricados, muito utilizados em produções em larga escala. Utilizam um polímero com o qual a matriz contendo os EXOs é incubada, resultando na precipitação dos EXOs. Normalmente recorre-se à centrifugação para separar os EXOs precipitados. Os Kits pré-fabricados são extremamente vantajosos pois possuem uma boa taxa de recuperação de EXOs purificados, são simples e custo-efetivos (*exosome isolation* | Thermo Fisher Scientific, n.d.; *Exosome Isolation Kits & Products* | System Biosciences, n.d.).

De notar que um isolamento e uma purificação absolutos são inalcançáveis. A seleção das técnicas a aplicar deverá permitir uma otimização do processo de isolamento e purificação com uma qualidade suficientemente rigorosa para encontrar os objetivos do estudo para o qual se destinam. Microscopia Eletrónica, Citometria de Fluxo, *Western Blot*, entre outras, são técnicas que permitem observar a integridade e qualidade dos EXOs e a eficiência de separação (Witwer *et al.*, 2013).

### 3.3. Eleição Da Carga a Inserir Nos EXOs

---

A estrutura esférica dos EXOs permite a incorporação tanto de moléculas hidrofílicas como de moléculas hidrofóbicas. Esta evidente capacidade de *loading* incitou ao estudo de EXO-DDS, por forma a incorporar neles a mensagem que se quer transmitir às células-alvo.

Várias moléculas associadas aos EXOs demonstraram os benefícios desta inovação. As mais estudadas são iRNAs (do inglês, *interfering Ribonucleic Acids*), com ação fulcral na terapia génica, um campo amplamente estudado nos dias de hoje. Os seus problemas de instabilidade na corrente sanguínea, por rápida degradação, são ultrapassados quando estas moléculas são incorporadas em EXO-DDS (Ozpolat *et al.*, 2014). Exemplos de iRNAs são siRNAs (do inglês, *small interfering Ribonucleic Acids*), shRNAs (do inglês, *short hairpin Ribonucleic Acids*) e miRNAs (do inglês, *micro Ribonucleic Acids*). EXOs modificados para entregar às células-alvo RAD51-siRNAs e RAD52-siRNAs demonstraram ser eficazes *in vitro* na sua entrega, com silenciamento génico e resultados benéficos no controlo de células tumorais (Shtam *et al.*, 2013). Além disso, em doenças crónicas como a Hepatite C, uma ação terapêutica duradoura é o ideal, e este efeito é conseguido com a administração de vetores contendo shRNAs em oposição aos siRNAs que têm ação mais curta (Pan *et al.*, 2012). Um outro estudo na área da dermatite de contacto expõe a modificação de EXOs para entregarem mi-RNA150 em células T, inibindo-as (Bryniarski *et al.*, 2013).

Também se utilizam EXO-DDS na entrega de proteínas. Por exemplo, no estudo de Haney *et al.*, os investigadores optaram por efetuar o *loading* de catalase em EXOs por métodos exógenos, resultando numa redução nos níveis de stress oxidativo e prevalentes efeitos neuroprotetores *in vivo* e *in vitro* em modelos de Doença de Parkinson. A encapsulação da catalase nos EXOs impediu a degradação desta enzima, preservando a sua atividade catalítica (Haney *et al.*, 2015).

Ainda, outras moléculas são estudadas para incorporação em EXO-DDS. Exemplificando, a curcumina é um composto amarelado presente em rizomas da espécie *Curcuma longa*. Possui efeitos anti-inflamatórios e anti-oxidativos comprovados. Contudo, fatores como fraca absorção e rápida *clearance* colocam um obstáculo na sua aplicação clínica. A sua incorporação em EXOs soluciona estas dificuldades e promove efeitos anti-inflamatórios e anti-oxidativos. Ainda, é possível o *targeting* das células-alvo por funcionalização da superfície dos EXO-DDs, reduzindo os efeitos adversos e entregando eficazmente a curcumina nas células-alvo (Kalani & Chaturvedi, 2017; Sun *et al.*, 2010).

Benefícios semelhantes são observados com o *loading* de citostáticos em EXO-DDs (Jang *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2018; Tian *et al.*, 2014). O cancro é uma patologia que exige formulações que evitem a ativação da resposta imunológica e que sejam dirigidas ao tumor, com elevada taxa de entrega de fármaco no alvo terapêutico para uma melhor eficácia e reduzida toxicidade por ações *off-target*.

Igualmente, utilizam-se EXO-DDS com o propósito de efetuar o *tracking* de EXOs *in vivo* ou *in vitro*, possível pela incorporação, na sua estrutura, de componentes típicos de imagiologia (C. P. Lai *et al.*, 2014; J. Wang *et al.*, 2016; Oosthuizen *et al.*, 2013).

### **3.4. Loading De Moléculas Terapêuticas Em EXO-DDS** \_\_\_\_\_

A manipulação de EXOs deverá ser cuidadosa, pois determinará o sucesso da sua performance como DDS. O *loading* de moléculas terapêuticas em EXO-DDS inclui manipulação *in vivo* e *in vitro*, correspondendo respetivamente, durante e após a biogénese de EXOs.

#### **3.4.1. Loading De Moléculas Terapêuticas In Vitro (Loading Exógeno)** \_\_\_\_\_

Estas metodologias são indicadas em situações onde há uma pré-produção de EXOs e respetiva purificação. Em seguida encontram-se explanados detalhadamente os vários procedimentos de *loading* exógeno.

A eletroporação é uma técnica que utiliza uma corrente elétrica para estimular a formação de pequenos poros transitórios (1 nm de diâmetro) nos EXOs, permitindo a entrada das moléculas terapêuticas. É extensamente utilizada no *loading* de moléculas grandes, pois a sua difusão através da bicamada lipídica dos EXOs não é espontânea. Infelizmente, a eletroporação tem repercussões ao nível da integridade estrutural dos EXOs, que culmina recorrentemente em agregados. A boa notícia é que esta desvantagem pode ser contornada pela utilização de um tampão enriquecido com trealose<sup>11</sup> (Hood *et al.*, 2014; Johnsen *et al.*, 2016).

Na sonicação, os EXOs são incubados com as moléculas terapêuticas de interesse e uma sonda aplica ondas sonoras na mistura. Consequentemente é gerada uma força de cisalhamento, que provoca a disrupção da integridade da membrana e permite a entrada das moléculas nos EXOs. Possui, como grande vantagem, a elevada capacidade de *loading*. Contudo, há comprometimento da integridade da membrana dos EXOs, tal como observado na eletroporação, e há uma libertação inespecífica do fármaco em dois tempos, pois as

---

<sup>11</sup> Dissacarídeo (duas unidades de glucose ligadas por uma ligação alfa). Estabiliza os lípidos da membrana e previne a fusão de bicamadas lipídicas entre exossomas (Johnsen *et al.*, 2016).

moléculas não só são incorporadas no interior dos EXOs mas também aderem à sua superfície (Kim *et al.*, 2016).

A extrusão é um processo muito semelhante ao anterior, mas recorre a uma seringa de extrusão com uma membrana porosa de 400 nm para promover o *loading* dos EXOs. Tal como a sonicação, possui elevada capacidade de *loading*. Em contrapartida, também compromete a integridade da membrana dos EXOs, com alteração do seu potencial zeta (Fuhrmann *et al.*, 2015).

Na incubação, exossomas produzidos por um determinado tipo de células são colhidos e colocados num meio enriquecido com as moléculas terapêuticas e incubados por um determinado tempo e temperatura. A sua eficiência depende do caráter hidrofóbico da molécula terapêutica. Quanto mais hidrofóbico, maior capacidade de difusão (a favor do gradiente de concentração) para o interior dos EXOs. É um método bastante simples e custo-efetivo. No que diz respeito a desvantagens são de referir a incapacidade de *loading* de moléculas hidrófilas e a reduzida capacidade de *loading* (Das *et al.*, 2019).

Ciclo de congelação/descongelação é uma metodologia que consiste na incubação, por um determinado período à temperatura ambiente, dos EXOs com as moléculas terapêuticas. Posteriormente, sucede-se uma etapa de congelação (a uma temperatura de 80°C negativos ou recorrendo a azoto líquido), seguida de descongelação. O ciclo é repetido o número de vezes necessárias à otimização do método, com um mínimo de três ciclos. A eficiência de *loading* é maior quando comparada com a incubação, mas menor comparativamente à sonificação e à extrusão. À semelhança das últimas técnicas, o ciclo de congelação/descongelação promove agregação dos EXOs, o que constitui uma desvantagem (Sato *et al.*, 2016; Das *et al.*, 2019).

A incubação com permeabilizantes é um método que utiliza um surfactante como, por exemplo, a saponina. Esta cria poros ao interatuar com o colesterol da membrana exosomal, aumentando a permeabilidade e, conseqüente, a eficiência de *loading*, comparativamente à técnica de incubação. A saponina também auxilia a incorporação de moléculas hidrófilas e, ao contrário de técnicas anteriores, não provoca alteração da membrana dos EXOs. De notar que a utilização da saponina requer especial atenção, uma vez que poderá causar eventos de toxicidade e hemólise, pelo que o seu uso deverá ser limitado e sempre seguido de processos de purificação (Podolak *et al.*, 2010; Das *et al.*, 2019).

