



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Mariana Nunes Aniceto

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “A utilização de vesículas extracelulares no diagnóstico e tratamento de doenças infecciosas”, referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, do Dr. Paulo Jorge da Silva Monteiro, Dra. Cláudia Maria Branco da Gama e da Professora Doutora Maria do Céu Sousa, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Mariana Nunes Aniceto

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “A utilização de vesículas extracelulares no diagnóstico e tratamento de doenças infecciosas”, referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, do Dr. Paulo Jorge da Silva Monteiro, Dra. Cláudia Maria Branco da Gama e da Professora Doutora Maria do Céu Sousa, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2021

Eu, Mariana Nunes Aniceto, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2016231733, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “A utilização de vesículas extracelulares no diagnóstico e tratamento de doenças infecciosas” 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, 23 de setembro de 2021.

Mariana Nunes Aniceto

(Mariana Nunes Aniceto)

Agradecimentos

À minha mãe e ao meu pai, por me darem a liberdade de voar, mas serem sempre o meu porto seguro para onde voltar.

Aos meus irmãos, por serem os melhores companheiros de vida que podia ter.

Aos meus avós, por me apoiarem sempre, mesmo quando não concordam com as minhas escolhas e a toda a minha família por estarem sempre lá com um sorriso ao ver-me crescer.

Aos meus amigos de vida e aos amigos que a vida me deu, por crescermos juntos.

Ao TRI, à Beatriz e à Gabriela, por me entenderem como ninguém e por acreditarem em mim mesmo quando eu não acreditava.

Aos meus padrinhos e afilhados por partilharem parte deste percurso comigo.

À Phartuna – Tuna de Farmácia de Coimbra, a minha segunda família. Por tudo o que vivemos pelo país fora com instrumentos às costas e que guardo com carinho. Que nunca se calem as canções que um dia cantámos juntos.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra por ser a minha segunda casa nos últimos 5 anos.

À Professora Doutora Maria do Céu Sousa pela paciência e pelo apoio que me deu na realização desta monografia.

Ao Dr. Paulo Monteiro e à equipa da Farmácia São José pelos ensinamentos que me transmitiram e por me mostrarem o amor à profissão farmacêutica.

À Dr. Cláudia Gama, à Ana Paula e à equipa do Laboratório de Microbiologia que guardo com muito carinho, pela amizade.

A Coimbra, cidade dos estudantes, que me acolheu como se já lá pertencesse. Não te digo adeus porque te levo sempre comigo.

E a todos os que se cruzaram comigo durante este percurso.

O meu mais sincero obrigada.

“Sê todo em cada coisa.
Põe quanto és, no mínimo que fazes”.

Fernando Pessoa

Índice

Parte I - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas	9
1. Introdução	10
2. Contextualização da Farmácia S. José	10
3. Análise SWOT	11
3.1. Pontos Fortes (Strengths)	12
3.1.1. Localização, horário e utentes.....	12
3.1.2. Equipa técnica	12
3.1.3. Tarefas de gestão farmacêutica	13
3.1.4. Tecnologias auxiliares	14
3.1.5. Dermofarmácia e cosmética.....	15
3.2. Pontos Fracos (Weaknesses)	15
3.2.1. Número de estagiários	15
3.2.2. Limitação de conhecimentos em certas áreas	16
3.3. Oportunidades (Opportunities)	16
3.3.1. Formações externas.....	16
3.3.2. Realização de testes rápidos de antigénio para a COVID-19.....	17
3.4. Ameaças (Threats)	17
3.4.1. Plano de contingência COVID-19	17
3.4.2. Vacinação.....	17
4. Casos Práticos	18
5. Considerações Finais	19
Referências Bibliográficas	20

Parte II - Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Lista de Abreviaturas	22
1. Introdução	23
2. Bluepharma Indústria Farmacêutica S.A.	23
2.1. Controlo de Qualidade e Laboratório de Microbiologia	24
3. Análise SWOT	25
3.1. Pontos Fortes (Strengths)	25
3.1.1. Acolhimento e equipa.....	25
3.1.2. Formação contínua.....	26
3.1.3. Metodologia Kaizen	27
3.1.4. Fornecimento do material necessário.....	27
3.1.5. Plano de estágio	28
3.2. Pontos Fracos (Weaknesses)	30
3.2.1. Métodos tradicionais pouco automatizados	30
3.2.2. Preenchimento de documentação	30
3.3. Oportunidades (Opportunities)	30
3.3.1. Experiência noutro setor do controlo da qualidade.....	30
3.3.2. Contacto com a Indústria Farmacêutica a nível internacional.....	31
3.4. Ameaças (Threats)	31
3.4.1. Pandemia COVID-19 e isolamento profilático	31

3.4.2. Duração do estágio	32
4. Considerações Finais	33
Referências Bibliográficas	34

Parte III - Monografia "A Utilização de Vesículas Extracelulares no Diagnóstico e Tratamento de Doenças Infeciosas"

Lista de Abreviaturas.....	38
Resumo	39
Abstract.....	40
1. Introdução	41
2. Vesículas extracelulares	42
2.1. Caraterização e biogénese	42
2.1.1. Exossomas.....	43
2.1.2. Microvesículas	44
2.1.3. Corpos apoptóticos.....	45
2.2. Mecanismos de comunicação celular	45
2.3. Conteúdo das VEs e mecanismos envolvidos na incorporação dos constituintes.....	46
2.3.1. Manipulação do conteúdo.....	47
2.4. Métodos de isolamento e identificação de VEs	48
2.5. Aplicações clínicas	49
2.5.1. Biomarcadores	49
2.5.2. Terapêutica	50
3. VEs nas doenças infecciosas.....	51
3.1. Infecções bacterianas	52
3.2. Infecções parasitárias	54
3.3. Infecções virais.....	56
3.4. Aplicação das VEs ao diagnóstico	57
3.5. Aplicação das VEs no desenvolvimento de vacinas	59
4. Conclusões e Perspetivas Futuras.....	61
5. Referências Bibliográficas.....	62

Índice de Figuras e Tabela – Parte III: Monografia

Figura 1 - Representação esquemática da libertação de vesículas extracelulares.....	42
Figura 2 - Mecanismos moleculares associados à formação de microvesículas.....	44
Figura 3 - Formação das vesículas da membrana externa em bactérias Gram negativo e moléculas envolvidas.....	53
Figura 4 - Produção de VEs associadas à infecção parasitária.....	55
Tabela 1 - Tabela informativa sobre exossomas nas infecções parasitárias.....	55

Parte I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia São José



Lista de Abreviaturas

ANF – Associação Nacional das Farmácias

COVID-19 – Coronavirus Disease 2019

FC – Farmácia Comunitária

FSJ – Farmácia São José

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

SNS – Serviço Nacional de Saúde

SWOT – *Strenghts, Weaknesses, Opportunities and Threats*

TRAg – Teste Rápido de Antígeno

1. Introdução

O farmacêutico, enquanto profissional de saúde e agente do medicamento, tem uma responsabilidade acrescida não só no tratamento da doença, mas também na melhoria da qualidade de vida dos seus utentes. A sua área de atuação não se restringe apenas à dispensa de medicamentos, tendo também um papel fundamental no aconselhamento e acompanhamento do estado de saúde do utente de modo a promover a consciencialização para o uso correto de medicamentos, produtos de saúde e dispositivos médicos.

A farmácia comunitária (FC) ou farmácia de oficina, como até há uns anos era chamada, é um local que permite o contacto direto com a comunidade no geral e o utente em específico. É um espaço de confiança e que garante, em conjunto com o Serviço Nacional de Saúde (SNS), “a acessibilidade ao medicamento e a equidade na prestação de cuidados de saúde de qualidade a todos os cidadãos, independentemente da sua localização geográfica” (1).

Pela sua extrema importância na formação de futuros farmacêuticos, o plano curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) pressupõe a realização de um estágio curricular na área de FC, de carácter obrigatório e apenas no último ano do curso. Este estágio possibilita o contacto com o que é a realidade de uma farmácia e a aplicação prática dos conhecimentos teóricos que são transmitidos ao longo dos 5 anos de curso e em termos de farmacologia, farmacoterapia, indicação terapêutica e de organização, gestão, deontologia e legislação farmacêutica. O meu estágio curricular na Farmácia São José (FSJ) teve início no dia 6 de abril e fim a 23 de julho de 2021 e ao longo desse tempo estive em contacto com todas as vertentes de uma FC, tanto no atendimento ao público como nas atividades de *backoffice*.

O presente relatório é apresentado na forma de uma Análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*) discriminando os pontos fortes, os pontos fracos, as oportunidades e as ameaças relativas ao meu estágio curricular em FC na Farmácia São José (FSJ), em Coimbra, sob a orientação do respetivo Diretor Técnico, o Dr. Paulo Monteiro.

2. Contextualização da Farmácia S. José

A FSJ localiza-se na Avenida Calouste Gulbenkian e, atualmente, tem propriedade e direção técnica do Dr. Paulo Monteiro, uma presença ativa na farmácia à qual dedica muito do seu tempo e esforço. A farmácia abriu ao público na zona da Praça da República, no ano de 1950, após obtenção do seu alvará em 1949. Anos mais tarde, em 1984, mudou de localização para o local onde se encontra atualmente. Para além disso, integra a rede Elo Farma, uma rede

que medeia as condições comerciais entre as farmácias aderentes e os laboratórios farmacêuticos, e é sócia da Associação Nacional das Farmácias (ANF).

Há mais de 60 anos ao serviço da população de Coimbra, e não só, a FSJ tem marcado a vida dos seus utentes pela simpatia e rigor no atendimentos e prestação de serviços, contando com uma equipa de profissionais responsáveis e multifacetados. Ao longo do tempo, a farmácia tem sofrido reformulações e melhoramentos em termos organizacionais, mas também em termos de espaço tendo sempre em vista o utente e a melhoria da sua experiência na ida à farmácia.

3. Análise SWOT

Tabela I – Resumo da análise SWOT

Pontos Fortes (Strengths)	Pontos Fracos (Weaknesses)	Oportunidades (Opportunities)	Ameaças (Threats)
Localização, horário e utentes • Equipa técnica • Tarefas de gestão farmacêutica • Tecnologias auxiliares • Dermofarmácia e cosmética	Número de estagiários • Limitação de conhecimentos em certas áreas	Formações externas • Realização de testes rápidos de antigénio para a COVID-19	Plano de contingência COVID-19 • Vacinação

3.1. Pontos Fortes (Strengths)

3.1.1. Localização, horário e utentes

A FSJ beneficia de uma localização excepcional numa zona onde vivem e por onde passam, todos os dias, muitas pessoas, sendo um local próximo dos mais variados serviços de saúde. Localiza-se no Centro Comercial Primavera, na Avenida Calouste Gulbenkian, relativamente perto de estruturas como as Faculdades de Medicina e Farmácia da Universidade de Coimbra, o Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E (IPOCFG, E.P.E), o Centro de Saúde de Celas, a Liga Portuguesa Contra o Cancro – Núcleo Regional do Centro e o Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra incluindo o Hospital da Universidade, o Hospital Pediátrico e a Maternidade Dr. Bissaya Barreto. Para além disso, é uma zona com muito acessos, nomeadamente a cafés e restaurantes, supermercados, ginásios, lojas diversas, consultórios médicos e clínicas privadas. Toda esta envolvência leva à farmácia pessoas de todas as faixas etárias, de todos os estratos socioeconómicos e com as mais variadas necessidades.

Com uma grande afluência de pessoas, a FSJ oferece também um horário alargado de segunda a sexta, das 8h30 às 21h, e aos sábados das 9h às 20h, que se demonstra um horário favorável para a maioria das pessoas. Tendo isto em conta, durante o período de estágio realizei um horário rotativo, tendo a oportunidade de participar no processo de abertura e fecho da farmácia, assim como testemunhar as horas do dia com maior ou menor afluência.

Devido às condições propícias, todos os dias passam pela FSJ um grande número de pessoas, muitas delas utentes fidelizados, alguns desde o tempo em que a farmácia se encontrava na anterior localização. Estas pessoas, por já serem conhecidas pela maioria da equipa, estão habituadas a um tipo de atendimento mais personalizado que, no início, os estagiários não conseguem dar. Ainda assim, essas interações acabam por ser recompensantes na medida em que esses utentes começam a ganhar confiança nos estagiários.

Estes 3 fatores em conjunto, constituem um dos pontos fortes do meu estágio porque me permitiram estar em contacto com as mais variadas situações e com diversos casos clínicos que contribuíram para a minha aprendizagem e para a aplicação dos conhecimentos adquiridos ao longo do curso.

3.1.2. Equipa técnica

Devido à grande afluência de pessoas, a FSJ conta uma equipa numerosa, mas organizada para a realização das diferentes tarefas necessárias. Com a satisfação das

necessidades dos utentes em vista, a farmácia possui uma elevada quantidade de serviços e de produtos em *stock*, o que pressupõe um maior número de processos de organização e gestão e consequentemente, um maior número de pessoas.

Com uma equipa variada, cada elemento tem as suas funções bem definidas no que toca a gestão e receção de encomendas, arrumação de produtos, reposição de *stocks*, organização dos lineares, preparação de manipulados, verificação do receituário, atendimento ao público, gestão das redes sociais, entre outras. Para o bom funcionamento da farmácia, este tipo de organização pressupõe a colaboração e comunicação entre todas as partes envolvidas, mas dando a cada elemento da equipa, a liberdade e autonomia necessárias ao desempenho das suas funções. Com a responsabilidade individual cada colaborador sabe que é necessário para a equipa, causando um sentimento de pertença e união. Ainda assim, cada pessoa encontra-se apta a realizar outras funções sempre que seja necessário. A direção técnica é assumida pelo Dr. Paulo Monteiro, sendo um elemento de destaque na farmácia, para a equipa e para os utentes. Devido à sua experiência na área da FC, transmite segurança no domínio dos conhecimentos de gestão, das necessidades da farmácia e dos utentes, sendo um apoio para a restante equipa.

No que toca à relação com os estagiários a equipa demonstra-se prestável para ensinar e esclarecer qualquer dúvida que surja no decorrer do estágio e, por ser uma equipa relativamente jovem focada na sua própria formação contínua fomentam, no estagiário, esse princípio. Enquanto estagiária senti-me à vontade para esclarecer dúvidas e com total liberdade para dar ideias e sugerir métodos para a otimização do tempo e das tarefas. Assim sendo, considero a equipa técnica um ponto forte do meu estágio, por todas as possibilidades de aprendizagem e todos os momentos de convívio que me proporcionaram.

3.1.3. Tarefas de gestão farmacêutica

A parte inicial do meu estágio foi mais direcionada para as diversas tarefas de *backoffice*, como por exemplo receção de encomendas, arrumação de produtos, gestão de *stocks* e conferência de receituário.

Uma vez que a FSJ tem um grande leque de clientes, também necessita de ter uma grande variedade de produtos para a satisfação das necessidades dos mesmos. Esta variedade implica a receção de encomendas várias vezes ao dia, tanto de fornecedores como diretamente dos laboratórios, o tratamento da documentação relacionada (notas de encomenda, faturas e notas de crédito) e a posterior organização e arrumação dos produtos nas localizações

corretas. A gestão de *stocks* inclui a realização de contagens físicas e a comparação com a contagem no sistema informático, o que permite a deteção de erros de *stock* que podem condicionar os atendimentos, assim como a verificação dos prazos de validade. Na gestão de *stocks*, está ainda incluída a verificação da saída e rotatividade dos produtos permitindo adequar as quantidades encomendadas consoante a sazonalidade dos mesmos. Estas tarefas são fundamentais para o bom funcionamento da farmácia mantendo-a organizada.

Relativamente à conferência do receituário, esta é de extrema importância pois permite detetar erros nas receitas manuais, que possam prejudicar a farmácia em termos da comparticipação dos medicamentos.

Apesar de parecerem tarefas simples, revelaram-se como um ponto forte do meu estágio pois permitiram-me conhecer melhor o funcionamento e organização interna da farmácia antes de passar para o atendimento ao público. A realização destas tarefas, antes de começar no atendimento, mostrou-se vantajosa pois já tinha tido contacto com os vários produtos disponíveis, a sua localização, o aspeto da embalagem e os nomes comerciais.

