



Maria Margarida Carvalho Vale da Silva

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Exossomas – novos vetores para o transporte, entrega e tratamento de doenças do cérebro” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, da Dra. Cláudia Silvestre, Dra. Fátima Canedo e do Professor Doutor Luís Almeida e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Maria Margarida Carvalho Vale da Silva

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Exossomas — novos vetores para o transporte, entrega e tratamento de doenças do cérebro” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, da Dra. Cláudia Silvestre, Dra. Fátima Canedo e do Professor Doutor Luís Almeida e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Maria Margarida Carvalho Vale da Silva, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2011153795, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Exossomas - novos vetores para o transporte, entrega e tratamento de doenças do cérebro” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 8 de setembro de 2017

Maria Margarida Carvalho Vale da Silva

(Maria Margarida Carvalho Vale da Silva)



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Um agradecimento sincero,

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e a todo o seu corpo docente e não docente, por todos os conhecimentos e valores transmitidos ao longo do meu percurso académico.

Ao Professor Doutor Luís Almeida, por toda a disponibilidade e orientações prestadas.

À Dra. Cláudia Silvestre e equipa da Farmácia de Celas, pela amizade, espírito de ajuda e ensinamentos transmitidos durante o meu estágio na farmácia.

À Dra. Fátima Canedo e equipa da Direção de Gestão do Risco de Medicamentos do Infarmed, pela integração, atenção e disponibilidade demonstradas.

A todos os meus amigos e colegas da faculdade, por estarem sempre presentes.

À minha família, pela oportunidade de realizar este sonho, pelo apoio incondicional em todos os momentos e pela educação que me proporcionaram.

Índice

Resumo	6
Abstract.....	6
Parte I – Monografia.....	8
Lista de Abreviaturas	9
Nota Introdutória.....	11
1. Biogénese, secreção e internalização celular.....	12
1.1 Biogénese.....	12
1.2 Secreção.....	13
1.3 Internalização celular	14
2. Estrutura da membrana e composição	14
3. Mecanismo de travessia da barreira hematoencefálica	16
4. Design e produção de exossomas como sistemas de entrega de fármacos	17
4.1 Seleção da fonte celular	17
5. Estratégias de modificação de exossomas e incorporação de agentes terapêuticos	19
6. Papel dos exossomas nas doenças neurodegenerativas: neuroproteção e neurotoxicidade	22
7. Aplicações terapêuticas nas doenças neurodegenerativas	26
7.1 Exossomas como alvo da terapêutica	26
7.1.1 Inibição da formação.....	26
7.1.2 Inibição da libertação.....	27
7.1.3 Inibição da internalização.....	28
7.2 Exossomas como vetores terapêuticos.....	29
7.2.1 Exossomas como vetores de ácidos nucleicos (siRNAs, miRNAs, hsiRNAs)	29
7.2.2 Exossomas como vetores de moléculas de baixo peso molecular	31
7.2.3 Exossomas como vetores de proteínas	32
7.3 Vexossomas	32
8. Conclusões e perspetivas futuras	34
9. Bibliografia	35
Parte II – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária	46
Lista de Abreviaturas	47
1. Introdução	48
2. Farmácia de Celas.....	48
3. Análise SWOT	49
3.1 Pontos fortes	49
3.1.1 Metodologia Kaizen.....	49
3.1.3 Formação contínua.....	51
3.1.4 Dinamização da farmácia.....	52
3.1.5 Localização	52
3.1.6 Equipa.....	52
3.1.7 Medicamentos manipulados	53
3.1.8 Sistema Sifarma e Receituário	53
3.2 Pontos fracos	54
3.2.1 Contacto reduzido com os nomes comerciais dos medicamentos.....	54

3.2.2	Relação entre a formação académica e a prática profissional.....	54
3.3	Oportunidades	55
3.3.1	Organização de eventos temáticos	55
3.3.2	Serviços farmacêuticos.....	55
3.3.3	Cartão Saúde	55
3.3.4	Diversidade de utentes	56
3.3.5	Valormed.....	56
3.3.6	Adequação da formação do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas à prática profissional.....	56
3.4	Ameaças.....	57
3.4.1	Grandes superfícies comerciais.....	57
3.4.2	Conjuntura atual do setor farmacêutico.....	57
3.4.3	Rutura de stocks.....	58
3.4.4	Desvalorização do medicamento genérico.....	58
4.	Considerações finais	58
5.	Bibliografia	60
Parte III – Relatório de Estágio na Direção de Gestão do Risco de Medicamentos.....		61
Lista de Abreviaturas		62
1.	Introdução	63
2.	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P. – Infarmed, I.P.	63
3.	Farmacovigilância	64
4.	O Estágio Curricular na Direção de Gestão do Risco de Medicamentos.....	67
5.	Análise SWOT.....	70
5.1	Pontos fortes	70
5.1.1	Equipa da DGRM.....	70
5.1.2	Plano de estágio	70
5.1.3	Formações certificadas.....	70
5.1.4	Autonomia, responsabilidade e gestão de tempo	71
5.1.5	Sistema de gestão da qualidade	72
5.1.6	Pontos fracos	72
5.1.7	Duração do estágio curricular.....	72
5.2	Oportunidades	72
5.2.1	Sensibilizar os doentes e os profissionais de saúde para a importância da notificação de reações adversas	72
5.2.2	Boletim de Farmacovigilância.....	73
5.2.3	Comunicação do risco através de novas plataformas.....	73
5.2.4	Redistribuição do Sistema Nacional de Farmacovigilância.....	74
5.2.5	Candidatura portuguesa à Agência Europeia do Medicamento.....	74
5.2.6	Deteção de reações adversas a medicamentos através das redes sociais	74
5.3	Ameaças.....	75
5.3.1	Falta de recursos humanos para a carga de trabalho.....	75
5.3.2	Subnotificação de reações adversas a medicamentos	75
6.	Considerações finais	76
7.	Bibliografia	77

Resumo

Os exossomas são nanovesículas extracelulares libertadas por todos os tipos de células do Sistema Nervoso Central (SNC) durante os processos fisiológicos e patológicos. Recentemente, os exossomas têm sido alvo de intensa investigação uma vez que, para além da remoção de compostos resultantes do metabolismo celular, estas vesículas participam na comunicação intercelular através do transporte de proteínas, mRNA e miRNA. No que se refere às doenças neurodegenerativas, existe evidência de que os exossomas contribuem para a transmissão de moléculas tóxicas entre as células, tais como formas tóxicas de agregados proteicos. O papel dos exossomas na comunicação cerebral e neuropatogénese sugere que estratégias terapêuticas baseadas nestas vesículas poderão ter promissora utilização na clínica.

Neste trabalho, são apresentadas as potenciais aplicações terapêuticas dos exossomas como sistema de entrega de moléculas para o tratamento das doenças do cérebro.

Adicionalmente, é apresentado o Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária, sob a forma de uma análise SWOT (pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças), sobre o estágio curricular realizado na Farmácia de Celas, em Coimbra, durante os meses de janeiro a abril de 2017.

Por fim, é apresentado o Relatório de Estágio em Farmacovigilância sobre o estágio realizado na Direção de Gestão do Risco de Medicamentos da Autoridade Nacional de Medicamentos e Produtos de Saúde (Infarmed), I.P., em Lisboa, que teve início em maio e terminou em julho de 2017.

Palavras-chave: comunicação intercelular, doenças neurodegenerativas, exossomas, vesículas extracelulares, terapêutica

Abstract

Exosomes are extracellular nanovesicles released by all cell types of the Nervous Central System under physiological and pathological processes. Recently, intense research in exosomes has been carried out since these vesicles are involved in intercellular communication by delivering proteins, mRNAs and miRNAs as well as removing molecules from the releasing cells. Furthermore, accumulating evidence suggests that exosomes are mediators of toxic aggregated proteins spread in neurodegenerative diseases. Due to the role of exosomes within brain communication and neuropathogenesis, novel therapeutic strategies

are being developed that take advantage of exosomes as carriers and biomarkers in clinical context.

This dissertation presents the potential applications of exosomes as delivery vehicles of pharmacological molecules for the treatment of neurodegenerative diseases.

Additionally, it is also presented the Community Pharmacy Internship report. This curricular internship was performed at Farmácia de Celas, in Coimbra and the report includes a SWOT analysis (strengths, weaknesses, opportunities and threats) about my experience in the curricular internship from january to april 2017.

Finally, it is included a report on the Pharmacovigilance Internship, which describes my experience at Directorate of Risk Management for Medicines of the National Authority of Medicines and Health Products (Infarmed), I.P., in Lisbon, between may and july 2017.

