



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Maria Beatriz Amaro Canaveira

Relatórios de Estágio orientados pela Dra. Sandra Palma e Dra. Teresa Bernardes Antunes e Monografia intitulada “*Revolutionizing Leishmania Vaccine Research with Exosomes*” orientada pela Professora Doutora Olga Maria Fernandes Borges Ribeiro referentes à Unidade Curricular “Estágio”, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2023



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Maria Beatriz Amaro Canaveira

Relatórios de Estágio orientados pela Dra. Sandra Palma e Dra. Teresa Bernardes Antunes e
Monografia intitulada “Revolutionizing *Leishmania* Vaccine Research with Exosomes”
orientada pela Professora Doutora Olga Borges referentes à Unidade Curricular “Estágio”,
apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na
prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2023

Eu, Maria Beatriz Amaro Canaveira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2018278712, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Revolutionizing *Leishmania* Vaccine Research with Exosomes” 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, 4 de setembro de 2023.

(Maria Beatriz Amaro Canaveira)

Agradecimentos

Começo por agradecer aos meus pais porque sem a sua ajuda e motivação diária não seria possível chegar onde cheguei. Pela incansável confiança e por me impulsionarem a não desistir dos meus objetivos. Porque são os pilares da pessoa que sou hoje

A toda a família, com especial destaque aos meus avós, pelo apoio incondicional. Por serem os meus principais espectadores e admiradores. Por serem a minha casa e por me simplificarem todas as etapas menos boas.

A todos os meus amigos, por todos os bons momentos que me proporcionaram, por todos os excessos, noitadas e principalmente por estarem presentes quando eu mais precisava. Pelo constante incentivo e por serem o meu porto seguro. Por me ensinarem o verdadeiro sentido de amizade!

À Professora Doutora Olga Borges pela sua disponibilidade e auxílio no desenvolvimento desta monografia e pela total competência. Por todos os desafios que me impôs.

A todos os membros da equipa dos Laboratórios Expanscience, com especial destaque à Dr^a Sandra Palma, pelos conhecimentos que me transmitiu, pelas condições de estágio ideais que me proporcionou. Pelo constante investimento em mim e constante atenção. Levo no coração.

À fantástica família da Farmácia Teresa Bernardes Antunes- à Dra. Teresa Antunes, à Beta, à Catarina, ao Ruben, ao Tiago, à Patrícia, à Jéssica e à D. Rosa que me proporcionaram momentos de aprendizagem indiscritíveis, sempre acompanhados de boa disposição e energia. Por me ensinarem os principais valores de um farmacêutico comunitário!

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra por todo o percurso que me proporcionou.

A Coimbra, que sempre fez e sempre fará parte de mim.

PARTE I

Relatório de Estágio em Assuntos Regulamentares e Marketing
nos Laboratórios Expanscience

PARTE II

Relatório de Estágio nos Laboratórios Expanscience

PARTE III

Monografia: Revolutionizing *Leishmania* Vaccine Research
with Exosomes

ÍNDICE

PARTE I	9
Lista de Abreviaturas	10
1. Nota Introdutória	11
1.1 Enquadramento- Os Laboratórios Expanscience.....	11
2. Análise SWOT	12
2.1 Análise Interna - Pontos Fortes (<i>Strenghts</i>)	12
2.1.1 Possibilidade de realização do estágio curricular em Indústria Farmacêutica..	13
2.1.2 Certificação <i>B-corp</i>	13
2.1.3 Forte aposta da divulgação da marca (digital e física).....	13
2.1.4 Multidisciplinaridade.....	15
2.1.5 Aposta em contactos presenciais.....	15
2.1.6 Domínio da plataforma digital Salesforce.....	16
2.2 Análise Interna - Pontos Fracos (<i>Weaknesses</i>)	16
2.2.1 Duração do estágio	16
2.2.2 Instalações de reduzidas dimensões	17
2.2.3 Dificuldades na gestão do trabalho.....	17
2.2.4 Falta de comparência na reunião de ciclo e Operadora Logística.....	17
2.3 Análise externa- Oportunidades (<i>Opportunities</i>)	17
2.3.1 Ideologias da empresa	17
2.3.2 Linguística	18
2.3.3 Aposta na divulgação	18
2.4 Análise externa - Ameaças (<i>Threats</i>).....	18
2.4.1 Concorrência e situação económica e financeira do país	18
3. Considerações Finais	19
4. Bibliografia	20
PARTE II	21
Lista de Abreviaturas	22
1. Nota Introdutória	23
1.1 Enquadramento - A farmácia Teresa Bernardes Antunes.....	24
2. Análise SWOT	25
2.1 Análise Interna - Pontos Fortes (<i>Strenghts</i>)	25

2.1.1	Equipa técnica.....	25
2.1.2	Investimento constante na formação	25
2.1.3	Prestação de serviços ao utente	26
2.1.4	Preparação de medicamentos manipulados.....	26
2.1.5	Automação da farmácia.....	27
2.2	Análise Interna - Pontos Fracos (<i>Weaknesses</i>)	28
2.2.1	Dificuldade no aconselhamento ao utente.....	28
2.2.2	Ausência de um plano organizacional de tarefas	28
2.3	Análise externa - Oportunidades (<i>Opportunities</i>)	29
2.3.1	Aposta num <i>site on-line</i>	29
2.3.2	Implementação de consultas de Acompanhamento Farmacoterapêutico	29
2.4	Análise externa - Ameaças (<i>Threats</i>).....	30
2.4.1	Venda de MNSRM fora dos estabelecimentos farmacêuticos.....	30
2.4.2	Medicamentos esgotados em armazém.....	30
3.	Casos Práticos	31
	Caso 1: <i>Congestão nasal</i>	31
	Caso 2: <i>Crosta láctea no bebé</i>	32
	Caso 3: <i>Dificuldade em adormecer</i>	32
	Caso 4: <i>Gripe</i>	33
	Caso 5: <i>Diarreia e cólicas</i>	33
4.	Considerações Finais.....	34
5.	Bibliografia.....	35
PARTE III	36
	Resumo	37
	Abstract	38
	List of abbreviations.....	39
1.	Introduction.....	40
2.	Exploring the Evolution of Leishmaniasis Vaccines: From Canines to Humans.....	42
3.	Exploring Extracellular Vesicles as a Novel Avenue for <i>Leishmania</i> Vaccine Advancements.....	44
3.1	Exploring the Enigmatic Exoproteome.....	44

3.2	Exosomes composition.....	46
3.3	Biological Sources of exoproteome components in <i>Leishmania</i> spp	47
3.3.1	Conventional secretory pathway	47
3.3.2	Unconventional secretory pathway.....	48
4.	The Role of exosomes in Infectious Diseases	49
4.1	Signaling pathways modulated by <i>Leishmania</i> spp.....	51
5.	Exosomes as vaccines for <i>Leishmania</i> spp disease	53
5.1	Challenges of vaccine development	53
6.	Unlocking the Potential of Exosomes in Vaccine Development.....	54
7.	Research on exosomal vaccine development.....	55
7.1	<i>In vitro</i> studies with future vaccine candidates	55
7.2	<i>In vivo</i> studies with future vaccine candidates	57
8.	Concluding remarks and future strategies	58
9.	References	60

PARTE I

Relatório de Estágio em Assuntos Regulamentares e Marketing

Laboratórios Expanscience

Lisboa

Lista de Abreviaturas

CNP: Código Nacional de Produto

DIM: Delegado de Informação Médica

DM: Dispositivo médico

IF: Industria Farmacêutica

KOL: Key opinion leaders

LE: Laboratórios Expanscience

MICF: Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

PAO: Period After Opening (Período Após Abertura)

PCHC: Produtos cosméticos e de higiene corporal

SWOT: *Strengths, Weakness, Opportunities, Threats* (Pontos Fortes, Pontos Fracos, Oportunidades e Ameaças)

I. Nota Introdutória

A formação académica na área da Dermofarmácia e Cosmética, Assuntos Regulamentares e Marketing e Comunicação farmacêutica que nos é proporcionada no decorrer do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), quando comparado com os restantes cursos a nível nacional, coloca-nos em vantagem no momento que nos centramos na temática. Este foi um dos aspetos visíveis ao longo do meu estágio nos Laboratórios Expanscience e é com a maior das certezas que consigo afirmar que fará um peso considerável na altura de ingressar no mercado de trabalho.

A oportunidade de obtenção de conhecimentos práticos assim como a enorme empatia que criei por estes temas foram o principal motor que me levou a realizar o meu estágio nesta mesma empresa.

I.1 Enquadramento- Os Laboratórios Expanscience

Os laboratórios Expanscience (LE) são uma empresa farmacêutica de dermocosmética francesa e independente, a qual desenvolve e fabrica produtos inovadores, com destaque para a área da saúde da pele.

Contando com mais de 70 anos de existência, a sua fundação foi levada a cabo pelo industrialista Paul Berthomé, em 1950, juntamente com o farmacêutico Claude Guillon e cujo primeiro lançamento terá sido uma loção de limpeza Mustela, que marca o início da industrialização dermocosmética.

Tendo por base o sucesso em França, a empresa iniciou a sua expansão, tendo chegado a Portugal no ano de 1979, local onde realizei o meu estágio.

O meu estágio nos LE teve uma duração total de 456 horas, sendo que consegui retirar deste período uma experiência holística que me permitiu consolidar conhecimentos teóricos lecionados em Unidades Curriculares como Assuntos Regulamentares e Marketing e Comunicação Farmacêutica. Tive igualmente a oportunidade de contactar, ainda que não muito aprofundadamente, com o ramo da logística, tendo sido muito bem-recebida e incluída no seio desta filiar dermocosmética.

Desta forma, o presente relatório diz respeito a uma análise SWOT dos Laboratórios Expanscience, onde irei mencionar de um ponto de vista interno os pontos fortes e fracos, e do ponto de vista externo as oportunidades e ameaças por mim experienciadas durante este estágio.

2. Análise SWOT

A análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*) trata-se de uma ferramenta direcionada para uma análise global de uma dada entidade de forma a determinar a sua posição estratégica e consequente planeamento estratégico. Engloba uma metodologia simples de implementar, o que sustenta a sua utilização nas mais diversas situações, identificando, de forma simplificada, quais as forças e fraquezas de um ponto de vista interno que poderemos controlar diretamente, assim como as oportunidades e ameaças de um ponto de vista externo, que não estão sob o nosso controlo direto.

Passarei agora a descrever o estágio, por mim realizado em farmácia comunitária, seguindo a abordagem de uma análise SWOT.

2.1 Análise Interna - Pontos Fortes (*Strengths*)

Caraterizados pela sua seriedade e constante capacidade de inovação, os LE têm vindo a construir ao longo dos anos a sua reputação internacional.

Os LE têm como principal foco a pele do recém-nascido e criança, extravasando atualmente também para uma abordagem mais familiar e com foco nos cuidados maternos. Desde de 1950 que tem existido um constante crescimento no que toca à criação de atividade dermocosmética, através da introdução de novas gamas inclusivas e produtos no mercado assim como estudos acerca da pele do recém-nascido e da criança, os quais sustentam a naturalidade, segurança e respeito pelo ambiente que caraterizam a marca.

Esta empresa é detentora da marca Mustela[®], a qual é atualmente uma referência em cuidados da pele do bebé, desde o nascimento. No entanto, a filial portuguesa é representante de marcas como Marimer, Physidose, Parasidose, Akileine, Ecrinal, A-Cerumen, Fungex e Dr.Yglo. Trabalha assim um grande número de produtos entre os quais cosméticos e dispositivos médicos (DM).

Nos LE existem gamas de produtos cada vez mais diversificadas e heterogéneas em que cada ingrediente é cuidadosamente selecionado e validado por especialistas e cada fórmula é complementada com uma percentagem mínima de ingredientes essenciais para a garantia da conservação, textura e estabilidade dos produtos. Assim, contamos com 3 gamas principais: Bebé e Criança, Maternidade e Família.

2.1.1 Possibilidade de realização do estágio curricular em Indústria Farmacêutica

A Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra é a única faculdade a nível nacional que oferece a possibilidade de realização de um estágio em Indústria farmacêutica (IF), no âmbito curricular. Este é um dos aspetos mais fortes, uma vez que oferece uma grande vantagem em contexto profissional.

Prestei auxílio na organização de projetos e participei em inúmeras visitas médicas, de forma a dar a conhecer os produtos. Realizei relatórios pós-eventos, sorteios, passatempos, preparei materiais de publicidade e de visita médica, estruturei protocolos de bolsas com hospitais públicos e privados e elaborei bases de dados com base no Excel, permitindo um maior domínio das minhas competências de organização e conhecimentos. Elaborei uma apresentação em formato *Powerpoint* de todos os acontecimentos marcantes e eventos realizados no presente ano de forma a ser apresentada em posterior reunião de ciclo da empresa.

Muita da informação e conceitos com que me cruzei ao longo do estágio eram familiares, sendo derivados de unidades curriculares que me eram familiares pelo que facilitou o meu contacto e a compreensão das diferentes vertentes deste estágio.

2.1.2 Certificação B-corp

A marca Mustela[®], desde o ano de 2018 que faz parte da comunidade *B-corp*, sendo a primeira marca de dermocosmética francesa a obter esta certificação. Este rótulo internacional é considerado exigente e é concedido a marcas que demonstrem um impacto positivo nas suas atividades em termos económicos, sociais e ambientais de três vias como parte de uma avaliação periódica.

Com a *B Corp*, a Mustela[®] reforça os seus pilares de compromisso e de promoção de saúde e bem-estar entre os jovens, pais e comunidades de profissionais de saúde.