3.1.4. Tecnologias auxiliares

Para melhoria dos atendimentos e da organização interna, destaco na FSJ dois aparelhos tecnológicos muito úteis: o *cashguard* e o *robot*. O *cashguard* é um aparelho que permite fazer os pagamentos das compras e serviços na farmácia, fazendo simultaneamente e de modo automático o troco, o que diminui a probabilidade da ocorrência de erros que possam lesar o utente ou a farmácia. Para além disso, a cada elemento da equipa é atribuído um código, tornando fácil a identificação de quais foram os valores e as horas das vendas de cada operador, o que ajuda na deteção e correção de erros e no controlo da caixa ao final do dia (2).

O *robot* é um sistema tecnológico inovador adaptado às necessidades de cada farmácia que permite a poupança de tempo e de recursos (3). Este sistema permite a arrumação automática, após entrada manual, de medicamentos por data de validade, de modo a cumprir o princípio “*first in, first out*”, e a sua dispensa no balcão de atendimento mediante pedido no sistema Novo Modulo de Atendimento, Sifarma. Esta tecnologia permite uma melhor organização do *backoffice* e um melhor atendimento ao público uma vez que o farmacêutico pode focar-se exclusivamente no utente, nas suas necessidades e no aconselhamento, não tendo de se deslocar para aquisição dos medicamentos e diminuindo a ocorrência de erros.

Considero estas tecnologias auxiliares um ponto forte do meu estágio por ter tido a oportunidade de contactar com elas e porque, na maioria das vezes, otimizaram o meu tempo e trabalho, dando-me uma maior segurança na finalização dos atendimentos.

3.1.5. Dermofarmácia e cosmética

Apesar da área de dermofarmácia e cosmética ser pouco abordada no plano curricular do MICF, esta falha foi colmatada pela abordagem da FSJ. Sendo uma área muito presente na realidade diária da farmácia, a maioria das pessoas procura um aconselhamento mais cuidado e personalizado de técnicas e produtos.

Com um vasto número de produtos, para várias finalidades e aos mais variados preços, disponíveis na FSJ, a escolha do mais indicado para cada situação não é fácil. Com a ajuda de membros especializados da equipa, pude expandir os meus conhecimentos nesta área, em termos de produtos e patologias da pele mais frequentes, tendo ainda contacto com as diferentes marcas e o seu posicionamento de mercado. Para além disso, a FSJ disponibiliza aos seus utentes, a possibilidade de aconselhamento com consultores de várias marcas, o que também leva à fidelização de clientes.

Esta área demonstra-se como um dos pontos fortes para o meu estágio uma vez que a FSJ se apresenta como uma farmácia de referência no aconselhamento de dermofarmácia e cosmética, apostando na formação especializada de vários elementos da equipa. Isto permitiu-me ter contacto com essa experiência e conhecimento que, certamente, me serão úteis no futuro.

3.2. Pontos Fracos (*Weaknesses*)

3.2.1. Número de estagiários

Como referido anteriormente, a FSJ possui uma grande afluência, o que pressupõe uma elevada quantidade de trabalho e, para isso, conta com uma grande equipa de profissionais multidisciplinares. A equipa da farmácia é constituída por 17 elementos, de modo a assegurar o horário de funcionamento alargado, sem contar com os estagiários, cujo número varia consoante a altura do ano.

No início do meu estágio e apesar dos horários rotativos, cheguei a estar na farmácia com uma equipa de 5 estagiários (que posteriormente passou a 3) adicionalmente à equipa normal da farmácia, o que condicionava a distribuição de tarefas. Enquanto estagiária, algumas

foram as vezes em que me deparei com a falta de um computador disponível no *backoffice* ou com todos os balcões ocupados no atendimento, impedindo-me de realizar certas tarefas. Assim, tendo também em conta o tamanho da equipa, considero o número de estagiários como um ponto fraco no sentido em que resultou em menores oportunidades de aprendizagem e treino e num ambiente competitivo entre estagiários.

3.2.2. Limitação de conhecimentos em certas áreas

No dia-a-dia em FC somos abordados relativamente a uma grande variedade de medicamentos e produtos de saúde. A nossa formação, apesar de ampla tem um maior foco para os medicamentos e, por isso, falha em diversas temáticas que têm uma grande aplicação prática durante o estágio e no futuro desempenho da profissão farmacêutica.

Durante o meu estágio consegui aprofundar e aplicar diversos conhecimentos teóricos, adquiridos ao longo do curso, mas senti algumas dificuldades em termos de aconselhamento em áreas como: produtos naturais, produtos de veterinária, puericultura, ortopedia e dispositivos médicos que, apesar de abordadas no plano curricular do MICEF, não espelham a real dimensão de aplicação na prática farmacêutica. A equipa da FSJ sempre se demonstrou disponível a esclarecer qualquer dúvida que tivesse, mas considero a limitação de conhecimentos nas áreas referidas, como um ponto fraco do meu estágio, pela insegurança causada durante os atendimentos.

3.3. Oportunidades (*Opportunities*)

3.3.1. Formações externas

Nos pontos de destaque da equipa da FSJ, enquanto profissionais de saúde, está incluída a formação contínua para a melhoria do ato farmacêutico. Tendo isso em conta, várias foram as formações dadas por organismos externos à farmácia, nomeadamente delegados representantes de diversos laboratórios, nas quais tive a oportunidade de participar. Estas formações visavam determinados produtos, assim como as patologias para as quais estavam destinados e como as abordar.

Para além do contacto com as diversas marcas e laboratórios durante a visita dos delegados, em termos de aplicabilidade do conteúdo das formações no atendimento ao público, estas mostraram-se de extrema importância pois permitiram a aquisição de novos conhecimentos, a sua consolidação e a aplicação de diversas técnicas de venda. Algumas foram as vezes em que, durante o atendimento, me lembrei e apliquei o conteúdo das formações.

3.3.2. Realização de testes rápidos de antígeno para a COVID-19

Com o aumento da recomendação da testagem para a COVID-19, a FSJ decidiu começar a realizar testes rápidos de antígeno (TRAg), o que levou à necessidade de adaptação de toda a equipa, por ser um serviço novo, e do espaço da farmácia de modo a cumprir as normas de segurança, definidas pela Direção Geral de Saúde. A disponibilização deste serviço também levou ao desenvolvimento de metodologias organizativas, por parte da farmácia, pela quantidade de processos e da responsabilidade envolvida. Com vista à otimização do processo de registo de utentes para a realização do teste na farmácia, tive oportunidade de sugerir uma alteração prática que foi aceite por toda a equipa e que resultou, no que considero ser uma melhoria do processo, diminuindo o tempo de espera do utente, a acumulação de utentes na sala de atendimento e facilitando o registo por parte da equipa.

Considero o início da realização de TRAg para a COVID-19 na FSJ uma oportunidade, pois permitiu-me, enquanto estagiária, acompanhar de perto o processo de organização e adaptação de toda a equipa na implementação de um novo serviço ao público.

3.4. Ameaças (*Threats*)

3.4.1. Plano de contingência COVID-19

Durante o período de estágio, todas as atividades na farmácia eram realizadas de acordo com o Plano de contingência COVID-19 para a FC, proposto pelo Centro de Informação do Medicamento e Intervenções em Saúde (CEDIME) da ANF (4). Para cumprimento do plano de contingência, o número de utentes da farmácia era limitado, o que muitas vezes resultou na formação de uma fila de espera fora da farmácia e no aumento do tempo de espera pelo atendimento. Já dentro da farmácia, era obrigatório o uso de máscara e cada balcão tinha uma proteção de acrílico para evitar o contacto e reduzir possíveis transmissões do vírus. Apesar de reconhecer a importância e a necessidade destas medidas de segurança, considero este aspeto como uma ameaça ao meu estágio pois também reconheço que, em alguns casos, possam ter prejudicado o atendimento ao público e a comunicação com o utente.

3.4.2. Vacinação

Mesmo com o cumprimento do plano de contingência e das medidas de segurança, o surgimento da vacina contra a COVID-19 apresentou-se como uma medida adicional, fundamental para a proteção do indivíduo e da comunidade no geral. Os farmacêuticos e a

restante equipa da farmácia, enquanto profissionais de saúde, foram, na sua maioria, vacinados com prioridade por estarem sujeitos aos perigos inerentes ao atendimento ao público na área da saúde. No entanto, os estagiários, sujeitos às mesmas condições não foram incluídos na vacinação prioritária sendo, na maioria das vezes, os únicos nas equipas, que não estavam protegidos. Assim considero este aspeto uma ameaça ao meu estágio pois, enquanto estagiária, desempenhei as mesmas funções que a restante equipa, o que incluía o contacto direto com utentes, fornecedores e delegados de saúde, mas com um risco acrescido por não estar vacinada.

4. Casos Práticos

Caso Prático I

Um casal, ambos na casa dos 70 anos, dirigem-se à farmácia para ir buscar a medicação habitual. O senhor apresenta a receita com 8 medicamentos: Ticagrelor 90 mg (antiagregante plaquetário); Ácido Acetilsalicílico 100 mg (anticoagulante); Pantoprazol 20 mg (inibidor da bomba de prótons); Atorvastatina 80 mg (estatina, antilipídico); Valsartan 40 mg (antagonista do recetor da angiotensina); Carvedilol 6,25 mg (bloqueador beta e alfa, anti-hipertensor); Sertralina 50 mg (inibidor seletivo da recaptção da serotonina); Furosemida 40 mg. Destes apenas quer levar alguns, não pretendendo levar a Sertralina e a Furosemida, medicamentos essenciais na sua terapêutica (5,6).

Realizei o aconselhamento explicando a importância dos medicamentos naquele caso específico e de não parar de tomar sem a indicação do médico, tendo inclusive pedido ajuda a uma colega. Após todo o aconselhamento necessário que a situação pretendia, o senhor acabou por não levar apenas a sertralina e apesar de não ser o indicado do ponto de vista terapêutico, o que prevalece é a vontade do utente. Nestes casos e enquanto profissionais de saúde apenas podemos pôr à disposição do utente toda a informação necessária para que tome uma decisão consciente dos benefícios e riscos que esta acarreta.

Caso Prático 2

Utente do sexo masculino, na casa dos 40 anos, apresenta-se ao balcão com queixas de comichão, ardor e vermelhidão entre os dedos do pé e pede Canespor[®] (um medicamento antifúngico que tem como princípio ativo o bifonazol).

Uns dias antes tinha ocorrido na farmácia uma formação por parte Bayer que focou a gama de produtos para o pé de atleta e na qual tinham referido a substituição do Canespor[®]

pelo novo Canesten Unidia[®]. Após verificar que já não tínhamos Canespor[®] em stock sugeri a aplicação do Canesten Unidia[®], com o mesmo princípio ativo e 1x por dia como o nome indica, pelo que o utente aceitou a sugestão (7).

5. Considerações Finais

A área de farmácia comunitária, sendo a que alberga mais farmacêuticos, é também a que tem a responsabilidade acrescidas pelo contacto próximo com a população. Por ser, muitas vezes, o primeiro local a que os utentes recorrem para ver as suas necessidades de saúde resolvidas, a farmácia é o local que possibilita o estabelecimento de relações de confiança entre utentes e profissionais de saúde. Associada a esta confiança vem a responsabilidade, por parte dos farmacêuticos, para a promoção da saúde pública, sensibilizando e informando a população sobre o uso consciente do medicamento e noutras questões de saúde. Neste sentido é importante uma formação contínua para o melhor desempenho da profissão farmacêutica.

O meu estágio em farmácia comunitária, na Farmácia São José, foi uma experiência enriquecedora na medida em que me permitiu perceber a importância do papel do farmacêutico na sociedade, enquanto profissional de saúde. Ao longo do estágio tive a oportunidade de evoluir e aprender, pondo também em prática os conhecimentos adquiridos ao longo dos 5 anos de curso.

Resta-me apenas agradecer a toda a equipa da Farmácia São José e em especial ao Dr. Paulo Monteiro por me terem ensinado e partilhado o gosto pelo que é a profissão farmacêutica e o ato farmacêutico. Foi uma experiência enriquecedora tanto ao nível pessoal como ao nível curricular e tenho a certeza de que saio deste estágio mais bem preparada para o meu futuro enquanto farmacêutica.

Referências Bibliográficas

1. Ordem dos Farmacêuticos – **A farmácia comunitária** [Consultado a 28/07/2021]
Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/>
2. Cashguard – **Homepage** [Consultado a 30/07/2021] Disponível em: <https://www.cashguard.es/?lang=pt-pt>
3. Glintt – **Robótica** [Consultado a 30/07/2021] Disponível em: <https://www.glintt.com/pt/o-que-fazemos/mercados/Pharma/Negocio/Paginas/Rob%C3%B3tica.aspx>
4. Ordem dos Farmacêuticos – **Planos de Contingência COVID-19: Farmácia** [Consultado a 29/07/2021] Disponível em: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/editor2/covid_19/planos/PlanoFC.pdf
5. INFARMED – **Resumo das Características do Medicamento – Sertralina 50 mg.** [Consultado a 06/08/2021] Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
6. INFARMED – **Resumo das Características do Medicamento – Furosemida 40 mg.** [Consultado a 06/08/2021] Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
7. Bayer – **Produtos Canesten: Canesten Unidia creme** [Consultado a 28/07/2021]
Disponível em: <https://www.antifungicos.bayer.pt/produtos/saude-da-pele-e-dos-pes/canesten-unidia-creme>

Parte II

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Bluepharma, Indústria Farmacêutica, S.A.



Lista de Abreviaturas

BLPH – Bluepharma

BPF – Boas Práticas de Fabrico

COVID-19 – *Coronavirus Disease 2019*

CQ – Controlo da Qualidade

CSA – Agar de Caseína e Soja (*Soybean-Casein Digest Agar*)

GC – *Gas Chromatography*

HPLC – *High-performance Liquid Chromatography*

IF – Indústria Farmacêutica

LFQ – Laboratório Físico e Químico

LM – Laboratório de Microbiologia

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

PA – Princípio Ativo

Ph.Eur. – Farmacopeia Europeia

SDA – Agar de Dextrose de Sabouraud (*Sabouraud-Dextrose Agar*)

SOP – *Standard Operating Procedure*

SWOT – *Strenghts, Weaknesses, Opportunities and Threats*

TAMC – *Total Aerobic Microbial Count*

TYMC – *Total Yeast/Mould count*

UFC – Unidade Formadora de Colónia

USP – Farmacopeia dos Estados Unidos

VL – Validação de Limpeza

I. Introdução

Basta analisar o plano curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) para perceber a sua aplicação nas mais diversas áreas de atuação do farmacêutico, enquanto profissional de saúde e especialista do medicamento. A profissão e o ato farmacêutico baseiam-se em muito mais do que a dispensa de medicamentos ao balcão, integrando no seu conteúdo as atividades de: preparação, controlo, seleção, aquisição, armazenamento e dispensa de medicamentos para uso humano e veterinário e de dispositivos médicos; acompanhamento e vigilância da dispensa e utilização de medicamentos; interpretação e avaliação de prescrições médicas, entre outras (1).

Será então a formação um ponto fulcral para a distinção de cada um de nós enquanto futuros farmacêuticos. Assim sendo, de modo a complementar a minha formação e adicionalmente ao período de estágio em Farmácia Comunitária, decidi realizar um estágio em Indústria Farmacêutica (IF), uma área com cada vez mais relevância e destaque nos dias que correm. Por ser uma empresa farmacêutica localizada em Coimbra, com elevado prestígio a nível nacional e internacional candidatei-me para o estágio na Bluepharma (BLPH) e, após entrevista, fui selecionada para o departamento do Controlo da Qualidade (CQ), mais concretamente para o Laboratório de Microbiologia (LM), sob orientação da Dra. Cláudia Gama e coorientação da Ana Paula Reis. O meu estágio apresentou a duração aproximada de 3 meses, desde 11 de janeiro a 1 de abril de 2021, realizando um horário por turnos e num total de 464 horas.

O presente relatório é apresentado na forma de uma Análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*) discriminando os pontos fortes, os pontos fracos, as oportunidades e as ameaças relativas ao meu estágio na Bluepharma – Indústria Farmacêutica.

2. Bluepharma Indústria Farmacêutica S.A.

A Bluepharma, criada e sediada em S. Martinho do Bispo em Coimbra, iniciou a sua atividade em fevereiro de 2001 após aquisição de um edifício da multinacional alemã Bayer e a partir daí que tem crescido no panorama nacional e internacional enquanto IF. Atualmente, e passados 20 anos, está na origem de um grupo farmacêutico, o grupo Bluepharma, constituído por 20 empresas, mais de 700 colaboradores e delegações em vários países, o que lhes permitiu alcançar uma taxa de exportação de 88% (2).