Keywords: intercellular communication, neurodegenerative diseases, exosomes, extracellular vesicles, therapy

Parte I – Monografia

Exossomas - novos vetores para o transporte,
entrega e tratamento de doenças do cérebro

Lista de Abreviaturas

AAV - Vírus adeno-associado
APP - proteína precursora amiloide
ASC - *adipose-derived MSC*
A β - peptídeo β -amiloide
BACE1 – beta-secretase I
bEND.3 - *immortalized mouse brain endothelial cell line*
BHE – Barreira Hematoencefálica
BMEC - *Bone marrow Microvascular Endothelial Cells*
DC – *Dendritic cell*
ELA – Esclerose Lateral Amiotrófica
ESCRT - *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*
FasL - *Fas ligand*
FTD - Demência fronto-temporal
Gag – *Group-specific antigen*
hnRNPA2B1 – *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1*
hsiRNA - *hydrophobically modified siRNA*
HSP - *Heat Shock Protein*
HSPG - *Heparan Sulfate Proteoglycan*
IFN- γ – Interferão-gama
IL-1 – Interleucina I
ILV – Vesícula intra-luminal
LAMP2b - *lysosomal-associated membrane protein 2b*
LPS – lipopolissacáridos
MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade
mRNA - RNA mensageiro
MSC - célula mesenquimatosa estaminal
mtHtt - proteína Huntingtina mutante
MVB – Corpos multivesiculares
ncRNA - RNA não codificante
nSMase2 - proteína esfingomielinase neutral
PDCD6IP - *protein programmed cell death 6 interacting protein*
PDL-2 – *programmed death-ligand 2*
PrP^C – proteína prião normal

PrP^{Sc} - proteína prião anormal
RNA - ácido ribonucleico
RNase - Ribonuclease
RNP – Ribonucleoproteína
RVG - peptídeo derivado da glicoproteína do vírus da raiva
SNARE - *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor*
SNC – Sistema Nervoso Central
SOD1 – superóxido dismutase
TDP-43 - *TAR DNA-binding protein 43*
TNF- α – *Tumor necrosis factor alpha*
TRAIL - *TNF-related apoptosis-inducing ligand*
TSG101 – *Tumor susceptibility gene 101*
VHC – Vírus da hepatite C
VIH – Vírus da imunodeficiência humana
 α -syn - alfa-sinucleína

Nota Introdutória

A comunicação intercelular pode ser mediada por exossomas, vesículas extracelulares libertadas por todos os tipos de células do SNC, capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e percorrer curtas e longas distâncias no organismo. Os exossomas são constituídos por diversas moléculas biológicas, lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, de acordo com a célula que lhes deu origem, atuando como mensageiros de informação biológica entre as células em contexto quer fisiológico, quer patológico. As células do SNC libertam exossomas que promovem neuroprotecção ao nível dos processos sinápticos e regenerativos. Contudo, os exossomas libertam também produtos resultantes do metabolismo celular e podem ser responsáveis por transportar proteínas tóxicas associadas ao desenvolvimento de diversas doenças neurodegenerativas, contribuindo para a propagação da patologia no cérebro.

As características particulares dos exossomas no que diz respeito à estabilidade, biocompatibilidade e capacidade de proteger o seu conteúdo, bem como a capacidade de atravessar barreiras biológicas e as suas propriedades de vetorização para um tecido específico, têm vindo a ser exploradas por diversos grupos de investigação com vista à utilização deste tipo de vesículas na terapêutica das doenças neurodegenerativas. As estratégias de modificação e incorporação de agentes terapêuticos incluem o isolamento dos exossomas e carregamento com as moléculas farmacológicas ou, por outro lado, a manipulação das células produtoras de exossomas. Adicionalmente, é possível modificar a membrana exossomal com o intuito de promover a vetorização dos exossomas para um tecido ou órgão específico.

A presente monografia aborda os principais mecanismos envolvidos na biogénese dos exossomas e o seu papel no SNC, particularmente nas doenças neurodegenerativas, bem como as estratégias de manipulação e as múltiplas aplicações terapêuticas dos exossomas como sistemas de entrega promissores no tratamento das doenças do cérebro.

I. Biogénese, secreção e internalização celular

I.1 Biogénese

As vesículas extracelulares são libertadas pelas células no meio extracelular numa forma estável, distribuindo-se por curtas e longas distâncias no organismo. Os exossomas são pequenas vesículas extracelulares, de tamanho entre 30 e 150 nm, formados no sistema endossomal, a partir de vesículas intraluminais (ILVs) que se encontram dentro dos corpos multivesiculares (MVB, ver Figura 1). Existem também outras vesículas extracelulares designadas microvesículas ou ectossomas, com tamanho compreendido 50 nm e 1 μ m, que se formam a partir da membrana plasmática e são libertadas para o meio extracelular (COLOMBO, RAPOSO e THÉRY, 2014). Podem ainda ser encontradas grandes vesículas irregulares (50 nm – 5 μ m), designadas de corpos apoptóticos, que são libertadas por células em apoptose (VADER *et al.*, 2016). Também as células tumorais libertam vesículas extracelulares de grandes dimensões - os oncossomas, (1-10 μ m) (MINCIACCHI, FREEMAN e DI, 2015).

No que se refere aos exossomas, o processo de biogénese influencia diretamente o seu conteúdo em proteínas, lípidos e ácidos nucleicos (MAAS, BREAKFIELD e WEAVER, 2017). Os endossomas que constituem o sistema endossomal dividem-se em endossomas precoces, endossomas tardios e lisossomas (GRANT e DONALDSON, 2009). A formação do endossoma inicia-se com a invaginação da membrana celular, dando origem ao endossoma precoce. Os endossomas precoces transformam-se em endossomas tardios que, por sua vez, vão acumulando ILVs que se formam a partir da membrana endossomal, ocorrendo a deposição de proteínas, lípidos e ácidos nucleicos no interior das pequenas vesículas. Os endossomas tardios contendo múltiplas ILVs são designados de MVBs, sendo que estes podem ser degradados em lisossomas ou, por outro lado, fundir-se com a membrana celular e libertar ILVs como exossomas no meio extracelular.

A formação das ILVs inicia-se com a reorganização da membrana endossomal e o enriquecimento em proteínas membranares designadas tetraspaninas (CD9 e CD63), necessárias ao recrutamento de outras proteínas envolvidas neste processo (POLSKA e KLUMPERMAN, 2009). Adicionalmente, os componentes do complexo ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) são responsáveis pelo reconhecimento e seleção das proteínas que constituem as ILVs. A proteína Alix está também envolvida nos processos de biogénese dos exossomas, nomeadamente no carregamento e formação das vesículas. Deste

modo, ocorre a formação sequencial das ILVs que posteriormente dão origem aos exossomas (LINDÁS e BERNANDER, 2013).

Existem estudos que evidenciam a biogênese de exossomas independente do complexo ESCRT e a existência de mecanismos que podem ocorrer paralelamente à via ESCRT, dependendo do tipo de célula (TRAJKOVIC *et al.*, 2008). As diferenças no conteúdo que os exossomas apresentam estão relacionadas com os diversos mecanismos envolvidos na sua biogênese.

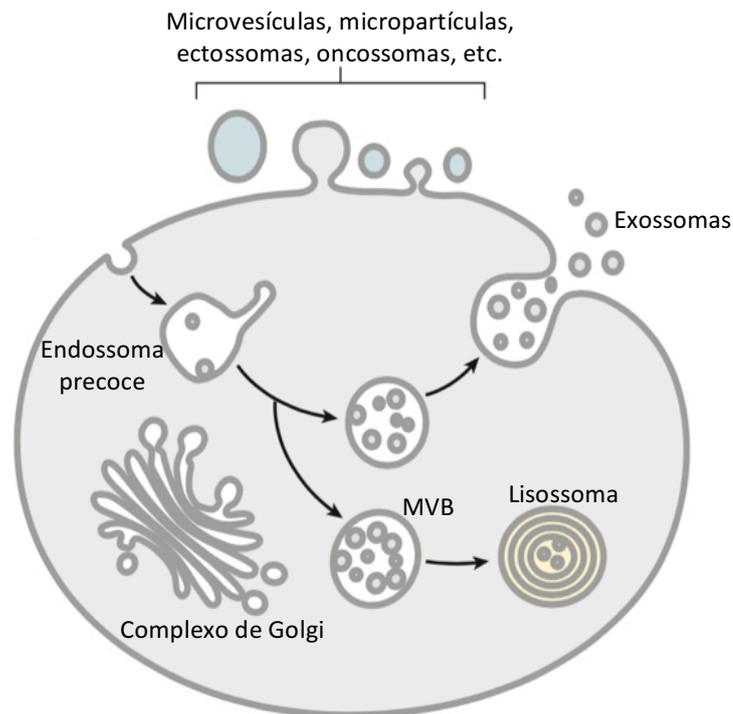


Figura 1 - Biogênese e liberação dos exossomas. A endocitose da membrana plasmática resulta na internalização de proteínas, ácidos nucleicos e moléculas associadas à membrana e na formação do endossoma precoce; a transformação do endossoma precoce em endossoma tardio promove a formação das ILVs dentro do endossoma tardio/MVB; a fusão do MVB com a membrana plasmática permite que os exossomas sejam libertados no meio extracelular; em alternativa, o MVB pode fundir-se com o lisossoma e ser degradado. Adaptado de COLOMBO, RAPOSO e THÉRY, 2014.