2.1.3 Forte aposta da divulgação da marca (digital e física)

Uma grande aposta por parte desta empresa, atualmente, é a realização regular e periódica de conteúdos digitais, em direto, denominados de *Webinars*, dirigidos a enfermeiras/os e farmacêuticos/as, onde tive a oportunidade de agendar estes eventos, promover a sua divulgação e auxiliar na gestão durante o decorrer dos mesmos. Desta forma, é notório o investimento na criação de ligações de proximidade com o público alvo, permitindo reforçar a posição de especialistas na área desta marca.

Recentemente foi lançada uma aplicação destinada a dispositivos móveis, a “Expanscience Academy” a qual surge com o objetivo de dinamizar as atividades realizadas no âmbito dos produtos dermocosméticos assim como estar mais perto de todas as pessoas que, de alguma forma se interessam pelas diferentes gamas da marca Mustela®. Assim, para além da informação sobre os diversos produtos, poderão ser encontrados diversos conteúdos de carácter interativo sobre diferentes temáticas, sob o formato vídeo, quizzes, e/ou imagens contando com o acumular de pontos que irão trazer inúmeras vantagens, nomeadamente na obtenção de produtos, mediante a decisão dos utilizadores. Permite assim uma maior aprendizagem, de forma simples.

É mensalmente proposta uma forte e inovadora divulgação das marcas a nível das redes sociais, por via dos *Post Plans*, com grande destaque para aplicações como o Instagram. Neste segmento, não só a marca Mustela® é promovida, mas também algumas que se são distribuídas e representadas pelos LE, incrementando o seu reconhecimento e notoriedade. É assim de salientar a preocupação inerente à permanência em manter as páginas atualizadas periodicamente, como já referido.



Figura I: App Expanscience Academy

2.1.4 Multidisciplinaridade

No que toca aos recursos humanos na filial portuguesa, esta revê-se num registo multidisciplinar, contando com uma equipa de farmacêuticos, contabilistas, economistas, merchandisers, delegados de informação médica e gestores. A minha facilidade de integração no trabalho deveu-se em grande parte à equipa constituinte dos LE a qual reconheço como sendo jovem, motivada e acolhedora.

Este fator aliado ao facto de ter sido um estágio dinâmico e enriquecedor que conseguiu abranger mais do que uma área singular da empresa, contribuiu para o bom desenrolar de atividades na empresa.

Ao longo do estágio obtive contacto com várias áreas da empresa: assuntos regulamentares, marketing e logística.

Tive contacto com procedimentos de vigilância de PCHC e DM: retomei contacto com conteúdos lecionados em MICF tais como a má utilização de produtos e efeitos indesejáveis.

No *Marketing* pude ajudar na elaboração de *displays*, expositores, folhetos, entre outros de forma a ter alguma noção da informação/claims permitidos na promoção dos produtos, assim como fazer a ponte com assuntos regulamentares, responsável pela validação de todos os materiais. Para além disso, pude ter contacto com a criação de eventos, revisão de planos mensais dirigidos às redes sociais e publicidades.

Ao nível da logística consegui estar a par da estrutura e organização desta vertente da empresa, podendo observar e aprender como é feito todo o contacto com a empresa responsável pelos produtos: Dilofar.

2.1.5 Aposta em contactos presenciais

Existe uma forte aposta no que toca a conteúdos promocionais. Uma destas apostas consiste nas idas a Faculdades, no âmbito da dermocosmética e, aliando o conhecimento à divulgação de marca, é permitido aos LE dar a conhecer a sua marca, aumentar o número de vendas e conseguir fazer o escoamento de produtos (Figura 2).

É de realçar a grande proximidade dos LE com os *stakeholders* da Indústria farmacêutica (IF), através da visita regular e contínua a diferentes profissionais qualificados ao nível de hospitais e maternidades (Figura 3), assim como formações a nível hospitalar e farmacêutico, demonstrando uma preocupação basilar por parte dos LE em querer manter os profissionais ocorrentes e devidamente formados e informados sempre que necessário.

Ainda neste âmbito há uma forte aposta ao fornecer produtos e/ou amostras a diversas influenciadoras digitais para que estas as possam promover, mediante a sua opinião própria. É uma medida considerada forte uma vez que dão segurança e ressalvam o bom nome das LE.



Figura 2: Aula lecionada no contexto da dermocosmética na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.



Figura 3: Formação para enfermeiras num hospital privado.

2.1.6 Domínio da plataforma digital Salesforce

O *Salesforce* consiste numa plataforma desenvolvida em *Cloud*, sendo considerada uma plataforma de gestão de relacionamento com o cliente. Permite igualmente manusear, ativar e produzir conteúdos a nível da *app* e dos *Webinars*, gerir vendas, realizar sorteios, passatempos e cursos. Esta plataforma esteve presente no dia-a-dia do meu estágio, possibilitando desenvolver as minhas competências e espírito crítico, podendo perceber uma vertente inerente a toda à logística envolvida nas vendas de produto.

2.2 Análise Interna - Pontos Fracos (*Weaknesses*)

2.2.1 Duração do estágio

Devido à versatilidade e multidisciplinaridade do estágio, teria sido benéfico um período mais extenso nos LE, para permitir uma maior consolidação de informação e conceitos.

2.2.2 Instalações de reduzidas dimensões

As instalações da empresa têm reduzidas dimensões, não sendo proporcionais ao número de profissionais que aí trabalham, assim como à quantidade de materiais que necessitam de ser armazenados no local.

Para além disso, a unidade filial portuguesa não conta com unidade produtiva nem de investigação pelo que não me foi possível ter contacto com essa vertente.

2.2.3 Dificuldades na gestão do trabalho

Existe uma constante dificuldade no que toca à adequação dos trabalhadores da empresa ao volume de trabalho, o que implica a não concretização de alguns projetos ou consequentes atrasos nas metas estabelecidas.

Posto isto, é notório que a falta de consistência impede o aumento das vendas e a oportunidade de aumentar a receita dos LE. Uma das consequências será: Os LE têm como principal foco as zonas de Lisboa, Porto e Algarve, pelo que, nos restantes locais a nível nacional abrem margem de insurgência a marcas da concorrência para ganharem reconhecimento.

2.2.4 Falta de comparência na reunião de ciclo e Operadora Logística

A reunião de ciclo dos LE não coincidiu com o meu período de estágio. Desta forma não me foi possível assistir à reunião de consolidação anual do trabalho feito nem perceber quais as novas metas e objetivos a serem estabelecidos. A auditoria com a Dilofar, a operadora logística, é realizada anualmente, não tendo coincidido, igualmente, com o meu período de estágio.

2.3 Análise externa- Oportunidades (*Opportunities*)

2.3.1 Ideologias da empresa

Tendo por base os cuidados desenvolvidos, a característica política de naturalidade e toda a envolvência bebé, criança e maternidade, os LE destacam-se a nível internacional. Desta forma foi, garantidamente, um privilégio ter feito parte temporariamente desta equipa de renome e ter retirado tantas bases para o meu futuro, mediante os ensinamentos dos melhores profissionais do meio.

Têm como pilar o facto de a saúde ter de ser algo a preservar, garantindo assim soluções eficazes, revolucionárias e seguras: cultivar um modelo de empresa familiar,

desenvolver saúde natural, dar a cada pessoa o poder de ser interveniente, construir um modelo de negócios cada vez mais justo, reforçar o bem-estar dos colaboradores e prosperar deixando o mínimo de resíduos possível para o ecossistema. É uma empresa pioneira em vários estudos e com diversas patentes registadas, priorizando a eficácia, tolerância, segurança, naturalidade e prazer durante a utilização. Regem-se pela naturalidade e constante procura dos melhores ingredientes, idealmente biológicos, para extrair os “ingredientes ativos” com destaque para o abacate, girassol e cera de abelha.

2.3.2 Linguística

Os LE são originalmente uma empresa francesa pelo que, inevitavelmente, o contacto com a casa-mãe era feito em francês. Apesar de ser uma fraqueza minha, acabou por expandir os meus horizontes e abrir portas para a introdução de uma nova ferramenta, uma vez que o francês se trata de uma língua transversal à cosmética.

2.3.3 Aposta na divulgação

O crescente processo de internacionalização, assim como aumento do número de parcerias para distribuição de produtos de outras empresas permite uma maior abertura e disponibilidade para outros mercados, solidificando o seu futuro e contribuindo assim para gerar mais receita, com posterior aposta no desenvolvimento e investigação.

Para além disso, uma aposta promissora seria insistir na publicidade ao nível de cidades assim como em zonas consideradas “escassas” uma vez que aqui, o mercado não será tão competitivo, permitindo assim um avanço no mercado face a outras marcas concorrentes. Desta forma, uma forte aposta a ser mantida será a análise de mercado e da concorrência.

2.4 Análise externa - Ameaças (*Threats*)

2.4.1 Concorrência e situação económica e financeira do país

Atualmente, a concorrência que os laboratórios enfrentam é forte, uma vez que quer os DM, quer os PCHC já se encontram no mercado sob a forma de inúmeras marcas. Ou seja, ao existir muita oferta nestes ramos, mais difícil se torna para os LE tornarem-se líderes de mercado. Desta forma, é importante ressaltar a constante análise da concorrência com o objetivo de obter vantagem competitiva em relação aos concorrentes.

Também o atual baixo poder de compra, aliado a uma baixa natalidade nacional podem ser considerados uma forte ameaça aos LE, pondo em risco a venda dos produtos Mustela®.

No entanto, a aposta na inovação, na naturalidade, na saúde e no bem-estar são aliciantes, o que leva a que os consumidores nunca os deixem de parte.

3. Considerações Finais

O campo da dermocosmética sempre despertou em mim um interesse particular. Agora, ao concluir o meu estágio, consigo perceber com clareza os pontos mais robustos e os menos sólidos, sendo que os primeiros claramente predominaram sobre os segundos.

Encaro este período como uma experiência bastante positiva e crucial para o meu desenvolvimento quer profissional quer pessoal. Permitiu-me ver de perto como esta área funciona, proporcionando-me aplicar conceitos e conhecimentos adquiridos previamente em unidades curriculares lecionadas.

Com este estágio surgiu a oportunidade de fazer parte de uma equipa exemplar quer a nível de competências técnicas quer a nível de obtenção de novos conhecimentos, com todo o rigor que daí advém. Experimentei novos desafios com toda a necessidade de atualização que é intrinsecamente exigida: novos produtos, novas gamas, novas formulações. Ao ter sido inserida neste seio da empresa, senti-me extremamente motivada, mas ao mesmo tempo desafiada por toda a equipa competente.

Considero-me uma sortuda por ter embarcado nesta experiência sob a orientação da Dra. Sandra Palma, a qual me inspirou diariamente e permitiu que a minha vontade de aprender mais sobre esta área crescesse exponencialmente.

Concluo esta etapa com certeza de ter cumprido o objetivo que estabeleci para mim mesma: compreender o papel do farmacêutico, de forma holística, na área de cosmética, aliado a uma experiência enriquecedora a nível curricular e pessoal.

É com grande satisfação que reconheço a variedade de funções que aqui são desempenhadas e clarifico indubitavelmente que esta área se trata de uma aposta que eu pretendo ter a oportunidade de aprofundar.

4. Bibliografia

1. **Laboratoires Expanscience**- dermo-cosmética, reumatologia e ativos cosméticos. Disponível na internet: <https://www.expanscience.com/pt>
2. **INFARMED** – Cosméticos (2018). Disponível na internet: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/cosmeticos>
3. **Mustela®** - Mustela Portugal. Disponível na internet: <https://www.mustela.pt/>

PARTE II

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Teresa Bernardes Antunes

Coimbra

Lista de Abreviaturas

DT: Diretor(a) Técnico (a)

FFUC: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

IMC: Índice de Massa Corporal

MICF: Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM: Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

MSRM: Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

PVP: Preço de venda ao público

SWOT: *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

TBA: Teresa Bernardes Antunes

I. Nota Introdutória

Lecionado na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) trata-se de um curso integrado na área da saúde. Tem como principal característica o facto de ser um curso multidisciplinar o qual tem como objetivo fomentar conhecimentos base nos seus alunos, de uma forma precisa e eficiente.

Tendo este curso uma duração de 5 anos, é no último semestre do presente ano letivo que irei tratar da realização da unidade curricular “Estágio Curricular”, sendo esta marcada pelo culminar de toda a informação e conhecimentos obtidos durante os passados anos.

A farmácia comunitária surge num contexto de resolução de questões quotidianas de menor gravidade, de forma segura e eficaz, sendo o seu papel na cadeia de cuidados de saúde, inquestionável. Assegura um acompanhamento personalizado, independentemente da fase de tratamento do utente assim como consegue aliviar o congestionamento muitas vezes verificado nos restantes setores da saúde.

Como tal, o papel do farmacêutico entra como um papel de destaque na medida em que este deve desempenhar com rigor as suas responsabilidades, tendo por base a sua formação académica e englobando as capacidades humanas e operacionais obtidas tanto a nível curricular como extracurricular.

Foi mediante as anteriores considerações que iniciei o meu estágio em farmácia comunitária, de forma dedicada e responsável, no período de abril a julho na farmácia Teresa Bernardes Antunes (TBA), tendo tido uma duração de 700 horas.

Quero deixar um agradecimento a toda a equipa da Farmácia Teresa Bernardes Antunes pela simpática receção e integração, com especial destaque à minha orientadora, Dra. Teresa Bernardes Antunes, pela sua compressão, exemplar transmissão de conhecimentos e por todo o apoio constante.

A todos, o meu sincero muito obrigada!