A transfeção baseada em reagentes químicos não é muito fidedigna no sentido em que o processo de *loading* não é controlado. Só existem dois estudos com a aplicação desta técnica (Wahlgren *et al.*, 2012; Shtam *et al.*, 2013).

\*

Para modificações à superfície dos EXOs, é comumente utilizada uma técnica de nome Cicloadição Azida-Alcino (*click chemistry*, em inglês). Consiste numa reação entre um alcino, previamente acoplado à superfície do EXO, e uma azida – presente na molécula a adicionar ao EXO, podendo ser, entre outras, anticorpo ou peptídeo –, culminando na formação de uma ligação triazol. Ainda, esta reação normalmente ocorre na presença de um catalisador (cobre) (Smyth *et al.*, 2014), mas também poderá suceder na sua ausência (C.-F. Wang *et al.*, 2014). Esta reação é altamente eficiente, sem impacto negativo a nível estrutural ou funcional do EXO, nem alterações na extensão de ligação entre exossomas e célula recetora (Smyth *et al.*, 2014).

Também se pode recorrer ao conceito de interações eletrostáticas multivalentes. Num estudo de Nakase e Futaki, estes obtiveram um complexo entre EXO, lípidos catiónicos e um peptídeo fusogénico sensível a variações no pH levam a um melhoramento do *uptake* desses EXO pela célula-alvo e libertação da sua carga (Nakase & Futaki, 2015).

Adicionalmente, Qi *et al.* basearam a sua estratégia na Ligação recetor-ligando. Nanopartículas com propriedades magnéticas são conjugadas com moléculas de transferrina, que por sua vez, são conjugadas com EXOs pela sua ligação aos recetores de transferrina presentes na sua superfície. Ainda, promoveram a entrada de Doxorrubicina nos EXOs recentemente desenhados. Pela aplicação de um campo magnético exterior, estes EXOs vão acumular-se no cancro pois a neovascularização e angiogénese, características da tumorigénese, apresentam menores fluxos sanguíneos quando comparados com outras áreas vascularizadas. Assim aumenta-se a concentração de fármaco no tumor e pela sua ação controla-se o seu crescimento (Qi *et al.*, 2016).

De um modo geral, estas técnicas de modificação à superfície dos EXOs são efetuadas com dois objetivos. Por um lado, para a funcionalização dos EXOs, pela integração de determinadas moléculas que possuem recetores nas células-alvo. Isto permite uma interação específica entre os EXOs e as células-alvo, afetando, portanto, a biodistribuição destes EXOs (Ohno *et al.*, 2013). Essa funcionalização também poderá ser otimizada, como por exemplo, com a glicosilação dos peptídeos para prevenir a sua degradação (Hung & Leonard, 2015). Por outro lado, para o rastreamento dos EXOs com agentes fluorescentes, radioativos ou de imagiologia

de ressonância magnética (Smyth *et al.*, 2014). Lai *et al.* desenvolveram um método não invasivo e altamente sensível e versátil de imagiologia *in vivo* – EVs possuindo uma Luciferase e um domínio aceitador de Biotina conjugados, que permitem, respetivamente, o rastreamento por bioluminescência (quando combinados com a Luciferina Coelenterazina, substrato da Luciferase) e por tomografia molecular de fluorescência (quando conjugada com Streptavidina previamente marcada). Esses EVs também permitem o rastreamento da sua biodistribuição e *clearance* (C. P. Lai *et al.*, 2014).

### **3.4.2. Loading De Moléculas Terapêuticas In Vivo (Loading Endógeno)** \_\_\_\_\_

Esta é uma vertente bastante apelativa, não só pela sua relevância clínica (por ser *in vivo*) mas também pela ausência de necessidade de produção prévia de EXOs em larga escala, como acontece no *loading* exógeno. A incorporação das moléculas terapêuticas de interesse ocorre durante a biogénese de EXOs, sendo o produto final o EXO-DDS idealizado. Normalmente aplicado para proteínas citosólicas ou transmembranares, pois já serão integradas nos EXOs no processo natural de biogénese, e ainda para moléculas de elevado peso molecular – estando dificultada a passagem através da bicamada lipídica dos EXOs, é preferível fazê-las “nascer” dentro deles (Johnsen *et al.*, 2014; Lim & Kim, 2019).

A transfeção das células de origem é uma técnica na qual vetores ou pré-miRNAs<sup>12</sup> são introduzidos nas células de origem, incitando à expressão exacerbada de um produto de um gene (molécula de interesse), o qual que será incorporado durante a biogénese dos EXOs. É um método bastante efetivo, mas que implica muito tempo e trabalho despendidos. A título de exemplo, num estudo efetuaram a transfeção de células mesenquimais com um plasmídeo contendo o gene responsável pela expressão de miR-146. Observaram uma redução da proliferação tumoral, pelo que se perceberam que as células produziram EXOs contendo miR-146 e que estes exerceram a sua função nas células-alvo (Katakowski *et al.*, 2013).

A incubação das células de origem com moléculas terapêuticas constitui outro método de *loading* endógeno. Num estudo de Pascucci *et al.*, células mesenquimais foram pré-tratadas com uma elevada concentração de Paclitaxel. Observou-se que a concentração do fármaco aumentou no citoplasma dessas células e que o Paclitaxel é incorporado nos EXOs secretados, sendo estes últimos detentores de uma forte atividade anticancerígena (Pascucci *et al.*, 2014).

Concluindo, existem vários métodos de *loading* dos EXO-DDS. Ponderando as suas vantagens e desvantagens, o grande objetivo (e desafio) será atingir uma elevada eficiência de

---

<sup>12</sup> Pré-miRNAs são os precursores dos miRNAs (Zang, 2013).

*loading* sem causar modificações estruturais e composicionais significativas nos EXOs. Ainda, deverão ser estudados mecanismos de otimização dos efeitos indesejados provocados pela aplicação destas técnicas, ao nível das características dependentes do método de preparação, tais como tamanho, morfologia e estabilidade.

### **3.5. Administração Dos EXO-DDS**

---

Existem variados métodos de administração de EXO-DDS sendo a via sistémica a mais frequentemente utilizada (Alvarez-Erviti *et al.*, 2011; Y. Takahashi *et al.*, 2013). No entanto, procuram-se alternativas de modo a tornar a administração dos DDS mais seletiva. No contexto da oncologia, quando a zona do tumor é acessível, é preferível a via intratumoral uma vez que a terapêutica é dirigida, é mais seletiva, evitando efeitos adversos (Kosaka *et al.*, 2012). Num estudo efetuado por Mizrak *et al.*, microvesículas modificadas foram injetadas no tumor, ao mesmo tempo que era administrado via intraperitoneal um profármaco, resultando positivamente na regressão e inibição de crescimento do tumor (Mizrak *et al.*, 2013).

Ainda, outras vias foram exploradas para a entrega de EXO-DDS: oral (Ju *et al.*, 2013), subcutânea (Lee *et al.*, 2011), intraperitoneal (Kosaka *et al.*, 2012), intraventricular (Grapp *et al.*, 2013) e intranasal (Zhuang *et al.*, 2011; Perets *et al.*, 2018). Esta última é curiosamente interessante, pois a via intranasal é prática, não invasiva e promissora para a entrega de fármacos destinados ao Sistema Nervoso Central (SNC) – ou pela transposição da camada epitelial para a corrente sanguínea, evitando metabolismo intestinal e hepático; ou pelo transporte pelas células nervosas olfativas, quando o fármaco ultrapassa a BHE e entra diretamente no cérebro. Contudo, é importante notar que apenas uma pequena parte do fármaco administrado por via intranasal alcança o cérebro. A administração intranasal de EXO-cur ou EXO-JSII24 (anti-inflamatórios), no estudo de Zhuang *et al.* foi bem-sucedida, com um rápido movimento dos EXO-DDS para o cérebro, 1 h após administração intranasal.

## **4. EXO-DDS Na Área Da Oncologia**

---

O cancro é uma patologia com características muito complexas. A sua incidência tem vindo a aumentar todos os anos, tendo sido registados, em 2018, cerca de 60 000 novos casos em Portugal (Serviço Nacional de Saúde, n.d.). Segundo o Portal do Instituto Nacional de Estatística, o cancro é a segunda maior causa de morte, ultrapassada apenas pelas doenças do aparelho circulatório. Relativamente ao ano de 2018, os três mais mortais, no sexo masculino, foram o cancro da traqueia, brônquios e pulmão, o cancro do cólon, reto e ânus e o cancro do estômago, por ordem decrescente. Já no sexo feminino, os três mais mortais foram o cancro da mama, o cancro do cólon, reto e ânus e o cancro da traqueia, brônquios e pulmão,

por ordem decrescente. De um modo geral, o género masculino regista mais mortes por tumores do que o género feminino (Portal do Instituto Nacional de Estatística, n.d.). Infelizmente, a taxa de mortalidade tem tendência a aumentar, prevendo-se uma subida em 31% em 2040. Acredita-se que muitas destas mortes seriam evitáveis com redução dos riscos comportamentais e promoção da prevenção, deteção e tratamento precoces (Serviço Nacional de Saúde, n.d.).

Os tratamentos mais utilizados no cancro são a quimioterapia, a radiação e a remoção cirúrgica, quando possível. Contudo, a complexa patofisiologia do cancro, aliada a diagnósticos tardios e opções de tratamento limitadas suscitam a necessidade de estabelecer terapias inovadoras. Os EXO-DDS têm aqui um papel importante, pois são capazes de proteger e entregar diretamente nas células-alvo determinadas moléculas com atividade biológica, sem provocar grandes efeitos a nível de toxicidade e ativação imunológica (Pullan *et al.*, 2019).