1.2 Secreção

Os exossomas transportam entre outros componentes, fatores de crescimento, bem como moléculas sinalizadoras, pelo que, após a fusão dos MVBs com a membrana plasmática, a sua liberação no meio extracelular pode originar uma sinalização autócrina e parácrina. O destino dos exossomas, degradação ou liberação, pode ser influenciado por diversos fatores, nomeadamente o transporte dos MVBs ao longo de microtúbulos da membrana plasmática, a existência de locais de acoplamento molecular na membrana plasmática ou presença de

proteínas SNARE que medeiam a fusão com lisossomas ou com a membrana plasmática. A libertação dos exossomas está associada a moléculas reguladoras do acoplamento molecular dos MVBs tais como GTPases, Rab11, Rab35, Rab27a e Rab27b (ABELS e BREAKFIELD, 2016).

1.3 Internalização celular

A internalização celular dos exossomas pode ocorrer pela fusão com a membrana celular ou por endocitose, de acordo com os processos de endocitose mediados por clatrina, caveolina, *rafts* lipídicos, macropinocitose ou fagocitose (MULCAHY, PINK e CARTER, 2014). Fatores como o tipo de célula e o seu estado fisiológico, bem como a existência de recetores à superfície da célula, capazes de reconhecer ligandos na membrana dos exossomas, influenciam o modo de incorporação da vesícula. Constatou-se que o bloqueio de proteoglicanos HSPGs na membrana plasmática da célula recetora diminui a internalização de vesículas, traduzindo a sua elevada importância no processo de internalização. Após a interação do exossoma com a célula recetora, pode ser desencadeada a sinalização via interação ligando/receptor, sem que ocorra a entrada do exossoma na célula (PATEL *et al.*, 2016) ou, por outro lado, endocitose da vesícula, transferência do conteúdo da vesícula para o citoplasma ou núcleo da célula, degradação lisossomal ou incorporação em MVB (RIDDER *et al.*, 2014)(MULCAHY, PINK e CARTER, 2014).

2. Estrutura da membrana e composição

Os exossomas são formados por uma estrutura anfifílica, constituída por dois compartimentos, um núcleo aquoso e uma membrana de bicamada lipídica capaz de proteger o seu conteúdo no meio extracelular. Apesar da composição do exossoma depender do estado fisiológico da célula que lhe deu origem e dos mecanismos envolvidos na organização do seu conteúdo, a sua composição consiste num conjunto de proteínas, lípidos e ácidos nucleicos (ver Figura 2) que por sua vez podem ser transferidos para outras células e desencadear respostas celulares (LOPEZ-VERILLI *et al.*, 2016; WILLMS *et al.*, 2016).

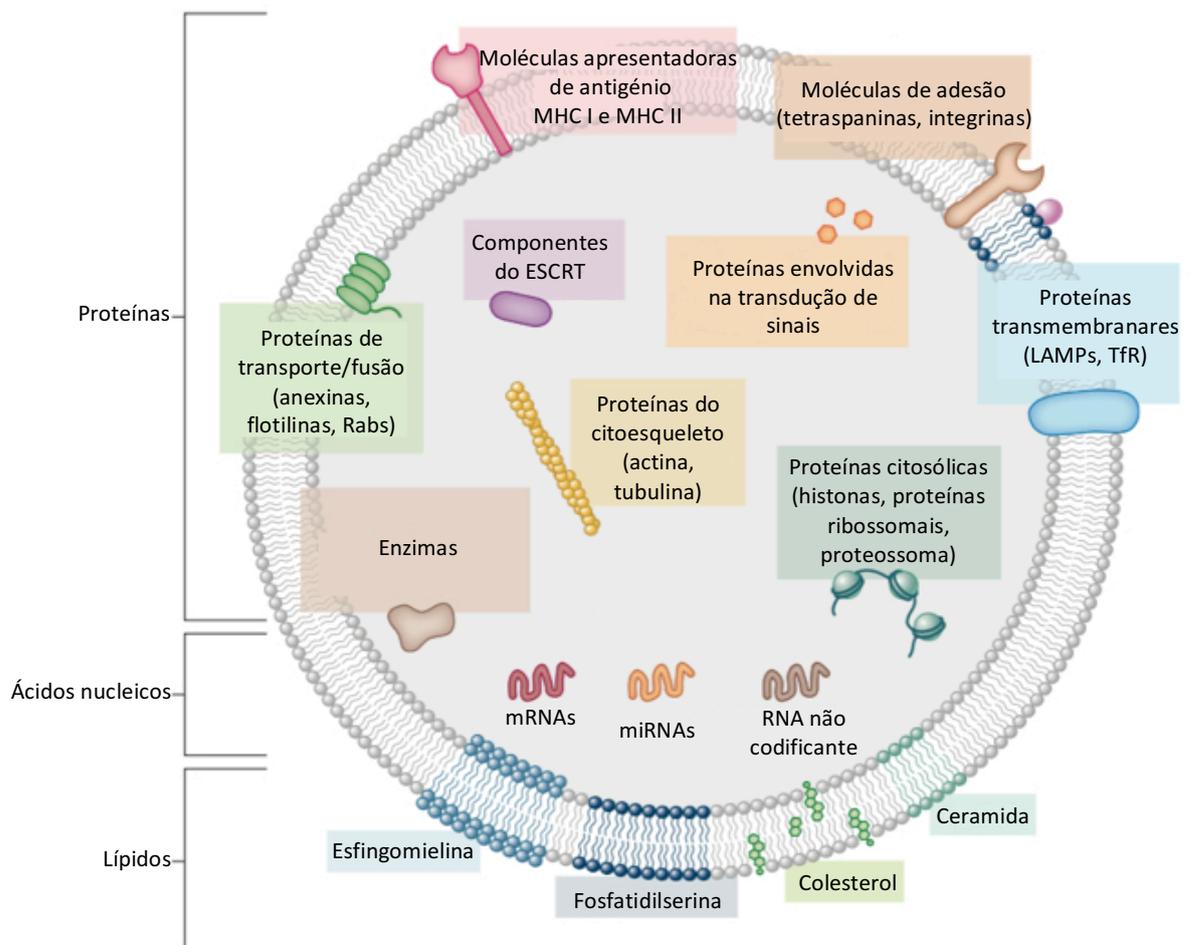


Figura 2 - Representação da composição dos exossomas. Os exossomas são constituídos por rafts lipídicos, ácidos nucleicos, bem como proteínas de adesão, tetraspaninas, proteínas transmembranares, proteínas citosólicas e componentes do ESCRT. Adaptado de COLOMBO, RAPOSO e THÉRY, 2014.

Relativamente à composição em proteínas, uma vez que os exossomas são obtidos a partir dos endossomas, podem ser encontradas nos exossomas proteínas do complexo ESCRT (Alix, TSG101, Gag), proteínas de transporte e fusão (anexinas, flotilinas, GTPases), proteínas de adesão (integrinas), tetraspaninas (CD9, CD63, CD81, CD82), moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), proteínas *heat shock* (HSP70, HSP90), bem como proteínas associadas a *rafts* lipídicos (ZHANG *et al.*, 2015). Neste sentido, foi criada uma base de dados designada Exocarta, com uma lista que inclui mais de 100 proteínas que funcionam como biomarcadores de exossomas (KEERTHIKUMAR *et al.*, 2015).

No que diz respeito ao teor em lípidos, os exossomas são compostos por colesterol, esfingolípido, fosfolipídios, ceramidas, *rafts* lipídicos e cadeias de ácidos gordos saturados. A elevada rigidez que estas moléculas apresentam confere aos exossomas a estabilidade necessária para protegerem o seu conteúdo até ao local alvo de entrega. O enriquecimento

dos exossomas em fosfatidilserina poderá estar relacionado com a sua internalização celular (MULCAHY, PINK e CARTER, 2014).

Em relação ao material genético que faz parte dos exossomas, foram identificados microRNAs (miRNAs), RNAs não codificantes (ncRNAs) e RNA mensageiro (mRNA), sendo que a maioria se encontra fragmentado. O RNA pode encontrar-se no interior da vesícula, protegido da digestão de RNases pela bicamada lipídica, ou associado a ribonucleoproteínas (RNPs) como a AGO2, o que lhe confere estabilidade (ARROYO *et al.*, 2011; VICKERS *et al.*, 2011). A incorporação de RNA em exossomas é controlada por diferentes mecanismos, sendo exemplo a ação da ribonucleoproteína hnRNPA2B1 que reconhece um pequeno motivo específico, designado EXOmotif, composto por pelo menos quatro nucleótidos (GGAG) em determinados miRNAs, promovendo a sua incorporação nos exossomas (VILLARROYA-BELTRI *et al.*, 2013). A complexidade e diversidade dos mecanismos de incorporação de mRNA e miRNA refletem a heterogeneidade do conteúdo das vesículas (ABELS e BREAKFIELD, 2016).

3. Mecanismo de travessia da barreira hematoencefálica

A BHE constitui uma barreira dinâmica que controla a passagem de substâncias entre o SNC e a circulação vascular periférica, sendo responsável pela regulação do meio favorável para a função neuronal. Contudo, a BHE limita o acesso de moléculas terapêuticas ao cérebro, pelo que os exossomas surgem como veículos para a entrega de fármacos no cérebro, uma vez que têm a capacidade de atravessar a barreira protetora do cérebro, embora os mecanismos subjacentes não sejam totalmente compreendidos (HAQQANI *et al.*, 2013).