I.1 Enquadramento - A farmácia Teresa Bernardes Antunes

A farmácia Teresa Bernardes Antunes foi fundada no ano de 1987, pela Dra Teresa Bernardes Antunes, a qual assume até aos dias correntes as funções de proprietária e Diretora Técnica (DT). O logotipo desta farmácia é encontrado na Figura 1.

Atualmente localizada no bairro de Santa Apolónia, em Eiras, a farmácia TBA, apesar de se localizar nos arredores de Coimbra, tem sido alvo de um constante e elevado crescimento a nível populacional assim como de infraestruturas e acessos nos últimos anos. Estas alterações justificam a mudança de localização da farmácia da sua localização inicial em Brasfemes, onde se encontrava operacional desde o ano de 1987. Por este motivo, assim como devido à proximidade física de ambos os locais, foi possível manter uma elevada quantidade de utentes fidelizados. Desta forma, podemos afirmar que a maioria dos utentes da farmácia TBA são utentes das zonas envolventes, já de longa data, que conhecem e depositam a sua confiança nos profissionais que aqui trabalham.



Figura 1: Logotipo da Farmácia Teresa Bernardes

Sendo atualmente composta por uma equipa sólida de 7 elementos com uma capacidade exímia de aliar a juventude à competência, esta farmácia dispõe de um portfólio completo de Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM) e Medicamentos não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM), englobando uma vasta escolha de fabricantes de genéricos. Inclui ainda um vasto leque de marcas que incluem produtos cosméticos, veterinária, suplementos alimentares, entre outros.

2. Análise SWOT

Na parte I deste documento foram descritas sumariamente as bases de uma análise SWOT. Desta forma, passarei a relatar o meu período de estágio de aproximadamente quatro meses sob a perspetiva deste tipo de análise.

2.1 Análise Interna - Pontos Fortes (Strengths)

2.1.1 Equipa técnica

A farmácia TBA é constituída por um conjunto de profissionais de elevada qualidade. Tive a oportunidade de colocar dúvidas, ouvir conselhos e ter um acompanhamento inicial por toda a farmácia de forma a conhecer, de forma generalizada, os medicamentos não sujeitos a receita médica, assim como produtos de venda livre, dermocosmética e veterinária. Destaco o constante cuidado de todos os membros da equipa que incansavelmente se dispuseram a tirar-me dúvidas e dar-me explicações, o que me motivou a evoluir enquanto profissional de saúde.

As trocas de conhecimentos entre os diferentes membros da equipa promoveram uma aprendizagem constante, minimizando a probabilidade de erros associados a falta de informação.

Para além disso, também a capacidade de autonomia de cada um dos profissionais era notória na medida em que, a Dra Teresa Bernardes Antunes distribuiu diferentes responsabilidades pelos diferentes colaboradores, dotando-os de uma elevada capacidade de autonomia e de resolução dos problemas.

Também a excelência do ambiente experienciado na farmácia aliado a uma boa disposição inconfundível é alvo de destaque: a forma como fui incluída nesta “família” foi importantíssima para que todos os dias pudesse trabalhar com um bom ambiente em meu redor.

2.1.2 Investimento constante na formação

Um dos fatores sempre presente no dia-a-dia desta farmácia foi a constante procura de conhecimento de forma a aperfeiçoarem cada vez mais o atendimento. O investimento em formações, eventos organizados pela indústria farmacêutica, assim como a própria receção periódica de delegados de informação médica contribuíram para que existisse uma constante evolução, permitindo uma maior segurança no aconselhamento. Durante o meu estágio tive a oportunidade de comparecer na formação dada pelos Laboratoire Native[®],

onde foram abordadas as marcas Lierac® e Phyto® e ainda em variadas pequenas formações dadas na própria farmácia, sob o encargo dos delegados.

2.1.3 Prestação de serviços ao utente

Um outro ponto forte que identifiquei na farmácia TBA é a relevância dada à prestação de serviços aos seus utentes. Os serviços englobavam as medições de colesterol total, HDL, LDL, triglicéridos, glicémia, tensão arterial e ainda o cálculo do IMC. Também alguns testes à COVID-19 foram realizados. Existem ainda também as consultas de nutrição, assim como de podologia, ambas muito frequentadas. Este aspeto sustenta o facto de a farmácia TBA ser uma farmácia de confiança e excelência, assumindo-se como um ponto central na saúde da população, na medida em que conseguem permitir o acesso a estes mesmo cuidados mais especializados que muitas vezes e por diversas razões poderiam não estar acessíveis à população.

A título pessoal, considero igualmente importante ressaltar enquanto ponto forte o contacto com o utente. Este assenta sobretudo na satisfação do doente no que toca ao seu estado de saúde e conforto, sendo este o motor de motivação para qualquer farmacêutico por forma a trabalhar e evoluir diariamente, através do respeito pelo próximo e pela vida. Ao contrário do meu estágio prévio, realizado na indústria, consegui perceber o impacto real das minhas ações na qualidade de vida dos utentes, sendo este um impacto direto e imediato.

2.1.4 Preparação de medicamentos manipulados

Os medicamentos manipulados surgem como sendo uma área de intervenção do farmacêutico comunitário, na medida em que este fica responsável pela aquisição das matérias-primas necessárias, a sua preparação e consequente dispensa.

Durante o meu estágio, tive a oportunidade de participar na preparação de um manipulado semissólido: uma pomada constituída por vaselina e enxofre a 6%, a qual era dirigida para uma afeção cutânea contagiosa denominada de sarna. O enxofre possui propriedades antisséticas, fungicidas e antibacterianas. A vaselina constitui uma base hidrófoba com propriedades emolientes.

Procedi ao preenchimento da ficha de preparação do manipulado (Figura 3), onde constam as matérias-primas, as propriedades organolépticas, o material da embalagem e o cálculo do preço de venda. Esta ficha depois de datada e assinada é arquivada conjuntamente com uma cópia da receita e do rótulo.

produtos, ou seja, medicamentos cujo prazo de validade seja menor, serão os primeiros a ser dispensados.

Esta ferramenta de automação é sem dúvida um ponto na forte na medida em que há uma poupança de espaço aliada a uma simplificação no processo de receção de encomendas, sendo que, maioritariamente, estes fatores ir-se-ão refletir numa poupança de tempo no atendimento.

Outra ferramenta que permite automatizar de forma eficaz o atendimento é o sistema CashGuard[®], o qual é utilizado para gerir as transações. Sendo a farmácia TBA uma farmácia movimentada e cujo valor monetário em rotação é elevado, o CashGuard[®] permite que cada membro da equipa consiga gerir com mais facilidade a sua caixa de fim de dia, evitando erros associados a trocos.

2.2 Análise Interna - Pontos Fracos (*Weaknesses*)

2.2.1 Dificuldade no aconselhamento ao utente

No que toca aos pontos fracos, começando pelos referentes ao estágio curricular em particular, senti uma elevada dificuldade no que toca ao aconselhamento de produtos de uso veterinário e de cosmética.

Na atualidade é crescente a procura de cuidados de saúde diários nomeadamente no que toca aos produtos cosméticos, os quais têm uma elevada importância na sustentabilidade de farmácia. Para além disso, também os produtos de uso veterinário são muito procurados, pelo que, rapidamente me apercebi que a minha preparação em ambos os campos não estava ao nível da restante, o que se acabou por revelar um fator preocupante. Na minha opinião, ambas as unidades curriculares de Dermofarmácia e Cosmética e Preparações de Uso Veterinário estão pouco adaptadas ao dia-a-dia do meio profissional.

2.2.2 Ausência de um plano organizacional de tarefas

Um outro fator que considero um ponto fraco foi a falta de um plano organizado que me permitisse ter tarefas definidas de forma clara. Numa fase inicial comecei por executar as tarefas relacionadas com entradas de encomendas através do *robot*, devoluções e contagem de *stock*. No entanto, para além dessas tarefas, a minha autonomia tornou-se limitada, uma vez que não percebia quais os objetivos para o dia e quais as tarefas que teria de realizar de forma clara. Não existia um plano de estágio estruturado para a semana, com uma pessoa responsável, o que tornou o estágio e a sedimentação de conhecimentos um pouco menos organizada. Um exemplo é o caso do atendimento ao público, no qual chegava a não

perceber a minha posição pois nunca fui incluída numa ordem previamente estabelecida, o que levou a que alguns dos meus atendimentos, por serem tão esporádicos e repentinos, condicionassem o assimilar de informação.

No entanto, é importante referir que apesar destas situações, tive a oportunidade de ter inúmeros momentos de contacto e atendimento ao público.

Por forma a conseguir aumentar o número de atendimentos, adaptei o meu horário às horas de mais fluxo de utentes (ao fim do dia, sábados e até serviços noturnos).

2.3 Análise externa - Oportunidades (*Opportunities*)

De forma a alcançar o reconhecimento devido, o farmacêutico deve ser capaz de identificar todas as oportunidades de forma a dignificar o bom nome da profissão e, consequentemente, alcançar o merecido reconhecimento.

2.3.1 Aposta num site on-line

Atualmente, a *internet* é um dos motores fulcrais no quotidiano de todos nós. As compras *on-line* estão a ter cada vez mais força na sociedade moderna.

Sendo assim, o desenvolvimento de um site por parte da farmácia TBA direcionado para a venda de MNSRM assim como produtos de Health Care tratar-se-ia de uma possibilidade de modernização assim como conseguir atingir um público-alvo diferente e mais vasto. Desta forma, iria permitir aos utilizadores um acesso a informação e a produtos a partir das suas casas, evitando aglomerados de pessoas na farmácia e proporcionando aos profissionais a oportunidade de despenderem uma maior quantidade do seu tempo aos utentes que possam necessitar de cuidados e atenção específicos.

2.3.2 Implementação de consultas de Acompanhamento Farmacoterapêutico

Tendo em conta a atual situação de saúde pública que atravessamos, acredito que esta seria uma forte oportunidade para a farmácia TBA, por forma a auxiliar na prestação de serviços especializados, direcionados e individualizados à população.

No decorrer dos meses da realização do meu estágio era constante a preocupação dos utentes: não conseguirem entrar em contacto com os médicos assim como não conseguirem marcar consultas. Desta forma, o farmacêutico surge como uma ferramenta essencial na medida em que este possui todos os conhecimentos base necessários a uma recolha e filtragem da informação do doente, podendo posteriormente proceder à avaliação

da mesma, intervindo e acompanhando a evolução do doente. Para além disso, em casos mais gravosos poderá agilizar o processo de ida ao médico.

2.4 Análise externa - Ameaças (*Threats*)

2.4.1 Venda de MNSRM fora dos estabelecimentos farmacêuticos

Uma das sérias ameaças à sustentabilidade das farmácias engloba a venda de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM) fora deste estabelecimento. É crescente o número de locais de compra de MNSRM, conjuntamente com suplementos e até cosméticos. Este fator, na minha opinião, consegue por em causa não só a sustentabilidade da farmácia assim como a próprio papel desempenhado pelo farmacêutico, na medida em que praticam PVPs inoportáveis para qualquer estabelecimento farmacêutico para além de atribuírem uma visão simplista do que é o medicamento.

No entanto, através da minha experiência, consegui observar um fator diferenciador que ainda é muito valorizado pelos utentes: o aconselhamento farmacêutico. É o papel do farmacêutico que surge nestas situações como sendo preponderante e decisivo através da sustentação de decisões baseadas nos seus conhecimentos teóricos, combatendo assim a banalização deste setor.

2.4.2 Medicamentos esgotados em armazém

Para além disto, um dos problemas que mais se manifestou no dia-a-dia da farmácia comunitária foi a quantidade de medicamentos esgotados. No caso do meu estágio constatei a falta de Concor[®], Ozempic[®], Trulicity[®], Ovestin[®] e Victoza[®]. Esta situação acaba por criar um certo transtorno na medida em que o utente certamente não irá ficar satisfeito e, apesar de ser uma situação que não depende da farmácia, pode por vezes não ser muito fácil transmitir essa mesma informação.

Nestas circunstâncias, a equipa procura realizar o máximo de esforços possíveis de forma a maximizar a satisfação do utente, sendo que, ao existir uma pesquisa incansável a estes produtos, este fator acaba por consumir algum tempo, o que pode ser determinante em horas de maior afluência à farmácia.

É ainda crucial ter atenção ao mercado e em particular aos stocks da farmácia, para que se possa antever a rutura de alguns produtos.

3. Casos Práticos

Relativamente aos casos práticos, compete-me destacar os pilares fulcrais necessários para um maior entendimento e capacidade de resolução dos mesmos: os conteúdos abordados ao longo destes cinco anos de curso.

No que toca às unidades curriculares é importante realçar a importância nomeadamente, mas não apenas, da unidade curricular de Farmácia Galénica, importante na preparação de manipulados que cheguei a acompanhar; nas várias Farmacologias que me conseguiram atribuir uma forma de visão clínica e técnica dos tratamentos.

Caso I: *Congestão nasal*

Uma utente do sexo feminino, de idade entre os 30 e os 40 anos desloca-se à farmácia e afirma estar com o nariz congestionado. Assim, interroguei a utente relativamente à existência de mais algum tipo de sintomatologia associada. A utente acrescentou que também espirrava bastante durante o dia e que sentia uma dor/pressão constante abaixo da zona ocular, e que lhe andava a causar desconforto no seu dia-a-dia. Para além disso referiu que se sente assim há cerca de 2 dias e que anualmente estas crises ocorriam. Pegando no facto de se tratar de uma situação recorrente, optei por perguntar como é que a utente tinha controlado a situação nos passados anos e por quais medidas terapêuticas tinha optado. Desta forma, a utente indica que já costumava usar o Vibrocil[®] composto por fenilefrina mas que este lhe causava alguma irritação e sensação de desconforto no nariz/comichão.