A BLPH prima pela aplicação da sua visão que se baseia no Investimento com vista a Inovar a Internacionalizar através de Parcerias feitas com foco na Qualidade (3). Assim, a sua

área de atuação inclui a atividade industrial de fabrico, embalagem e controlo da qualidade, associada à atividade de investigação e desenvolvimento de novos medicamentos e à comercialização de medicamentos genéricos, abrangendo todo o ciclo de vida do medicamento.

Sendo a qualidade um pilar importante, esta encontra-se certificada no que diz respeito ao cumprimento das normas ISO 9001 (Gestão da Qualidade), ISO 14001 (Gestão Ambiental) e OHSAS 180001 (Gestão de Saúde e Segurança Ocupacional) e das Boas Práticas de Fabrico (BPF), tendo ainda obtido a certificação por parte da *Food and Drug Administration* (FDA) (4).

Com o projeto “Bluepharma Acelera 2030” está previsto o investimento de cerca de 47 milhões de euros na criação de uma nova unidade industrial em Eiras que vai possibilitar a criação de emprego, a inovação tecnológica e a entrada em novos mercados, nomeadamente o da produção de medicamentos que incorporam substâncias de elevada atividade farmacológica, acentuando a posição da Bluepharma, enquanto Indústria Farmacêutica a nível nacional e internacional (5).

2.1. Controlo de Qualidade e Laboratório de Microbiologia

O CQ é o departamento responsável pelas análises dos excipientes, princípios ativos (PAs) e formas farmacêuticas finais de modo a garantir a qualidade e segurança das mesmas, durante e após a produção, para que possam sair para o mercado e ser comercializadas. Este é dividido em dois laboratórios: o Laboratório Físico e Químico (LFQ) e o Laboratório de Microbiologia, que trabalham em conjunto nas análises de controlo da qualidade segundo as especificações dos clientes, dos métodos farmacopeicos e das SOPs (*Standard Operating Procedures*), documentos internos que detalham a execução das análises e a utilização dos equipamentos como balanças, potenciómetro, autoclave, câmaras de fluxo laminar e equipamentos de *High-performance Liquid Chromatography* (HPLC) e *Gas Chromatography* (GC).

O LM para além de responsável pelas análises microbiológicas de excipientes, PAs e formas farmacêuticas finais, realiza ainda a validação de limpeza (VL) dos equipamentos e salas da produção, a monitorização do ar das salas limpas e a monitorização da água purificada em termos de possíveis contaminações. Nas análises microbiológicas é analisada a contaminação da amostra que não pode ultrapassar os limites máximos definidos.

Devido à manipulação de microrganismos e da possibilidade de contaminação, o LM é constituído por 3 salas com a circulação de pessoas e materiais controlada de uma sala para outra. A sala I, considerada a mais limpa, é onde são realizadas as esterilizações e se preparam

os meios de cultura; a sala 2, é onde ocorrem todas as análises e incubação das amostras; e a sala 3, é onde é realizada a lavagem dos materiais e o descarte de resíduos. O LM cumpre ainda várias normas de segurança como a utilização obrigatória de bata, diferente da dos restantes colaboradores do CQ, sapatos de laboratório e máscara. Durante a realização das análises é necessária a utilização de luvas e, por vezes, de máscara FFP2 dependendo da amostra e dos produtos a ser utilizados. No fim, é importante a desinfeção de todo o espaço de trabalho e dos materiais, de modo a proteger o colaborador e evitar contaminações cruzadas.

3. Análise SWOT

Tabela I – Resumo da análise SWOT

Pontos Fortes (Strengths)	Pontos Fracos (Weaknesses)	Oportunidades (Opportunities)	Ameaças (Threats)
<p>Acolhimento e equipa</p> <ul style="list-style-type: none"> • <p>Formação contínua</p> <ul style="list-style-type: none"> • <p>Metodologia <i>Kaizen</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • <p>Fornecimento do material necessário</p> <ul style="list-style-type: none"> • <p>Plano de estágio</p>	<p>Métodos tradicionais pouco automatizados</p> <ul style="list-style-type: none"> • <p>Preenchimento de documentação</p>	<p>Experiência nouros setores do controlo da qualidade</p> <ul style="list-style-type: none"> • <p>Contacto com a Indústria Farmacêutica a nível internacional</p>	<p>Pandemia COVID-19 e isolamento profilático</p> <ul style="list-style-type: none"> • <p>Duração do estágio</p>

3.1. Pontos Fortes (Strengths)

3.1.1. Acolhimento e equipa

O primeiro dia de estágio na BLPH começou com a participação dos estagiários na sessão de acolhimento e em várias formações feitas pelo departamento dos Recursos Humanos para dar a conhecer a empresa, o seu funcionamento e a sua história. Após essa primeira interação foi-nos fornecido todo o material necessário à realização do estágio e

atribuído um tutor, pertencente à equipa da qual íamos fazer parte. No meu caso, como tive a oportunidade de realizar o estágio em modo presencial, fui depois encaminhada para os laboratórios para conhecer também as instalações.

Devido à pandemia COVID-19 e para minimizar o contacto, as equipas dos laboratórios estavam divididas em 2 turnos com horas de saída e entrada desfasadas de modo que não se cruzassem. Deste modo estive apenas em contacto com um dos turnos. Tanto a equipa do LFQ como a equipa do LM se revelou como um ponto importante na minha ambientação ao local de estágio pois sempre se mostraram disponíveis para ensinar e esclarecer as minhas dúvidas. Para além do contacto nos laboratórios durante a realização do trabalho, o facto da equipa se organizar para que ninguém fizesse as pausas para a refeição sozinho também ajudou no desenvolvimento de relações interpessoais, por ser um momento de maior descontração entre a equipa. Posto isto, considero o acolhimento e a equipa do LFQ e do LM como um ponto forte do meu estágio na BLPH.

3.1.2. Formação contínua

Ao longo do meu estágio na BLPH, experienciei uma formação contínua tendo acesso a diversas formações todas as semanas. No início estas eram mais específicas para os estagiários e incluíam a semana de integração 1 e 2 com módulos gerais sobre “Qualidade e BPF”, “Ambiente, Saúde e Segurança no trabalho”, “Noções de Farmacovigilância”, “Assuntos Regulamentares”, “Desenvolvimento e Inovação”, entre outras. Depois havia formações para todos os colaboradores, incluindo os estagiários, de acordo com o departamento em que se encontravam. Devido à pandemia COVID-19 e de modo a evitar o contacto com pessoas de diferentes departamentos, as formações eram *online* ou através de vídeos na plataforma interna “*Success Factors*” direccionada para o acompanhamento dos objetivos formativos. Em casos excecionais de existirem formações práticas para os colaboradores do mesmo departamento, estas podiam ser presenciais, como foi o caso da formação de “Boas práticas de pesagem”. No fim de algumas formações havia também um teste de avaliação para consolidar o conhecimento adquirido.

No geral, considero o método de formação contínua uma mais-valia para os estagiários e colaboradores pois permite um acompanhamento e uma atualização constante dos conhecimentos, fomentando a evolução pessoal de cada um na empresa.

3.1.3. Metodologia Kaizen

A metodologia *Kaizen* quando aplicada ao local de trabalho significa melhorar, envolvendo todas as pessoas, em todas as áreas e todos os dias. Este processo de melhoria contínua deve ser aplicado nas empresas com a base de que todos os colaboradores devem estar envolvidos na criação de valor para o cliente e na eliminação do desperdício. Relativamente à administração da empresa, também envolvida na metodologia *Kaizen*, esta deve organizar e capacitar as equipas proporcionando-lhes as ferramentas e um sistema para atingir os objetivos que devem ser tangíveis e visíveis (6).

A BLPH, enquanto empresa focada na melhoria contínua, aplica a metodologia *Kaizen* em todos os departamentos de modo a melhorar a qualidade do trabalho realizado, diminuindo o tempo e custos associados. No início ou no fim dos turnos, são realizadas reuniões de *Kaizen* diárias com a equipa de cada turno para organização do trabalho em que cada colaborador especifica o trabalho que já fez e que ainda tem para fazer. Para além disso, todos os laboratórios estão organizados com os devidos locais de arrumação, limpeza e análise bem identificados. No LM é feito um plano semanal de trabalho onde são descritas as funções e os objetivos diários para cada colaborador, o que me ajudou a perceber o ritmo de trabalho do laboratório. Toda esta organização, assim como a sua aplicação por parte de todos os colaboradores da BLPH, tornou a minha integração mais fácil e rápida.

3.1.4. Fornecimento do material necessário

Como referido anteriormente, no primeiro dia, foram fornecidos a cada estagiário os materiais necessários para a realização do estágio na BLPH e consoante cada departamento. Nestes materiais estava incluído o cartão de identificação, de modo a controlar os acessos aos laboratórios e áreas de produção, computador portátil para uso na empresa (ou em casa, nos casos de teletrabalho) com acesso aos documentos e plataformas oficiais, bata para uso no laboratório, material de escrita, fones para as formações e reuniões e mochila para transportar as minhas coisas. No decorrer do estágio, e sempre que necessário tinha também a opção de pedir mais material.

Esta iniciativa permite que todos os estagiários tenham as mesmas condições, a nível material, que os restantes colaboradores da empresa, gerando um sentimento de pertença à equipa e, por isso, são um dos pontos positivos a destacar.

3.1.5. Plano de estágio

O plano de estágio é um fator decisivo para a realização de qualquer estágio. No meu caso, este foi da responsabilidade da Dra. Cláudia Gama, responsável pelo departamento de CQ, e da Ana Paula, responsável pelo LM. Foi elaborado um plano de estágio flexível tendo em conta as minhas necessidades e aprendizagens, e de modo a passar por todas as tarefas que são realizadas no LM. De tempos a tempos fazíamos uma revisão do plano para verificarmos o que já estava cumprido, o que faltava cumprir e se havia a necessidade de adaptar alguma coisa, pelo que a minha opinião também foi tida em conta.

Nas primeiras 3 semanas de estágio estive com a equipa do LFQ a acompanhar as análises de rotina e de VL. Ao mesmo tempo fui lendo várias SOPs e capítulos da Farmacopeia Europeia (Ph.Eur.) e da Farmacopeia dos Estados Unidos (USP), que servem de suporte às análises em termos de procedimentos de segurança, validações e métodos a utilizar. Este contacto com a parte teórica possibilitou-me uma melhor preparação para a parte prática no laboratório.

Quando finalmente fui para o LM comecei por assistir e acompanhar todos os processos envolvidos numa análise microbiológica completa, desde a preparação da amostra à interpretação dos resultados. Deste modo tive contacto com:

- i) Preparação e controlo de meios de cultura: para análise no LM, os meios de cultura são preparados sob a forma de caldos ou geloses sendo respetivamente distribuídos em balões de *Erlenmeyer* ou placas e, posteriormente, controladas as suas propriedades nutritivas, seletivas e de esterilidade (Figura 1 e 2 – Anexos). O controlo das suas propriedades nutritivas e seletivas é realizado através da inoculação com microrganismos padrão para se verificar se ocorre ou não o seu crescimento (Figura 3 – Anexos). O controlo da esterilidade é realizado no autoclave com a presença de bioindicadores que, através da mudança de cor, indicam a eficácia da esterilização (7, 8).
- ii) Análise microbiológica de excipientes, PAs e formas farmacêuticas: a análise destas amostras serve para assegurar a qualidade e segurança microbiológicas dos lotes produzidos. Estas análises são realizadas pela pesquisa de Total Aerobic Microbial Count (TAMC) e de Total Yeast/Mould Count (TYMC) através do Método de Sementeira em placas com meio de crescimento Agar de Caseína e Soja (CSA) e Agar de Dextrose de Sabouraud (SDA), respetivamente. Consoante a amostra, pode ser necessária a utilização de

meios de cultura específicos para a pesquisa de microrganismos específicos. Após incubação nas condições recomendadas para cada análise, o resultado é expresso em unidades formadoras de colónias (UFC)/placa (9,10).

- iii) Análise de água purificada: as amostras de água purificada são recolhidas nos vários laboratórios, nos designados “pontos críticos”, e analisadas no LM por um método de filtração por membrana de um determinado volume. Essa membrana é depois colocada em placas com o meio de cultura adequado e, após incubação, os resultados são expressos em UFC/ml (11).
- iv) Análise da qualidade do ar: a colheita das amostras é realizada pelo Método de Sedimentação e pelo Método de Impacto. No Método de Sedimentação são deixadas placas com CSA (para a determinação de TAMC) e SDA (para a determinação de TYMC) abertas no local por um determinado período de tempo para que os microrganismos presentes no ar possam sedimentar. As placas são depois incubadas à temperatura e tempo definidos e os resultados expressos em UFC/placa. No Método de Impacto é usado um equipamento, o RCS (*Reuter Centrifugal Sampler*), que recolhe um volume de ar estipulado e semeia os microrganismos presentes em tiras com CSA e SDA. Essas tiras são, posteriormente, incubadas e o resultado expresso em UFC/m³.
- v) Validação de limpeza: após a produção de um lote farmacêutico, todas as salas e equipamentos expostos aos excipientes e PAs têm de ser completamente limpos, de modo a não contaminar o produto seguinte. Após a limpeza é realizada a sua validação para que a produção possa avançar. A VL é executada tanto pelo LFQ, para a pesquisa de contaminações de PA ou de substâncias desconhecidas, como pelo LM para a pesquisa de contaminações microbiológicas. Para o LM, a colheita das amostras é feita usando placas de contacto com meio de crescimento, que são depois incubadas nas condições necessárias.

Considero que a abordagem teórica e prática do meu plano de estágio no LM me ajudou na integração gradual na equipa e no ritmo de trabalho, possibilitando uma aprendizagem abrangente em todos os processos envolvidos nas várias análises.

3.2. Pontos Fracos (*Weaknesses*)

3.2.1. Métodos tradicionais pouco automatizados

Os métodos analíticos utilizados no LM baseiam-se na pesquisa de TAMC e TYMC através da pesagem da amostra, da sua diluição em solução tampão peptonada de cloreto de sódio (NAPP), para a manutenção dos microrganismos, e da posterior realização de sementeira com meio de crescimento, em placas. Após este processo, ocorre a repicagem da amostra do meio de crescimento para meios seletivos, que permitem a identificação de microrganismos que possam estar presentes nas amostras. Estes são métodos convencionais que, apesar de estarem descritos na Ph.Eur e na USP, são pouco automatizados e não espelham a realidade atual da análise microbiológica em termos tecnológicos e metodológicos. Considero a utilização de métodos convencionais pouco automatizados como um ponto fraco do meu estágio por não ter tido a oportunidade de estar em contacto com métodos mais atuais.

3.2.2. Preenchimento de documentação

De modo a garantir a qualidade e credibilidade das análises, todos os processos realizados nos laboratórios necessitam da sua comprovação escrita. Este registo de documentação é feito em papel e inclui o preenchimento de diários de análise onde são apontadas todas as condições e resultados das análises e de *logbooks* ou cadernos de registo, específicos para os processos realizados em cada equipamento.

Apesar de estar ciente da necessidade de ter disponíveis todos os registos referentes à produção e análise de todos os lotes de medicamentos, estes representam um gasto considerável de papel e de tempo. Considero o preenchimento desta documentação como um ponto fraco do meu estágio pois, apesar dos processos estarem otimizados, esta comprometia a continuação das análises e o lançamento de resultados.

3.3. Oportunidades (*Opportunities*)

3.3.1. Experiência noutro setor do controlo da qualidade

As primeiras 3 semanas do meu estágio na BLPH foram no LFQ a acompanhar as análises de rotina e VL, enquanto era preparada a minha ida para o LM. Apesar de não ter começado na área que era suposto, a minha passagem pelo LFQ revelou-se uma mais-valia para adquirir conhecimentos teóricos e práticos sobre o funcionamento do departamento e

do laboratório. Isto permitiu-me ter a percepção do que é a realidade prática de um laboratório de CQ na IF.

Durante esse tempo, tive a oportunidade de acompanhar diferentes análises como a validação de limpeza, a deteção de solventes residuais e a análise de águas, para uso laboratorial, incluindo a colheita e preparação das amostras, análise e tratamento dos resultados. Estes processos são realizados por diferentes analistas, o que também me permitiu ter um maior contacto com a equipa. Devido à variedade de análises ainda tive contacto com várias metodologias analíticas como a HPLC e a GC, abordadas no plano curricular do MICF e com uma aplicação enorme na IF.