Seguidamente será exposta a vantagem da aplicação de EXO-DDS em dois dos cancros mais prevalentes: o cancro do pulmão e o cancro da mama.

#### **4.1. EXO-DDS No Cancro Do Pulmão**

---

Em contexto oncológico, o cancro do pulmão é o mais agressivo, contando com um elevado número de mortes. Em Portugal, é a principal causa de morte por cancro, no sexo masculino, apesar de haver evidências do seu decréscimo nos últimos anos. Apenas 20% das mulheres sofrem de cancro do pulmão em Portugal, mas há aumento desta tendência (Hespanhol *et al.*, 2013).

O primeiro exemplo de EXO-DDS com potencial terapêutico no cancro do pulmão consiste num estudo efetuado por Aquil *et al.*. Devido à limitada utilização terapêutica do Celastrol, um triterpenoide vegetal com propriedades antitumorais e antiproliferativas, por constatação de baixa biodisponibilidade e toxicidade, estes investigadores decidiram experimentar a entrega deste composto natural através de EXOs. EXOs derivados do leite foram misturados com uma solução rica em Celastrol, promovendo o *loading* desta molécula bioativa nos EXOs. A posterior aplicação em modelos de cancro do pulmão *in vitro* e *in vivo* permitiu observar, respetivamente, uma ação antiproliferativa e antitumoral melhoradas (Aquil *et al.*, 2016).

O segundo exemplo envolve a associação de EXOs derivados do leite com Paclitaxel para o tratamento de cancro do pulmão por administração por via oral, em alternativa à via intravenosa convencional. Os resultados foram promissores, pois os EXOs contendo Paclitaxel administrados por via oral evidenciaram inibição do crescimento tumoral e

diminuída toxicidade quando comparados com o Paclitaxel administrado por via intravenosa (Agrawal *et al.*, 2017).

O terceiro e último exemplo evidencia a potencialidade de *targeting* promovida pelos EXOs. Kim *et al.* efetuaram a otimização de EXOs contendo o citostático Paclitaxel ao adicionarem-lhes um vetor que permitirá o *targeting* de um recetor presente na superfície de células de cancro do pulmão. Estes novos EXOs detêm uma elevada capacidade de *loading*, uma habilidade melhorada para acumular o citostático nas células tumorais por administração sistémica e evidente aumento da taxa de sobrevivência com reduzidos efeitos *off-target* (Kim *et al.*, 2018).

## 4.2. EXO-DDS No Cancro Da Mama

---

O cancro da mama é o cancro mais prevalente e mortal, no sexo feminino, em Portugal. Apesar de existirem evidências recentes da diminuição da incidência desta patologia, por maior adesão a programas de rastreio, a verdade é que estão reportados aumentos nas taxas de incidência de cancro da mama. Isto dever-se-á, provavelmente, a situações de reincidência observados até 20 anos após intervenções cirúrgicas, com maior probabilidade de metástases e resistência a fármacos (Forjaz de Lacerda *et al.*, 2018; Pullan *et al.*, 2019).

No sexo masculino, o cancro da mama é bastante raro, pelo que a literatura existente neste tópico se baseia essencialmente na incidência no sexo feminino. Apesar da panóplia de conhecimentos relativamente ao cancro da mama na mulher ser importante para inferir sobre o diagnóstico e tratamento no homem, existem determinados fatores que diferem entre os dois sexos e que devem ser levados em conta na definição das características do cancro da mama no homem e na procura de opções terapêuticas. Entre esses fatores destaca-se, por exemplo, a regulação hormonal. Atualmente há necessidade de uma investigação mais dedicada para esta patologia (Gucalp *et al.*, 2019). Um exemplo desse esforço consiste num dos maiores ensaios clínicos até à data tendo como foco o desenvolvimento de terapias para o cancro da mama no homem. Atualmente em fase II, o fármaco Seviteronel – inibidor da CYP17A1 não esteroide e dos recetores de androgénios – tem demonstrado potencial na terapêutica do cancro da mama e do cancro da próstata avançado (Gucalp *et al.*, 2019).

O primeiro exemplo de EXO-DDS com potencial terapêutico no cancro da mama envolve a utilização de uma vacina baseada em EXOs para ativação da resposta imune, estratégia promissora para terapia de cancros resistentes a fármacos. EXOs derivados de células dendríticas, previamente transfectadas com um vetor adenoviral (que expressa o oncogene HER2: *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) foram incubados com células T CD4<sup>+</sup>

ativadas com Concanavalina A e posteriormente aplicados em murghinhos possuindo cancros resistentes ao Trastuzumab, um anticorpo monoclonal utilizado contra o cancro da mama. Observou-se o desencadeamento da resposta imune específica para o HER2, mediada por células T citotóxicas, eliminando o tumor (L. Wang *et al.*, 2013).

O segundo exemplo baseia-se na entrega de miRNAs no tratamento do cancro da mama. Um estudo conduzido por O'Brien *et al.* utilizou EXOs para entregar miRNA-134, um supressor tumoral subexpresso no cancro da mama. Observaram-se resultados benéficos na redução da migração e invasão tumorais (O'Brien *et al.*, 2015).

## 5. Codiak BioSciences

---

A Codiak BioSciences é uma empresa de biotecnologia fundada em 2015 e situada em Cambridge, Massachusetts. É pioneira no desenvolvimento de terapias baseadas em EXO-DDS, desenhados para entregar moléculas bioativas dirigidas a um alvo específico, com potencial para revolucionar a limitação de opções terapêuticas num largo espectro de doenças (Our Mission • Codiak BioSciences, n.d.; Square, 2019).

### 5.1. engEx™ Platform

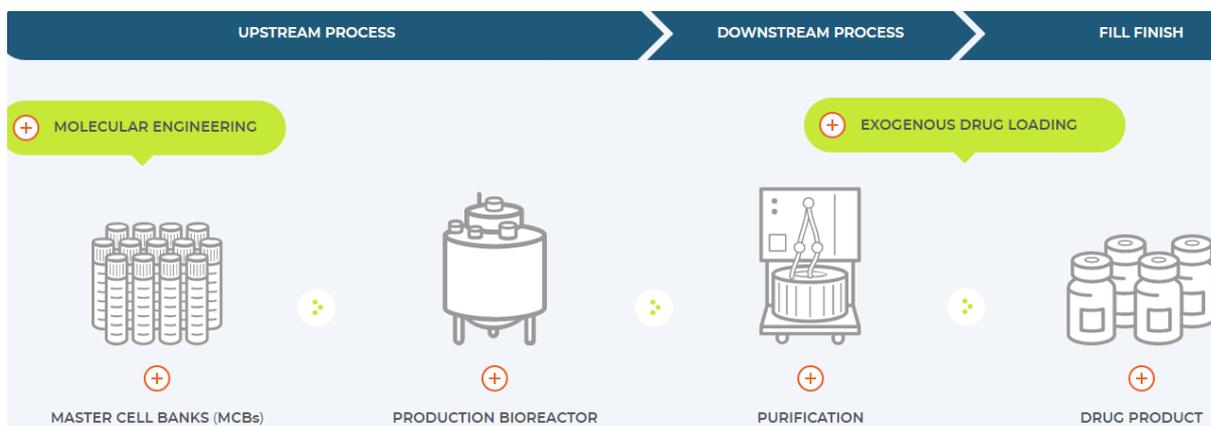
---

A Codiak BioSciences descobriu duas proteínas inatas e extremamente abundantes nos EXOs que desempenham um papel fulcral na engenharia precisa dos EXOs. São elas a PTGFRN (do inglês, *Prostaglandin F2 Receptor Inhibitor*) e a BASP-1 (do inglês, *Brain Acid Soluble Protein 1*), as quais se encontram localizadas na membrana dos EXOs, no exterior e no interior respetivamente. Estas duas proteínas auxiliam no *loading* das mais diversificadas moléculas.

Baseando-se no vasto conhecimento da literatura relativa aos EXOs e com esta nova descoberta, a equipa da Codiak BioSciences desenvolveu a engEx™ Platform. Este processo de manufaturação tem como objetivo expandir as propriedades inatas dos EXOs e divide-se em três pontos (engEx™ Platform • Codiak BioSciences, n.d.):

- ⇒ Design: *loading* das moléculas terapêuticas utilizando os métodos anteriormente descritos, assegurando a proteção e transporte adequados;
- ⇒ Tropismo: pela manipulação do proteoma da superfície dos EXOs, promovem a funcionalização da superfície dos EXOs com capacidades de *targeting* para determinadas células-alvo, levando à entrega seletiva e ao efeito terapêutico desejado;
- ⇒ Entrega: aliado ao tropismo, a administração dos novos EXOs é feita por *compartmental dosing*, isto é, administrar os novos EXOs num compartimento biológico específico,

através de dosagens regionais<sup>13</sup>. Tem o potencial de aumentar o compromisso com o alvo, promovendo uma maior eficácia enquanto reduz os efeitos *off-target* (*Targeted Administration* • Codiak BioSciences, n.d.).