Com o intuito de compreender o mecanismo de passagem dos exossomas através da BHE, foi realizado um estudo *in vitro*, usando exossomas obtidos de células HEK 293T e um modelo de BHE formado por células BMEC (*Bone marrow Microvascular Endothelial Cells*) em monocamada, mimetizando a BHE em condições normais e de neuroinflamação, em que a permeabilidade da BHE se encontra alterada devido a citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (ROCHFORD *et al.*, 2014). Foi demonstrado que os exossomas são internalizados por células BMEC por endocitose, sendo que o cruzamento da monocamada de células é feito pela via transcelular, isto é, formação de MVB seguida de exocitose no outro lado da monocamada. Os resultados evidenciaram a capacidade dos exossomas atravessarem a BHE apenas nas condições de inflamação (TNF- α ativado) da BHE (CHEN *et al.*, 2016).

Foi elaborado um estudo para avaliar o potencial uso dos exossomas na entrega de fármacos no cérebro e, como tal, na passagem da BHE. Exossomas isolados a partir de células endoteliais cerebrais bEND.3 (*immortalized mouse brain endothelial cell line*) foram otimizados para expressar à superfície da membrana marcadores envolvidos na penetração da BHE. *In vitro*, verificou-se um aumento na internalização celular de exossomas e na entrega de fármacos citotóxicos tais como doxorubicina e paclitaxel em células humanas de glioblastoma-astrocitoma U-87. *In vivo*, num modelo de peixe zebra, foi demonstrado que a entrega dos referidos fármacos encapsulados em exossomas permitiu a passagem da BHE, ao passo que quando administrados não estando associados a exossomas, não ocorreu a internalização pelas células cerebrais, o que sugere um potencial uso dos exossomas no tratamento em doenças neurológicas que atualmente não têm uma opção terapêutica disponível (YANG *et al.*, 2015).

4. Design e produção de exossomas como sistemas de entrega de fármacos

4.1 Seleção da fonte celular

A escolha da fonte celular para obter os exossomas é fundamental, uma vez que a composição em lípidos e proteínas superficiais determinam a sua função e direcionamento, bem como a proteção do conteúdo que transportam. Neste sentido, é necessário ter em consideração as características biológicas dos exossomas obtidos dos diferentes tipos celulares e avaliar os seus benefícios e riscos relativamente à biocompatibilidade e ao rendimento do processo.

Foram estudadas várias fontes celulares para se obterem exossomas a fim de serem utilizados em aplicações terapêuticas. A utilização de exossomas obtidos a partir de células tumorais para o transporte de agentes quimioterapêuticos constitui um desafio, uma vez que os exossomas tumorais conseguem induzir uma resposta imune contra as células tumorais, na medida em que possuem antígenos específicos que por sua vez são entregues às células dendríticas, ativando a imunidade por células T contra as células tumorais. Neste sentido, os exossomas originados a partir de células tumorais apresentam elevada especificidade de expressão de tetraspaninas, moléculas que estão envolvidas na ligação ao tecido alvo (WOLFERS *et al.*, 2001; RANA *et al.*, 2012). Contudo, foi demonstrado que exossomas com origem em células tumorais aumentam o crescimento do tumor em células com fraco

comportamento metastático, uma vez que possuem proteases e moléculas de adesão que promovem a formação do tumor, bem como miRNAs que induzem alterações malignas na célula alvo (ZOMER *et al.*, 2015; HARRIS *et al.*, 2015; MELO *et al.*, 2015). É importante realçar que a inibição de células T efectoras reativas ao tumor por exossomas tumorais ocorre através da expressão de ligandos indutores da apoptose (FasL, TRAIL, PDL-2). Estas vesículas são ainda responsáveis pela indução de apoptose em células T citotóxicas ativadas, diminuição da diferenciação de monócitos e indução da resposta pró-inflamatória (LUAN *et al.*, 2017). Assim sendo, existe elevado risco de malignidade associado a exossomas derivados de células tumorais, pelo que a sua utilização tem de ser ponderada para que a situação maligna não seja agravada.

Em alternativa, têm sido feitas outras abordagens no que se refere à escolha da fonte celular para obter exossomas, nomeadamente a utilização de plantas e frutos, devido ao perfil de segurança, para além de serem uma fonte económica, prática e possível de produzir em grande escala (LUAN *et al.*, 2017; JU *et al.*, 2013). O leite bovino pode igualmente ser utilizado como fonte de isolamento de exossomas para o transporte de agentes terapêuticos (MUNAGALA *et al.*, 2016). Ainda assim, apesar do elevado rendimento e melhor perfil de segurança, exossomas obtidos a partir de plantas e leite animal têm como desvantagem a incapacidade de induzir a resposta imune da célula alvo (LUAN *et al.*, 2017).

Por conseguinte, as células da resposta imune, nomeadamente monócitos e macrófagos, constituem uma fonte viável na obtenção de exossomas para aplicação de agentes terapêuticos e vacinas terapêuticas (ESCUDIER *et al.*, 2005), dado que estas vesículas são capazes de escapar à fagocitose imunitária do hospedeiro e consequentemente promover a eficácia terapêutica (HANEY *et al.*, 2015). Relativamente à aplicação de exossomas em vacinas terapêuticas, a fonte de exossomas mais promissora são as células dendríticas (DC), dado que células DC expostas a um antígeno libertam exossomas, por sua vez capazes de transferir peptídeos-MHC para outras células DC que não estiveram em contacto com o mesmo antígeno, promovendo-se a rejeição do tumor (SHENODA e AJIT, 2016).

Na terapêutica, as células mesenquimatosas estaminais (MSCs) são as células progenitoras de eleição para obter exossomas. Neste sentido, foram demonstrados os efeitos terapêuticos de exossomas com origem em células MSCs em modelos animais em condições de isquémia, promovendo a recuperação da função cerebral (XIN *et al.*, 2013; XIN *et al.*, 2012). Esta fonte celular de exossomas apresenta vantagens, nomeadamente a menor propensão dos exossomas de MSCs no desencadear de respostas imunes e a incapacidade da formação direta

de tumores (RANI *et al.*, 2015).

5. Estratégias de modificação de exossomas e incorporação de agentes terapêuticos

Os agentes terapêuticos podem ser incorporados em exossomas segundo um processo de encapsulação passiva ou ativa, associadas a diferentes eficiências de encapsulação e estabilidade dos fármacos nas vesículas (ver Tabela I).

A encapsulação passiva baseia-se na incubação dos exossomas com o agente terapêutico, de modo a que este seja incorporado no exossoma de acordo com o gradiente de concentração.

A eficiência de encapsulação é dependente da hidrofobicidade do fármaco, uma vez que fármacos hidrofóbicos têm maior afinidade para interagir com a membrana do exossoma. Neste sentido, foi demonstrado que é possível incorporar, por encapsulação passiva, fármacos como a curcumina, doxorubicina e paclitaxel. Paralelamente, a conjugação com colesterol constitui um método de incorporar oligonucleótidos em exossomas (DIDIOT *et al.*, 2016). Para além da incubação com o agente terapêutico, pode também recorrer-se à incubação do fármaco com as células dadoras com o objetivo de obter exossomas com o fármaco incorporado (PASCUCCI *et al.*, 2014).

Relativamente à encapsulação ativa, esta implica a perturbação da membrana do exossoma através de métodos de sonicação, extrusão, congelamento-descongelamento, eletroporação, incubação com permeabilizadores da membrana tais como saponinas e o método de *click chemistry* para conjugação direta. Na tabela I encontram-se os diferentes métodos que podem ser utilizados para manipular a incorporação de agentes terapêuticos e obter exossomas modificados. É importante realçar que deve ser considerada não apenas a eficiência de encapsulação do método, mas também fatores como a integridade da membrana dos exossomas e a estabilidade, a fim de se otimizar o efeito terapêutico (LUAN *et al.*, 2017).