Considero a passagem pelo LFQ uma oportunidade do meu estágio pois permitiu-me ter contacto direto com as duas principais áreas laboratoriais do CQ e adquirir experiência sobre as boas práticas de trabalho e segurança em laboratório, que me foram essenciais no LM.

3.3.2. Contacto com a Indústria Farmacêutica a nível internacional

A BLPH, enquanto empresa muito ativa no mercado das exportações, permite o contacto com a realidade internacional na IF. A produção de formas farmacêuticas para o mercado internacional implica uma adaptação dos processos de fabrico e análise, assim como os parâmetros de aceitação, consoante as condições dos clientes. Uma vez que o LM tem os seus métodos e parâmetros de quantificação e identificação de microrganismos de acordo com a Ph.Eur. e com a USP, isso possibilita a produção e exportação de medicamentos para a União Europeia e para os Estados Unidos da América, com a consequente certificação da FDA.

Ao longo do meu estágio presenciei a análise de diversas formas farmacêuticas para exportação, que diferiam entre si, tanto no LFQ como no LM. Acho que este contacto foi favorável para a minha percepção da IF a nível internacional.

3.4. Ameaças (*Threats*)

3.4.1. Pandemia COVID-19 e isolamento profilático

Devido à pandemia COVID-19, muito ativa no início do ano de 2021, os colaboradores da BLPH encontravam-se a trabalhar por regime de turnos para não se cruzassem e assim diminuir o risco de propagação no caso de alguma infeção. Deste modo apenas tive contacto

com um dos turnos, ficando privada da partilha de conhecimentos e experiências com os colaboradores do outro turno, que me poderiam ter sido benéficas no decorrer do estágio.

Para além disso, no início do meu estágio, fiquei no LFQ por causa da falta de colaboradores do LM que se encontravam em isolamento profilático e depois fiquei também eu 2 semanas em isolamento profilático por contacto com um caso positivo de COVID-19. Durante este tempo, apesar de ter estado em regime de teletrabalho mais focado na leitura de documentação, foi atrasada a minha ida para o laboratório de microbiologia. Creio que esse tempo teria sido fundamental para a obtenção de conhecimentos mais aprofundados no LM e, por isso, considero o sucedido como uma ameaça ao meu estágio.

3.4.2. Duração do estágio

A duração do meu estágio foi de, aproximadamente 3 meses, durante o qual estive 3 semanas no LFQ e 2 semanas em isolamento profilático, na modalidade de teletrabalho. Deste modo fiquei apenas 7 semanas no LM, o que limitou a minha possibilidade de evolução e autonomia no laboratório. Devido à complexidade e à responsabilidade que as análises microbiológicas implicam, foi necessário um período de observação e formação em todas as atividades realizadas no laboratório. Quando comecei a ficar mais independente na execução das análises, o estágio já estava a terminar e considero isto como uma ameaça à minha aprendizagem e evolução.

4. Considerações Finais

Enquanto futuros farmacêuticos temos o dever e a obrigação de melhorar constantemente o nosso conhecimento nas mais diversas áreas para um melhor desempenho profissional. Sendo a IF uma das áreas abordadas no plano curricular do MICF como uma das saídas profissionais, sempre tive curiosidade para a experienciar, não me cingindo apenas à área de Farmácia Comunitária.

Desde o início do meu estágio na BLPH que me senti parte da equipa, tendo a liberdade para aprender ao meu ritmo. Este facto mostrou-se benéfico por vários motivos: Ter a oportunidade de experienciar um departamento que sempre me suscitou curiosidade, como é o caso do CQ, pela sua componente prática; conhecer a realidade de uma IF a nível nacional e internacional; ter a possibilidade de aplicar diversos conhecimentos adquiridos ao longo do curso e adquirir novos conhecimentos que poderão servir como uma vantagem competitiva a nível profissional.

O estágio curricular na BLPH e em específico no CQ foi de extrema importância para o meu percurso académico permitindo-me a obtenção de conhecimentos que, certamente me irão ser uteis no futuro. Sinto-me grata pela realização desta experiência que me fez crescer a nível pessoal e profissional e deixo um agradecimento especial a toda a equipa do LM que me acolheu e ensinou neste percurso.

Referências Bibliográficas

1. Ordem dos Farmacêuticos – Código Deontológico [Consultado a 28/07/2021] Disponível em: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/codigo_deontologico_da_of_4436676175988472c14020.pdf
2. Bluepharma – Grupo Bluepharma [Consultado a 07/08/2021] Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/about-bluepharmagroup.php>
3. Bluepharma – Missão, visão e valores [Consultado a 07/04/2021] Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/about-mvv.php>
4. Bluepharma – Qualidade [Consultado a 07/08/2021] Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/manufacturing/qualityassurance.php>
5. Bluepharma – Bluepharma Acelera 2030 [Consultado a 07/08/2021] Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/P2020-Acelera2030.php>
6. What is Kaizen? [Consultado a 03/04/2021] Disponível em: https://pt.kaizen.com/o-que-e-kaizen.html#core_kaizen
7. USP - Capítulo 62 – Microbiological Examination of Nonsterile Products: Tests for Specified Microorganisms. United States Pharmacopoeia 39 - National Formulary 34. Rockville: The United States Convention (2016). ISBN: 978-376926560
8. COUNCIL OF EUROPE - 2.6.13. Microbiological Examination of Nonsterile Products: Test for Specified Micro-organisms. European Pharmacopoeia 9.0. Strasbourg (2017). ISBN: 978-9287181336.
9. USP - Capítulo 61 - Microbiological Examination of Nonsterile Products: Microbial Enumeration Tests. United States Pharmacopoeia 39 - National Formulary 34. Rockville: The United States Convention (2016). ISBN: 978-376926560
10. COUNCIL OF EUROPE - 2.6.1. Microbiological Examination of Nonsterile Products: Microbial Enumeration Tests. European Pharmacopoeia 9.0. Strasbourg (2017). ISBN: 978-9287181336
11. USP - Capítulo 1231 - Water for Pharmaceutical Purposes. United States Pharmacopoeia 39 - National Formulary 34. Rockville: The United States Convention (2016). ISBN: 978-376926560

Anexos

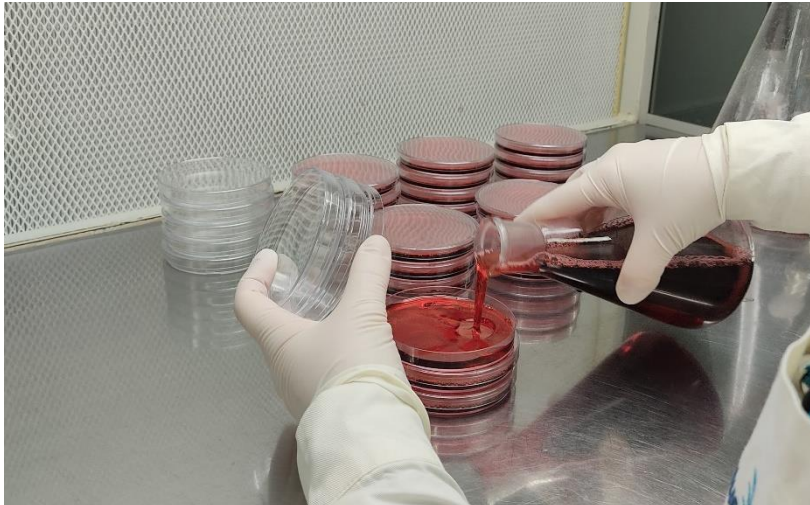


Figura 1 - Distribuição do meio sólido (Agar de MacConkey) em placas, já esterilizado, para posterior solidificação (Fonte: próprio)



Figura 2 - Distribuição do meio líquido (Caldo de MacConkey) em balões de Erlenmeyer, para posterior esterilização (Fonte: próprio)

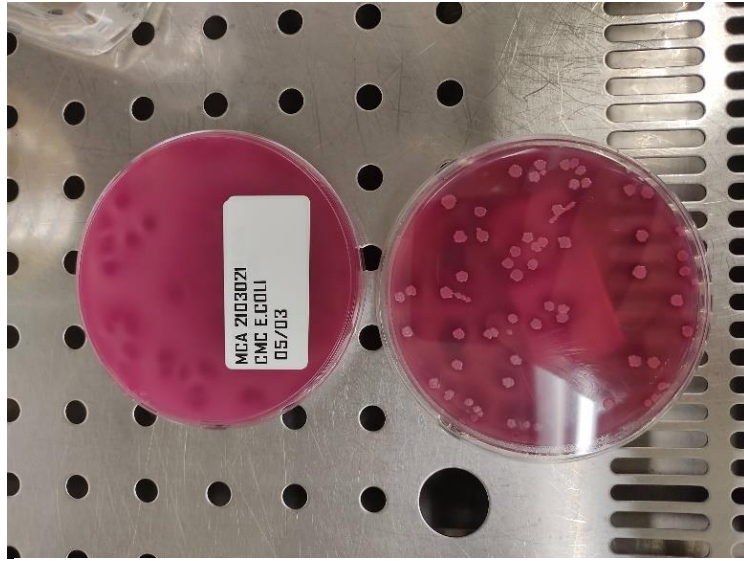


Figura 3 - Controlo dos meios de cultura. Inoculação do meio de cultura seletivo (Agar de MacConkey) com *Escherichia coli*. O crescimento de *E. coli* significa que o meio reúne as condições nutritivas (Fonte: próprio)

Parte III

Monografia

“A utilização de vesículas extracelulares no diagnóstico e tratamento de doenças infecciosas”

Lista de Abreviaturas

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

ARN– Ácido Ribonucleico

CAs – Corpos Apoptóticos

DI – Doenças Infeciosas

ESCRT – Complexos de Classificação Endossomal Requeridos para Transporte) do inglês *Endosomal sorting complexes required for transport*)

FTS – Fosfatidilserina

ISEV – do inglês *International society for extracellular vesicles*

LPS – Lipopolissacarídeo

MC – Membrana Citoplasmática

miARN – microARN

MISEV – do inglês *Minimal information for studies of extracellular vesicles*

MVs – Microvesículas

SARS-CoV-2 – do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*

TEM – Microdomínios Ricos em Tetraspaninas (do inglês *Tetraspanins enriched microdomains*)

TNF – Fator de Necrose Tumoral (do inglês *Tumor necrosis factor*)

VEs –Vesículas Extracelulares

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

VILs – Vesículas Intraluminais

VME – Vesícula da Membrana Externa

Resumo

Vesículas extracelulares (VEs) são micropartículas constituídas por uma bicamada lipídica, libertadas pela maioria das células e encontram-se na maioria dos fluidos biológicos. Dependendo da sua biogénese, as VEs podem ser classificadas em exossomas, de origem endossomal, microvesículas (MVs), formadas por gemulação da membrana celular, e corpos apoptóticos (CAs), libertados durante a morte celular. O seu conteúdo é constituído por proteínas, ácidos nucleicos, lípidos e metabolitos das células de origem e, por isso, são um ambiente adequado para transportar moléculas biologicamente ativas.

As VEs têm um papel importante na comunicação intercelular através do transporte e libertação do seu conteúdo, influenciando tanto as células de proximidade como as distantes. As vesículas são libertadas em condições fisiológicas normais e durante quadros infecciosos e inflamatórios, estando envolvidas em mecanismos fisiológicos e patológicos, como a indução ou supressão de funções celulares e da resposta imune. As doenças infecciosas (DI) afetam milhões de pessoas em todo o mundo e essa é uma das áreas de destaque no estudo das VEs nas interações patógeno-patógeno e patógeno-hospedeiro. O objetivo é melhorar o diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas utilizando as VEs como biomarcadores ou como transportadores de fármacos.

Palavras-chave: vesículas extracelulares, exossomas, microvesículas, corpos apoptóticos, doenças infecciosas.

Abstract

Extracellular vesicles are microparticles consisting of a lipid bilayer membrane, naturally released by cells, and found in almost all biological fluids. According to its biogenesis, they can be organized in: exosomes, with endosomal origin; microvesicles, released by budding of the cellular membrane; and apoptotic bodies, released during cell death. They contain proteins, nucleic acids, lipids, and metabolites that were found in the secreting cell and form the perfect environment to transport biologically active cargo.

Extracellular vesicles have an important role in intercellular communication, by transporting and releasing its cargo, influencing nearby and distant cells. Vesicles are naturally secreted even during infectious and inflammatory diseases, being related to physiological and pathological processes such as induction or suppression of cellular activities and immune response. Infectious diseases affect millions of people around the world and is one of the prominent areas in the study of the influence of extracellular vesicles on pathogen-pathogen and pathogen-host interactions. The final goal is to update current diagnostic methods and treatment using extracellular vesicles as biomarkers or as vehicles for drug delivery.

Keywords: extracellular vesicles, exosomes, microvesicles, apoptotic bodies, infectious diseases.

1. Introdução

O conceito de vesícula extracelular (VE) é usado há aproximadamente 50 anos tendo ganho mais destaque na última década. A designação de “Vesículas extracelulares” é muito abrangente pois refere-se às micropartículas que são libertadas por quase todos os tipos de células, eucarióticas ou procarióticas, independentemente da quantidade, composição e características físico-químicas (1,2). Desde a sua descoberta, já foram identificadas VEs em quase todos os fluidos biológicos humanos como por exemplo na saliva, sangue, urina, leite materno, fluido amniótico ou fluido cefalorraquidiano, entre outros (3,4).

As VEs são vesículas esféricas, compostas por uma ou mais membranas lipídicas e contêm proteínas, ácidos nucleicos, lípidos e metabolitos das células que lhes deram origem (1). No início achava-se que as células libertavam VEs com o objetivo de eliminar o “lixo” celular mas, nos últimos anos, vários estudos demonstraram que têm um papel importante na comunicação intercelular e conseqüentemente interferem na regulação de processos fisiológicos e patológicos (5). A regulação de processos patológicos inclui, por exemplo, a ativação endotelial, desencadeando mecanismos inflamatórios, o condicionamento ou o redirecionamento da capacidade metastática ou o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Por outro lado, relativamente aos processos fisiológicos, as VEs podem regular a reparação e regeneração tecidual e funções imunológicas (6,7). A comunicação intercelular pode ser realizada através da transmissão de sinais por interação direta entre as proteínas membranares da EV e da célula recetora ou por internalização do conteúdo vesicular na célula recetora (8).

As VEs, de origem humana ou de organismos patogénicos, têm sido associadas à patogenicidade de várias DI, beneficiando o agente patogénico ou à proteção do hospedeiro através da manutenção da hemóstase, limitando o crescimento e disseminação dos microrganismos (9,10). As vesículas provenientes de organismos patogénicos desempenham, assim, um papel importante nas interações patógeno-patógeno e patógeno-hospedeiro (11). Conhecendo-se os mecanismos subjacentes a estas interações, será possível estabelecer o potencial das VEs no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e de diagnóstico para as DI (12).

Devido ao crescente número de publicações sobre VEs, foi criada uma norma (*Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles (MISEV)*) pela *International Society for Extracellular Vesicles (ISEV)* que define critérios para o estudo das VEs incluindo a nomenclatura, preparação e caracterização das VEs e condições analíticas, entre outros, de modo a uniformizar a informação existente (13).

2. Vesículas extracelulares

2.1. Caracterização e biogénese

A caracterização das VEs é feita normalmente tendo em conta a sua biogénese/processo de libertação ou o seu tamanho, sendo que este último pode levar a confusões devido à variabilidade de tamanhos inter e intra-populações de vesículas. Uma vez que ainda não foram identificados marcadores específicos para cada tipo de vesícula, a sua distinção após a libertação é complicada, até porque a mesma célula pode libertar diferentes vesículas, quer de forma constitutiva quer de forma indutiva (1,2,5). Em adição, a terminologia referente às VEs não está estandardizada havendo várias designações para o mesmo tipo de vesícula (8). Assim, a norma MISEV propõe a utilização do termo genérico “vesículas extracelulares”, na impossibilidade de identificar marcadores específicos. A norma propõe, ainda, formas de distinção baseadas no tamanho (VEs pequenas, médias ou grandes), na densidade, na composição bioquímica (por exemplo, VEs ricas em tetraspaninas) ou nas condições das células de origem, como por exemplo os corpos apoptóticos com origem em células em apoptose (13).