**Figura 5 – Esquema do processo de fabricação de EXOs utilizando a engEx™ Platform.** Na fase *upstream*, num primeiro passo, temos a produção de EXOs pelas MCBs (do inglês, *Master Cell Banks*). Os EXOs produzidos são submetidos ao *design*, tirando partido das proteínas PTGFRN e BASP-I. Posteriormente, num biorreator há geração de um grande volume de EXOs necessários para dar resposta a uma larga população de doentes. Na fase *downstream*, na qual já temos o produto de interesse, vamos sujeitá-lo a metodologias de purificação como tecnologias de filtração e cromatografia avançados. Ainda, se necessário, os EXOs sofrem o *loading* exógeno de moléculas terapêuticas específicas. Finalmente, procedemos estabilização e conservação dos EXOs produzidos. **Retirado do website da Codiak BioSciences** (*Manufacturing* • Codiak BioSciences, n.d.).

De notar que é prioridade da Codiak BioSciences a refinação contínua do processo de produção e inovação dos métodos empregues para obtenção de EXOs reprodutíveis à larga escala e altamente puros (*Manufacturing* • Codiak BioSciences, n.d.).

## 5.2. Pipeline

Com a ajuda da engEx™ Plataforma, a Codiak BioSciences conseguiu construir, gradualmente, um conjunto de potenciais EXOs dirigidos ao tratamento doenças com opções terapêuticas limitadas, nomeadamente nas áreas da oncologia e da neurologia (*Pipeline* • Codiak BioSciences, n.d.).

<sup>13</sup> Demonstram o potencial dos engEx EXOs em modelos pré-clínicos pela administração por vias variadas, tais como intraocular, intratumoral, inalatória, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intraperitoneal, intratecal intracraniana, oral. Diferentes distribuições e retenções tecidulares são observadas em diferentes vias de administração.

**Tabela I – Pipeline da Codiak BioSciences.** Aqui encontram-se listados os EXOs candidatos e respetivas *payload*, via de administração e fase de desenvolvimento do medicamento (*Pipeline • Codiak BioSciences, n.d.*).

<i>Candidatos</i>	<i>Payload</i>	<i>Via de administração</i>	<i>Fase de desenvolvimento</i>
<b>ONCOLOGIA</b>			
<i>exoIL-12™</i>	Biológico	Intratumoral	Fase I
<i>exoSTING™</i>	Molécula pequena	Intratumoral	Fase I/II
<i>exoSTING™</i>	Molécula pequena	Intratumoral/Intratecal	Pré-clínica
<i>exoASO™-STAT6</i>	ASO	Intravenosa	Pré-clínica
<i>exoASO™-STAT3</i>	ASO	AD	Pré-clínica
<i>exoASO™-NRAS</i>	ASO	AD	Descoberta
<i>Oncogene Targets</i>	AD	AD	Descoberta
<b>NEUROLOGIA</b>			
<i>exoASO-NLRP3</i>	ASO	Intratecal	Descoberta
<i>exoASO™-NLRP3</i>	ASO	Intratecal	Descoberta
<i>Gene Targets</i>	Modulação genética	AD	Descoberta
<b>VACINAS</b>			
<i>exoVACC™</i>	Vacina	AD	Descoberta

**Legenda:** AD – A Definir; ASO – Oligonucleótido *Antisense* (do inglês, *Antisense Oligonucleotide*).

É missão da Codiak BioSciences continuar o estudo e o desenvolvimento destes candidatos para criar história e revolucionar os métodos terapêuticos nas áreas acima mencionadas.

## Considerações Finais

---

A exploração dos EXO-DDS na preparação de terapias inovadoras tem vindo a ser cada vez mais preponderante ao longo dos últimos anos. Contudo, ainda há muitas situações a melhorar e questões a serem respondidas.

Com o crescente interesse nas EVs, surgiram, conjuntamente, não só imensas hipóteses ilegítimas (elaboradas por investigadores de áreas distintas demasiado entusiasmados), mas também diversas conclusões insuficientemente fundamentadas. Ora, isto culminou numa utilização errónea dos mesmos termos para partículas estrutural e funcionalmente distintas. Ainda, resultou na atribuição de determinadas características e funções a misturas de populações de EVs. Posto isto, é de enorme relevância a promoção de uma ciência em EVs rigorosa e reprodutível, com o desenvolvimento e emprego de tecnologias efetivas que permitam um correto isolamento, análise e caracterização das EVs e, conseqüentemente, correta atribuição de marcadores estruturais, funções e aplicações terapêuticas. Para tal, as mais recentes publicações científicas respeitantes às EVs devem seguir as recomendações emitidas pela ISEV no documento MISEV2018. Igualmente, é necessária a padronização dos diversos métodos utilizados na produção de EXO-DDS, de forma a conseguir produtos finais reprodutíveis e custo-efetivos, e a reunião de todas as informações complementares que auxiliem na escolha correta das técnicas a utilizar.

Há urgência em efetuar estudos utilizando modelos animais e condições experimentais miméticas das condições fisiológicas. Logicamente, numa cultura celular, os EXOs vão ser mais facilmente colhidos pelas células-alvo pois este é um sistema relativamente simples. Porém, num modelo *in vivo* esta situação já não é tão linear, pelo que há necessidade de investir mais neste tipo de estudos para se poder inferir, com rigor, sobre a biogénese, *trafficking* e *uptake* dos EXOs.

A criação de bases de dados com informações detalhadas das diversas características das patologias, principalmente em doenças como o cancro que são tão complexas, parece ser ideal para a melhor adequação dos métodos de produção de EXO-DDS, para sejam mais específicas e para que haja maior taxa de sucesso na criação destas terapias inovadoras.

A alargada preparação multidisciplinar durante o seu percurso académico torna o farmacêutico apto e fundamental na criação, desenvolvimento e inovação de novas terapias; no estabelecimento de ensaios *in vitro* e *in vivo*, no desenvolvimento e melhoria de métodos e técnicas analíticas; na criação de protocolos e *guidelines* rigorosas e estandardizadas.

## Bibliografia

---

- AGRAWAL, A. K., AQIL, F., JEYABALAN, J., SPENCER, W. A., BECK, J., GACHUKI, B. W., ALHAKEEM, S. S., OBEN, K., MUNAGALA, R., BONDADA, S., & GUPTA, R. C. – **Milk-derived exosomes for oral delivery of paclitaxel.** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.* 13, 5 (2017) 1627–1636.
- ALVAREZ-ERVITI, L., SEOW, Y., YIN, H., BETTS, C., LAKHAL, S., & WOOD, M. J. A. – **Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes.** *Nature Biotechnology.* 29, 4 (2011) 341–345.
- AQIL, F., KAUSAR, H., AGRAWAL, A. K., JEYABALAN, J., KYAKULAGA, A. H., MUNAGALA, R., & GUPTA, R. – **Exosomal formulation enhances therapeutic response of celastrol against lung cancer.** *Experimental and Molecular Pathology.* 101, 1 (2016) 12–21.
- BEBELMAN, M. P., SMIT, M. J., PEGTEL, D. M., & BAGLIO, S. R. – **Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer.** *Pharmacology and Therapeutics.* 188 (2018) 1–11.
- BINENBAUM, Y., FRIDMAN, E., YAARI, Z., MILMAN, N., SCHROEDER, A., DAVID, G. BEN, SHLOMI, T., & GIL, Z. – **Transfer of miRNA in macrophage-derived exosomes induces drug resistance in pancreatic adenocarcinoma.** *Cancer Research.* 78, 18 (2018) 5287–5299.
- BRYNIARSKI, K., PTAK, W., JAYAKUMAR, A., & PÜLLMANN, K. – **Antigen specific antibody coated exosome-like nanovesicles deliver suppressor T cell miRNA-150 to effector T cells in contact sensitivity.** *J Allergy Clin Immunol.* 132, 1 (2013) 170–181.
- CASTAÑO, C., KALKO, S., NOVIALS, A., & PÁRRIZAS, M. – **Obesity-associated exosomal miRNAs modulate glucose and lipid metabolism in mice.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 115, 48 (2018) 12158–12163.
- CHEN, Q., TAKADA, R., NODA, C., KOBAYASHI, S., & TAKADA, S. – **Different populations of Wnt-containing vesicles are individually released from polarized epithelial cells.** *Scientific Reports.* 6 (2016).
- CHENG, Y., & SCHOREY, J. S. – **Extracellular vesicles deliver Mycobacterium RNA to promote host immunity and bacterial killing.** *EMBO Reports.* 20, 3 (2019).
- CHEVILLET, J. R., KANG, Q., RUF, I. K., BRIGGS, H. A., VOJTECH, L. N., HUGHES, S. M., CHENG, H. H., ARROYO, J. D., MEREDITH, E. K., GALLICHOTTE, E. N., POGOSOVA-

AGADJANYAN, E. L., MORRISSEY, C., STIREWALT, D. L., HLADIK, F., YU, E. Y., HIGANO, C. S., & TEWARI, M. – **Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 111, 41 (2014) 14888–14893.

CLINICAL TRIALS.GOV. – **Study Investigating the Ability of Plant Exosomes to Deliver Curcumin to Normal and Colon Cancer Tissue.** (s.d.). [Acedido a 19 de maio de 2020]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01294072>

COCUCCI, E., & MELDOLESI, J. – **Ectosomes and exosomes: Shedding the confusion between extracellular vesicles.** Trends in Cell Biology. 25, 6 (2015) 364–372.