Tabela I- Métodos de incorporação de agentes terapêuticos em exossomas

	Método	Procedimento	Vantagens	Desvantagens	Modelos
a) Encapsulação passiva	i. Incubação dos exossomas com o fármaco/proteína livre		Simples; Integridade da membrana é mantida	Baixa eficiência de encapsulação	Paclitaxel (PASCUCCI <i>et al.</i> , 2014) Catalase (HANEY <i>et al.</i> , 2015)
	ii. Incubação das células dadoras de exossomas com o fármaco livre		Simples; Integridade da membrana é mantida	Baixa eficiência de encapsulação; O fármaco pode causar citotoxicidade às células dadoras	
b) Encapsulação ativa	i. Sonicação	A mistura de exossomas e fármaco/proteína é sujeita a uma sonda homogeneizadora, cuja força de corte perturba a integridade da membrana do exossoma, deformando-a e permitindo a entrada de fármaco no exossoma. Os lípidos e proteínas à superfície da membrana do exossoma não são significativamente afetados e verifica-se a reconstituição da membrana exossomal. Pode ocorrer que o fármaco, para além de ser incorporado no interior do exossoma, se ligue à face exterior da membrana exossomal, observando-se a libertação do fármaco da vesícula em duas fases (Kim <i>et al.</i> , 2016)	Elevada eficiência de encapsulação	Integridade da membrana afetada	Catalase (HANEY <i>et al.</i> , 2015)
	ii. Extrusão	É utilizada uma seringa (extrusor) constituída por uma membrana com poros entre 100 e 400 nm, na qual é inserida a mistura de exossomas e fármaco, a temperatura controlada. Durante a extrusão, as propriedades da membrana do exossoma são alteradas de acordo com a força mecânica aplicada, sendo a membrana deformada e misturada com o fármaco.	Elevada eficiência de encapsulação	Integridade da membrana afetada; Efeitos citotóxicos relacionados com a alteração do potencial zeta nos exossomas;	Porfirina (FUHRMANN <i>et al.</i> , 2015)

	iii. Congelamento-descongelamento	Incubação dos exossomas com o fármaco, durante um período de tempo fixo, a temperatura ambiente. Seguidamente, a mistura é rapidamente arrefecida a -80 °C ou em azoto líquido e, por fim, aquecida à temperatura ambiente inicial. A encapsulação do fármaco é obtida ao fim de, pelo menos, três ciclos (Sato <i>et al.</i> , 2016).	Média eficiência de encapsulação; Fusão de lipossomas e exossomas para a obtenção de vesículas miméticas de exossomas (Sato <i>et al.</i> , 2016)	Formação de agregados e consequentemente uma grande distribuição de tamanho de vesículas incorporadas com fármaco.	Porfirina
	iv. Electroporação	Formação de poros na membrana do exossoma através da aplicação de um campo elétrico numa solução condutora. A estrutura da membrana do exossoma é restabelecida após a difusão do fármaco para o interior da vesícula.	Encapsulação de moléculas grandes como siRNA e miRNA	Formação de agregados de RNA; Instabilidade; Baixa eficiência de encapsulação.	Let-7a miRNA (OHNO <i>et al.</i> , 2013) MAPK1 siRNA (WAHLGREN <i>et al.</i> , 2012) Doxorubicina (Tian <i>et al.</i> , 2014) siRNA BACE1 (ALVAREZ-ERVITI, SEOW, YIN, <i>et al.</i> , 2011)
	v. Incubação com saponinas	A saponina, agente surfactante, liga-se ao colesterol presente na membrana do exossoma, criando poros que aumentam a permeabilidade da membrana, sem a destruir.	Elevada eficiência de encapsulação	Risco hemolítico e toxicidade (Podolak, Galanty e Sobolewska, 2010)	Catalase (HANEY <i>et al.</i> , 2015) Porfirina (FUHRMANN <i>et al.</i> , 2015)
	vi. <i>Click chemistry</i>	Método químico em que se promove a ligação covalente de moléculas à superfície dos exossomas.	Rápido; Eficiente; Controlo do local de conjugação;		(SMYTH <i>et al.</i> , 2014)

As nanovesículas miméticas de exossomas são produzidas artificialmente através de processos biotecnológicos, via extrusão de células dadoras. Comparativamente à obtenção de exossomas libertados a partir de células dadoras, designados por exossomas naturais, a técnica de produção vesículas miméticas de exossomas permite obter aproximadamente 100 vezes mais vesículas (SUTARIA *et al.*, 2017). É de esperar que nem todos os componentes dos exossomas naturais sejam necessários para a entrega eficiente do agente terapêutico na célula alvo, pelo que poderão ser apenas utilizados os componentes funcionais, reduzindo-se a complexidade biológica. Neste sentido e dada a constituição dos exossomas naturais, os lipossomas, estruturas compostas por membranas de fosfolípidos e de diâmetro, ajustável, próximo de 100 nm, constituem a base para a obtenção de vesículas miméticas de exossomas. Neste sentido, a produção de vesículas miméticas de exossomas possui vantagens como a

facilidade na transposição de escala e a possibilidade de se estudar o efeito de cada componente individualmente. Contudo, o design e desenvolvimento de vesículas miméticas de exossomas funcionais tem ainda algumas limitações, nomeadamente o desconhecimento dos componentes essenciais dos exossomas naturais, a incorporação de lípidos e proteínas funcionais, devido a complexidade da incorporação de múltiplas proteínas e a baixa eficiência de encapsulação dos componentes terapêuticos (KOOIJMANS *et al.*, 2012).

6. Papel dos exossomas nas doenças neurodegenerativas: neuroproteção e neurotoxicidade

O estudo das doenças neurodegenerativas incide nos eventos moleculares a nível celular e os seus efeitos nas células vizinhas e noutros locais do organismo. Deste modo, a comunicação intercelular que ocorre no meio extracelular através de exossomas constitui um alvo para a intervenção terapêutica, bem como para diagnóstico e avaliação da progressão da doença. A eliminação de produtos derivados do metabolismo celular e moléculas tóxicas e a transmissão de ácidos nucleicos, citocinas e enzimas entre as células podem representar atividades neuroprotetoras dos exossomas. Adicionalmente, vários estudos demonstraram a ação neuroprotetora dos exossomas libertados por neurónios, astrócitos, oligodendrócitos, microglia e células estaminais neuronais em processos de plasticidade sináptica e regeneração nervosa, pela entrega de moléculas em locais de lesão que promovem a síntese proteica local (KALANI, TYAGI e TYAGI, 2014).

Por outro lado, estas vesículas extracelulares podem transportar agregados proteicos que são transferidos para outras células, exercendo uma ação neurotóxica (Figura 3), na medida em que há evidências de que podem desencadear a transmissão e espalhamento de doenças tais como doença de Alzheimer (HOWITT e HILL, 2016; ASAI *et al.*, 2015), Parkinson (WU, ZHENG e ZHANG, 2017; MARIE *et al.*, 2015), Esclerose Lateral Amiotrófica (NONAKA *et al.*, 2013; GRAD *et al.*, 2014; IGUCHI *et al.*, 2016), doença de Huntington (JEON *et al.*, 2016; PEARCE *et al.*, 2015), Esclerose múltipla e neuroinflamação (BAKHTI, WINTER e SIMONS, 2011; SORIA *et al.*, 2017). Resultados de estudos *in vitro* suportam a hipótese de transmissão *prion-like* nas doenças neurodegenerativas.

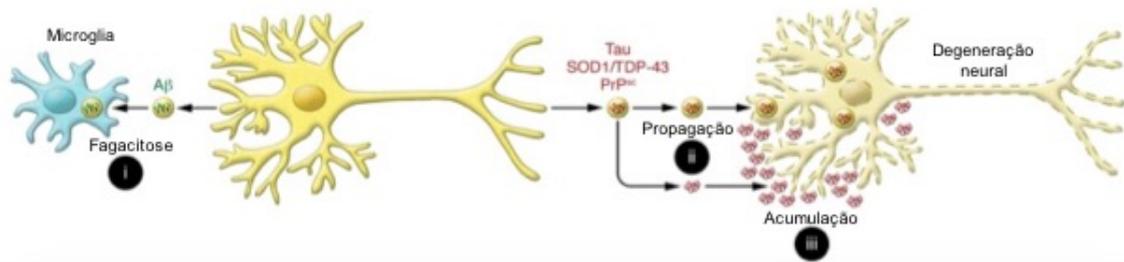


Figura 3 - Exossomas na patologia do sistema nervoso. Nas doenças neurodegenerativas, os exossomas podem regular a fagocitose de agregados proteicos, como o peptídeo A β na doença de Alzheimer. Os exossomas promovem a libertação, transmissão celular e acumulação de proteínas tóxicas, associadas à degenerescência neural, tais como Tau, SOD1, TDP-43 e priões. Adaptado de ZAPPULLI *et al.*, 2016.

Doenças do prião

Os priões são proteínas de conformação aberrante que têm a capacidade de transmitir a sua conformação a outras proteínas do mesmo tipo, formando agregados que resultam em oligómeros e fibrose. Neste sentido, os priões promovem a transmissão do estado fisiopatológico de uma determinada célula, na medida em que desencadeiam a reconformação e agregação proteica, conduzindo à neurodegenerescência. Do mesmo modo, observa-se a acumulação progressiva de proteínas não-conformacionais em proteinopatias tais como as doenças de Parkinson e Alzheimer, sendo que o seu mecanismo de propagação pode ser explicado pela hipótese *prion-like*. A relação entre a transmissão de doenças do prião e os exossomas surgiu na sequência do estudo da expressão celular da proteína prião (PrP) e da libertação pela célula de exossomas contendo PrP normal (PrP^C) e PrP anormal (PrP^{Sc}). Adicionalmente, verificou-se que a estrutura e o conteúdo dos exossomas são alterados pela PrP^{Sc}, bem como a sua secreção pela célula, conduzindo ao aumento da libertação e transmissão da PrP^{Sc} (SORIA *et al.*, 2017).