Posto isto, de acordo com a sintomatologia apresentada aconselhei gotas nasais de Vibrocil Actilong Protect[®], composto por cloridrato de xilometazolina, o qual reduz o inchaço do nariz e dexpanthenol, o qual acelera a regeneração da mucosa nasal, protegendo-a da secura. Este é indicado na profilaxia e tratamento da rinite alérgica sazonal e pressão sinusal associadas. De seguida passei a explicar o modo de utilização, indicando que previamente ao uso das gotas deveria assoar o nariz e frisando que não deveria usar por um período superior a 7 dias e no máximo deveria fazer 1 pulverização até 3 vezes por dia. Informei ainda que devia associar algumas medidas não farmacológicas tais como proceder a uma lavagem nasal com soro fisiológico ou com uma solução salina, beber muitos líquidos e evitar assoar o nariz com demasiada força pois poderia acabar por disseminar a infeção para o ouvido.

Caso 2: *Crosta láctea no bebé*

Uma utente do sexo feminino, de idade entre os 30 e os 40 desloca-se à farmácia com o seu filho de 6 meses e de imediato se mostra muito preocupada com a vermelhidão e com as pequenas “casquinhas” localizadas na zona do cabelo do bebé. Passei a observar o bebé e deparei-me de facto com pequenas crostas com um tom amarelado, oleosas e que estavam acompanhadas de uma vermelhidão associada a inflamação. Tanto se encontravam no couro cabeludo como já extravasam para a zona atrás das orelhas. Assim, primeiro que tudo, expliquei à senhora que se tratava de crosta láctea e que não havia motivos para alarmismos. Expliquei que se tratava de uma condição recorrente nos recém-nascidos e que surge espontaneamente, estando associada ao facto das glândulas sebáceas do couro cabeludo estarem dilatadas e a produzir sebo. Assim, após a utente referenciar que já usava um champô suave já para prevenir este tipo de situações, indicado pela médica, aconselhei somente óleo de amêndoas doces, de forma a tentar desconstruir aquelas escamas espessas. Frisei ainda que teria que, cerca de 2 horas de dar banho ao bebé, massajar suavemente a cabeça do bebé com uma escova macia e só passado esse período de tempo poderia então proceder à lavagem com um champô suave, tentando remover as crostas, sem forçar.

Caso 3: *Dificuldade em adormecer*

Um utente do sexo masculino com idade entre os 60 e os 70 anos desloca-se à farmácia e afirma ter muita dificuldade em adormecer. Acrescenta ainda já experimentara usar Valdispert Noite Rapid+® mas que não o ajudara e que ainda sentiu algumas dores de cabeça derivadas da toma. Desta forma, procedi a questionar o utente se o seu problema residia em ter dificuldade em adormecer ou em manter o sono, ao que me respondeu que somente tinha dificuldade em adormecer. De seguida questionei se o senhor fazia algum tipo de medicação concomitante, ao que me respondeu medicação direcionada para o controlo da diabetes e da hipertensão.

Por forma a contornar a utilização da melatonina, optei por aconselhar a toma de Dormidina®, constituída por doxilamina. A doxilamina é um anti-histamínico que possui também efeitos anticolinérgicos moderados e efeitos sedantes. O mecanismo de ação é devido ao efeito de inibição da histamina sobre os receptores H1.

Desta forma, indiquei que deveria tomar um comprimido 30 minutos antes de ir dormir, sempre que necessário e que não o deveria utilizar mais de 7 noites consecutivas

sem antes consultar o médico, sendo que a duração do tratamento deveria ser o mais curta possível.

Caso 4: Gripe

Uma utente com cerca de 50 anos entra na farmácia e afirma estar com gripe uma vez que se encontra com dores de cabeça, com alguma fraqueza, irritação na garganta e alguma febre. Afirma querer uma embalagem de Griponal® pois o marido também já teria recorrido aquela mesma medicação e que o tinha auxiliado. Com base nesta informação perguntei à senhora se fazia algum tipo de medicação crónica, a qual me respondeu que fazia TELMISARTAN há vários anos por forma a controlar a sua tensão arterial.

Desta forma alertei a senhora para o facto do Griponal® não ser uma opção viável por ser um medicamento efervescente e, como tal, tem uma elevada quantidade de sódio, o que pode ser prejudicial em pessoas com hipertensão. Como tal, optei por aconselhar a toma de Cêgripe®, o qual é constituído por paracetamol e que atua no alívio das dores de cabeça e no controlo da febre e, para além disso, contém maleato de clorofenamina, responsável por uma ação anti-histamínica. Assim, indiquei a toma de 2 a 6 comprimidos diários via oral, de preferência após as refeições. Por forma a diminuir a irritação na garganta aconselhei Golamir® spray, o qual é composto por um complexo molecular vegetal (taninos, resinas, flavonóides e polissacáridos) que tem como objetivo formar uma película com efeito barreira, protegendo a superfície da mucosa e normalizando a mesma. Para além disso, para reforçar o sistema imunitário aconselhei igualmente a toma de um complexo vitamínico rico maioritariamente em vitamina C e vitamina D (Centrum Imuno C®).

Caso 5: Diarreia e cólicas

Uma utente do sexo feminino, de idade próxima dos 30 anos dirige-se à farmácia e pede uma caixa de Imodium rapid® visto que anda com diarreia desde o dia anterior. Imediatamente questionei se a diarreia vinha acompanhada de mais algum tipo de sintomatologia ou se por algum motivo estaria a realizar antibioterapia ao que a utente me respondeu que não acrescentando que poderia derivar de algum tipo de refeição que teria feito, visto ter estado de férias. Após perceber que muito provavelmente se trataria de uma intoxicação alimentar, e uma vez que não estava associado a qualquer estado febril, optei por explicar à utente que na maioria dos casos, a diarreia aguda é autolimitada pelo que apenas seria necessário um tratamento sintomatológico. Desta forma, o Imodium Rapid®, contendo Loperamida, um agonista opióide e um agente obstipante poderia não ser a

melhor opção. Expliquei que a diarreia é um sintoma e não uma doença em si e, através do uso de loperamida, apesar de desta aumentar o tempo do transito intestinal, apenas iríamos mascarar a causa subjacente da diarreia.

Desta forma, o tratamento fulcral para este tipo de diarreia seria assegurar a reposição de fluídos e eletrólitos de forma a prevenir a desidratação. Assim aconselhei Diolaryte® Saquetas, explicando que as mesmas deveriam ser dissolvidas em cerca de 200 ml de água após cada dejeção. Para além disso seria importante conjugar com um probiótico de forma a repormos a flora intestinal e restituir o seu conforto. Para este fim, aconselhei Atyflor®, um completo simbiótico multiestirpe que contém uma mistura solúvel de sete estirpes de bactérias probióticas benéficas que habitam de forma natural na microbiota intestinal, nas concentrações adequadas, e frutooligossacarídeos (FOS). O modo de utilização consiste em beber uma saqueta por dia, dissolvida em água, leite ou sumo à temperatura ambiente.

Por fim, avisei que caso a diarreia se prolongasse por mais de 48 horas ou se surgisse febre superior a 38,5° deveria deslocar-se ao médico.

4. Considerações Finais

A realidade da farmácia comunitária é marcada por características muito específicas. A base teórica fornecida ao longo destes cinco anos de curso, apesar de fulcral e de se constituir como o pilar base para a formação de profissionais na área da saúde, não é suficiente. São inúmeras as ferramentas necessárias que não são passíveis de serem abordadas no curso e que inerentemente devem ser trabalhadas, nomeadamente no que toca à atenção dada ao doente, a comunicação com este e a capacidade de realizar vendas cruzadas. Apesar de conseguir antever uma longa caminhada que ainda está por vir, este estágio proporcionou-se as bases certas para melhorar as minhas capacidades práticas acima referidas.

Desta forma, considero o meu estágio na farmácia TBA um acrescento de excelência aos conteúdos teóricos aprendidos em MICF, tendo sido por isso, um estágio frutuoso.

5. Bibliografia

1. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS- **Farmácia Comunitária**. Disponível na Internet: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/>
2. The British Library. (2014). **What Is SWOT Analysis? *The British Library***. Disponível e.; <https://www.bl.uk/business-and-ip-centre/articles/what-is-swot-analysis>

PARTE III

MONOGRAFIA

“Revolutionizing *Leishmania* Vaccine Research with Exosomes”

Resumo

O género *Leishmania* pertence à classe Kinetoplastida, a qual compreende parasitas dimórficos pertencentes a cerca de 20 espécies diferentes. Estes parasitas são responsáveis por diversas manifestações clínicas, incluindo síndromes viscerais, cutâneas e mucosas. Participam ainda na comunicação celular através da secreção de vesículas extracelulares (EVs). O objetivo deste trabalho de revisão é reunir a informação que está publicada pela comunidade científica relativamente ao papel das EVs produzidas pela *Leishmania* sendo que, em particular, vai ser dada uma maior relevância aos exossomas.

As últimas tecnologias aplicadas à investigação em biologia têm sido usadas para investigar as interações *Leishmania*-célula hospedeira, sendo já possível ter alguma ideia do papel dos exossomas excretados pelo parasita.

Embora as exossomas tenham atraído grande atenção da comunidade científica nos últimos anos, relativamente às EVs excretadas pelos parasitas há ainda vários aspetos da sua biologia que permanecem enigmáticos. Isto inclui incertezas sobre a sua disponibilidade e papel nos processos moleculares intrínsecos relacionados com a patogénese. Tendo por base o papel fundamental dos exossomas nas interações entre parasita e hospedeiro, bem como as diferenças evolutivas inerentes à *Leishmania*, esta monografia visa explorar o uso de exossomas no que toca ao desenvolvimento de vacinas, bem como potenciais caminhos para o seu futuro desenvolvimento e aplicação.

Palavras-chave: *Leishmania*, exossomas, vacina, infeção parasitária, antigénios, exoproteoma.

Abstract

The *Leishmania* species belongs to the Kinetoplastida class, comprising dimorphic parasites encompassing approximately 20 different species. These parasites are responsible for various clinical manifestations, including visceral, cutaneous, and mucosal diseases. They are actively involved in cellular communication through the secretion of extracellular vesicles (EVs). The primary objective of this review is to compile information published by the scientific community concerning the role of EVs produced by *Leishmania*, with a particular highlighting on exosomes.

Recent advancements in biological research technologies have been exploited to explore *Leishmania*-host cell interactions, shedding light on the functions of exosomes released by the parasite. Despite the significant attention exosomes have gained in the scientific community in recent years, particularly in the context of parasite-secreted EVs, several aspects of their biology remain vague. These include uncertainties regarding their availability and roles in intrinsic molecular processes related to pathogenesis.

Given the pivotal role of exosomes in mediating interactions between the parasite and its host, along with the inherent evolutionary differences within the *Leishmania* genus, this monograph aims to investigate the potential utility of exosomes in vaccine development. Furthermore, it explores potential avenues for their future development and application.

Keywords: *Leishmania*, exosome, vaccine, parasitic infection, antigen, exoproteome.

List of abbreviations

CE: cholesterol esters

CL: cutaneous leishmaniasis

DC: dendritic cell

DEX: Dendritic-cell derived exosomes

EF-1 α : elongation factor 1 α

ESCRT: Endosomal Sorting Complex Required for Transport

EV: extracellular vesicle

GMP: Good manufacturing practices

HASPB: hydrophilic acylated surface protein B

HSP: heat shock protein

ILVs: intraluminal vesicles

JAK: jakus kinase

LEV: *Leishmania* Extracellular Vesicles

LPG: lipophosphoglycan

MAPKs: mitogen activated protein kinases

MHC: Major Histocompatibility Complex

MIP-1 α : macrophage inflammatory protein 1-alpha

MVBs: microvesicles

NO: nitric oxide

nSMase: neural sphingomyelinase

PAMPS: pathogen-associated molecular patterns

PKC: protein kinase C

PKDL: Post-kala-azar dermal leishmaniasis

PSG: promastigote secretory gel

PTP: protein tyrosine phosphatases

ROS: reactive oxygen species

SOP: Standart Operation Procedures

TAG: triacylglycerol

TLR: toll like receptors

TS: temperature shift

VL: visceral leishmaniasis

I. Introduction

The parasite multiplication and associated immune responses are responsible for the symptoms associated with leishmaniasis, a neglected tropical disease transmitted by vectors that threatens more than 12 million people worldwide (Figure 1). An estimated 700 000 to 1 million new cases occur annually^[1].

In absence of a human vaccine, disease control depends on the effective diagnosis and treatment of patients. The existing treatments are hampered by substantial limitations related to activity, toxicity, and the emergence of resistant parasites. Consequently, there is a pressing need for new drug targets, vaccine candidates, and improved diagnostic approaches are needed to tackle the disease^[2].

Leishmaniasis is treatable and curable as long as one has an immunocompetent system as medicines may not eliminate the parasite from the body. Consequently, there is a risk of relapse if immunosuppression occurs.

It is a parasitic protozoan that is transmitted to humans by the bite of infected female sandflies. Its incidence and distribution depend on the characteristics of the parasite species, the local ecological characteristics of the transmission sites, and human behavior^[1].

Eventhough infection does not generally have symptoms, some species are multi-host pathogens and they are able to cause disease in both humans and other mammals, which are important reservoirs of *Leishmania*^[3].