COLOMBO, M., MOITA, C., VAN NIEL, G., KOWAL, J., VIGNERON, J., BENAROCH, P., MANEL, N., MOITA, L. F., THÉRY, C., & RAPOSO, G. – **Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles.** Journal of Cell Science. 126, 24 (2013) 5553–5565.

COLOMBO, M., RAPOSO, G., & THÉRY, C. – **Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles.** Annual Review of Cell and Developmental Biology. 30 (2014) 255–289.

DAS, C. K., JENA, B. C., BANERJEE, I., DAS, S., PAREKH, A., BHUTIA, S. K., & MANDAL, M. – **Exosome as a Novel Shuttle for Delivery of Therapeutics across Biological Barriers.** Molecular Pharmaceutics. 16, 1 (2019) 24–40.

DIAZ, G., WOLFE, L. M., KRUIH-GARCIA, N. A., & DOBOS, K. M. – **Changes in the Membrane-Associated Proteins of Exosomes Released from Human Macrophages after Mycobacterium tuberculosis Infection.** Scientific Reports. 6 (2016).

DREYER, F., & BAUR, A. – **Biogenesis and functions of exosomes and extracellular vesicles.** Methods in Molecular Biology. 1448 (2016) 201–216.

DVORAK, H. F., QUAY, S. C., ORENSTEIN, N. S., DVORAK, A. M., HAHN, P., BITZER, A. M., & CARVALHO, A. C. – **Tumor shedding and coagulation.** Science. 212, 4497 (1981) 923–924.

ELMAGEED, Z. Y. A., YANG, Y., THOMAS, R., RANJAN, M., MONDAL, D., MOROZ, K., FANG, Z., REZK, B. M., MOPARTY, K., SIKKA, S. C., SARTOR, O., & ABDEL-MAGEED, A. B. – **Neoplastic reprogramming of patient-derived adipose stem cells by prostate cancer cell-associated exosomes.** Stem Cells. 32, 4 (2014) 983–997.

ENGEX™ PLATFORM. – **Codiak BioSciences.** (s.d.). [Acedido a 28 de outubro de 2020].

Disponível em: <https://www.codiakbio.com/our-science/engex-platform>

EXOSOME ISOLATION. – **Thermo Fisher Scientific**. (s.d.). [Acedido a 28 de outubro de 2020]. Disponível em: [https://www.thermofisher.com/search/results?query=exosome isolation&focusarea=Search All](https://www.thermofisher.com/search/results?query=exosome%20isolation&focusarea=Search%20All)

EXOSOME ISOLATION KITS & PRODUCTS. – **System Biosciences**. (s.d.). [Acedido a 28 de outubro de 2020]. Disponível em: [https://systembio.com/products/exosome-research/exosome-isolation/#browse\\_all](https://systembio.com/products/exosome-research/exosome-isolation/#browse_all)

FONG, M. Y., ZHOU, W., LIU, L., ALONTAGA, A. Y., CHANDRA, M., ASHBY, J., CHOW, A., O'CONNOR, S. T. F., LI, S., CHIN, A. R., SOMLO, G., PALOMARES, M., LI, Z., TREMBLAY, J. R., TSUYADA, A., SUN, G., REID, M. A., WU, X., SWIDERSKI, P., WANG, S. E. – **Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis**. *Nature Cell Biology*. 17, 2 (2015) 183–194.

FORJAZ DE LACERDA, G., KELLY, S. P., BASTOS, J., CASTRO, C., MAYER, A., MARIOTTO, A. B., & ANDERSON, W. F. – **Breast cancer in Portugal: Temporal trends and age-specific incidence by geographic regions**. *Cancer Epidemiology*. 54 (2018) 12–18.

FUHRMANN, G., SERIO, A., MAZO, M., NAIR, R., & STEVENS, M. M. – **Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins**. *Journal of Controlled Release*. 205 (2015) 35–44.

GENSCHMER, K. R., RUSSELL, D. W., LAL, C., SZUL, T., BRATCHER, P. E., NOERAGER, B. D., ABDUL RODA, M., XU, X., REZONZEW, G., VIERA, L., DOBOSH, B. S., MARGAROLI, C., ABDALLA, T. H., KING, R. W., MCNICHOLAS, C. M., WELLS, J. M., DRANSFIELD, M. T., TIROUVANZIAM, R., GAGGAR, A., & BLALOCK, J. E. – **Activated PMN Exosomes: Pathogenic Entities Causing Matrix Destruction and Disease in the Lung**. *Cell*. 176, 1–2 (2019).

GORAIN, B., BHATTAMISHRA, S. K., CHOUDHURY, H., NANDI, U., PANDEY, M., & KESHARWANI, P. – **Overexpressed Receptors and Proteins in Lung Cancer**. *Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Lung Cancer*. (2019) 39–75.

GRANT, R., ANSA-ADDO, E., STRATTON, D., ANTWI-BAFFOUR, S., JORFI, S., KHOLIA, S., KRIGE, L., LANGE, S., & INAL, J. – **A filtration-based protocol to isolate human Plasma Membrane-derived Vesicles and exosomes from blood plasma**. *Journal of Immunological Methods*. 371, 1–2 (2011) 143–151.

GRAPP, M., WREDE, A., SCHWEIZER, M., HÜWEL, S., GALLA, H. J., SNAIDERO, N.,

- SIMONS, M., BÜCKERS, J., LOW, P. S., URLAUB, H., GÄRTNER, J., & STEINFELD, R. – **Choroid plexus transcytosis and exosome shuttling deliver folate into brain parenchyma.** *Nature Communications.* 4 (2013).
- GUCALP, A., TRAINA, T. A., EISNER, J. R., PARKER, J. S., SELITSKY, S. R., PARK, B. H., ELIAS, A. D., BASKIN-BEY, E. S., & CARDOSO, F. – **Male breast cancer: a disease distinct from female breast cancer.** *Breast Cancer Research and Treatment.* 173, 1 (2019) 37–48.
- GUPTA, S., RAWAT, S., ARORA, V., KOTTARATH, S. K., DINDA, A. K., VAISHNAV, P. K., NAYAK, B., & MOHANTY, S. – **An improvised one-step sucrose cushion ultracentrifugation method for exosome isolation from culture supernatants of mesenchymal stem cells.** *Stem Cell Research and Therapy.* 9, 1 (2018).
- HANEY, M. J., KLYACHKO, N. L., ZHAO, Y., GUPTA, R., PLOTNIKOVA, E. G., HE, Z., PATEL, T., PIROYAN, A., SOKOLSKY, M., KABANOV, A. V., & BATRAKOVA, E. V. – **Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson’s disease therapy.** *Journal of Controlled Release.* 207 (2015) 18–30.
- HARRIS, D. A., PATEL, S. H., GUCEK, M., HENDRIX, A., WESTBROEK, W., & TARASKA, J. W. – **Exosomes released from breast cancer carcinomas stimulate cell movement.** *PLoS ONE.* 10, 3 (2015).
- HESPANHOL, V., PARENTE, B., ARAÚJO, A., CUNHA, J., FERNANDES, A., FIGUEIREDO, M. M., NEVEDAG, R., SOARES, M., JOÃOE, F., & QUEIROGA, H. – **Cancro do pulmão no norte de Portugal: Um estudo de base hospitalar.** *Revista Portuguesa de Pneumologia.* 19, 6 (2013) 245–251.
- HESSVIK, N. P., & LLORENTE, A. – **Current knowledge on exosome biogenesis and release.** *Cellular and Molecular Life Sciences.* 75, 2 (2018) 193–208.
- HOOD, J. L. – **Post isolation modification of exosomes for nanomedicine applications.** *Nanomedicine.* 11, 13 (2016) 1745–1756.
- HOOD, J. L., SCOTT, M. J., & WICKLINE, S. A. – **Maximizing exosome colloidal stability following electroporation.** *Analytical Biochemistry.* 448, 1 (2014) 41–49.
- HUNG, M. E., & LEONARD, J. N. – **Stabilization of exosome-targeting peptides via engineered glycosylation.** *Journal of Biological Chemistry.* 290, 13 (2015) 8166–8172.
- JANG, S. C., KIM, O. Y., YOON, C. M., CHOI, D. S., ROH, T. Y., PARK, J., NILSSON, J., LÖTVALL, J., KIM, Y. K., & GHO, Y. S. – **Bioinspired exosome-mimetic nanovesicles for targeted delivery of chemotherapeutics to malignant tumors.** *ACS Nano.* 7, 9

(2013) 7698–7710.

JEPPESEN, D. K., FENIX, A. M., FRANKLIN, J. L., HIGGINBOTHAM, J. N., ZHANG, Q., ZIMMERMAN, L. J., LIEBLER, D. C., PING, J., LIU, Q., EVANS, R., FISSELL, W. H., PATTON, J. G., ROME, L. H., BURNETTE, D. T., & COFFEY, R. J. – **Reassessment of Exosome Composition.** *Cell*. 177, 2 (2019) 428–445.

JOHNSEN, K. B., GUDBERGSSON, J. M., SKOV, M. N., CHRISTIANSEN, G., GUREVICH, L., MOOS, T., & DUROUX, M. – **Evaluation of electroporation-induced adverse effects on adipose-derived stem cell exosomes.** *Cytotechnology*. 68, 5 (2016) 2125–2138.