Doença de Alzheimer

Foi demonstrado *in vitro* a formação do peptídeo β -amiloide (A β) em endossomas, a partir da clivagem β da proteína precursora amiloide (APP), e conseqüentemente a sua secreção para o meio extracelular e propagação de A β via exossomas (RAJENDRAN *et al.*, 2006). De facto, estudos *in vitro* e *in vivo* identificaram fragmentos terminais APP-C em exossomas, evidenciando a ação dos exossomas na formação do A β .

O papel neuroprotetor dos exossomas pode traduzir-se na eliminação de espécies tóxicas de A β , contribuindo para a menor toxicidade e maior estabilidade das fibras nervosas.

Demonstrou-se que exossomas neuronais promovem a remoção do peptídeo A β , uma vez que induzem modificações conformacionais no A β que conduzem à formação de fibrilas de peptídeo A β não tóxicas e à sua remoção pela microglia, permitindo a sua degradação em lisossomas. A presença de exossomas promove uma remoção mais eficiente de A β pela microglia. Verificou-se também que o bloqueio de fosfatidilserina à superfície do exossoma através de anexina V impediu a internalização de exossomas, bem como a incorporação de A β na microglia. Neste sentido, pode concluir-se que existe uma coordenação entre os neurónios e a microglia na remoção do peptídeo A β via exossomas, sendo que a manipulação da libertação dos exossomas poderá permitir modificar o risco de doença de Alzheimer (YUYAMA *et al.*, 2012).

A proteína Tau hiperfosforilada está também associada à doença de Alzheimer e é o principal constituinte das redes de neurofibrilas (SAMAN *et al.*, 2012). Estudos *in vitro* evidenciaram que a sobre-expressão da proteína Tau está associada à sua secreção via exossomas (CHAI *et al.*, 2012; SIMÓN *et al.*, 2012) e consequentemente a transmissão trans-sináptica no meio extracelular (LEE *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2012), sugerindo a sua propagação pelo cérebro do doente de Alzheimer. De acordo com estudos *in vitro* e *in vivo* num modelo de expressão viral, a inibição da secreção de exossomas reduz a transmissão da proteína Tau (ASAI *et al.*, 2015).

Doença de Parkinson

Os corpos de Lewy que ocorrem na doença de Parkinson são o resultado da agregação da proteína α -sinucleína (α -syn) e fribrilação. Deste modo, o processo neurodegenerativo atinge as várias regiões cerebrais através da propagação da α -syn segundo a hipótese *prion-like* (ANGOT *et al.*, 2010). Os exossomas podem estar envolvidos na progressão da doença, na medida em que promovem a transferência intercelular da α -syn (ALVAREZ-ERVITI *et al.*, 2011). Adicionalmente, foi demonstrado *in vitro* que a internalização celular ocorre preferencialmente com α -syn incorporada em exossomas, associada a maior toxicidade, comparativamente à α -syn no estado livre (DANZER *et al.*, 2012).

Esclerose lateral amiotrófica

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma doença que se caracteriza nos casos familiares pela presença duma forma mutante da proteína superóxido dismutase (SOD1). O mecanismo de transferência de SOD1 pelo cérebro via exossomas foi estudado *in vitro*, pela

secreção de exossomas contendo SOD1 mutante, a partir de neurónios, para o meio extracelular e conseqüente propagação para outros neurónios (GRAD et al., 2014).

Nos doentes com ELA e demência fronto-temporal (FTD), ocorre a formação de agregados e inclusões de TDP-43, uma proteína nuclear que migra para o citoplasma das células neuronais doentes, que por sua vez são transmitidos a outras células, provocando a disseminação da doença (IGUCHI et al., 2016). Uma vez que esta substância é libertada por exossomas, a transmissão da doença poderá estar relacionada com a comunicação intercelular via exossomas (NONAKA et al., 2013; DING et al., 2015; WESTERGARD et al., 2016).

Como exemplo do efeito neuroprotetor mediado por exossomas na ELA, BONAFEDE et al. utilizaram um modelo *in vitro* de ELA e exossomas isolados a partir de células ASC (*adipose-derived MSC*). Os neurónios motores de ELA foram mimetizados através do uso de uma linha celular com mutações pontuais de SOD1, na presença de H₂O₂. Os exossomas permitiram aumentar o tempo de sobrevivência dos neurónios motores de ELA através de uma possível interação no mecanismo da apoptose (BONAFEDE et al., 2016). Num outro estudo, observou-se o efeito na ELA da aplicação de exossomas derivados de ASC, tendo ocorrido uma redução na formação agregados de SOD1, bem como o restabelecimento da função mitocondrial (LEE et al., 2016).

Doença de Huntington

Na doença de Huntington, existe evidência da transferência da proteína Huntingtina mutante (mtHtt) entre células via exossomas. Foi realizado um estudo com o intuito de analisar o efeito da propagação de moléculas tóxicas através de exossomas, com origem em células de neuroblastoma humanas, injetados em animais (*newborn wild-type mice*). Dado que os exossomas transportavam a proteína mtHtt, verificou-se que os animais desenvolveram os sintomas e a doença de Huntington (JEON et al., 2016).

Esclerose múltipla e inflamação

O processo de neuroinflamação pode ser desencadeado por exossomas transportadores de moléculas modeladoras da inflamação tais como mRNAs, miRNAs e citocinas. Do mesmo modo, a microglia pode igualmente libertar exossomas contendo moléculas pró-inflamatórias (ex. IL-1), bem como outras citocinas. A inflamação ao nível do cérebro está associada a um aumento da sinalização endócrina via exossomas, com origem nas células hematopoiéticas (RIDDER et al., 2014). Devido ao facto dos exossomas serem capazes de atravessar a BHE, é possível que os processos inflamatórios sistémicos influenciem os processos fisiológicos a nível cerebral.

A esclerose múltipla é um exemplo de doença que tem por base um processo de neuroinflamação, desmielinização e perda de oligodendrócitos. Num modelo de doença de esclerose múltipla, designado de encefalomielite autoimune experimental (EAE), as células do sistema imune, induzidas por citocinas pró-inflamatórias, libertaram exossomas contendo moléculas pró-inflamatórias capazes de disseminar a inflamação. Adicionalmente, verificou-se que a formação da mielina pode ser inibida por exossomas libertados a partir de oligodendrócitos (BAKHTI *et al.*, 2011).

7. Aplicações terapêuticas nas doenças neurodegenerativas

7.1 Exossomas como alvo da terapêutica

As evidências crescentes de que os exossomas poderão ser responsáveis pela propagação de moléculas associadas a doença incentivam o desenvolvimento de estratégias de inibição da função das vesículas extracelulares, incluindo a biogénese, libertação, internalização celular e componentes das vesículas que contribuem para o progresso da doença (ver Figura 4) (RAPOSO e STOOORVOGEL, 2013).

7.1.1 Inibição da formação

A inibição da formação dos componentes celulares que constituem os exossomas surge como estratégia terapêutica, embora ainda esteja numa fase muito precoce no desenvolvimento uma vez que ainda não existe um grande número de estudos em modelos de doença. A inibição da formação de ceramida, associada à biogénese exossomal, pode ser conseguida através de moléculas inibidoras da esfingomielinase, enzima que converte a esfingomielina em ceramida, ou com amiloride, fármaco usado no tratamento da hipertensão arterial, reduzindo-se a formação de exossomas (TRAJKOVIC *et al.*, 2008; CHALMIN *et al.*, 2010). Recentemente foi estudada a influência dos sindecanos, proteoglicanos localizados na superfície da célula, e da sintenina, adaptador dos sindecanos no citoplasma, que possui afinidade para a proteína exossomal PDCD6IP (*protein programmed cell death 6 interacting protein*), também designada de Alix, na regulação da formação dos exossomas (BAIETTI *et al.*, 2012). O uso de RNA de interferência na perturbação da interação sindecano-sintenina resulta na diminuição da produção de exossomas. Adicionalmente, ainda que não tenha sido testado, o bloqueio de moléculas envolvidas na formação das vesículas extracelulares como as

tetraspaninas, nomeadamente a tetraspanina 30 (TSPAN 30) constitui uma possível estratégia na inibição da produção de exossomas (NAZARENKO *et al.*, 2010).

No que se refere à doença de Alzheimer, num estudo recente verificou-se que, nas células neuronais, a formação de exossomas pode ser impedida pelo silenciamento da proteína esfingomielinase neutral (nSMase2). Foram utilizados murganhos geneticamente modificados deficientes em nSMase2, como modelo de doença de Alzheimer, com redução da produção de ceramida, dado que a nSMase2 é ativada pelo peptídeo A β para originar ceramida. Os níveis de ceramida encontram-se aumentados no cérebro de doentes com doença de Alzheimer. Foram realizados ensaios *in vitro* para estudar a agregação de A β 42 e a remoção pela microglia na presença e na ausência de exossomas derivados astrócitos. Na presença de exossomas, a formação de agregados de A β 42 foi acelerada e verificou-se o bloqueio da remoção glial, contrariamente ao verificado no trabalho desenvolvido por YUYAMA *et al.* (2012). A redução da secreção de exossomas pela perda da função da nSMase2 reduziu, neste modelo, a progressão da doença de Alzheimer (DINKINS *et al.*, 2016).