De acordo com o mecanismo de biogénese/libertação, as VEs são caracterizadas em três populações: exossomas, de origem endossomal; microvesículas, formadas por gemulação da membrana citoplasmática (MC); e corpos apoptóticos, com origem na libertação de material celular durante a apoptose (Figura I).

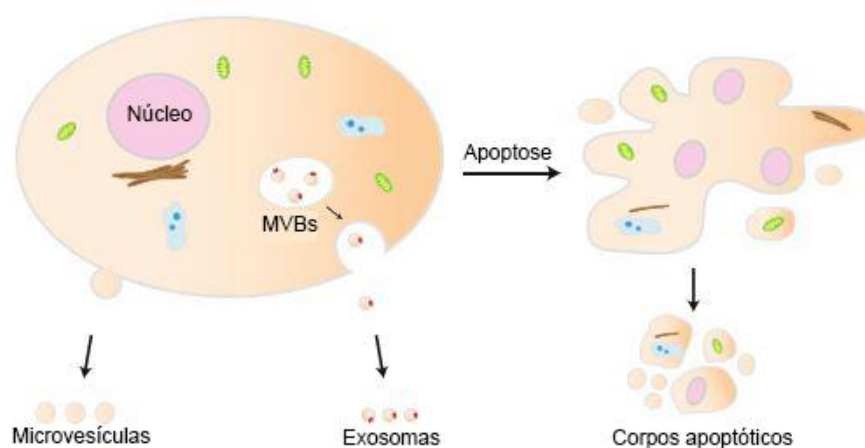


Figura I – Representação esquemática da libertação de vesículas extracelulares.
(Adaptado de Akers, 2013)

2.1.1. Exossomas

Exossomas são vesículas de origem endossomal e a sua membrana é composta por uma bicamada lipídica (1). Representam uma população heterogénea tanto em composição como em tamanho. A sua composição, tal como as outras VEs, depende da célula de origem e o tamanho encontra-se, em média, entre os 40 e os 100 nm (5).

Durante o processo de formação dos exossomas podem-se distinguir dois tipos de endossomas: os endossomas iniciais e os endossomas tardios. Os endossomas iniciais sofrem várias transformações num processo de amadurecimento para formar os endossomas tardios. Nesta fase e após reorganização das proteínas endossomais, a membrana dos endossomas tardios invagina em vários locais, formando as vesículas intraluminais (VILs) que incorporam no seu interior proteínas citosólicas e ácido ribonucleico (ARN) (1,8).

Na formação das VILs, o processo de invaginação ocorre normalmente por duas fases. A primeira fase consiste na reorganização das proteínas da membrana endossomal, na qual são determinantes as tetraspaninas, proteínas da MC, que vão formar regiões especializadas da membrana, denominadas microdomínios ricos em tetraspaninas (TEM – do inglês *Tetraspanins Enriched Microdomains*), por interação com diversas proteínas sinalizadoras transmembranares e citosólicas. Deste modo, as tetraspaninas são frequentemente encontradas nos exossomas, podendo ser usadas para a sua identificação. As tetraspaninas mais frequentemente encontradas nos exossomas são as CD9, CD63 e CD81 (6). Na segunda fase são determinantes os complexos de classificação endossomal requeridos para transporte (ESCRT – do inglês *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*) (1). O ESCRT está envolvido no direcionamento das proteínas ubiquitinadas e na rutura da membrana durante a formação das VILs e é composto por quatro complexos: ESCRT-0, responsável pelo direcionamento das proteínas ubiquitinadas; ESCRT-1 e ESCRT-2, que medeiam a gemulação da membrana; e ESCRT-3, envolvido na rutura da membrana(14).

Apesar do mecanismo principal de biogénese envolver o ESCRT, vários estudos sugerem a existência de mecanismos de regulação da biogénese de exossomas, independentes de ESCRTs, envolvendo tetraspaninas, lípidos e RabGTPases (1).

Aos endossomas que contêm no seu interior as VILs dá-se o nome de corpos multivesiculares (MVBs – do inglês *Multi Vesicular Bodies*). A formação dos MVBs tem como objetivo determinar o destino das vesículas no seu interior: ou fundem-se com lisossomas, direcionando as VILs para degradação lisossomal; ou fundem-se com a MC, libertando para o meio extracelular as vesículas, denominadas de exossomas (8).

2.1.2. Microvesículas

As MVs ou ectossomas, são vesículas membranares tal como os exossomas, mas formadas por um mecanismo completamente diferente. As MVs são libertadas para o meio extracelular por gemulação da MC num mecanismo dependente de cálcio (15). Analogamente aos exossomas, apresentam uma composição rica em proteínas e outros componentes provenientes da célula de origem. As MVs são normalmente maiores que os exossomas, possuindo um tamanho entre 100 a 1000 nm (5).

No entanto, o mecanismo de biogénese continua a ser o principal fator de diferenciação. A biogénese de MVs é um processo gradual que tem início na ativação da célula como resposta a fatores de crescimento ou citocinas. O aumento dos níveis de cálcio intracelulares provoca uma reorganização do citoesqueleto através da distribuição fosfolipídica (1). A gemulação inicia-se após a translocação de fosfatidilserina (FTS) para o folheto exterior da membrana com ajuda das enzimas flofase e flipase, presentes também na MC (Figura 2). Este processo resulta na sua curvatura e termina com a contração de estruturas do citoesqueleto por interações de actina-miosina, libertando a MV (8). Deste modo, a superfície das MVs é rica em FTS (15).

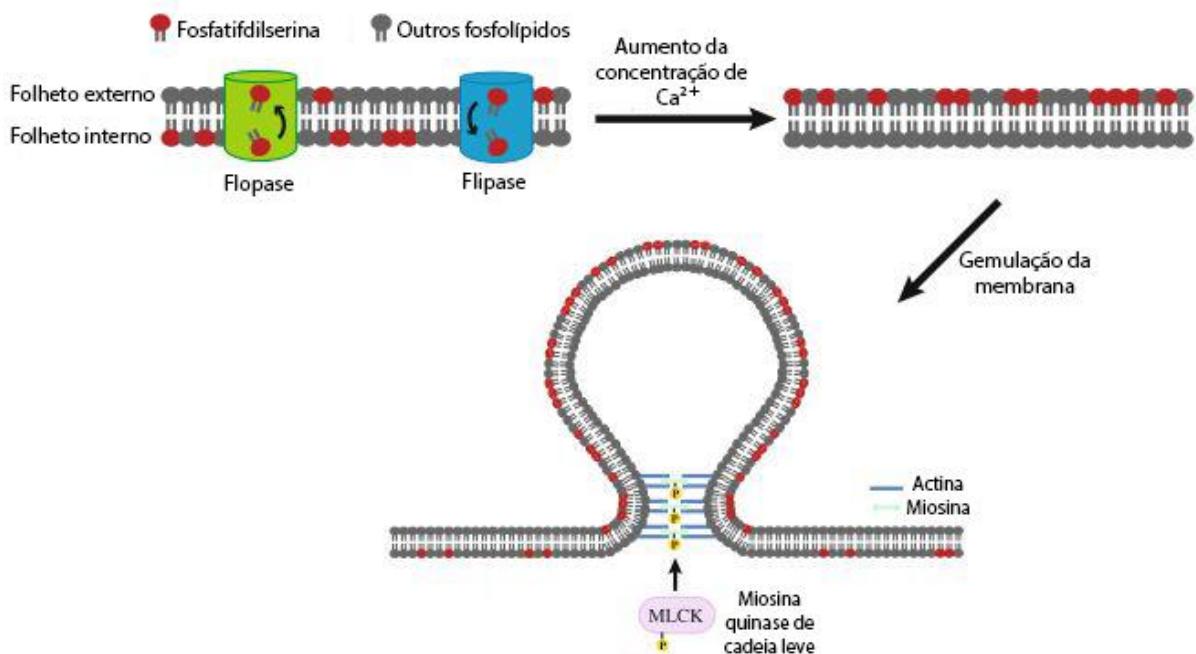


Figura 2 – Mecanismos moleculares associados à formação de microvesículas. O aumento da concentração intracelular de cálcio provoca uma alteração na orientação dos fosfolípidos. Ocorre a externalização da fosfatidilserina, por ação das enzimas flofase e flipase, o que desencadeia a gemulação da MC. Esta reorganização do citoesqueleto ativa uma cascata de sinalização que resulta na fosforilação da cadeia leve da miosina e consequente libertação da microvesícula. (Adaptado de Akers, 2013)

2.1.3. Corpos apoptóticos

Os CAs diferem dos outros tipos de VEs por serem libertados apenas durante a morte celular. A morte programada das células desencadeia várias alterações estruturais intracelulares como a redução do tamanho do núcleo e a formação de protuberâncias na membrana, seguidas da sua fragmentação em vesículas onde fica distribuído o conteúdo celular, designadas por corpos apoptóticos (1). Possuem um tamanho entre 50 e 5000 nm e, normalmente, são identificadas pela detecção de ácido desoxirribonucleico (ADN) e histonas, ambos presentes no núcleo das células (5).

Normalmente, os CAs medeiam o recrutamento de células fagocitárias, estando envolvidos na clearance das células apoptóticas e dos detritos celulares que são, posteriormente, fagocitados, maioritariamente por macrófagos, no local da morte celular (16,17). No entanto, foi detetada a presença de CAs no sangue de animais, sugerindo que os mesmo possam ter outra função, tal como os exossomas e microvesículas que medeiam a comunicação intercelular através do seu conteúdo (8). De facto, há evidências de que os CAs têm um papel regulador na imunidade apresentando relevância em doenças autoimunes, cancro e em DI (16).

2.2. Mecanismos de comunicação celular

As VEs têm um papel importante na comunicação celular através de diferentes mecanismos celulares:

- i) Estimulação direta da célula alvo por interações com a membrana. Como exemplo, a maioria das VEs presentes no sangue são derivadas de plaquetas e por isso estão revestidas com o fator tecidual permitindo-lhes interagir e ligar-se à membrana de macrófagos, neutrófilos e plaquetas. Esta interação, e devido à FTS presente na membrana das vesículas, vai ajudar na ligação dos fatores de coagulação (18).
- ii) Transferência de recetores da MC entre as células de origem e as células alvo que podem conferir novas propriedades ou funcionar como sinalizadores para diversas funções celulares. Este mecanismo ocorre por exemplo, na transferência de moléculas de adesão derivadas de plaquetas para células hematopoiéticas ou células tumorais, promovendo a adesão ao endotélio (19).
- iii) Transferência de proteínas e material genético para as células alvo. Apesar dos mecanismos, pelos quais esta transferência ocorre, não estarem completamente descritos é proposto que seja através da internalização das VEs que, uma vez

dentro das células alvo podem libertar o conteúdo para o meio intracelular ou seguir para degradação lisossomal, ou através da fusão direta das VEs com a MC. As VEs transportam agentes infecciosos, como por exemplo príões (agente infeccioso composto por proteínas) e, por isso, estão associadas à sua disseminação através da transferência para as células alvo. Ao mesmo tempo, a transferência de fatores de transcrição e material genético pode induzir alterações epigenéticas nas células, pela tradução de ARNm em proteínas específicas (19,20).

2.3. Conteúdo das VEs e mecanismos envolvidos na incorporação dos constituintes

Existe um interesse crescente na identificação do conteúdo das VEs de modo a avaliar as suas potenciais aplicações, como por exemplo como biomarcadores de doenças (21). Como meios auxiliares à identificação do seu conteúdo, várias bases de dados *online* como ExoCarta (22), Vesiclepedia (23) e EVpedia (24) têm disponíveis informações sobre as proteínas, lípidos e material genético encontrados nas VEs.

A composição molecular das VEs é definida pelo seu conteúdo interno, principalmente proteínas celulares, material genético como ARN, ADN e microARN (miARN) (pequenas moléculas de ARN não codificante), lípidos (como ceramidas, colesterol e fosfolípidos) e pelos componentes presentes na membrana (nomeadamente proteínas e recetores), todos provenientes da célula de origem. Contudo, a composição depende do estágio das células de origem. Por exemplo, o perfil lipídico de vesículas provenientes de células não tumorais baseia-se em glicerolípidos e ácidos gordos enquanto as vesículas de células tumorais apresentam níveis mais elevados de glicerofosfolípidos e esfingolípidos (25).

Por ter a composição análoga ao interior das células de origem, o lúmen das VEs representa um ambiente perfeito para transportar moléculas biologicamente ativas (5).

Os mecanismos de incorporação e organização do conteúdo vesicular não são totalmente conhecidos, mas na maior parte dos casos não são aleatórios, uma vez que vesículas provenientes da mesma célula podem ter composições diferentes. Existem modificações pós-translacionais que interferem no processo de incorporação como a ubiquitinação e a fosforilação. A ubiquitinação é uma das modificações mais comuns, sinalizando a molécula ubiquitinada para a sua internalização nas VILs através da interação com o ESCRT. Em estudos da proteómica, é também comum encontrar proteínas fosforiladas nas VEs uma vez que a fosforilação parece proteger as proteínas da degradação endossomal

enquanto facilita a sua incorporação nas vesículas (1). Esta é uma modificação pós-translacional importante na estrutura proteica, função e localização celular das proteínas (26). No entanto, importa referir que ambas as modificações não significam necessariamente a incorporação das proteínas nas VEs e que podem, também, influenciar a incorporação de proteínas patogénicas (1).

2.3.1. Manipulação do conteúdo

Para que as VEs possam ser utilizadas no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, é necessária a sua manipulação de modo a permitir a incorporação e transporte de moléculas terapêuticas exógenas (27). Quando se trata de nanopartículas sintéticas, existe uma maior flexibilidade e controlo na escolha do método e dos materiais a usar na incorporação de moléculas. No caso das VEs, a produção e incorporação do conteúdo são processos celulares complexos, o que faz com que as possibilidades de êxito sejam mais limitadas. Os métodos de incorporação de moléculas podem ser realizados durante a fase de produção das vesículas, pelo que é necessário que sejam compatíveis com a cultura celular e a sua viabilidade, ou então após o isolamento das vesículas, o que requer a manutenção da integridade e composição das vesículas (2).

Existem duas abordagens para a incorporação de moléculas terapêuticas em VEs: *ex vivo* e *in vitro*. Na abordagem *ex vivo*, as VEs são isoladas de fluidos biológicos e as moléculas são incorporadas, normalmente, por um processo de eletroporação (27,28). Na abordagem *in vitro* as moléculas são incorporadas durante a biogénese vesicular por diferentes processos. Um dos processos baseia-se na sobre expressão de proteínas ou ARNs terapêuticos pretendidos, de modo a concentrarem-se no citoplasma que rodeia as vesículas em processo de biogénese. Estas moléculas são depois incorporadas nas VEs, mas correndo-se o risco de acumular também moléculas indesejadas que estejam presentes no citoplasma. A manipulação das proteínas pretendidas para a fusão com proteínas constitutivas de VEs, como por exemplo a CD63, ou para a ubiquitinação demonstrou ser uma ajuda na incorporação dessas proteínas específicas. Outros processos de incorporação de pequenas moléculas farmacológicas incluem a sonicação (tratamento com ultrassons) das vesículas ou a incubação com as células que vão dar origem às vesículas. (28,29).

Para análise do conteúdo vesicular, a espectrometria de massa é uma das técnicas mais utilizadas, devido à sua sensibilidade, permitindo a identificação, caracterização e quantificação de proteínas e lípidos (30,31).

2.4. Métodos de isolamento e identificação de VEs

Atendendo às características físicas e químicas das diferentes populações de VEs, diferentes métodos de isolamento poderão ser aplicados ao isolamento de determinadas vesículas. Os métodos utilizados estão também associados a diferentes graus de pureza das vesículas uma vez que podem isolar conjuntamente agregados proteicos, detritos celulares ou outras micropartículas, resultando numa mistura heterogénea (2). Alguns métodos podem ainda comprometer a estrutura e integridade das VEs afetando a sua estabilidade e função sendo que já foram detetados agregados de VEs após ultracentrifugação (32). Em adição, a maioria dos métodos não são suficientemente seletivos podendo isolar diferentes VEs que tenham características comuns (6).