JOHNSEN, K. B., GUDBERGSSON, J. M., SKOV, M. N., PILGAARD, L., MOOS, T., & DUROUX, M. – **A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles – Endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy.** *Biochimica et Biophysica Acta – Reviews on Cancer*. 1846, 1 (2014) 75–87.

JU, S., MU, J., DOKLAND, T., ZHUANG, X., WANG, Q., JIANG, H., XIANG, X., DENG, Z. BIN, WANG, B., ZHANG, L., ROTH, M., WELTI, R., MOBLEY, J., JUN, Y., MILLER, D., & ZHANG, H. G. – **Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis.** *Molecular Therapy*. 21, 7 (2013) 1345–1357.

KALANI, A., & CHATURVEDI, P. – **Curcumin-primed and curcumin-loaded exosomes: Potential neural therapy.** *Neural Regeneration Research*. 12, 2 (2017) 205–206.

KALLURI, R., & LEBLEU, V. S. – **The biology, function, and biomedical applications of exosomes.** *Science*. 367, 6478 (2020).

KAMERKAR, S., LEBLEU, V. S., SUGIMOTO, H., YANG, S., RUIVO, C. F., MELO, S. A., LEE, J. J., & KALLURI, R. – **Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer.** *Nature*. 546, 7659 (2017) 498–503.

KATAKOWSKI, M., BULLER, B., ZHENG, X., LU, Y., ROGERS, T., OSOBAMIRO, O., SHU, W., JIANG, F., & CHOPP, M. – **Exosomes from marrow stromal cells expressing miR-146b inhibit glioma growth.** *Cancer Letters*. 335, 1 (2013) 201–204.

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

KIBRIA, G., RAMOS, E. K., WAN, Y., GIUS, D. R., & LIU, H. – **Exosomes as a Drug**

**Delivery System in Cancer Therapy: Potential and Challenges.** *Molecular Pharmaceutics*. 15, 9 (2018) 3625–3633.

KIM, M. S., HANEY, M. J., ZHAO, Y., MAHAJAN, V., DEYGEN, I., KLYACHKO, N. L., INSKOE, E., PIROYAN, A., SOKOLSKY, M., OKOLIE, O., HINGTGEN, S. D., KABANOV, A. V., & BATRAKOVA, E. V. – **Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells.** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 12, 3 (2016) 655–664.

KIM, M. S., HANEY, M. J., ZHAO, Y., YUAN, D., DEYGEN, I., KLYACHKO, N. L., KABANOV, A. V., & BATRAKOVA, E. V. – **Engineering macrophage-derived exosomes for targeted paclitaxel delivery to pulmonary metastases: in vitro and in vivo evaluations.** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 14, 1 (2018) 195–204.

KOSAKA, N., IGUCHI, H., YOSHIOKA, Y., HAGIWARA, K., TAKESHITA, F., & OCHIYA, T. – **Competitive interactions of cancer cells and normal cells via secretory microRNAs.** *Journal of Biological Chemistry*. 287, 2 (2012) 1397–1405.

KOWAL, J., ARRAS, G., COLOMBO, M., JOUVE, M., MORATH, J. P., PRIMDAL-BENGTSON, B., DINGLI, F., LOEW, D., TKACH, M., & THÉRY, C. – **Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 113, 8 (2016) 968–977.

KUMARI, A. – **Ceramide Structure and Derivatives.** *Sweet Biochemistry*. (2018) 59–61.

KW, P., & KIERULF, B. – **Direct Isolation of Exosomes from Cell Culture: Simplifying Methods for Exosome Enrichment and Analysis.** *Translational Biomedicine*. 6, 2 (2015).

LAI, C. P., MARDINI, O., ERICSSON, M., PRABHAKAR, S., MAGUIRE, C. A., CHEN, J. W., TANNOUS, B. A., & BREAKFIELD, X. O. – **Dynamic biodistribution of extracellular vesicles in vivo using a multimodal imaging reporter.** *ACS Nano*. 8, 1 (2014) 483–494.

LAI, R. C., YEO, R. W. Y., TAN, K. H., & LIM, S. K. – **Exosomes for drug delivery – a novel application for the mesenchymal stem cell.** *Biotechnology Advances*. (2012).

LEE, Y. S., KIM, S. H., CHO, J. A., & KIM, C. W. – **Introduction of the CIITA gene into tumor cells produces exosomes with enhanced anti-tumor effects.** *Experimental and Molecular Medicine*. 43, 5 (2011) 281–290.

LI, P., KASLAN, M., LEE, S. H., YAO, J., & GAO, Z. – **Progress in exosome isolation techniques.** *Theranostics*. 7, 3 (2017) 789–804.

- LIAO, W., DU, Y., ZHANG, C., PAN, F., YAO, Y., ZHANG, T., & PENG, Q. – **Exosomes: The next generation of endogenous nanomaterials for advanced drug delivery and therapy.** *Acta Biomaterialia*. 86 (2019) 1–14.
- LIM, W., & KIM, H. S. – **Exosomes as Therapeutic Vehicles for Cancer.** *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 16, 3 (2019) 213–223.
- LIU, Y., & CHEN, Q. – **150 years of Darwin’s theory of intercellular flow of hereditary information.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 19, 12 (2018) 749–750.
- MAHAWENI, N. M., KAIJEN-LAMBERS, M. E. H., DEKKERS, J., AERTS, J. G. J. V., & HEGMANS, J. P. J. J. – **Tumour-derived exosomes as antigen delivery carriers in dendritic cell-based immunotherapy for malignant mesothelioma.** *Journal of Extracellular Vesicles*. 2, 1 (2013).
- MALHOTRA, H., SHEOKAND, N., KUMAR, S., CHAUHAN, A. S., KUMAR, M., JAKHAR, P., BORADIA, V. M., RAJE, C. I., & RAJE, M. – **Exosomes: Tunable nano vehicles for macromolecular delivery of transferrin and lactoferrin to specific intracellular compartment.** *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 12, 5 (2016) 1101–1114.
- MANUFACTURING. – **Codiak BioSciences.** (s.d.). [Acedido a 28 de outubro de 2020]. Disponível em: <https://www.codiakbio.com/manufacturing>
- MARGOLIS, L., & SADOVSKY, Y. – **The biology of extracellular vesicles: The known unknowns.** *PLoS Biology*. 17, 7 (2019) 1–12.
- MATHIEU, M., MARTIN-JAULAR, L., LAVIEU, G., & THÉRY, C. – **Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication.** *Nature Cell Biology*. 21, 1 (2019) 9–17.
- MAYOURIAN, J., CEHOLSKI, D. K., GORSKI, P. A., MATHIYALAGAN, P., MURPHY, J. F., SALAZAR, S. I., STILLITANO, F., HARE, J. M., SAHOO, S., HAJJAR, R. J., & COSTA, K. D. – **Exosomal microRNA-21-5p Mediates Mesenchymal Stem Cell Paracrine Effects on Human Cardiac Tissue Contractility.** *Circulation Research*. 122, 7 (2018) 933–944.
- MCANDREWS, K. M., & KALLURI, R. – **Mechanisms associated with biogenesis of exosomes in cancer.** *Molecular Cancer*. 18, 1 (2019).
- MELO, S. A., SUGIMOTO, H., O’CONNELL, J. T., KATO, N., VILLANUEVA, A., VIDAL, A., QIU, L., VITKIN, E., PERELMAN, L. T., MELO, C. A., LUCCI, A., IVAN, C., CALIN, G. A., & KALLURI, R. – **Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis.** *Cancer Cell*. 26, 5 (2014) 707–721.

MENDT, M., KAMERKAR, S., SUGIMOTO, H., MCANDREWS, K. M., WU, C. C., GAGEA, M., YANG, S., BLANKO, E. V. R., PENG, Q., MA, X., MARSZALEK, J. R., MAITRA, A., YEE, C., REZVANI, K., SHPALL, E., LEBLEU, V. S., & KALLURI, R. – **Generation and testing of clinical-grade exosomes for pancreatic cancer.** JCI Insight. 3, 8 (2018).

MENON, R., DEBNATH, C., LAI, A., GUANZON, D., BHATNAGAR, S., KSHETRAPAL, P. K., SHELLER-MILLER, S., & SALOMON, C. – **Circulating exosomal miRNA profile during term and preterm birth pregnancies: A longitudinal study.** Endocrinology. 160, 2 (2019) 249–275.

MENON, R., DIXON, C. L., SHELLER-MILLER, S., FORTUNATO, S. J., SAADE, G. R., PALMA, C., LAI, A., GUANZON, D., & SALOMON, C. – **Quantitative proteomics by SWATH-MS of maternal plasma exosomes determine pathways associated with term and preterm birth.** Endocrinology. 160, 3 (2019) 639–650.

MIZRAK, A., BOLUKBASI, M. F., OZDENER, G. B., BRENNER, G. J., MADLENER, S., ERKAN, E. P., STRÖBEL, T., BREAKEFIELD, X. O., & SAYDAM, O. – **Genetically engineered microvesicles carrying suicide mRNA/protein inhibit schwannoma tumor growth.** Molecular Therapy. 21, 1 (2013) 101–108.

MORISHITA, M., TAKAHASHI, Y., MATSUMOTO, A., NISHIKAWA, M., & TAKAKURA, Y. – **Exosome-based tumor antigens–adjuvant co-delivery utilizing genetically engineered tumor cell-derived exosomes with immunostimulatory CpG DNA.** Biomaterials. 111 (2016) 55–65.