7.1.2 Inibição da libertação

O mecanismo pelo qual os exossomas são segregados a partir da célula que lhes deu origem é regulado por diversas proteínas, de acordo com os vários tipos celulares. Nas células tumorais, a estratégia de silenciamento da proteína Rab27a, uma pequena GTPase da família de proteínas Rab envolvida na regulação da secreção dos exossomas, através de siRNAs, provoca a suspensão do mecanismo de libertação de exossomas, reduzindo a sinalização via exossomas da supressão de neutrófilos. Deste modo, foi possível reduzir o crescimento de carcinoma metastático em murganhos, dado que a comunicação de sinais a partir das células tumorais foi interrompida (BOBRIE *et al.*, 2012). Estes resultados foram confirmados num outro estudo *in vivo*, em que se usou um modelo de melanoma de murganho a fim de se demonstrar a relação entre inibição da Rab27 por siRNA e a redução do crescimento do tumor e da formação de metástases (PEINADO *et al.*, 2016).

Relativamente às proteínas que promovem o acoplamento e/ou fusão dos MVBs com a membrana plasmática, as GTPases Rab11 e Rab35 podem ser utilizadas como alvo para o bloqueio da libertação de exossomas (HSU *et al.*, 2010). Fatores como o aumento do pH do meio e da concentração intracelular de Ca²⁺ estimulam a secreção de exossomas. Neste sentido, a supressão da libertação de exossomas pode ser obtida através de um inibidor da bomba de protões ou de moléculas que bloqueiem o canal de Ca²⁺ dependente de voltagem (SAVINA *et al.*, 2003; FEDERICI *et al.*, 2014). Contudo, a inibição da libertação de exossomas

possui algumas limitações, na medida em que os exossomas estão envolvidos na comunicação intercelular e manutenção do meio fisiológico celular, pelo que o bloqueio destes processos poderá conduzir a efeitos tóxicos para as células.

7.1.3 Inibição da internalização

A inibição da entrada dos exossomas nas células pode ser feita através do bloqueio das proteínas à superfície do exossoma, na medida em que estas atuam como ligandos dos recetores celulares (MULCAHY, PINK e CARTER, 2014). Como exemplo, a anexina V bloqueia um fosfolípido à superfície dos exossomas, a fosfatidilserina, responsável pela internalização de exossomas derivados de células tumorais (LIMA *et al.*, 2009). O sulfato de heparano, um polissacárido linear, atua como recetor para a internalização de exossomas originados a partir de células tumorais (CHRISTIANSON *et al.*, 2013). Este mecanismo é bloqueado quando é administrada heparina que inibe a migração celular mediada por exossomas. O bloqueio de moléculas sinalizadoras localizadas nas vesículas extracelulares poderá ter um impacto significativo na terapêutica. Contudo, a interferência nos mecanismos de internalização das vesículas exossomais pode desencadear efeitos adversos uma vez que os exossomas regulam os processos biológicos e as proteínas envolvidas na biogénese dos exossomas estão também envolvidas noutros processos celulares, pelo que é necessário que o sistema de entrega terapêutico seja direcionado para uma determinada população de células produtoras de exossomas (EL ANDALOUSSI *et al.*, 2013).

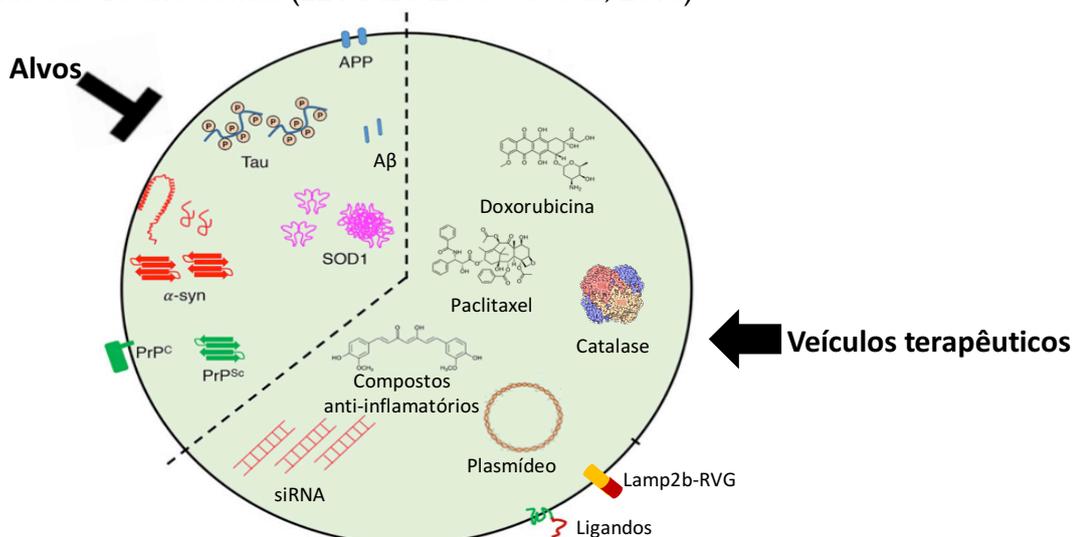


Figura 4 - Representação dos exossomas como alvo terapêutico e como vetores terapêuticos. Nas doenças neurodegenerativas, os processos de biogénese, secreção e internalização dos exossomas podem ser considerados alvos terapêuticos, com o intuito de reduzir a propagação de moléculas tóxicas. Adicionalmente, os exossomas constituem veículos terapêuticos de fármacos (moléculas anti-inflamatórias, paclitaxel, doxorubicina), ácidos nucleicos (siRNA, miRNA) e proteínas (catalase). Adaptado de SORIA *et al.*, 2017.

7.2 Exossomas como vetores terapêuticos

As características dos exossomas no que se refere ao tamanho e flexibilidade conferem-lhes a capacidade de atravessarem a BHE e penetrarem o cérebro, passíveis de serem utilizados como veículos de entrega de moléculas no cérebro (ver Figura 4) (ALVAREZ-ERVITI *et al.*, 2011). Adicionalmente, as vesículas exossomais possuem membranas ricas em proteínas adesivas à superfície (VICKERS e REMALEY, 2012) e, uma vez que ocorrem naturalmente no organismo, possuem baixa toxicidade.

7.2.1 Exossomas como vetores de ácidos nucleicos (siRNAs, miRNAs, hsiRNAs)

Os siRNAs são utilizados em terapia gênica com o intuito de silenciar um gene de interesse. No entanto, os siRNAs são facilmente degradados por endonucleases extracelulares que estão presentes no soro, células e meio extracelular, pelo que, para serem utilizados na terapêutica, é necessário estarem associados a um vetor que os proteja. Neste sentido, os exossomas têm vantagens interessantes enquanto vetores, em comparação com outros sistemas tais como lipossomas, na medida em que possuem um tempo de meia vida superior e menor imunogenicidade (KALANI, TYAGI e TYAGI, 2014). A fim de se direcionarem moléculas para o cérebro, os exossomas podem ser modificados através de bioengenharia, associando o peptídeo derivado da glicoproteína do vírus da raiva (RVG) a uma proteína abundante da membrana do exossoma, a LAMP2b (*lysosomal-associated membrane protein 2b*). Esta metodologia foi testada no SNC de murganhos *wild type*, tendo sido utilizados exossomas contendo siRNAs, com o objetivo de inibir a expressão do gene BACE1, que codifica para a proteína envolvida na formação do peptídeo A β (ALVAREZ-ERVITI *et al.*, 2011). Os exossomas foram isolados a partir de vários tipos de células, sendo que, posteriormente, introduziram-se os siRNAs por eletroporação, tendo-se verificado que os siRNAs foram eficientemente incorporados nos exossomas.

Recentemente, em 2014, um outro estudo utilizou a mesma metodologia, na doença de Parkinson, na entrega de siRNAs para diminuir a expressão e acumulação de α -syn em murganhos (COOPER *et al.*, 2014). Os exossomas, obtidos a partir de células dendríticas dos murganhos, foram modificados para incluírem o peptídeo RVG à sua superfície. Posteriormente, foram submetidos à eletroporação de siRNAs e administrados sistemicamente, tendo-se verificado uma diminuição na expressão de α -syn em diferentes regiões do cérebro dos animais. Deste modo, exossomas contendo RVG podem ser utilizados

como veículos na terapia génica das doenças neurodegenerativas uma vez que possibilitam uma entrega específica e segura após administração sistémica (ALVAREZ-ERVITI, SEOW, YIN, *et al.*, 2011).

A entrega de miRNAs via exossomas pode igualmente ser vista como uma estratégia terapêutica, devido ao facto destas moléculas estarem envolvidas na regulação da expressão génica, nomeadamente na ligação a sequências complementares nos mRNAs alvo e no controlo da expressão génica pós-transcricional (BARTEL, 2004; BARTEL, 2009).