Não havendo consenso sobre qual o melhor método de isolamento de VEs, existem vários que têm sido usados com base no tamanho, densidade, expressão de proteínas de superfície, solubilidade ou uma combinação de vários fatores (32). A centrifugação seguida de ultracentrifugação é uma das técnicas mais utilizadas para o isolamento de VEs, apesar do baixo rendimento (8,33). Outro dos métodos utilizados é a cromatografia, que separa as partículas da mesma amostra por tamanhos. Este método foi eficaz na obtenção de exossomas do sangue sem a contaminação de albumina (34). No entanto, apresentou também um baixo rendimento e não foi avaliada a possível contaminação com outras proteínas plasmáticas. A separação das diferentes VEs pode ser também realizada através de microesferas magnéticas revestidas com anticorpos específicos para moléculas existentes na superfície das vesículas (2,8).

As vesículas, após serem isoladas podem ser purificadas por gradiente de densidade, utilizando por exemplo um gradiente de sacarose, ou através de filtração. As vesículas isoladas e purificadas devem ser posteriormente caracterizadas e identificadas uma vez que não há protocolos standardizados e reprodutíveis de isolamento (33). Dos vários métodos de identificação disponíveis e amplamente utilizados noutras áreas de estudo salientam-se: o *immunoblotting*, que utiliza anticorpos específicos para certas proteínas, que funcionam como marcadores dos diferentes tipos de VEs (35); microscopia eletrónica de transmissão e citometria de fluxo, normalmente usadas para confirmação das vesículas isoladas e na caracterização de diferentes populações de VEs (36); e a análise de rastreamento de nanopartículas, baseada no movimento das partículas em solução e utilizada no rastreamento da concentração e do diâmetro das VEs isoladas (37).

2.5. Aplicações clínicas

Um dos principais objetivos na área da investigação farmacêutica é o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que sejam específicas para os órgãos, tecidos ou células afetadas, garantindo não só a concentração de fármaco necessária no local pretendido, mas também diminuindo a sua quantidade noutros locais onde não é necessária (38). No entanto, muitos agentes terapêuticos apresentam um fraco desempenho *in vivo* devido às barreiras fisiológicas como a pele, o endotélio, o espaço intersticial, a MC, as mucosas e o sistema imunitário cuja sua função é controlar a entrada de organismos externos potencialmente nocivos (39). As VEs revelam-se como sistemas ideais para contornar estes problemas devido às suas características únicas. São vesículas de origem celular, não são um alvo para o sistema imunitário, mesmo com carga exógena, e apresentam organotropismo, ou seja, seletividade para certos órgãos ou tecidos (40,41). Outra vantagem é que conseguem transportar a sua carga para recetores que se encontrem próximos e para aqueles que se encontrem em órgãos ou tecidos mais distantes (2). Tendo em conta estas vantagens, as VEs possuem diversas potenciais aplicações clínicas.

2.5.1. Biomarcadores

As VEs têm-se destacado não só como meio de comunicação entre células, mas também na sua potencial utilização como biomarcadores de diagnóstico (33). Estudos sugerem uma incorporação seletiva de proteínas nas VEs dependendo da fase da doença. Assim, o conteúdo vesicular permite determinar o estado patológico ou não das células no momento da produção das vesículas, permitindo monitorizar a progressão ou regressão de doenças como resposta à terapêutica, nomeadamente no cancro (2). Com esta abordagem, as biópsias convencionais podem ser evitadas, minimizando o risco de infeção e possibilitando a recolha de informação de órgãos mais inacessíveis, pela possibilidade das VEs poderem ser recolhidas de fluidos biológicos como o sangue (32). Uma vez que o material genético e proteínas das VEs estão protegidos da degradação do meio extracelular, este modo de “rastreamento” do estado celular fornece informações que podem ajudar em termos de diagnóstico, prognóstico ou no seguimento da doença (8).

Em 2016 passou a ser comercializado nos Estados Unidos da América o primeiro teste para o diagnóstico do cancro baseado em exossomas. Este teste utiliza uma amostra de sangue para análise do ARN exossomal e foi um marco importante no estudo das VEs aplicadas ao desenvolvimento de biomarcadores na medicina (42).

Destaca-se ainda o estudo das VEs e do seu conteúdo nas doenças neurodegenerativas, como é o caso da Doença de Alzheimer e da Doença de Parkinson. Em estudos pré-clínicos da Doença de Alzheimer foram detetados valores mais elevados da proteína tau (potencial biomarcador para a neurodegeneração) em VEs isoladas de fluido cerebrospinal. Em estudos clínicos da Doença de Parkinson, destacam-se os estudos ao conteúdo proteico das VEs isoladas do fluido cerebrospinal, urina e sangue para a pesquisa de biomarcadores de diagnóstico e de progressão da doença (43).

2.5.2. Terapêutica

O potencial terapêutico das VEs embora menos estudado, não deixa de ser uma nova abordagem promissora no tratamento de várias doenças. O objetivo principal é direcionar as vesículas para tecidos específicos de modo que as EVS exerçam a sua atividade terapêutica intrínseca através da sua carga (2). Uma das aplicações terapêuticas é, por exemplo, a utilização de VEs de células mesenquimais provenientes de vários órgãos (medula óssea, cordão umbilical, tecido adiposo, entre outros) na medicina regenerativa. A capacidade terapêutica destas VEs foi demonstrada em diversas patologias, como por exemplo, foi observada a recuperação funcional e neurovascular após uma lesão cerebral, a recuperação de lesão renal ou uma função cardioprotetora, criando a hipótese de aplicação noutras patologias (44).

Apesar dos avanços no desenvolvimento de fármacos, muitos não chegam à prática clínica por falta de veículos de distribuição que sejam seguros, não imunogénicos e com especificidade para as células e tecidos alvo. A utilização de nanopartículas como veículos de distribuição de fármacos além de apresentar algumas destas limitações, apresentam, ainda, custo elevado e dificuldade de produção em larga escala (45). As VEs apresentam uma série de características favoráveis que podem solucionar estes problemas. O transporte na corrente sanguínea de várias moléculas, como hormonas, pode ocorrer sem problemas, mas quando se trata de moléculas sujeitas a degradação, há o risco de não chegarem na quantidade desejada ao destino pretendido. A bicamada lipídica das VEs consegue proteger ácidos nucleicos e fármacos evitando as enzimas do meio extracelular, como ADNases e ARNases, e também a *clearance* renal, garantindo a sua entrega nas células alvo (5,45). Para além disso, a expressão de diferentes proteínas na superfície das vesículas pode ter diferentes efeitos. Um dos exemplos é a expressão da proteína CD47 na superfície das VEs que vai melhorar a possibilidade de administração intravenosa pois sinaliza para a não degradação da vesícula. Já a FTS tem o efeito oposto e sinaliza para a internalização da vesícula (2). As VEs possuem também um mecanismo de escape aos endossomas. Analogamente a outras moléculas, as VEs

após entrarem na célula seguem a via endossomal de degradação por lisossomas mas, por um mecanismo ainda desconhecido, as VEs mostraram a capacidade de libertar o seu conteúdo para o citoplasma, evitando a degradação (45).

A estratégia terapêutica de utilizar as VEs como vetores para o transporte de fármacos ou de genes, possibilitando a terapia genética, também tem sido estudada (8). A utilização de vetores virais em terapia genética não é novidade, mas associando esses vetores às VEs (formando vesículas híbridas) pode-se tirar partido das vantagens de ambos para o desenvolvimento de novos veículos de terapia genética, aplicável às mais diversas áreas. Os vetores virais enquanto partículas eficientes na transferência de genes e as VEs enquanto veículos naturalmente libertados pelas células, menos imunogênicos e com maior capacidade de penetrar as barreiras biológicas (28,46). Um dos vetores possíveis serão os vírus adeno-associados, pequenos vírus não envelopados pertencentes à família dos parvovírus, com eficácia e perfil de segurança estudados para a entrega de genes em culturas de células e em modelos animais de doenças (46). Contudo, o desenvolvimento de terapêuticas baseadas em VEs apresenta várias limitações nomeadamente a avaliação e quantificação da dose a utilizar, o *scale-up* a nível industrial ou o cumprimento das boas práticas de fabrico, essenciais na produção de qualquer forma terapêutica. Também são encontradas outras limitações ao nível da standardização de procedimentos analíticos de isolamento e caracterização (44).

3. VEs nas doenças infecciosas

Tal como as células eucarióticas, também as células procarióticas libertam vesículas para o meio extracelular (47). Durante uma infeção, as VEs são libertadas por uma grande variedade de células incluindo células T, mastócitos, plaquetas, células epiteliais, oligodendrócitos, entre outras células dos diferentes tecidos (48). Nas condições em que células infetadas sofrem apoptose, os CAs libertados podem apresentar antigénios do organismo patogénico favorecendo a proteção do hospedeiro por ativação do sistema imune, mas nos casos de infeção por vírus, estes controlam a maquinaria das células e, conseqüentemente, as vesículas favorecem o patógeno na disseminação da infeção (16). Assim, as VEs no sistema imunitário podem ter um papel tanto de ativação como de imunossupressão (48).

As VEs têm sido associadas à imunopatologia por mediação de processos inflamatórios e imunes, que incluem a apresentação de antigénios, indução da adesão ao endotélio, aumento ou diminuição da permeabilidade capilar e a ativação de vias de sinalização (12). As MVs são

uma das fontes do fator tecidual que tem um papel importante na hemóstase. Assim, MVs libertadas durante o processo de sépsis, independentemente do agente patogénico causador, têm um papel importante na ativação da hemóstase com o objetivo de limitar a disseminação da infeção, funcionando como um mecanismo de defesa do hospedeiro em conjunto com a imunidade inata (9).

Por serem um fator importante na comunicação celular, tem vindo a ser estudado o envolvimento das várias VEs na fisiopatologia das DI de origem bacteriana, parasitária e viral.

3.1. Infeções bacterianas

A participação e influência das VEs nas infeções bacterianas não é consensual havendo que vários estudos que sugerem um papel patogénico com libertação de toxinas e mediadores de inflamação enquanto outros defendem um papel de proteção do hospedeiro, sendo que ambos podem acontecer (12,49–51).

Tanto as bactérias Gram-positivas como as Gram-negativas libertam VEs. No entanto, devido às diferenças na constituição da membrana, em lípidos e proteínas, as VEs de bactérias Gram-negativas são referidas como vesículas da membrana externa (VMEs). Estas VMEs já foram encontradas em vários ambientes como por exemplo em esgotos, no solo ou em fluidos biológicos (como o fluido cérebroespinal e o sangue) e tecidos infetados (49). As VMEs das bactérias Gram-negativas têm um diâmetro entre os 20 e os 200 nm e são compostas por proteínas tanto da membrana externa como do espaço periplasmático (espaço entre a MC e a membrana externa), lípidos, material genético e outros fatores de virulência (Figura 3) (52). Uma vez que o folheto externo da membrana externa das bactérias Gram-negativas é constituído maioritariamente por lipopolissacarídeo (LPS), este é um dos principais constituintes da membrana das VMEs (50). Foi também demonstrado que a libertação destas vesículas está associada ao *stress* celular bacteriano, como por exemplo durante a colonização do tecido hospedeiro, sendo que o número de vesículas aumenta em situações de *stress* (51).

Ao contrário da parede das bactérias Gram-negativas que é constituída por duas membranas com uma fina camada de peptidoglicano no meio, a das bactérias Gram-positivas é constituída por uma membrana revestida de uma camada espessa de peptidoglicano. Devido a estas características, seria pouco provável a libertação de VEs pelas bactérias Gram-positivas e, por isso, estas encontram-se menos estudadas. Relativamente à estrutura da membrana, as VEs de bactérias Gram-positivas distinguem-se das VMEs pela ausência de LPS (53).

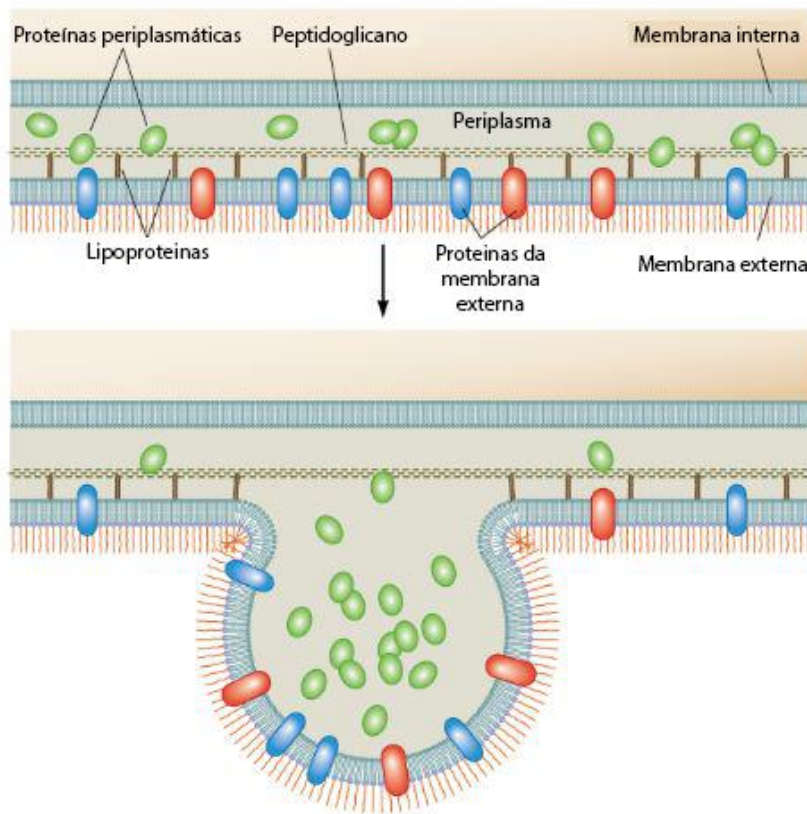


Figura 3 – Formação das vesículas da membrana externa em bactérias Gram-negativas e partículas envolvidas. (Adaptado de Ellis, 2010)

O conteúdo das VEs bacterianas tem um papel importante nas interações bactéria-bactéria, em ambientes de competição e de cooperação, e bactéria-hospedeiro (53). Em ambientes de competição, como em casos de limitação de nutrientes, as bactérias destroem outras bactérias presentes no meio. Em ambientes de cooperação, as VEs bacterianas parecem ajudar na sobrevivência de outras bactérias presentes, como foi comprovado em infecções mistas (51). Assim, o conteúdo das VEs bacterianas pode ter várias funções como:

- i) Resistência aos antibióticos conferida pela transferência de enzimas, como a β -lactamase, ou de genes, através das VEs, para outras bactérias presentes no meio, promovendo a sua sobrevivência (53). Esta foi uma das primeiras funções detetadas nas VEs de bactérias Gram-positivas. A resistência à ampicilina foi transferida para bactérias suscetíveis, por meio de VEs de *Staphylococcus aureus* que contêm β -lactamase. Esta transferência do conteúdo das vesículas entre diferentes espécies de bactérias, incluindo de fatores de virulência associados à resistência aos antibióticos, pode estar na base na disseminação de resistências antimicrobianas (51).

- ii) Formação de biofilmes promovendo a captação de materiais extracelulares e a adesão bacteriana, através de adesinas da membrana vesicular (54).
- iii) Fatores de virulência. Nas VMEs de *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria oportunista que causa infecções agudas e crônicas na pele, trato urinário e pulmões, foram detetados vários fatores de virulência. Uns causam respostas pro-inflamatórias, como as proteínas flagelares, por estimulação da imunidade inata, enquanto outros causam a morte das células do hospedeiro, nomeadamente através da fosfolipase C, a fosfatase alcalina e a hemolisina (52).
- iv) Morte de outras bactérias competitivas através de endolisinas que degradam a camada de peptidoglicano (53).
- v) Invasão celular através de atividade proteolítica (50).

3.2. Infecções parasitárias

As infecções parasitárias constituem um grave problema de saúde pública com grandes impactos socioeconómicos, maioritariamente em países subdesenvolvidos. As resistências dos parasitas aos tratamentos existentes também são um problema crescente, ressaltando a necessidade da descoberta de novas terapias (10). Uma vez que as infecções parasitárias têm maior prevalência em países e regiões mais pobres, o seu estudo é por vezes negligenciado. A maior limitação no estudo de novas estratégias terapêuticas são os poucos incentivos financeiros da indústria farmacêutica para esta área (10,55).

Das infecções parasitárias mais prevalentes destacam-se as causadas por protozoários como a malária (agente etiológico: *Plasmodium*; sp.), a toxoplasmose (agente etiológico: *Toxoplasma gondii*), as leishmanioses (agente etiológico: *Leishmania* sp.) e a tricomoníase (agente etiológico: *Trichomonas vaginalis*) e as causadas por helmintas como esquistossomose (agente etiológico: *Schistosoma*)(55).