Figure 1: Latest status of endemicity of cutaneous leishmaniasis 2021 (WHO)

The World Health Organization has reported three main clinical forms of the disease: visceral leishmaniasis or kala-azar and cutaneous leishmaniasis and mucocutaneous leishmaniasis. Also, post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) is a complication of visceral leishmaniasis (VL).

These diseases are caused by infection with one of several species (20 species) of the protozoan parasite *Leishmania* and are transmitted by the bite of female phlebotomine sand flies (over 90 sandfly species are known to transmit *Leishmania* parasites).

Leishmaniasis is characterized by a broad spectrum of clinical presentations, which mainly depend on the infective species of *Leishmania* and the patient's immune system status.

Most infections are asymptomatic, although at some point it may turn out to develop visceral *Leishmaniasis*. Disease may be localized to the site of sand fly bite (cutaneous leishmaniasis [CL]), spread to other parts of the skin (disseminated and diffuse leishmaniasis) or mucosal (mucocutaneous leishmaniasis) sites, or may involve systemic organs, notably spleen, liver, and bone marrow (kala azar or visceral leishmaniasis [VL]). Post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL), a chronic skin disease characterized by nodular or macular lesions that start on the face and spread to cover full body and arms, may develop in patients previously treated for VL. PKDL is thought to play an important role in sustaining the transmission of VL, especially in inter-epidemic periods^[1].

The incubation period ranges from 10 days to over 1 year and the most common symptoms are fever, shivering, weight loss and anorexia^[1].

Leishmania infection is linked to a clear pathological profile, characterized by identifiable histopathological and clinical traits. These characteristics strongly show that the extracellular vesicles released by *Leishmania*, which are taken up by phagocytic cells and subsequently transformed into the obligate intracellular amastigote form, play a pivotal role in influencing the host's immune response. This phenomenon ultimately aids in promoting the survival of the parasite and the progression of the disease.

For comparison purposes, the phenotypic variation of the susceptibility of dogs to *Leishmania infantum* may be a consequence of the activity of the genetic markers that control both pro- and anti-inflammatory cytokines (immunomodulatory activity during leishmaniasis pathogenesis) and the different patterns of the cellular immune response to the presence of *Leishmania*.

There is increasing evidence that the prolonged persistence of *Leishmania* in infected patients is a frequent phenomenon. This persistence can lead to the development of immunocompromised individuals and, in some cases, immunosuppression that affects the mechanisms of both the innate and adaptive immune systems, resulting in an inefficient and polarized immune response^[3].

2. Exploring the Evolution of Leishmaniasis Vaccines: From Canines to Humans

While studies on human vaccination have generated disappointing results, numerous veterinary vaccines seem to demonstrate effectiveness (Table I).

Nowadays, there are no licensed vaccines available for the treatment of human leishmaniasis. The primary means of addressing the disease and controlling its transmission within the community primarily relies on chemotherapy. Nevertheless, the current drugs in use are suboptimal due to their significant toxicity and susceptibility to resistance. While chemotherapy can effectively treat the CL form, it is impractical for addressing other disease variants^[4].

As per the World Health Organization (WHO), vaccination is considered the most promising approach for disease control, offering a means to mitigate the undesirable effects associated with chemotherapy. The development of a vaccine that is safe, efficient, and accessible for all manifestations is a favorable strategy and stands as a principal priority in global public health. Consequently, it is important to concentrate on the present status and encouraging outcomes of existing vaccines assessed across various modalities.

1. First-generation vaccines, as killed vaccines, present an extensive range of antigens and have the capacity to provide substantial protection against infection by mimicking natural infections. Nonetheless, several studies have revealed that these vaccines trigger a less robust Th1-type immune response compared to live parasites, which leads to the variability of the outcomes. Four fractionated vaccines have received licensure and demonstrated remarkable efficacy in preventing canine leishmaniasis^[5].
2. When it comes to second generation vaccines, they include both subunit and genetically modified parasites. They are better suited for widespread vaccination efforts, thanks to their recombinant nature, which makes large-scale and cost-effective production more achievable^[6].
3. More recently, it was described a third-generation vaccines which utilize DNA. In this relatively recent method, either naked plasmid DNA or DNA enclosed within a viral vector is administered through intradermal or intramuscular injection. DNA vaccines are considered safe since they do not contain any pathogenic organism that could possibly regain virulence. Furthermore, they effectively boost protection against *Leishmania* infection^{[7][8]}.

Table 1: Examples of different types of *Leishmania* spp vaccines and their intrinsic properties ^[59,60]

Vaccine candidate	Clinical form	Benefits	Concerns
Leishmanization	CL	Single dose Long-term and strong immunity	Not safe
Killed vaccines	CL	Safer than live vaccines	Less powerful than live vaccines Require multiple doses
Live genetically modified vaccines	CL, VL	Safer than general live vaccines Stimulate immune system as in natural infection Don't require multiple doses	Risk of reversion to virulent state Need cold chain for transportation
Recombinant and subunit vaccines	CL, MCL, VL	No risk Induce strong immune response	Need cold chain for transportation Need adjuvant
DNA vaccines	CL, VL; PKDL	Safe No need of adjuvant Antigen-specific immune responses	Low potency in humans

CL: Cutaneous leishmaniasis; VL: visceral leishmaniasis; MCL: Mucocutaneous leishmaniasis; PKDL: post-kala-azar leishmaniasis

Extensive efforts are in progress globally to develop a range of vaccine approaches. Some of these modalities have advanced to clinical phases, demonstrating safety and immunogenicity. Additionally, animal vaccines are anticipated to be pivotal in curtailing the transmission of Leishmaniasis to humans. Moreover, various vaccine candidates are undergoing assessment across different stages of clinical trials, encompassing first, second, and even third-generation options.

Extracellular vesicles are known as excellent platforms for delivering vaccines due to their unique structural attributes. These vaccine delivery systems offer numerous benefits, including precise control over antigen release, safeguarding vaccine antigens from degradation, and enabling site-specific delivery. Additionally, they can even possess adjuvant

properties. These distinctive qualities contribute to an improved bioavailability of antigens, leading to the stimulation of the immune response^[9].

The packaging and delivery of innumerable large proteins sustain the fact that EVs are capable of transferring, within a population, diverse macromolecules. In order to develop novel disease control strategies, it is essential to better understand this parasite exosomes' origin, biology and physiology.

3. Exploring Extracellular Vesicles as a Novel Avenue for *Leishmania* Vaccine Advancements

Cells release small, membrane-bound structures called extracellular vesicles (EVs) into their surroundings. These vesicles, which include exosomes, microvesicles, and apoptotic vesicles, are pivotal for intercellular communication. One of the primary components of EVs are proteins. These proteins can be selectively packaged into EVs and transported to recipient cells. In this way, the exoproteome can contribute to the protein cargo of EVs. These proteins can have various functions in intercellular communication or in modulating the microenvironment.

While the exoproteome represents proteins directly secreted by cells into the extracellular space, extracellular vesicles are membrane-bound structures that can contain a diverse cargo of molecules, including proteins. The interplay between these two components is significant in various biological processes, particularly in the context of intercellular communication, host-pathogen interactions, and disease mechanisms.

To uncover and elucidate the biological functions of these secreted proteins, we will consider the exoproteome of *Leishmania* spp and scrutinize the existing data, exploring their hidden capabilities.

3.1 Exploring the Enigmatic Exoproteome

As previously mentioned, the term "exoproteome" is employed to characterize the extracellular contents surrounding a biological system.

It includes actively secreted proteins and non-secreted proteins that can result from surface shedding or cell lysis. Hence, the terms 'secretome' and 'exoproteome' should not be conflated; secretome is a subset of the exoproteome. As so, they are separate yet interconnected notions. The secretome encompasses both traditionally and non-traditionally secreted proteins. Among the latter category, a significant focus over the past decade has been on proteins linked to extracellular vesicles, which have been extensively investigated^[2].

These vesicles are secreted from promastigotes, cells infected with amastigote forms, and free amastigotes after host cell rupture.

There are, at least, a three established mechanisms through which EVs engage with recipient cells.: 1. Direct fusion with the plasma membrane of the recipient cell; 2. Receptor-mediated endocytosis following receptor-ligand interactions between EVs and recipient cell; 3. Signaling via direct interactions of receptor and ligand on the recipient cell surface^[10].

With a diameter of approximately 30 nm to 150 nm, EVs are nanoparticles formed by a lipid bilayer containing proteins and nucleic acids, which are derived and released by many types of cells^[11]. Hence, extracellular vesicles can serve as agents facilitating intercellular communication, whether in prokaryotic or eukaryotic organisms.

EVs have emerged as a pervasive mechanism for transferring information between cells and organisms across all the three kingdoms.

There's a number of different types of EVs, often categorized based on their size or location within the cell; As so, EVs that come from cell membrane are labeled "ectosomes". On the other hand, small EVs produced inside the cell are known as "exosomes"^[11].

There is a lot of research going on at the moment with the aim of interpreting the role of EVs in our body. Much information has already been established and much is yet to be confirmed.

Within the EVs, exosomes play a role in innumerable essential biological functions, such as nerve cell communication, presentation of antigens, immune responses, organ development and reproductive performances. They also participate in some pathological disorders, including viral and/or parasitic diseases^[12].

The process of exosome biogenesis initiates with the transformation of the endosomal membrane, leading to the creation of intraluminal vesicles (ILVs) within the organelle's interior. This occurs through two key stages: firstly, the maturation of early endosomes into microvesicles (MVBs), and subsequently, the conversion of late endosomes into exosomes upon their fusion with the plasma membrane. This mechanism can be activated in response to cellular stimulus^[13].

Due to their development within Multivesicular Bodies (MVBs) as a component of the endosomal pathway, a distinct cargo sorting process occurs. For transportation and cargo sorting, the most studied endosomal pathways are associated with the Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT)^[13].

In order to understand why exosomes are capable of being candidates for vaccine development, we need to understand the structure of this nanoparticles, which is transversal

to almost all living organisms, making them suitable for incorporation as vaccine delivery method and enhanced vaccine efficiency.

3.2 Exosomes composition

Exosomes' size, shape and rigidity provide a roadmap to rational delivery of efficient vaccines.

The surfaces of these heterogeneous exosomes are rich in triacylglycerol (TAG) and cholesterol esters (CE), constituents typically found in the lipid droplet core, as well as cardiolipin, a lipid component prevalent within the mitochondrial membrane^[14].

They also include cytosolic proteins like tubulin, actin, flotillin, membrane transport protein like annexin, and RAB proteins^[15].

Exosomes additionally contain signal transduction proteins, including protein kinases and heterotrimeric G proteins. Moreover, metabolic enzymes such as pyruvate and lipid kinases, as well as peroxidases, are also present on the surface of exosomes.

Exosomes also transport heat shock proteins, including HSP20, HSP27, HSP70, and HSP90, which play roles in antigen presentation by helping in the loading and binding of antigen peptides onto MHC molecules, dendritic cell maturation, and the translocation of NF- κ B into the nucleus via CD91^[16].

Several lipids and lipid metabolism enzymes have shown a critical role in the release and formation of exosomes. Neutral sphingomyelinase (nSMase) contributes to forming cone-shaped ceramide, which is essential for exosome secretion. Both cell-specific and ubiquitous proteins selectively express exosomes from their native cells^[17].

The generation of exosomes is preserved across eukaryotic cells, and their contents are both extensive and distinctive. Consequently, it is logical to observe that diverse cells in variable states will be able to transport unique exosomal cargo^[18].

Moreover, the liberation of exosomes has been linked to the functioning of calpains, which are calcium-dependent cysteine proteases. Elevated intracellular calcium levels initiate calpain activation, leading to the cleavage of specific filaments that attach the plasma membrane to the cytoskeleton, resulting in the release of EVs^[19].

3.3 Biological Sources of exoproteome components in *Leishmania* spp

3.3.1 Conventional secretory pathway

In *Leishmania* spp, most of the organelles engaged in secretion of proteins and the initial endocytic process are arranged around the flagellar pocket (Figure 2). The flagellar pocket is a structure located near the base of the flagellum. Analogous to higher eukaryotic organisms, conventionally secreted proteins in *Leishmania* spp possess N-terminal signal peptides, guiding them through the endoplasmic reticulum (ER).

The flagellar pocket stands as a markedly specialized formation found across all trypanosomatids. Within its recognized functions are protein secretion, incorporation of integral membrane proteins, and participation in endocytic processes^[20].

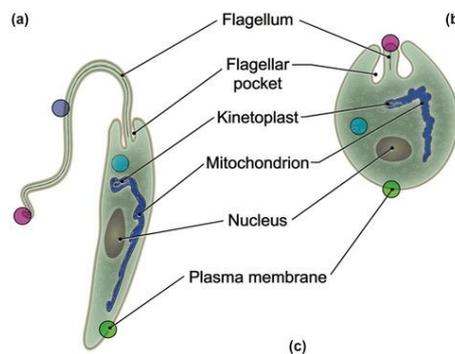


Figure 2: *Leishmania* spp main structures (Source: Laramie Studio, Portland, OR ^[61]).

These secreted proteins were demonstrated to have distinct functions in sustaining the parasite's survival and proliferation during both the insect stage and within the mammalian host. (Figure 3).

When it comes to the transmission of this parasite, the sandfly's stomodeal valve, which has ectodermal origin and is responsible for the one-way flow of food during feeding^[21], becomes congested by a substance known as promastigote secretory gel (PSG). This PSG, secreted by *Leishmania* spp promastigotes, is secreted in significant quantities, forming a semi-solid barrier that wraps the parasites^[22]. This action pushes the stomodeal valve open, facilitating colonization of the foregut and subsequent transmission. The primary components of PSG are filamentous secreted phosphoglycans, which not only provide resistance against digestive enzymes in the fly midgut but also appear to contribute to establishing infection in the mammalian host^[23].