MUNAGALA, R., AQIL, F., JEYABALAN, J., AGRAWAL, A. K., MUDD, A. M., KYAKULAGA, A. H., SINGH, I. P., VADHANAM, M. V., & GUPTA, R. C. – **Exosomal formulation of anthocyanidins against multiple cancer types.** Cancer Letters. 393 (2017) 94–102.

MUNAGALA, R., AQIL, F., JEYABALAN, J., & GUPTA, R. C. – **Bovine milk-derived exosomes for drug delivery.** Cancer Letters. 371, 1 (2016) 48–61.

NAKASE, I., & FUTAKI, S. – **Combined treatment with a pH-sensitive fusogenic peptide and cationic lipids achieves enhanced cytosolic delivery of exosomes.** Scientific Reports. 5 (2015).

DRUG DELIVERY SYSTEMS. – **National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering.** (s.d.). [Acedido a 19 de maio de 2020]. Disponível em: <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/drug-delivery-systems-getting-drugs-their-targets-controlled-manner#pid-1241>

O'BRIEN, K., LOWRY, M. C., CORCORAN, C., MARTINEZ, V. G., DALY, M., RANI, S., GALLAGHER, W. M., RADOMSKI, M. W., MACLEOD, R. A. F., & O'DRISCOLL, L. – **miR-134 in extracellular vesicles reduces triple-negative breast cancer aggression and increases drug sensitivity.** *Oncotarget*. 6, 32 (2015) 32774–32789.

OHNO, S. I., TAKANASHI, M., SUDO, K., UEDA, S., ISHIKAWA, A., MATSUYAMA, N., FUJITA, K., MIZUTANI, T., OHGI, T., OCHIYA, T., GOTOH, N., & KURODA, M. – **Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells.** *Molecular Therapy*. 21, 1 (2013) 185–191.

OOSTHUYZEN, W., SIME, N. E. L., IVY, J. R., TURTLE, E. J., STREET, J. M., POUND, J., BATH, L. E., WEBB, D. J., GREGORY, C. D., BAILEY, M. A., & DEAR, J. W. – **Quantification of human urinary exosomes by nanoparticle tracking analysis.** *Journal of Physiology*. 591, 23 (2013) 5833–5842.

OUR MISSION. – **Codiak BioSciences.** (s.d.). [Acedido a 28 de outubro 2020]. Disponível em: <https://www.codiakbio.com/about-us/our-mission>

OZPOLAT, B., SOOD, A. K., & LOPEZ-BERESTEIN, G. – **Liposomal siRNA nanocarriers for cancer therapy.** *Advanced Drug Delivery Reviews*. 66 (2014) 110–116.

PALMIROTTA, R., LOVERO, D., CAFFORIO, P., FELICI, C., MANNAVOLA, F., PELLÈ, E., QUARESMINI, D., TUCCI, M., & SILVESTRIS, F. – **Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology.** *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 10 (2018).

PAN, Q., RAMAKRISHNAIAH, V., HENRY, S., FOURASCHEN, S., DE RUITER, P. E., KWEKKEBOOM, J., TILANUS, H. W., JANSSEN, H. L. A., & VAN DER LAAN, L. J. W. – **Hepatic cell-to-cell transmission of small silencing RNA can extend the therapeutic reach of RNA interference (RNAi).** *Gut*. 61, 9 (2012) 1330–1339.

PASCUCCI, L., COCCÈ, V., BONOMI, A., AMI, D., CECCARELLI, P., CIUSANI, E., VIGANÒ, L., LOCATELLI, A., SISTO, F., DOGLIA, S. M., PARATI, E., BERNARDO, M. E., MURACA, M., ALESSANDRI, G., BONDILOTTI, G., & PESSINA, A. – **Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: A new approach for drug delivery.** *Journal of Controlled Release*. 192 (2014) 262–270.

PATHAN, M., FONSEKA, P., CHITTI, S. V., KANG, T., SANWLANI, R., VAN DEUN, J., HENDRIX, A., & MATHIVANAN, S. – **Vesiclepedia 2019: A compendium of RNA,**

**proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles.** *Nucleic Acids Research*. 47, D1 (2019) D516–D519.

PENG, Q., ZHANG, S., YANG, Q., ZHANG, T., WEI, X. Q., JIANG, L., ZHANG, C. L., CHEN, Q. M., ZHANG, Z. R., & LIN, Y. F. – **Preformed albumin corona, a protective coating for nanoparticles based drug delivery system.** *Biomaterials*. 34, 33 (2013) 8521–8530.

PERETS, N., HERTZ, S., LONDON, M., & OFFEN, D. – **Intranasal administration of exosomes derived from mesenchymal stem cells ameliorates autistic-like behaviors of BTBR mice.** *Molecular Autism*. 9, 1 (2018).

PIPELINE. – **Codiak BioSciences.** (s.d.). [Acedido a 30 de outubro de 2020]. Disponível em: <https://www.codiakbio.com/pipeline-programs/pipeline>

PLEBANEK, M. P., ANGELONI, N. L., VINOKOUR, E., LI, J., HENKIN, A., MARTINEZ-MARIN, D., FILLEUR, S., BHOWMICK, R., HENKIN, J., MILLER, S. D., IFERGAN, I., LEE, Y., OSMAN, I., THAXTON, C. S., & VOLPERT, O. V. – **Pre-metastatic cancer exosomes induce immune surveillance by patrolling monocytes at the metastatic niche.** *Nature Communications*. 8, 1 (2017).

PODOLAK, I., GALANTY, A., & SOBOLEWSKA, D. – **Saponins as cytotoxic agents: A review.** *Phytochemistry Reviews*. 9, 3 (2010) 425–474.

ÓBITOS (N.º) POR LOCAL DE RESIDÊNCIA (NUTS – 2013), SEXO, GRUPO ETÁRIO E CAUSA DE MORTE (LISTA OCDE ADAPTADA). – **Portal do Instituto Nacional de Estatística.** (s.d.). [Acedido a 19 de maio 2020. Disponível em: [https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_indicadores&indOcorrCod=0008281&selTab=tab0&xlang=pt](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0008281&selTab=tab0&xlang=pt)

PULLAN, J. E., CONFELD, M. I., OSBORN, J. K., KIM, J., SARKAR, K., & MALLIK, S. – **Exosomes as Drug Carriers for Cancer Therapy.** *Molecular Pharmaceutics*. 16, 5 (2019) 1789–1798.

QI, H., LIU, C., LONG, L., REN, Y., ZHANG, S., CHANG, X., QIAN, X., JIA, H., ZHAO, J., SUN, J., HOU, X., YUAN, X., & KANG, C. – **Blood Exosomes Endowed with Magnetic and Targeting Properties for Cancer Therapy.** *ACS Nano*. 10, 3 (2016) 3323–3333.

RANA, S., YUE, S., STADEL, D., & ZÖLLER, M. – **Toward tailored exosomes: The exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection.** *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 44, 9 (2012) 1574–1584.

ROMAGNOLI, G. G., ZELANTE, B. B., TONIOLO, P. A., MIGLIORI, I. K., & BARBUTO, J. A.

M. – **Dendritic cell-derived exosomes may be a tool for cancer immunotherapy by converting tumor cells into immunogenic targets.** *Frontiers in Immunology*. 6 (2015).

ROSAS, L. E., ELGAMAL, O. A., MO, X., PHELPS, M. A., SCHMITTGEN, T. D., & PAPPENFUSS, T. L. – **In vitro immunotoxicity assessment of culture-derived extracellular vesicles in human monocytes.** *Journal of Immunotoxicology*. 13, 5 (2016) 652–665.

SHELLER-MILLER, S., TRIVEDI, J., YELLON, S. M., & MENON, R. – **Exosomes Cause Preterm Birth in Mice: Evidence for Paracrine Signaling in Pregnancy.** *Scientific Reports*. 9, 1 (2019) 608.

SAARI, H., LÁZARO-IBÁÑEZ, E., VIITALA, T., VUORIMAA-LAUKKANEN, E., SILJANDER, P., & YLIPERTTULA, M. – **Microvesicle- and exosome-mediated drug delivery enhances the cytotoxicity of Paclitaxel in autologous prostate cancer cells.** *Journal of Controlled Release*. 220 (2015) 727–737.

SANSONE, P., SAVINI, C., KURELAC, I., CHANG, Q., AMATO, L. B., STRILLACCI, A., STEPANOVA, A., IOMMARINI, L., MASTROLEO, C., DALY, L., GALKIN, A., THAKUR, B. K., SOPLOP, N., URYU, K., HOSHINO, A., NORTON, L., BONAFÉ, M., CRICCA, M., GASPARE, G., ... BROMBERG, J. – **Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 114, 43 (2017) E9066–E9075.

SATO, Y. T., UMEZAKI, K., SAWADA, S., MUKAI, S. A., SASAKI, Y., HARADA, N., SHIKU, H., & AKIYOSHI, K. – **Engineering hybrid exosomes by membrane fusion with liposomes.** *Scientific Reports*. 6 (2016).