A produção de VEs pelos parasitas depende se o parasita é intracelular ou extracelular e da interação com as células do hospedeiro. Três grupos de VEs estão associados à infecção parasitária: (a) VEs secretadas diretamente de parasitas extracelulares, (b) VEs produzidas por células hospedeiras infetadas por parasitas intracelulares e (c) VEs produzidas por células hospedeiras estimuladas por antígenos derivados de parasitas (Figura 4). As evidências indicam que VEs derivados do parasita podem atuar como moléculas de sinalização nas interações parasita-hospedeiro, mantendo a fisiologia parasitária normal e exercer, assim, o seu poder patogénico (55).

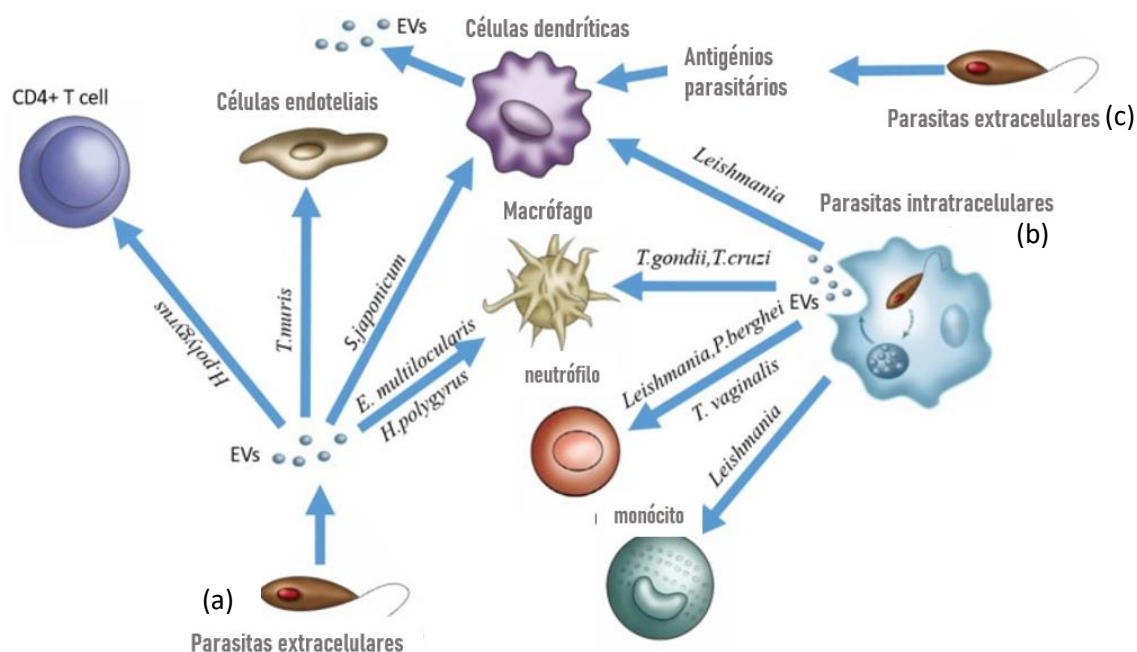


Figura 4 – Liberação de vesículas extracelulares de parasitas. (Adaptado de Wu, 2019)

Analogamente às outras patologias, as VEs de origem parasitária têm a função de regulação imune podendo entregar antígenos às células apresentadoras de antígenos e desencadear uma resposta imune adaptativa ou inata. Em alguns casos a resposta beneficia o hospedeiro, mas noutros casos pode beneficiar o parasita (Tabela I) (55).

Tabela I – Tabela informativa sobre exossomas nas infecções parasitárias. (Adaptado de Wu, 2019)

Doença	Patógeno	Célula de origem	Função	Mecanismo	Potencial aplicação
Malária	<i>Plasmodium falciparum</i>	Glóbulos vermelhos infectados	Promover a sobrevivência do parasita e a propagação da doença	Comunicação intercelular por transferência de genes	Alvo terapêutico
Leishmaniose	<i>Leishmania donovani</i>	Parasita	Inibir a resposta imune de monócitos e células dendríticas derivadas de monócitos	Facilita a produção de IL-10 e diminui a ativação do TNF para inibir a resposta imune de monócitos	Adjuvante de vacina para a Leishmaniose
Toxoplasmose	<i>Toxoplasma gondii</i>	Células dendríticas infectadas	Induzir a imunidade protetora contra a toxoplasmose	Induz a proliferação de esplenócitos com expressão de citocinas de células Th1	Preparação de vacinas
Tricomoníase	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Parasita	Facilitar a invasão do parasita e modular a ativação da inflamação	Promove a adesão do patógeno às células epiteliais	Diagnóstico e tratamento de tricomoníase
Esquistossomose	<i>Schistosoma japonicum</i>	Parasita	Ativação do sistema imune por interações parasita-hospedeiro	Polarização de macrófagos com aumento da produção de fatores pró-inflamatórios	Biomarcador de diagnóstico, novas vacinas e terapêuticas

A título de exemplo, refere-se a malária, que é uma doença parasitária causada por várias espécies do género *Plasmodium* e que provoca febre, vômitos, fadiga e dores de cabeça (55). A severidade da doença, que pode levar a quadros de anemia graves e a malária cerebral, está relacionada com a produção em excesso de citocinas pro-inflamatórias, nomeadamente a interleucina 6 (IL-6), o fator de necrose tumoral (TNF) e o interferão gama (INF- γ). Foi demonstrado que as VEs que continham antígenos do parasita estimulam a ativação de macrófagos através da expressão de CD40 na sua superfície e a libertação de TNF, provocando a ativação de uma resposta imunitária provavelmente associada à inflamação durante a infeção (56). Este papel patogénico é também suportado pela evidência de que a inibição da libertação de VEs, pela depleção de um gene, por exemplo, protege contra a severidade da doença e consequentemente contra a mortalidade (12).

Nas infeções por helmintas intestinais, os parasitas desenvolveram métodos de regulação e escape ao sistema imune evitando a sua expulsão do organismo e levando ao desenvolvimento de infeções crónicas. A indução de citocinas anti-inflamatórias e células T reguladoras são responsáveis pela tolerância imunitária e pela manutenção da homeostasia (57). Foi demonstrado que a obtenção deste ambiente imunomodulador pode ser atribuída às VEs secretadas pelos parasitas, que parecem ter um papel importante não só na comunicação entre parasitas mas na interação entre parasita e hospedeiro (58).

As VEs com ARN do helminta são internalizadas pelas células intestinais tendo um papel na mediação da comunicação parasita-hospedeiro (59). As proteínas e miARNs presentes nas VEs de helmintas, devido à sua capacidade supressora da inflamação, têm um grande potencial no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de infeções helmínticas ou outras doenças não infecciosas resultantes de uma desregulação do sistema imune. As terapias baseadas nas VEs de helmintas apresentam a possibilidade de aplicação em doenças inflamatórias como a doença celíaca, asma, esclerose múltipla ou doenças inflamatórias intestinais (58).

3.3. Infeções virais

Vírus são pequenos agentes infecciosos constituídos por material genético (ADN ou ARN) envolto numa estrutura proteica denominada cápside e alguns ainda possuem uma membrana exterior denominada de envelope. São caracterizados como parasitas intracelulares obrigatórios uma vez que estão dependentes da célula hospedeira para se replicarem (60). Os vírus utilizam a maquinaria celular para replicar e disseminar o viriões, favorecendo a patogénese e progressão da infeção.

Como já referido, as VEs através da distribuição do conteúdo biologicamente ativo, vão influenciar a fisiologia das células alvo podendo afetar o metabolismo celular, a transcrição, replicação, diferenciação, migração ou sinalização. Os vírus manipulam as VEs naturalmente libertadas pelas células, permitindo-lhes transportar material genético e proteínas virais sem serem detetados pelo sistema imune do hospedeiro. Demonstrou-se que as VEs podem contribuir para a replicação viral silenciando os mecanismos antivirais do hospedeiro, nomeadamente, as funções das células NK (*natural killer*) e as respostas do interferão tipo I (61).

Em pacientes sujeitos à terapia antirretroviral, foram encontradas VEs com proteínas do Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH). A deteção destes antígenos virais em VEs sugere a participação destas vesículas na infeção por VIH e na persistência viral (62). Por outro lado, as VEs podem inibir a replicação viral pela estimulação dos mecanismos antivirais do hospedeiro. Por exemplo, foi demonstrado que trofoblastos humanos não infetados são muito resistentes à infeção viral e, por isso, podem transmitir essa resistência antiviral, por meio de VEs, para outras células através de um processo de indução da autofagia (63).

3.4. Aplicação das VEs ao diagnóstico

Uma vez que as DI provocam quadros clínicos muito graves, por vezes incapacitantes ou fatais, é importante um rápido diagnóstico para dar início atempado do tratamento (33). A libertação de vesículas, associadas a um processo infeccioso, é um fator chave na resposta inflamatória aos agentes patogénicos e, por isso, deve ser estudada a sua aplicação ao diagnóstico (51).

Os métodos diagnósticos tradicionais baseiam-se na observação do agente infeccioso ou na cultura microbiana da amostra biológica. No entanto, nem todos os microrganismos são cultiváveis, alguns locais de infeção necessitam de uma colheita invasiva e infeções com uma baixa carga microbiana podem ser diagnosticadas erradamente como negativas (falsos negativos). A utilização de VEs pode representar uma potencial solução para estes problemas. Há estudos que indicam um aumento da libertação de vesículas com a progressão da infeção e que as VEs vão acumular-se na circulação sanguínea, possibilitando a colheita de amostras por um processo mais fácil e menos invasivo (11).

Para fins de diagnóstico será necessário o isolamento de VEs do plasma sanguíneo, uma vez que o sangue é a amostra biológica mais utilizada para a pesquisa de biomarcadores. No entanto, a qualidade e pureza de vesículas isoladas de fluidos biológicos pode ser um desafio,

ao contrário das isoladas de um meio controlado em laboratório (34). Adicionalmente, os métodos analíticos disponíveis, ainda não permitem a distinção entre as VEs normalmente libertadas das VEs relacionadas com a infeção e, conseqüentemente, não permitem a sua quantificação (11).

Dando como exemplo a infeção por VIH, os métodos de deteção e quantificação do vírus baseiam-se na amplificação do genoma viral ou na deteção da proteína p24, que estão mais acessíveis quando o vírus está em replicação ativa. Assim, as células que iniciem a expressão génica lentamente, podem não ser detetadas, resultando num falso negativo. Deste modo, a utilização de VEs é uma nova abordagem a ser estudada (61). MiARNs, são pequenas moléculas de ARN não codificante e apresentam padrões de expressão alterados em casos de infeção. Estas moléculas têm vindo a ser associadas à infeção por VIH, são encontradas no sangue e podem ser transportadas por VEs. Um exemplo específico de um miARN encontrado em VEs é o miARN-223, usado como biomarcador de doença, pois regula a diferenciação de monócitos, neutrófilos e granulócitos associados à resposta imunitária numa fase inicial da infeção por VIH e subsequente inflamação. Assim, o estudo das VEs e do seu conteúdo em miARN parece ser uma estratégia a desenvolver para o diagnóstico de VIH (64,65).

Outro exemplo é a utilização de ADN exossomal no diagnóstico da tuberculose, doença causada por *Mycobacterium tuberculosis*. A tuberculose é uma doença infecciosa bacteriana que ataca, principalmente, os pulmões e cujo prognóstico depende da rapidez do diagnóstico e do início do tratamento. Os métodos atualmente disponíveis para o seu diagnóstico apresentam algumas limitações, entre elas a baixa sensibilidade em amostras com baixa carga bacteriana ou no início da infeção (falsos negativos). Como já referido anteriormente, o stress celular estimula a libertação de VEs e, conseqüentemente, as células infetadas por *Mycobacterium tuberculosis* libertam VEs (maioritariamente exossomas) que contêm ADN da bactéria. A pesquisa deste ADN exossomal da bactéria através do método de reação de polimerase em cadeia (PCR) apresentou uma maior sensibilidade tendo inclusive detetado a presença de ADN bacteriano em amostras com resultado negativo no método de cultura bacteriana (66,67).

O diagnóstico da esquistossomose é, normalmente, realizado através da pesquisa de ovos do parasita *Schistosoma* em fezes ou urina e, por isso, o diagnóstico na presença de uma baixa carga parasitária é complicado. A presença de miARNs de *Schistosoma* foi detetado em VEs isoladas do soro de pacientes com esquistossomose e com baixa carga parasitária. Para além disso, foi ainda detetada a diminuição destes miARNs em VEs ao longo do tratamento. Deste modo, esta parece ser uma abordagem promissora não só para o diagnóstico da infeção

por *Schistosoma* mas também para o acompanhamento da infecção (68). Outros estudos sugerem a possível utilização de VEs para diagnóstico da tricomoníase, infecção pelo parasita protozoário *Trichomonas vaginalis* (55).

3.5. Aplicação das VEs no desenvolvimento de vacinas

As VEs provenientes de organismos patogênicos têm vindo a ser utilizadas no desenvolvimento de candidatos a vacinas para imunização contra esses mesmos organismos (69). Uma vez que também existem poucos adjuvantes aprovados para uso humano, o estudo das VEs como adjuvantes para vacinas é uma abordagem interessante devido à sua interação com o sistema imune (69).

Atualmente, o tratamento de infecções bacterianas está dificultado devido ao aumento de bactérias resistentes aos antibióticos. Por isso, as vacinas têm sido uma abordagem com interesse crescente, principalmente após a descoberta de que as VEs de origem bacteriana transportam fatores de virulência que podem atuar como antigénios (54). As VEs de organismos patogênicos que, por si só, já possuem uma elevada imunogenicidade, podem ainda ser conjugadas com pequenas proteínas bacterianas para o desenvolvimento de vacinas, de modo a aumentar a resposta imunitária no organismo exposto, pelo aumento da quantidade antigénica (69). A título de exemplo, refere-se a vacina Bexsero[®] do grupo Novartis, para a meningite B, que é uma vacina conjugada com VMEs, isoladas da estirpe NZ98/254 do *Meningococcus* do tipo B, e proteínas expressas na superfície das células de *Neisseria meningitidis*. As várias estirpes de *Meningococcus* do tipo B apresentam uma grande variabilidade na expressão das proteínas de superfície, pelo que, ao utilizar diferentes proteínas de superfície na composição da vacina, consegue-se uma maior proteção contra as várias estirpes responsáveis pela meningite meningocócica (70). Outro exemplo é a utilização de VEs provenientes de células infetadas por *Mycobacterium tuberculosis* na proteção contra a infecção (68). No estudo foram utilizados CAs de macrófagos infetados e não infetados com tuberculose para vacinar ratos saudáveis. Após exposição à bactéria concluiu-se que a vacinação com CAs de macrófagos infetados, protege contra a tuberculose. Esses CAs continham antigénios e moléculas apresentadoras de antigénios que induziram a ativação de linfócitos T, CD4 e CD8, que têm um papel crucial na imunidade contra a infecção. Isto não só demonstra o papel dos CAs na modulação da imunidade como a sua aplicação em estratégias terapêuticas nas DI (16,71).

Relativamente às infecções parasitárias, foi estudada a aplicação, em ratos, de uma vacina exossomal na proteção contra a infecção por *Toxoplasma gondii*, um parasita intracelular

obrigatório responsável pela toxoplasmose. A infecção é normalmente assintomática, mas pode levar a complicações ou a malformações fetais no caso da infecção ocorrer durante a gravidez. A vacinação com exossomas derivados de células dendríticas, apresentadoras de antígenos, induziu uma resposta imunitária protetora contra a toxoplasmose. Uma vez que os exossomas derivados de células dendríticas conseguem desencadear uma resposta sistémica protetora, podem ser bons candidatos para o desenvolvimento de vacinas anti-parasitárias (72,73). Outros estudos também mencionam a possível aplicação de VEs em vacinas para infeções com a esquistossomose e a malária (55).

Nas infeções virais é necessário o conhecimento dos mecanismos de interação entre os vírus e as VEs para que estas possam ser usadas no desenvolvimento de vacinas e novas terapêuticas para o controlo de infeções virais (74). Neste momento, está a ser desenvolvida uma candidata a vacina intranasal contra o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) com vesículas extracelulares de *Salmonella typhimurium* incorporadas com o domínio de ligação ao recetor (RBD – do inglês *Receptor Binding Domain*) de SARS-CoV-2 (75).