Also, Chitinase has been investigated, revealing its significance intra host survival. This enzyme facilitates a faster colonization of the sand fly's anterior midgut by the parasites,

alters the sand fly's stomodeal valve, and impacts its blood-feeding behavior. All of these factors work together to increase transmission efficiency^[23].

GP63 is also anticipated to hold a crucial function within the sandfly vector, since it's synthesized during the promastigote stage, where it is likely to assume roles in protection and nutrition. GP63 has been extensively studied due to its interactions with host cells, engaging in multiple virulence-associated mechanisms. Both free and vesicle-bound GP63 contribute to rapid defense against complement-induced lysis and could potentially infiltrate the host cell's cytoplasm through a lipid raft-reliant pathway. Once inside, it enzymatically cleaves cytosolic host protein tyrosine phosphatases (PTPs), thereby contributing to the induction of macrophage anergy^[24].

3.3.2 Unconventional secretory pathway

Alternative pathways for protein delivery to the extracellular space exist beyond the classical secretory pathway. Unconventional secretion is characterized by the absence of recognized conventional signal peptides, independence from the ER-Golgi apparatus, and resistance to brefeldin A, a specific inhibitor of classical secretion^[25].

Two primary mechanisms have been suggested to account for the release of these proteins: direct passage across plasma membranes via export, or transportation via unspecified intracellular transport intermediates^[26].

In *Leishmania spp* a well-characterized unconventionally secreted protein called hydrophilic acylated surface protein B (HASP B) has been described. This surface protein is linked to the plasma membrane of metacyclic promastigotes and amastigotes, playing a vital role in the metacyclogenesis process. Despite the precise translocation mechanism remaining unknown, several crucial requirements for translocation have been identified. Nevertheless, it is obvious that this protein does not possess any signal peptide, transmembrane domain, or GPI-anchor site^[27].

Based on proteomic analysis and the examination of secretomes from diverse eukaryotic parasites, it has been proposed that the vast majority of protein secretion in these parasites is via a non-conventional pathway^[26].

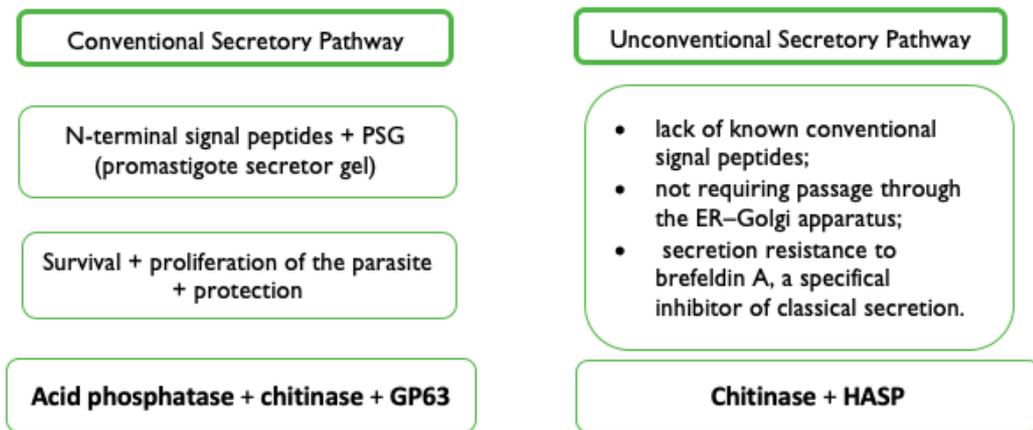


Figure 3: Representation of biological sources and characteristics of the conventional secretory pathway vs unconventional secretory pathway

4. The Role of exosomes in Infectious Diseases

The eradication of *Leishmania* spp from an host is based on perfect interaction between essential participants of the host immune system. From the moment promastigotes enter the bloodstream through a sand fly bite to the point where amastigotes enter macrophages, the ongoing battle between parasite elimination and disease establishment is, to a certain extent, influenced by *Leishmania's* capacity to manipulate and/or evade the host's immune defenses. The successful clearance of parasites requires the involvement of both innate and adaptive components of the host defense mechanisms^[28].

Cells infected by parasites or even the parasites themselves can release exosomes that activate T cells through antigen presentation. On the other hand, exosomes originating from microbial components such as *Leishmania* GP63 can inhibit T cell activation or trigger apoptosis in immune effector cells, including helper T cells and effector B cells^[28].

Leishmania's potential to generate exosomes was awakened by the observation of clusters of intra-macrophage vesicles encircling the metalloprotease (and virulence factor) GP63. Compelling evidence indicates that GP63, in conjunction with other virulence factors, can cleave macrophage proteins autonomously, regardless of parasite presence and phagocytosis. This implies that *Leishmania* exosomes assume a pivotal role during the early stages of infection, initiating the immunomodulation of macrophages to ensure the parasite's survival upon phagocytosis^[29].

Exosomes, well-known by their distinctive attributes including biocompatibility, stability, and low toxicity, have been extensively explored for diverse therapeutic and

diagnostic applications. These include drug and gene delivery, along with their potential in vaccination. Exosomes have this lipid bilayer membranes from plasma membranes, thereby enhancing their affinity for cellular membranes. This characteristic makes them well-suited for efficient gene or drug delivery. Targeted therapy can be realized by incorporating specific components onto their surfaces. Engineered exosomes are able to deliver fragile RNAs and DNAs, which are susceptible to degradation in the bloodstream. Beyond drug delivery and targeted therapy, the effectiveness of exosomes extends to vaccination, highlighting their potential as promising tools in this context^[30].

Also, EVs isolated from promastigotes were able to stimulate macrophages to express different types of cytokines. Moreover, the immunomodulatory properties of EVs probably contributed to an increase in parasite burden in mice. *Leishmania*-derived exosomes trigger IL-10 production while suppressing TNF- α and IL-8 secretion^[31]. The main alteration occurs within host macrophages, involving multiple tiers of modulation. This ends up disturbing crucial signaling pathways, breaking down specific substrates, and influencing transcription/translation factors. These modifications significantly impact fundamental macrophage functions like nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) production, along with cytokine synthesis. The outcome is an impaired capacity to effectively respond to external triggers and to present antigens^[32].

EVs seem to raise a beneficial environment for the proliferation of parasites, a function that appears to be one of their primary roles.

The outcomes of a vaccine clinical trial involving *L. major*-pulsed dendritic cell (DC) exosomes reveal that DC-derived exosomes have the capacity to induce protective Th1 immunity against cutaneous leishmaniasis, operating in a manner that is independent of direct cellular interactions. Significantly, numerous investigations have emerged employing DC-derived exosomes to confer protection against prevalent parasitic infections in livestock^[33].

Exosomes derived from mature dendritic cells (DEXs) typically exhibit higher levels of MHC class I and II molecules, along with co-stimulatory molecules, integrins, and tetraspanins (such as CD63 and CD81), in comparison to DEXs derived from immature dendritic cells. These particles possess the ability to be preferentially taken up by macrophages and certain other nascent myeloid cells^[34]. Furthermore, DEXs and exosomes originating from B-cells, loaded with antigenic proteins or peptides, have demonstrated a higher capacity to initiate specific immune responses in both B-cells and T-cells, since they can activate T cells at distal sites, in the absence of intact APC^[35]. Studies also demonstrated that DEX could acquire antigens either through internalization and processing of antigens by DC or by direct capture of free antigens^[36].

In consideration of their immunomodulatory attributes, exosomes hold potential utility in the realm of vaccines and other immunotherapeutic strategies.

4.1 Signaling pathways modulated by *Leishmania* spp.

Many pathogens have the capability to influence the signaling pathways within their target cells in order to promote their own survival, and *Leishmania* spp ain't no exception.

Leishmania accomplishes this by either employing tactics to delay proteins that contribute to immune cell activation or by triggering molecules known for their crucial involvement in inhibiting immune cell signaling and functionality^[37]. (Figure 4).

When it comes to alteration of macrophage signaling molecules, *Leishmania* is known to inhibit protein kinase C (PKC) activity, which plays a role in macrophages regulation and cytokine production. This inhibition occurs through the binding of *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) to the regulatory domain of PKC^[38].

Leishmania infection also affects Janus kinase 2 (JAK2), a tyrosine kinase involved in cell proliferation, differentiation, and immune activation. The parasite blocks the JAK/STAT signaling pathway, preventing the induction of nitric oxide (NO) production. *Leishmania* activates host SHP-1, leading to the inhibition of JAK2 phosphorylation^[39].

The parasite also interferes with mitogen-activated protein kinases (MAPKs), including Erk1/2, JNK, and p38, which are critical for the activation of transcription factors (TFs). *Leishmania* exploits different tactics to render MAPK members inactive, such as inhibiting their phosphorylation or degrading them using cysteine proteinases^{[40][41]}.

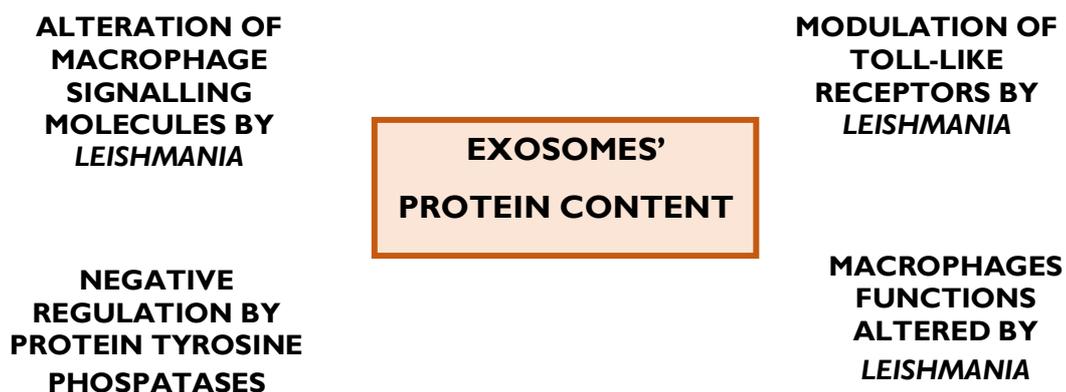


Figure 4: Brief overview of the role of *Leishmania* exosomes's content in infection.

Protein tyrosine phosphatases (PTPs) are enzymes that dephosphorylate substrates. SHP-1, an example of PTP, is predominantly expressed in hematopoietic cells and is involved in negative regulation. *Leishmania's* elongation factor-1 α (EF-1 α) and protease GP-63 have been implicated in the activation of SHP-1. Activation of SHP-1 by *Leishmania* is a crucial evasion strategy to suppress key macrophage pathways, making them unresponsive to stimuli like IFN- γ and LPG. This allows the parasite to evade host immune responses by inhibiting functions such as NO production and proinflammatory cytokine synthesis^[42-44].

Also, *Leishmania* modulates various signaling pathways in macrophages to alter their functions and promote parasite survival.

One strategy employed by *Leishmania* spp is to induce the expression of chemokines to recruit immune cells, particularly monocytes and macrophages to the site of infection. This facilitates the establishment of the parasite in the host. However, excessive neutrophil recruitment can be detrimental to the parasite, as it is associated with parasite killing^[44].

The parasite interferes with the production of proinflammatory cytokines, such as IL-1, TNF- α , and IL-12^[45]. *Leishmania* can inhibit IL-1 production at the translational level and inhibit IL-12 production, which is essential for driving a protective immune response^[46].

Leishmania also inhibits MHC class II expression in infected macrophages, impairing their ability to present antigens to T cells. The parasite interferes with the loading of antigens onto MHC class II molecules and can degrade MHC class II molecules using its proteases^[47].

Moreover, *Leishmania* interferes with macrophages' costimulatory signals, such as CD40, which are important for T cell activation. The parasite interferes with CD40 signaling, affecting macrophages' functions and impairing the host immune response^[41].

Finally, the detection of parasite PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) by TLRs (Toll-like receptor) has implications for both host defense and parasite evasion. TLR family members are important in bridging the innate and adaptive immune responses by recognizing PAMPs. Parasite-derived molecules, such as GPI-anchored proteins, are detected by TLRs. The activation of TLRs triggers proinflammatory responses and promotes host defense against parasites. Parasites have developed strategies to evade TLR detection and signaling. *Leishmania* interferes with multiple components of TLR signaling pathways, including MAPKs, NF- κ B, and AP-1^[48]. Manipulating TLR signaling can have both beneficial and detrimental effects, depending on the specific pathogen and infection context. Further research is needed to uncover additional evasion tactics employed by parasites and to explore the potential therapeutic applications of TLR modulation in parasitic diseases.

5. Exosomes as vaccines for *Leishmania* spp disease

Prevention and treatment are both relative terms in vaccine development. Prevention has two facets: avoiding contact with an infectious agent and abrogating further spread. Efficient prevention depends on a solid understanding of the dynamics of transmission of contagious disease. Treatment has different goals, including improving patients' quality of life, reducing or controlling the spread of the infection and suppress the infection. Thus, vaccine development has an immeasurable positive impact on health worldwide.

5.1 Challenges of vaccine development

Diseases caused by *protozoan* parasites such as leishmaniasis are extremely complex. Numerous vaccine solutions have been experimented, from DNA vaccines to whole inactivated parasites. Furthermore, while some vaccines against parasitic diseases may offer a certain level of protection, they are often tested in controlled conditions, as we'll see in the studies analyzed further ahead, that do not adequately represent the difficulties that the future patients will encounter. Despite of that, in addition to their role in cellular communication, exosomes have already proved their capacity to transmit biological molecules which opens a door to diverse vaccine approaches using exosomes as a vehicle for antigen delivery^[49].