DIA MUNDIAL DO CANCRO. – **Serviço Nacional de Saúde.** (s.d.). [Acedido a 19 de maio de 2020. Disponível em: <https://www.sns.gov.pt/noticias/2019/02/01/dia-mundial-do-cancro/>

SHTAM, T. A., KOVALEV, R. A., VARFOLOMEEVA, E. Y., MAKAROV, E. M., KIL, Y. V., & FILATOV, M. V. – **Exosomes are natural carriers of exogenous siRNA to human cells in vitro.** *Cell Communication and Signaling*. 11, 1 (2013).

SMYTH, T., PETROVA, K., PAYTON, N. M., PERSAUD, I., REDZIC, J. S., GRANER, M. W., SMITH-JONES, P., & ANCHORDOQUY, T. J. – **Surface functionalization of exosomes using click chemistry.** *Bioconjugate Chemistry*. 25, 10 (2014) 1777–1784.

SORIA, F. N., PAMPLIEGA, O., BOURDENX, M., MEISSNER, W. G., BEZARD, E., & DEHAY,

B. – **Exosomes, an unmasked culprit in neurodegenerative diseases.** *Frontiers in Neuroscience*. 11 (2017).

CODIAK BIOSCIENCES. – **Linked-in.** [Acedido a 28 de outubro de 2020]. Disponível em: <https://www.linkedin.com/company/codiak-biosciences>

SUN, D., ZHUANG, X., XIANG, X., LIU, Y., ZHANG, S., LIU, C., BARNES, S., GRIZZLE, W., MILLER, D., & ZHANG, H. G. – **A novel nanoparticle drug delivery system: The anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes.** *Molecular Therapy*. 18, 9 (2010) 1606–1614.

SZABO, G., & MOMEN-HERAVI, F. – **Extracellular Vesicles and Exosomes: Biology and Pathobiology.** In: I. M. ARIAS, H. J. ALTER, J. L. BOYER, D. E. COHEN, D. A. SHAFRITZ, S. S. THORGEIRSSON, & A. W. WOLKOFF. *The Liver: Biology and Pathobiology.* John Wiley & Sons Ltd. 2020. 978-1-119-43682-9, 1122.

TAKAHASHI, A., OKADA, R., NAGAO, K., KAWAMATA, Y., HANYU, A., YOSHIMOTO, S., TAKASUGI, M., WATANABE, S., KANEMAKI, M. T., OBUSE, C., & HARA, E. – **Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells.** *Nature Communications*. 8 (2017).

TAKAHASHI, Y., NISHIKAWA, M., SHINOTSUKA, H., MATSUI, Y., OHARA, S., IMAI, T., & TAKAKURA, Y. – **Visualization and in vivo tracking of the exosomes of murine melanoma B16-BL6 cells in mice after intravenous injection.** *Journal of Biotechnology*. 165, 2 (2013) 77–84.

TARGETED ADMINISTRATION. – **Codiak BioSciences.** (s.d.). [Acedido a 28 de outubro de 2020]. Disponível em: <https://www.codiakbio.com/our-science/targeted-administration>

THÉRY, C., WITWER, K. W., AIKAWA, E., ALCARAZ, M. J., ANDERSON, J. D., ANDRIANTSITOHAINA, R., ANTONIOU, A., ARAB, T., ARCHER, F., ATKIN-SMITH, G. K., AYRE, D. C., BACH, J.-M., BACHURSKI, D., BAHARVAND, H., BALAJ, L., BALDACCHINO, S., BAUER, N. N., BAXTER, A. A., BEBAWY, M., ... ZUBA-SURMA, E. K. – **Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines.** *Journal of Extracellular Vesicles*. 7,1 (2018) 1022–1027.

TIAN, Y., LI, S., SONG, J., JI, T., ZHU, M., ANDERSON, G. J., WEI, J., & NIE, G. – **A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy.** *Biomaterials*. 35, 7 (2014) 2383–2390.

- TRAMS, E. G., LAUTER, C. J., NORMAN SALEM, J., & HEINE, U. – **Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles.** *BBA – Biomembranes.* 645, 1 (1981) 63–70.
- VAN NIEL, G., D'ANGELO, G., & RAPOSO, G. – **Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 19, 4 (2018) 213–228.
- VILLARROYA-BELTRI, C., BAIXAULI, F., MITTELBRUNN, M., FERNÁNDEZ-DELGADO, I., TORRALBA, D., MORENO-GONZALO, O., BALDANTA, S., ENRICH, C., GUERRA, S., & SÁNCHEZ-MADRID, F. – **ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins.** *Nature Communications.* 7 (2016).
- WAHLGREN, J., KARLSON, T. D. L., BRISLERT, M., VAZIRI SANI, F., TELEMO, E., SUNNERHAGEN, P., & VALADI, H. – **Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes.** *Nucleic Acids Research.* 40, 17 (2012).
- WANG, C.-F., MÄKILÄ, E. M., KAASALAINEN, M. H., LIU, D., SARPARANTAC, M. P., AIRAKSINEN, A. J., SALONEN, J. J., HIRVONEN, J. T., & SANTOS, H. A. – **Copper-free azidealkyne cycloaddition of targeting peptides to porous silicon nanoparticles for intracellular drug uptake.** *Biomaterials.* 35 (2014) 1257–1266.
- WANG, J., GUO, R., YANG, Y., JACOBS, B., CHEN, S., IWUCHUKWU, I., GAINES, K. J., CHEN, Y., SIMMAN, R., LV, G., WU, K., & BIHL, J. C. – **The Novel Methods for Analysis of Exosomes Released from Endothelial Cells and Endothelial Progenitor Cells.** *Stem Cells International.* 2016.
- WANG, L., XIE, Y., AHMED, K. A., AHMED, S., SAMI, A., CHIBBAR, R., XU, Q., KANE, S. E., HAO, S., MULLIGAN, S. J., & XIANG, J. – **Exosomal pMHC-I complex targets T cell-based vaccine to directly stimulate CTL responses leading to antitumor immunity in transgenic FVBneuN and HLA-A2/HER2 mice and eradicating trastuzumab-resistant tumor in athymic nude mice.** *Breast Cancer Research and Treatment.* 140, 2 (2013) 273–284.
- WANG, Q., REN, Y., MU, J., EGILMEZ, N. K., ZHUANG, X., DENG, Z., ZHANG, L., YAN, J., MILLER, D., & ZHANG, H. G. – **Grapefruit-derived nanovectors use an activated leukocyte trafficking pathway to deliver therapeutic agents to inflammatory tumor sites.** *Cancer Research.* 75, 12 (2015) 2520–2529.
- WEN, S. W., LIMA, L. G., LOBB, R. J., NORRIS, E. L., HASTIE, M. L., KRUMEICH, S., &

- MÖLLER, A. – **Breast Cancer-Derived Exosomes Reflect the Cell-of-Origin Phenotype.** *Proteomics*. 19, 8 (2019).
- WHITESIDE, T. L. – **Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Cancer Progression.** *Advances in Clinical Chemistry*. 74 (2016) 103–141.
- WITWER, K. W., BUZA, E. I., BERNIS, L. T., LO, J., NOLTE, E. N., BORA, A., LA, C., PIPER, M. G., SIVARAMAN, S., THE, C., & HOCHBERG, F. – **Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research.** *Journal of Extracellular Vesicles*. 2, 20360 (2013) 1–25.
- WOLF, P. – **The nature and significance of platelet products in human plasma.** *British Journal of Haematology*. 13, 3 (1967) 269–288.
- YANG, T., MARTIN, P., FOGARTY, B., BROWN, A., SCHURMAN, K., PHIPPS, R., YIN, V. P., LOCKMAN, P., & BAI, S. – **Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in Danio Rerio.** *Pharmaceutical Research*. 32, 6 (2015) 2003–2014.
- YUAN, L., & LI, J. Y. – **Exosomes in parkinson’s disease: Current perspectives and future challenges.** *ACS Chemical Neuroscience*. 10, 2 (2019) 964–972.
- ZHANG Y. – **Pre-miRNA.** In: DUBITZKY W., WOLKENHAUER O., CHO KH., YOKOTA H. *Encyclopedia of Systems Biology*. New York, Springer, 2013. 978-1-4419-9863-7.
- ZHANG, H., FREITAS, D., KIM, H. S., FABIJANIC, K., LI, Z., CHEN, H., MARK, M. T., MOLINA, H., MARTIN, A. B., BOJMAR, L., FANG, J., RAMPERSAUD, S., HOSHINO, A., MATEI, I., KENIFIC, C. M., NAKAJIMA, M., MUTVEI, A. P., SANSONE, P., BUEHRING, W., ... LYDEN, AND D. – **Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation.** *Nature Cell Biology*. 20 (2018) 332–343.
- ZHU, X., BADAWI, M., POMEROY, S., SUTARIA, D. S., XIE, Z., BAEK, A., JIANG, J., ELGAMAL, O. A., MO, X., PERLE, K. LA, CHALMERS, J., SCHMITTGEN, T. D., & PHELPS, M. A. – **Comprehensive toxicity and immunogenicity studies reveal minimal effects in mice following sustained dosing of extracellular vesicles derived from HEK293T cells.** *Journal of Extracellular Vesicles*. 6, 1 (2017).
- ZHUANG, X., XIANG, X., GRIZZLE, W., SUN, D., ZHANG, S., AXTELL, R. C., JU, S., MU, J., ZHANG, L., STEINMAN, L., MILLER, D., & ZHANG, H. G. – **Treatment of brain**

**inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain.** *Molecular Therapy*. 19, 10 (2011) 1769–1779.