4. Conclusões e Perspetivas Futuras

Tanto as VEs de origem humana, como as VEs de origem bacteriana e parasitária têm ganho grande destaque devido à sua participação nos mecanismos fisiopatológicos das doenças infecciosas. Assim, são bons alvos para a pesquisa e desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e de vacinas contra esses agentes patogénicos. No entanto, existem ainda alguns desafios a ultrapassar. Apesar de terem origem em quase todas as células, a sua libertação depende de vários fatores como a idade, estado da infeção ou estado de inflamação sendo importante conhecer os mecanismos subjacentes à biogénese.

No caso de doenças infecciosas, o facto das amostras biológicas conterem uma grande diversidade de VEs pode ser um obstáculo à sua caracterização. Os métodos de isolamento que se baseiam no tamanho, densidade ou marcadores como as CD63 não são, na maioria das vezes, suficientemente seletivos, ou seja, específicos de determinado tipo de vesícula. Para o isolamento, com sucesso, das diferentes VEs numa amostra é necessário encontrar marcadores específicos de cada tipo de vesícula, permitindo a sua distinção. Assim, neste momento é importante validar os potenciais marcadores em estudo para a sua sensibilidade e especificidade.

A área de aplicação das VEs nas doenças infecciosas, apesar de pouco desenvolvida, apresenta um enorme potencial seja no desenvolvimento de biomarcadores para diagnóstico, seja para o desenvolvimento de vacinas ou como veículos de transporte fármacos para o tratamento e prevenção.

Atualmente, ainda falta conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos em todo o ciclo de “vida” das VEs, desde a sua formação, internalização e degradação nas células alvo, bem como métodos adequados que permitam manipular o seu conteúdo e libertação. Apesar dos custos associados, isto poderá implicar o desenvolvimento de equipamentos específicos para VEs.

5. Referências Bibliográficas

1. Anand S, Samuel M, Kumar S, Mathivanan S. **Ticket to a bubble ride: Cargo sorting into exosomes and extracellular vesicles.** *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics.* 2019;1867(12):140203.
2. de Jong OG, Kooijmans SAA, Murphy DE, Jiang L, Evers MJW, Sluijter JPG, et al. **Drug Delivery with Extracellular Vesicles: From Imagination to Innovation.** *Accounts of Chemical Research.* 2019;52(7):1761–70.
3. Keshtkar S, Azarpira N, Ghahremani MH. **Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: Novel frontiers in regenerative medicine.** *Stem Cell Research and Therapy.* 2018;9(1):1–9.
4. Raposo G, Stoorvogel W. **Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends.** *Journal of Cell Biology.* 2013;200(4):373–83.
5. Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, Zimoch J, Lekka M, Siedlar M, Baran J. **The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization.** *International Journal of Molecular Sciences.* 2017;18(6).
6. Andreu Z, Yáñez-Mó M. **Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function.** *Frontiers in Immunology.* 2014;5(SEP):1–13.
7. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, et al. **Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis.** *Nature.* 2015;527(7578):329–35.
8. Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC. **Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies.** *Journal of Neuro-Oncology.* 2013;113(1):1–11.
9. Delabranche X, Berger A, Boisramé-Helms J, Meziani F. **Microparticles and infectious diseases.** *Medecine et Maladies Infectieuses.* 2012;42(8):335–43.
10. Andrews KT, Fisher G, Skinner-Adams TS. **Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases.** *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance.* 2014;4(2):95–111.
11. Rodrigues M, Fan J, Lyon C, Wan M, Hu Y. **Role of extracellular vesicles in viral and bacterial infections: Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics.** *Theranostics.* 2018;8(10):2709–21.

12. Hosseini-Beheshti E, Grau GER. **Extracellular vesicles as mediators of immunopathology in infectious diseases.** *Immunology and Cell Biology.* 2018;96(7):694–703.
13. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. **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.* 2018;7(1).
14. Babst M. MVB Vesicle Formation: **ESCRT-Dependent, ESCRT-Independent and Everything in Between.** *Nih Public Access.* 2012;23(4):452–7.
15. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. **Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication.** *Kidney International.* 2010;78(9):838–48.
16. Caruso S, Poon IKH. **Apoptotic cell-derived extracellular vesicles: More than just debris.** *Frontiers in Immunology.* 2018;9(JUN).
17. Atkin-Smith GK, Tixeira R, Paone S, Mathivanan S, Collins C, Liem M, et al. **A novel mechanism of generating extracellular vesicles during apoptosis via a beads-on-a-string membrane structure.** *Nature Communications.* 2015;6(May).
18. Camussi G, Deregibus M-C, Bruno S, Grange C, Fonsato V, Tetta C. **Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells.** *American journal of cancer research.* 2007 Feb;1(1):98–110.
19. Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. **Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication.** *Leukemia.* 2006 Sep 20;20(9):1487–95.
20. 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.* 2019;21(1):9–17.
21. Haraszti RA, Didiot MC, Sapp E, Leszyk J, Shaffer SA, Rockwell HE, et al. **High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources.** *Journal of Extracellular Vesicles.* 2016;5(1).

22. Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, Al Saffar H, Anand S, Zhao K, et al. **ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo**. *Journal of Molecular Biology*. 2016;428(4):688–92.
23. Pathan M, Fonseka P, Chitti S V., Kang T, Sanwlani R, Van Deun J, et al. **Vesiclepedia 2019: A compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles**. *Nucleic Acids Research*. 2019;47(D1):D516–9.
24. Kim DK, Lee J, Kim SR, Choi DS, Yoon YJ, Kim JH, et al. **EVpedia: A community web portal for extracellular vesicles research**. *Bioinformatics*. 2015;31(6):933–9.
25. Brzozowski JS, Jankowski H, Bond DR, McCague SB, Munro BR, Predebon MJ, et al. **Lipidomic profiling of extracellular vesicles derived from prostate and prostate cancer cell lines**. *Lipids in Health and Disease*. 2018;17(1):1–12.
26. Gonzales PA, Pisitkun T, Hoffert JD, Tchapyjnikov D, Star RA, Kleta R, et al. **Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes**. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2009;20(2):363–79.
27. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhal S, Wood MJA. **Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes**. *Nature Biotechnology*. 2011 Apr 20;29(4):341–5.
28. Gyorgy B, Hung ME, Breakefield XO, Leonard JN. **Therapeutic Applications of Extracellular Vesicles: Clinical Promise and Open Questions**. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2015;55:439–64.
29. Liu C, Su C. **Design strategies and application progress of therapeutic exosomes**. *Theranostics*. 2019;9(4).
30. Chamberlain CA, Hatch M, Garrett TJ. **Extracellular vesicle analysis by paper spray ionization mass spectrometry**. *Metabolites*. 2021;11(5).
31. Bandu R, Oh JW, Kim KP. **Mass spectrometry-based proteome profiling of extracellular vesicles and their roles in cancer biology**. *Experimental and Molecular Medicine*. 2019;51(3).
32. Allelein S, Medina-Perez P, Lopes ALH, Rau S, Hause G, Kölsch A, et al. **Potential and challenges of specifically isolating extracellular vesicles from heterogeneous populations**. *Scientific Reports*. 2021;11(1):1–12.
33. da Cruz AB. **Purificação e expressão de vesículas extracelulares humanas e a correlação com a toxoplasmose**. 2019.

34. Baranyai T, Herczeg K, Onódi Z, Voszka I, Módos K, Marton N, et al. **Isolation of exosomes from blood plasma: Qualitative and quantitative comparison of ultracentrifugation and size exclusion chromatography methods.** PLoS ONE. 2015;10(12):1–13.
35. Wang F, Cerione RA, Antonyak MA. **Isolation and characterization of extracellular vesicles produced by cell lines.** STAR Protocols. 2021;2(1):100295.
36. Crescitelli R, Lässer C, Szabó TG, Kittel A, Eldh M, Dianzani U, et al. **Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: Apoptotic bodies, microvesicles and exosomes.** Journal of Extracellular Vesicles. 2013;2(1).
37. Bachurski D, Schuldner M, Nguyen PH, Malz A, Reiners KS, Grenzi PC, et al. **Extracellular vesicle measurements with nanoparticle tracking analysis—An accuracy and repeatability comparison between NanoSight NS300 and ZetaView.** Journal of Extracellular Vesicles. 2019;8(1).
38. de Jong B, Barros ER, Hoenderop JGJ, Rigalli JP. **Recent advances in extracellular vesicles as drug delivery systems and their potential in precision medicine.** Pharmaceutics. 2020;12(11).
39. Barua S, Mitragotri S. **Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects.** Nano Today. 2014 Apr;9(2):223–43.
40. Busatto S, Pham A, Suh A, Shapiro S, Wolfram J, Clinic M, et al. **Organotropic drug delivery: Synthetic nanoparticles and extracellular vesicles.** 2020;21(2):1–27.
41. Maas, S. L., Breakefield, X. O., & Weaver AM. **Extracellular vesicles: Unique intercellular delivery vehicles.** Trends in Cell Biology. 2017;27(3):172–88.
42. Sheridan C. **Exosome cancer diagnostic reaches market.** Nature Biotechnology. 2016 Apr 7;34(4):359–60.
43. Ciferri MC, Quarto R, Tasso R. **Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic tools: From pre-clinical to clinical applications.** Biology. 2021;10(5):1–14.
44. Willis GR, Kourembanas S, Mitsialis SA. **Toward Exosome-Based Therapeutics: Isolation, Heterogeneity, and Fit-for-Purpose Potency.** Frontiers in Cardiovascular Medicine. 2017 Oct 9;4(October):1–13.

45. Dang XTT, Kavishka JM, Zhang DX, Pirisinu M, Le MTN. **Extracellular Vesicles as an Efficient and Versatile System for Drug Delivery.** *Cells.* 2020;9(10).
46. Maguire CA, Balaj L, Sivaraman S, Crommentuijn MHW, Ericsson M, Mincheva-Nilsson L, et al. **Microvesicle-associated AAV Vector as a Novel Gene Delivery System.** *Molecular Therapy.* 2012 May 1;20(5):960–71.
47. Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, Bedina Zavec A, Borràs FE, Buzas EI, et al. **Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions.** *Journal of Extracellular Vesicles.* 2015 Jan 1;4(1):27066.
48. Thakur A, Ke X, Chen YW, Motalebnejad P, Zhang K, Lian Q, et al. **The mini player with diverse functions: extracellular vesicles in cell biology, disease, and therapeutics.** *Protein and Cell.* 2021.
49. Kim JH, Lee J, Park J, Gho YS. **Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles.** *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 2015;40:97–104.
50. Kulp A, Kuehn MJ. **Biological Functions and Biogenesis of Secreted Bacterial Outer Membrane Vesicles.** *Annual Review of Microbiology.* 2010;64:163–84.
51. Ellis TN, Kuehn MJ. **Virulence and Immunomodulatory Roles of Bacterial Outer Membrane Vesicles.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2010;74(1):81–94.
52. Choi D, Kim D, Choi SJ, Lee J, Choi J, Gho YS. **Proteomic analysis of outer membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa*.** *Proteomics.* 2011;11:3424–9.
53. Ñahui Palomino RA, Vanpouille C, Costantini PE, Margolis L. **Microbiota–host communications: Bacterial extracellular vesicles as a common language.** *PLoS Pathogens.* 2021;17(5):1–20.
54. Unal CM, Schaar V, Riesbeck K. **Bacterial outer membrane vesicles in disease and preventive medicine.** *Seminars in immunopathology.* 2011;33(5):395–408.
55. Wu Z, Wang L, Li J, Wang L, Wu Z, Sun X. **Extracellular vesicle-mediated communication within host-parasite interactions.** *Frontiers in Immunology.* 2019;10(JAN).
56. Couper KN, Barnes T, Hafalla JCR, Combes V, Ryffel B, Secher T, et al. **Parasite-derived plasma microparticles contribute significantly to malaria infection-**

- induced inflammation through potent macrophage stimulation.** PLoS Pathogens. 2010;6(1).
57. Maizels RM, McSorley HJ. **Regulation of the host immune system by helminth parasites.** Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2016;138(3):666–75.
 58. Eichenberger RM, Ryan S, Jones L, Buitrago G, Polster R, de Oca MM, et al. **Hookworm secreted extracellular vesicles interact with host cells and prevent inducible colitis in mice.** Frontiers in Immunology. 2018;9(APR):1–14.
 59. Buck AH, Coakley G, Simbari F, McSorley HJ, Quintana JF, Le Bihan T, et al. **Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity.** Nature Communications. 2014;5.
 60. Carter J, Saunders V. **Viruses and Their Importance: Chapter 1 at a Glance.** In: Virology: Principles and Applications. 2nd ed. 2013. p. 1–8.
 61. McNamara RP, Dittmer DP. **Extracellular vesicles in virus infection and pathogenesis.** Current Opinion in Virology. 2020;44:129–38.
 62. Anderson M, Kashanchi F, Jacobson S. **Role of Exosomes in Human Retroviral Mediated Disorders.** Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology. 2018;13(3):279–91.
 63. Pérez PS, Romaniuk MA, Duette GA, Zhao Z, Huang Y, Martin-Jaular L, et al. **Extracellular vesicles and chronic inflammation during HIV infection.** Journal of Extracellular Vesicles. 2019;8(1).
 64. Verma P, Pandey RK, Prajapati P, Prajapati VK. **Circulating MicroRNAs: Potential and Emerging Biomarkers for Diagnosis of Human Infectious Diseases.** Frontiers in Microbiology. 2016 Aug 15;7.
 65. Bazié WW, Boucher J, Vitry J, Goyer B, Routy JP, Tremblay C, et al. **Plasma Extracellular Vesicle Subtypes May be Useful as Potential Biomarkers of Immune Activation in People With HIV.** Pathogens and Immunity. 2021 Jan 14;6(1):1–28.
 66. Cho SM, Shin S, Kim Y, Song W, Hong SG, Jeong SH, et al. **A novel approach for tuberculosis diagnosis using exosomal DNA and droplet digital PCR.** Clinical Microbiology and Infection. 2020 Jul 1;26(7):942.e1–942.e5.
 67. Elzanowska J, Semira C, Costa-Silva B. **DNA in extracellular vesicles: biological and clinical aspects.** Molecular Oncology. 2021 Jun 19;15(6):1701–14.

68. Meninger T, Lerman G, Regev-Rudzki N, Gold D, Ben-Dov IZ, Sidi Y, et al. **Schistosomal microRNAs isolated from extracellular vesicles in sera of infected patients: a new tool for diagnosis and follow-up of human schistosomiasis.** *Journal of Infectious Diseases.* 2017;215(3):378–86.
69. Acevedo R, Fernández S, Zayas C, Acosta A, Sarmiento ME, Ferro VA, et al. **Bacterial outer membrane vesicles and vaccine applications.** *Frontiers in Immunology.* 2014;5(MAR):1–6.
70. Watson PS, Novy PL, Friedland LR. **Potential benefits of using a multicomponent vaccine for prevention of serogroup B meningococcal disease.** *International Journal of Infectious Diseases.* 2019;85:22–7.
71. Winau F, Weber S, Sad S, de Diego J, Hoops SL, Breiden B, et al. **Apoptotic Vesicles Crossprime CD8 T Cells and Protect against Tuberculosis.** *Immunity.* 2006 Jan 1;24(1):105–17.
72. Beauvillain C, Ruiz S, Guiton R, Bout D, Dimier-Poisson I. **A vaccine based on exosomes secreted by a dendritic cell line confers protection against T. gondii infection in syngeneic and allogeneic mice.** *Microbes and Infection.* 2007 Nov;9(14–15):1614–22.
73. da Cruz AB, Maia MM, Pereira I de S, Taniwaki NN, Namiyama GM, Telles JPM, et al. **Human extracellular vesicles and correlation with two clinical forms of toxoplasmosis.** *PloS one.* 2020;15(3):e0229602.
74. Meckes DG, Raab-Traub N. **Microvesicles and Viral Infection.** *Journal of Virology.* 2011 Dec 15;85(24):12844–54.
75. Jiang L, Driedonks T, Lowman M, Jong WSP, van den Berg van Saparoea HB, Dhakal S, et al. **A bacterial extracellular vesicle-based intranasal vaccine against SARS-CoV-2.** *bioRxiv.* 2021.06.28.450181.