Despite a better understanding of the immune response to infectious diseases, many vaccine candidates fail due to the high degree of reactogenicity, creating safety issues. Although animal models may exhibit protective immunity after vaccination, immunodominant antigen recognition may differ in these models compared to human.

Immune cells like DCs and macrophages are activated by pattern recognition receptors, such as TLRs (Toll-like-receptors), and activate multiple downstream pathways to influence adaptative immune response; this process shows some variation between humans and rodents. The balance of circulating leukocytes and neutrophils is different; antibody subclasses also have minor differences^[50].

In addition, it will be important to define vaccine target molecules to evaluate efficacy of antibody generation in different populations, to research possible antigen variations in isolated parasites and to monitor any future loss of protection.

For these reasons, attention is now turned to identifying and testing specific exosomes-associated antigens which can be formulated into a vaccine^[49].

In principle, the exosomes represent a large membranous surface which envelops a relatively small intravesicular volume, so, it is expected that a high proportion of exosomes-

associated proteins, already mentioned previously, will be linked to the vesicular membrane, although one cannot necessarily predict that these will be exposed on the exterior surface.

6. Unlocking the Potential of Exosomes in Vaccine Development

By using these LEVs, *Leishmania* parasites retained sophisticated survival pathways in their most ancient evolution. Their origin can vary from infected cells or producer cells^[3].

Practically all living organisms, ranging from viruses and bacteria, release exosomes into the extracellular space, a phenomenon that carries both benefits and drawbacks (Table 2). Proteomic analysis of the biological fluid reveals that exosomes contain numerous immune response molecules on the surface and carry biological messengers like proteins, chaperons, mRNA, and DNA fragments. Lipids, proteins, nucleic acid-like signal transducer, membrane trafficking, T cell stimulation, and anti-apoptosis molecules found on the exosome surface also have some immune-modulatory effects^[49].

EVs are able to interact with the target cell through direct cargo transfer (merging with the recipient cell membrane) thanks to the enrichment with relevant molecules such as integrins and tetraspanins, or through phagocytosis or endocytosis. Some EVs have also been shown to interact with T-cells through simple attachment by expression of MHC-II^[51].

The heterogenous nature of exosomes renders their clinical application more complicated: their production, isolation, to their approval for use in potential future vaccines and therapeutics. Exosomes' engineering has proposed to produce vesicles with increased homogeneity; others suggest the development of strategies to precisely load natural or artificial exosomes with molecules (such as antigens) of interest for added reliability.

These solutions and recent advancements in the field, along with the isolation and characterization of increasingly specific subgroups of EVs and their contents could greatly facilitate the generation, manufacture and approval of EV-based products^[49].

Table 2: Characteristics of the exosomes as a vaccine strategy

Vaccine strategy	Exosomes
Advantages	<ul style="list-style-type: none"> • The cargo reflects the cell of origin • Are able to self-present antigens (MHC molecules on their surface) • Can generate protective immune responses
Disadvantages	<ul style="list-style-type: none"> • Production and scability are difficult • Antigen identification and immune responses in samples needs further research • There is no clear regulatory frame to move from research to industrial production and commercialization

7. Research on exosomal vaccine development

7.1 *In vitro* studies with future vaccine candidates

Leishmania parasites exist in phagocytic cells, primarily macrophages, within the mammalian host. These parasites undergo a transformation from flagellated promastigotes to non-flagellated amastigotes within the acidic vacuolar compartments of macrophages. Inside these compartments, amastigotes undergo replication, leading to the rupture of the host macrophages. This results in the dissemination of the parasites to previously uninfected cells, giving rise to disease symptoms^[52].

While macrophages are essential in safeguarding the host against microbial infections, *Leishmania* parasites have cleverly evolved strategies to elude and influence the host immune response. The destiny of intracellular parasites hinges on the macrophages' state of activation. Macrophages activated in a classical manner, urged by interferon-gamma (IFN- γ), exhibit the capability to efficiently eliminate parasites by generating nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS). Notably, certain chemokines, such as MIP-1 α and MCP-1, have demonstrated the ability to limit *Leishmania* survival by triggering the activation of NO-related mechanisms^[53].

Alternatively, macrophages that have been activated through non-protective Th2 cytokines (IL-4 and IL-10) assume a role in promoting parasite survival by engaging the arginase pathway and amplifying polyamine production. The equilibrium maintained between the activation of macrophages and the strength of parasites ultimately manages the lasting presence of *Leishmania* within macrophagic environments^[54].

Due to the previous information, *in vitro* studies predominantly focus on macrophages. However, it is important to note that these studies are constrained by controlled settings that may not fully mirror the real-life conditions encountered by patients. Notably, existing literature offers limited accounts that demonstrate the exosomes' efficacy in curbing parasite growth.

Leishmania parasites use macrophages as their host cells and employ diverse tactics to elude the host immune reaction. A parasite component known as LeIF has the potential to impact cytokine generation and could contribute to determining susceptibility or resistance to *Leishmania* infection^[55].

Prior investigations have validated the significance of IFN- γ in the immune reaction against *Leishmania* infection. This cytokine triggers macrophages into action, stimulating the production of cytokines, initiating T cell activation, and orchestrating a range of mechanisms to manage the infection^[56].

At this point we will dive into a specific *in vitro* study in order to better understand how LelF is a good candidate for use as an anti-leishmanial molecule. Within this study^[55], it was observed that LelF had the capacity to enhance the effects of IFN- γ . When macrophages were exposed to both LelF and IFN- γ prior to *Leishmania* infection, a noteworthy decline in the growth of intracellular parasites was observed. This was substantiated by decreased infection rates and a reduction in the parasite load.

Furthermore, the study researched into the consequences of LelF/IFN- γ therapy after *Leishmania* infection. Remarkably, this treatment exhibited substantial efficacy in limitation of parasite proliferation during both the initial and advanced stages of infection. The inhibition of parasite expansion correlated with the synthesis of antimicrobial agents, most notably nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS). These particular molecules are well-known for their leishmanicidal capabilities and are stimulated by Th1 cytokines like TNF- α .

Additionally, the research explored into the involvement of chemokines, with specific focus on MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 alpha), within the immune reaction against *Leishmania*. The study uncovered the contribution of MIP-1 α in limitation the parasitic load within macrophages by stimulating the synthesis of safeguarding cytokines and suppressing non-protective ones. Notably, the investigation revealed an elevation in MIP-1 α mRNA expression within LelF/IFN- γ -treated macrophages, coupled with escalated generation of NO and ROS.

In summary, the research demonstrated the collaborative efficacy of LelF and IFN- γ in strengthening the immune defense against *Leishmania* infection. The LelF/IFN- γ intervention notably restrained the expansion of intracellular parasites via pathways reliant on nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS). The study further underscored the intricate interplay among oxidative burst, TNF- α , and leishmanicidal action. Moreover, the potential immune-modulating impact of LelF implies its promising candidacy for anti-leishmanial therapeutic strategies.

When it comes to exosomes and their prospects as vaccine candidates, the initial instance of utilizing exosomes derived from antigen-loaded bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) emerged as a pioneering approach for developing a vaccine against protozoan parasites. This marked the debut of DC-derived exosomes as a vaccine strategy in this context.

Vaccination strategies involving dendritic cells (DCs) rely on the method of *ex vivo* antigen loading onto these cells derived from pathogens. Crucial factors, including the choice of specific DC types and the determination of suitable stimulatory signals, play a pivotal role

in guiding the maturation of DCs into antigen-presenting cells. This maturation process is involved in directing the development of T-cell responses that confer protection.

7.2 *In vivo* studies with future vaccine candidates

Isolation techniques for exosomes can be monotonous and hard to translate to a clinical scenario. Even though we can find multiple commercial exosome isolation kits available, we still need more proofs and a substantial research and progress in this technology^[57].

There are hundreds of clinical trials that have been conducted based on exosome application. However, due to all the complexity and variations in methodology, the conclusions are widely varied, which turns out to be difficult to interpret. Therefore, standard operating procedures (SOPs) are needed in order to isolate, storage, characterize and analyze.

In some cases, exosomes alone have already been demonstrated to offer some protection against disease *in vitro* and *in vivo* in animal models.

Earlier investigation^[58] conducted by different researchers had already shown that the protecting effect facilitated by bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs), loaded with *L. major* antigens, did not rely on their capacity to secrete IL-12. On the other hand, the presence of IL-12 originating from cells within the vaccinated recipient's system was crucial for instigating the development of protective immunity through the transferred BMDCs. These observations prompted the hypothesis that vaccination utilizing antigen-loaded BMDCs might be linked to an initiating impact within the recipient cell, rather than direct engagement between the immunizing dendritic cells and the T cells of the recipient.

In the present study^[33], it was examined whether DC-derived exosomes were able to mediate a protective effect. These vesicles were prepared from BMDC that had been loaded with *L. major* antigen in the presence or absence of an activator CpG ODN and were injected into susceptible BALB/c mice. One week later, the mice were infected with *L. major* and the course of disease as well as the number of infected lymph node cells were examined.

DCs are able to trigger T-cell responses by releasing exosomes. These vesicles express MHC molecules associated with antigenic peptides and can stimulate specific T-cells.

Two mechanisms may explain the T-cell stimulation resulting from exosomes: immediate T-cell activation through direct interaction with exosomes, previously demonstrated in other anti-tumour experimental vaccines or, as supported by this study, the

requirement of a bystander assistance via additional cell populations within the spleen, a central site of the immune response.

In this system, complete splenocytes were essential for triggering antigen-specific T-cell proliferation, whereas splenic DCs exposed to the antigen alone were inadequate for inducing a noticeable T-cell response. Therefore, it was identified an indirect mechanism which showed that co-culturing exosomes and T cells alone did not induce T-cell proliferation unless mature DCs were present. Nevertheless, the precise mechanism underlying the activation of endogenous antigen-presenting cells responsible for specific T-cell induction remains unclear.

Collectively, the results presented in this study, involving the utilization of exosomes derived from DCs as a vaccination approach against *L. major*, indicate that the protective outcome is attributed more to a DC-targeted mechanism rather than a DC-based mechanism. Directing the antigen toward resident DCs within the vaccinated host appears to exhibit enhanced efficacy in contrast to traditional DC-centered vaccination tactics.

8. Concluding remarks and future strategies

Exosomes are used by both parasite and its host to influence the outcome of an infection/disease. Extracellular vesicles function through the transmission of signal between parasites themselves, from parasite to host, or from the host to the environment through antigen presentation.

This ability to transport innumerable populations of molecules in one single package might be able to occupy a range of niches in biology. Immune manipulation seems to be a predominant function of exosomes, which serves a vast cell to cell interactions within the human body.

The immune response to leishmaniasis is a complex: It is known that *Leishmania* parasites reside in macrophages and that Th1 immune response is generally considered the major mechanism of parasite clearance. But there's still a few questions left to answer when it comes to the pathways and mechanisms around the immune response. Furthermore, there's a need to better understand why vaccination has been relatively successful in mice and dogs but remains elusive in humans.

EVs belong to a promising strategy, as they can cause direct antigen presentation to immune cells, contain specific proteins related to the pathogen and are able to trigger the desired immune responses, or even act as adjuvants. Nevertheless, key gaps in knowledge of EV vaccination, such as scale-up of production, discovery of protective antigens, the

mechanism of action, the regulatory pathways for vaccine licensing, among others, need to be fully understood before these vaccines can reach the market.

With more in-depth knowledge of biogenesis and function, exosomes will surely open up significant and critical opportunities in therapeutic, diagnosis and prophylactic use.

9. References

1. *Leishmaniasis*. (n.d.). Retrieved September 5, 2023, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
2. Esteves, S., Costa, I., Luelmo, S., Santarém, N., & Cordeiro-da-Silva, A. (2022). Leishmania Vesicle-Depleted Exoproteome: What, Why, and How? *Microorganisms*, *10*(12). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10122435>
3. Gabriel, Á. M., Galué-Parra, A., Pereira, W. L. A., Pedersen, K. W., & da Silva, E. O. (2021). Leishmania 360°: Guidelines for Exosomal Research. *Microorganisms*, *9*(10), 2081. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102081>
4. Santana, W., de Oliveira, S. S. C., Ramos, M. H., Santos, A. L. S., Dolabella, S. S., Souto, E. B., Severino, P., & Jain, S. (2021). Exploring Innovative Leishmaniasis Treatment: Drug Targets from Pre-Clinical to Clinical Findings. *Chemistry and Biodiversity*, *18*(9). <https://doi.org/10.1002/CBDV.202100336>
5. Georges Helou, D. I., lie Mauras, A. I., ois Fasquelle, F., Sousa Lanza, J. I., Loiseau ID, P. M., Betbeder, D., & Cojean, S. (2021). *Intranasal vaccine from whole Leishmania donovani antigens provides protection and induces specific immune response against visceral leishmaniasis*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009627>
6. Velez, R., & Allego, M. G. (2020). *Commercially approved vaccines for canine leishmaniosis: a review of available data on their safety and efficacy*. <https://doi.org/10.1111/tmi.13382>
7. Mutiso, J. M., Chege Macharia, J., Kii, M. N., Maina Ichagichu, J., Rikoi, H., & Gicheru, M. M. (2013). Development of Leishmania vaccines: predicting the future from past and present experience. *The Journal of Biomedical Research*, *27*(2), 85–102. <https://doi.org/10.7555/JBR.27.20120064>
8. Aunguldee, T., Gerdprasert, O., Tangteerawatana, P., Jariyapongskul, A., Leelayoova, S., & Wongsatayanon, B. T. (2021). *Immunogenicity and potential protection of DNA vaccine of Leishmania martiniquensis against Leishmania infection in mice*. <https://doi.org/10.3855/jidc.14472>
9. Margaroni, M., Agallou, M., Athanasiou, E., Kammona, O., Kiparissides, C., Gaitanaki, C., & Karagouni, E. (2017). Vaccination with poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles loaded with soluble Leishmania antigens and modified with a TNF α -mimicking peptide or monophosphoryl lipid a confers protection against experimental visceral leishmaniasis Plain language summary. *International Journal of Nanomedicine*, *12*, 12. <https://doi.org/10.2147/IJN.S141069>

10. Mulcahy, L. A., Pink, R. C., Raul, D., Carter, F., David, D., & Carter, R. F. (n.d.). *Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake*. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24641>
11. Jeppesen, D. K., Zhang, Q., Franklin, J. L., & Coffey, R. J. (2023). *Extracellular vesicles and nanoparticles: emerging complexities*. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2023.01.002>
12. He, C., Zheng, S., Luo, Y., & Wang, B. (2018). Exosome Theranostics: Biology and Translational Medicine. *Theranostics*, 8(1), 237–255. <https://doi.org/10.7150/thno.21945>
13. He, C., Zheng, S., Luo, Y., & Wang, B. (2018). Exosome Theranostics: Biology and Translational Medicine. *Theranostics*, 8(1), 237–255. <https://doi.org/10.7150/thno.21945>
14. Van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (n.d.). *Membrane lipids: where they are and how they behave*. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>
15. Théry, C., Regnault, A., Garin, J., Wolfers, J., Zitvogel, L., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., & Amigorena, S. (1999). Molecular Characterization of Dendritic Cell-derived Exosomes: Selective Accumulation of the Heat Shock Protein hsc73. In *The Journal of Cell Biology* (Vol. 147, Issue 3). <http://www.jcb.org>
16. Gastpar, R., Gehrman, M., Bausero, M. A., Asea, A., Gross, C., Schroeder, J. A., & Multhoff, G. (n.d.). *Heat Shock Protein 70 Surface-Positive Tumor Exosomes Stimulate Migratory and Cytolytic Activity of Natural Killer Cells*. www.aacrjournals.org
17. Colombo, M., Moita, C., Van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L. F., Théry, C., & Raposo, G. (n.d.). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Cell Science*, 126, 5553–5565. <https://doi.org/10.1242/jcs.128868>
18. Atayde, V. D., Suau, H. A., Townsend, S., Hassani, K., Kamhawi, S., & Olivier, M. (2015). Exosome secretion by the parasitic protozoan *Leishmania* within the sand fly midgut. *HHS Public Access. Cell Rep*, 13(5), 957–967. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.058>
19. Taylor, J., Azimi, I., Monteith, G., & Bebawy, M. (2020). *Ca²⁺ mediates extracellular vesicle biogenesis through alternate pathways in malignancy*. <https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1734326>
20. Landfear, S. M., & Ignatushchenko, M. (2001). The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 115(1), 1–17. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00262-6](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00262-6)
21. Volf, P., Hajmova, M., Sadlova, J., & Votypka, J. (n.d.). *Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.07.010>

22. Rogers, M. E., Giraud, E., Svobodová, M., Müller, I., & Volf, P. (2019). *Parasitology* Promastigote secretory gel from natural and unnatural sand fly vectors exacerbate *Leishmania major* and *Leishmania tropica* cutaneous leishmaniasis in mice. <https://doi.org/10.1017/S0031182019001069>
23. Rogers, M. E., Chance, M. L., & Bates, P. A. (2002). The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, 124(5), 495–507. <https://doi.org/10.1017/S0031182002001439>
24. Santos, A. L. S., Branquinha, M. H., & D'ávila-Levy, C. M. (2006). *The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function*. 78(4), 687–714. www.scielo.br/aabc
25. Rabouille, C. (2016). *Pathways of Unconventional Protein Secretion*. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.11.007>
26. Maxwell, M. J., Chan, S. K., Robinson, D. P., Dwyer, D. M., Nandan, D., Foster, L. J., & Reiner, N. E. (2008). Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biology*, 9(2), 1–21. <https://doi.org/10.1186/GB-2008-9-2-R35/TABLES/3>
27. Stegmayer, C., Kehlenbach, A., Tournaviti, S., Wegehingel, S., Zehe, C., Denny, P., Smith, D. F., Schwappach, B., & Nickel, W. (2005). Direct transport across the plasma membrane of mammalian cells of *Leishmania* HASPB as revealed by a CHO export mutant. *Journal of Cell Science*, 118(3), 517–527. <https://doi.org/10.1242/jcs.01645>
28. Schorey, J. S., Cheng, Y., Singh, P. P., & Smith, V. L. (2015). Exosomes and other extracellular vesicles in host–pathogen interactions. *EMBO Reports*, 16(1), 24–43. <https://doi.org/10.15252/EMBR.201439363>
29. Da, A., Filho, S. L., Fajardo, E. F., Chang, K. P., Ment, P. C., Olivier, M., & Moreno, J. (2022). *Leishmania* Exosomes/Extracellular Vesicles Containing GP63 Are Essential for Enhance Cutaneous Leishmaniasis Development Upon Co-Inoculation of *Leishmania amazonensis* and Its Exosomes. *Article*, 11, 1. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.709258>
30. Hu, Q., Su, H., Li, J., Lyon, C., Tang, W., Wan, M., & Hu, T. Y. (n.d.). Clinical applications of exosome membrane proteins. *Precision Clinical Medicine*, 3(1), 54–66. <https://doi.org/10.1093/pcmedi/pbaa007>
31. Vale, A. M., Martinez, L. R., Xander, P., Fmc, B., Nfc, R., Lorenzo BHP, D., Marins Costa Barbosa, F., Vieira Dupin, T., dos Santos Toledo, M., Ferraz dos Campos Reis, N., Ribeiro, K., Cronemberger-Andrade, A., Nunes Rugani, J., Helena Pizarro De Lorenzo, B., Rômulo Novaes Brito, R., Pedro Soares, R., & Claudia Torrecilhas, A. (2018). *Extracellular Vesicles Released by Leishmania (Leishmania) amazonensis Promote Disease*

- Progression and Induce the Production of Different Cytokines in Macrophages and B-1 Cells.*
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03056>
32. Liu, D., Uzonna, J. E., Allen, L.-A. H., & Bengoechea, J. A. (2012). *The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response.* <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00083>
 33. Schnitzer, J. K., Berzel, S., Fajardo-Moser, M., Remer, K. A., & Moll, H. (2010). Fragments of antigen-loaded dendritic cells (DC) and DC-derived exosomes induce protective immunity against *Leishmania major*. *Vaccine*, 28(36), 5785–5793. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.06.077>
 34. Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., & Amigorena, S. (2001). *Proteomic Analysis of Dendritic Cell- Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles.* <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.12.7309>
 35. Sprent, J. (n.d.). *Direct stimulation of naïve T cells by antigen-presenting cell vesicles.* <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2005.04.004>
 36. Morelli, A. E., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Sullivan, M. L. G., Stolz, D. B., Papworth, G. D., Zahorchak, A. F., Logar, A. J., Wang, Z., Watkins, S. C., Falo, L. D., & Thomson, A. W. (2004). *Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells.* <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-0824>
 37. Olivier, M., Gregory, D. J., & Forget, G. (2005). Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: A signaling point of view. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(2), 293–305. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.293-305.2005>
 38. Mcneely, T. B., Rosen, G., Londnert, M. V., & Turco, S. J. (1989). Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite *Leishmania*. *Biochem. J*, 259, 601–604.
 39. Blanchette, J., Racette, N., Faure, R., Siminovitch, K. A., & Olivier, M. (n.d.). *Leishmania-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN- γ -triggered JAK2 activation.* [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199911\)29:11<3737::AID-IMMU3737>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199911)29:11<3737::AID-IMMU3737>3.0.CO;2-S)
 40. Privé, C., Privé, P., & Descoteaux, A. (n.d.). *Leishmania donovani promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages.* [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(2000\)30:8<2235::AID-IMMU2235>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1521-4141(2000)30:8<2235::AID-IMMU2235>3.0.CO;2-9)

41. Awasthi, A., Mathur, R., Khan, A., Joshi, B. N., Jain, N., Sawant, S., Boppana, R., Mitra, D., & Saha, B. (2003). Brief Definitive Report CD40 Signaling Is Impaired in L. major-infected Macrophages and Is Rescued by a p38MAPK Activator Establishing a Host-protective Memory T Cell Response. *The Journal of Experimental Medicine J. Exp. Med.* □ *The*, 197(8), 1037–1043. <https://doi.org/10.1084/jem.20022033>
42. Pao, L. I., Badour, K., Siminovitch, K. A., & Neel, B. G. (2007). Nonreceptor Protein-Tyrosine Phosphatases in Immune Cell Signaling. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115647>
43. Nandan, D., Yi, T., Lopez, M., Lai, C., & Reiner, N. E. (2002). *Leishmania EF-1 Activates the Src Homology 2 Domain Containing Tyrosine Phosphatase SHP-1 Leading to Macrophage Deactivation**. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209210200>
44. Rolão, N., Cortes, S., Gomes-Pereira, S., & Campino, L. (2007). doi:10.1016/j.exppara.2006.09.013. *Experimental Parasitology*, 115, 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.09.013>
45. Reiner, N. E., Ng, W., Wilson, C. B., McMaster, W. R., & Burchett, S. K. (n.d.). *Modulation of In Vitro Monocyte Cytokine Responses to Leishmania donovani Interferon- γ Prevents Parasite-induced Inhibition of Interleukin 1 Production and Primes Monocytes to Respond to Leishmania by Producing Both Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin 1*.
46. Carrera, L., Gazzinelli, R. T., Affaello Badolato, R., Hieny, S., Mfillerfl, W., Ihnfl, R. /, & Sacks, D. L. (n.d.). *Leishmania Promastigotes Selectively Inhibit Interleukin 12 Induction in Bone Marrow-derived Macrophages from Susceptible and Resistant Mice*. Retrieved September 5, 2023, from <http://rupress.org/jem/article-pdf/183/2/515/1678921/515.pdf>
47. De Almeida, M. C., Cardoso, S. A., & Barral-Netto, M. (n.d.). *Leishmania (Leishmania) chagasi infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage q*. Retrieved September 5, 2023, from www.parasitology-online.com
48. Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Delgado, J., Carrillo-Carrasco, N., Gutiérrez Kobeh, L., Ruiz, A., Cervantes, R., Torres, A. P., Cabrera, N., González, A., Maldonado, C., & Isibasi, A. (2003). Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 130, 65–74. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00160-9](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00160-9)
49. Dong, G., Filho, A. L., & Olivier, M. (2019). Modulation of Host-Pathogen Communication by Extracellular Vesicles (EVs) of the Protozoan Parasite Leishmania. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(APR), 100. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00100>

50. Huda, N., & Nurunnabi, Md. (2022). Potential Application of Exosomes in Vaccine Development and Delivery. *Pharmaceutical Research*, 39, 3. <https://doi.org/10.1007/s11095-021-03143-4>
51. Andreu, Z., Yáñez-Mó, M., Borrás, F. E., & Monk, P. (2014). Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00442>
52. Gossage, S. M., Rogers, M. E., & Bates, P. A. (n.d.). Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(03\)00142-5](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00142-5)
53. Gordon, S., & Martinez, F. O. (n.d.). Review Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.007>
54. Mcconville, M. J., & Naderer, T. (2011). Metabolic Pathways Required for the Intracellular Survival of *Leishmania* iNOS: inducible nitric oxide synthase or NOS2. *Annu. Rev. Microbiol*, 65, 543–561. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102913>
55. Koutsoni, O., Barhoumi, M., Guizani, I., & Dotsika, E. (2014). *Leishmania* Eukaryotic Initiation Factor (LelF) Inhibits Parasite Growth in Murine Macrophages. *PLoS ONE*, 9(5), e97319. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097319>
56. Bhaumik, S. K., Naskar, K., & De, T. (n.d.). Complete protection against experimental visceral leishmaniasis with complete soluble antigen from attenuated *Leishmania donovani* promastigotes involves Th1-immunity and down-regulation of IL-10. <https://doi.org/10.1002/eji.200839017>
57. Li, P., Kaslan, M., Han Lee, S., Yao, J., & Gao, Z. (2017). Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics*, 7(3), 789–804. <https://doi.org/10.7150/thno.18133>
58. Ramírez-Pineda, J. R., Fröhlich, A., Berberich, C., & Moll, H. (2004). Dendritic Cells (DC) Activated by CpG DNA Ex Vivo Are Potent Inducers of Host Resistance to an Intracellular Pathogen That Is Independent of IL-12 Derived from the Immunizing DC I. In *The Journal of Immunology* (Vol. 172). <http://journals.aai.org/jimmunol/article-pdf/172/10/6281/1175188/6281.pdf>
59. Mohammad. (2019). . https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM_116_18
60. Saljoughian, N., Taheri, T., Rafati, S., Ali, N., Krzych, U., & Army, W. R. (2014). Live vaccination tactics: possible approaches for controlling visceral leishmaniasis. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00134>
61. Kelly, F. D., Yates, P. A., & Landfear, S. M. (2021). Nutrient sensing in *Leishmania*: Flagellum and cytosol. *Molecular Microbiology*, 115(5), 849–859. <https://doi.org/10.1111/MMI.14635>