Como aplicação no tratamento da esclerose múltipla e inflamação, foi demonstrado que células dendríticas estimuladas com IFN- γ libertam exossomas, designados de IFN- γ -DC-Exos, contendo microRNAs que atuam na remielinização, após desmielinização aguda induzida por lisolecitina. Deste modo, foi possível promover a expressão de miRNAs envolvidos na diferenciação de oligodendrócitos e nos mecanismos de produção de mielina. *In vivo*, a administração nasal de IFN- γ -DC-Exos, internalizados preferencialmente por oligodendrócitos, permitiu o aumento da mielinização. Foi também observado que os IFN- γ -DC-Exos aumentam a tolerância oxidativa e os níveis de antioxidantes na microglia, possivelmente associado aos miRNAs anti-inflamatórios, envolvidos na redução da produção de radicais de oxigénio. Os resultados obtidos sugerem um elevado potencial terapêutico na promoção da remielinização na esclerose múltipla e em síndromes desmielinizantes (PUSIC *et al.*, 2014).

O carregamento de exossomas com moléculas de ácidos nucleicos modificadas constitui um dos diversos potenciais terapêuticos dos exossomas. Foi realizado um estudo em que se verificou que a encapsulação de siRNAs modificados - hsiRNAs (*hydrophobically modified siRNAs*) em exossomas obtidos de glioblastoma, através de co-incubação, promoveu o silenciamento do mRNA Htt e proteína Htt em culturas neuronais primárias de murganhos. A modificação química no siRNA confere maior estabilidade à molécula e resistência à degradação por nucleases, pelo que a eficiência de encapsulação em exossomas é superior e aproximadamente igual a 3000 hsiRNA por cada vesícula. Os resultados sugeriram que uma infusão de 3,5 a 7 μ g da formulação hsiRNA associado a exossomas durante 1 semana (1 μ g por dia) permitem reduzir os níveis de mRNA Htt em 35% (DIDIOT *et al.*, 2016), comparativamente aos resultados obtidos num outro estudo, em que se utilizou uma infusão de 700 μ g de oligonucleótidos *antisense* para o silenciamento de mRNA Htt (KORDASIEWICZ *et al.*, 2012).

7.2.2 Exossomas como vetores de moléculas de baixo peso molecular

No que diz respeito à entrega de fármacos, os exossomas têm sido utilizados como entidades transportadoras de moléculas anti-inflamatórias como a curcumina (ZHUANG *et al.*, 2011), bem como de compostos quimioterapêuticos tais como a doxorubicina (TIAN *et al.*, 2014) e o paclitaxel (YANG *et al.*, 2015; PASCUCCI *et al.*, 2014).

A curcumina possui propriedades antioxidantes, antineoplásicas e anti-inflamatórias, tendo uma reduzida biodisponibilidade devido à sua natureza hidrofóbica e afinidade para interagir com as membranas lipídicas (AGGARWAL e HARIKUMAR, 2009). Foi conduzido um estudo com o intuito de avaliar a atividade anti-inflamatória da curcumina, *in vitro* e *in vivo*, associada a exossomas (SUN *et al.*, 2010). Neste sentido, foram isolados exossomas obtidos a partir de uma linha celular tumoral (EL-4), previamente incubada com curcumina. A identificação do complexo exossoma-curcumina foi feita através dos marcadores TSG101 e CD81. No modelo *in vitro*, constatou-se que a atividade anti-inflamatória da curcumina foi potenciada pela associação desta molécula a exossomas, na medida em que macrófagos tratados com complexo exossoma-curcumina produziram menores quantidades de citocinas inflamatórias tais como IL-6 e TNF- α , relativamente aos macrófagos tratados apenas com curcumina. No modelo *in vivo*, usou-se um modelo animal de sépsis induzida por lipopolissacáridos (LPS), tendo-se observado maior capacidade de sobrevivência nos animais administrados com a curcumina exossomal, em comparação com aqueles administrados apenas com curcumina. O referido estudo concluiu ainda que a curcumina associada a exossomas provocou uma redução no número de células CD11b⁺Gr-1⁺, as quais, em condições de sépsis induzida por LPS, aumentam a resposta à infeção nos pulmões, conduzindo a inflamação aguda pulmonar.

A entrega de doxorubicina via exossomas em tecido tumoral foi evidenciada por TIAN *et al.*, tendo sido produzidos exossomas obtidos a partir de células dendríticas, previamente manipuladas, com o objetivo de obter exossomas com afinidade para o tecido alvo. Posteriormente, os exossomas foram purificados e encapsulados com doxorubicina por electroporação. Os exossomas administrados por via intravenosa foram eficientes na entrega de doxorubicina no tecido tumoral, resultando na inibição do crescimento do tumor (TIAN *et al.*, 2014).

Pascucci *et al.* estudaram a capacidade de células MSC, previamente expostas a elevadas concentrações de paclitaxel, libertarem exossomas contendo o fármaco, tendo-se verificado que as vesículas mantiveram a eficácia terapêutica anti-tumoral *in vitro*, pela redução da proliferação de células de adenocarcinoma do pâncreas (PASCUCCI *et al.*, 2014).

7.2.3 Exossomas como vetores de proteínas

O transporte de moléculas de grandes dimensões, tais como proteínas, pode ser mediado por exossomas. Recentemente, foi avaliada a capacidade de exossomas encapsulados com uma proteína antioxidante, a catalase, serem usados como estratégia terapêutica na doença de Parkinson, uma vez que esta é caracterizada por níveis baixos de enzimas envolvidas no stress oxidativo, como a catalase e a superóxido dismutase. A encapsulação da catalase em exossomas foi realizada *ex vivo*, através de diversos métodos tais como incubação à temperatura ambiente, permeabilização com saponinas, congelamento-descongelamento, sonicação e extrusão, tendo-se verificado que a eficiência de encapsulação da catalase foi otimizada com os métodos de sonicação e extrusão. As vesículas obtidas, designadas de *exoCAT*, possuíam um tamanho entre 100-200 nm e permitiram proteger a catalase contra a degradação de proteases. Após a administração intranasal das *exoCAT* num modelo animal de doença de Parkinson, foram detetados níveis de exossomas no cérebro que foram responsáveis pela diminuição da inflamação e aumento da sobrevivência neuronal, embora os mecanismos subjacentes a estes efeitos não sejam conhecidos. Neste sentido, conclui-se que formulações constituídas por exossomas contendo catalase poderão constituir uma estratégia no tratamento de doentes com Parkinson, na medida em que a atividade da catalase é preservada, o tempo de circulação na corrente sanguínea é prolongado e está associada uma reduzida imunogenicidade (HANEY *et al.*, 2015).

7.3 Vexossomas

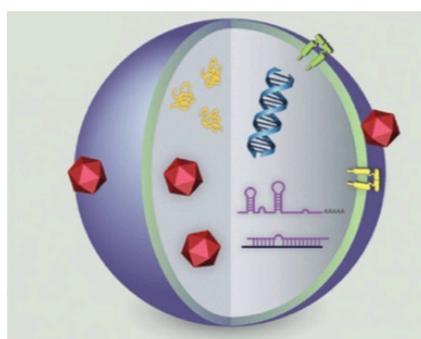


Figura 5 - Componentes do vexossoma. O vexossoma pode ser constituído por vetores AAV com o gene de interesse, mRNA, miRNA ou DNA, bem como proteínas. A superfície do vexossoma pode conter receptores ou ligandos. Adaptado de MAGUIRE *et al.*, 2012.

Casey Maguire e colaboradores estudaram uma estratégia particular para o uso de exossomas em terapia génica. Verificou-se que, em condições normais, durante a produção de vírus adeno-associados (AAVs) em células 293T, foram detetadas vesículas extracelulares contendo, no seu interior, cápsides de AAVs, designadas de vexossomas. Os referidos vexossomas mostraram maior resistência aos anticorpos anti-AAV e permitiram uma

transferência mais eficaz de material genético para células em cultura, relativamente aos vetores AAV convencionais com o mesmo número de cópias de genoma (HUDRY *et al.*, 2016). Adicionalmente, a expressão de ligandos à superfície do vexossoma, como o peptídeo RVG, permite a sua vetorização para o cérebro e ligação às células alvo (GYÖRGY *et al.*, 2014). Neste sentido, a estratégia de associar vesículas a cápsides virais de vírus AAV surge como uma oportunidade para a terapia génica. Os componentes do vexossoma podem incluir o vetor viral AAV com o gene de interesse, mRNA, miRNA, DNA, bem como proteínas (ver Figura 5).

Tal como já foi realizado com os vírus VIH (WILEY e GUMMULURU, 2006) e VHC (MASCIOPIENTO *et al.*, 2004), poderão ser utilizados outros vírus usados na terapia génica para serem incorporados em exossomas e, deste modo, desenvolverem-se novos veículos para a entrega de genes. Contudo, é necessário analisar o potencial imunogénico dos vexossomas em relação ao dos vetores AAV convencionais, a fim de se conhecer o impacto dos anticorpos na neutralização dos vexossomas (MAGUIRE *et al.*, 2012).

Na experiência pré-clínica, foram utilizados vexossomas, em modelos *in vitro* e *in vivo*, para o transporte e entrega de transgenes em células do ouvido interno, para a recuperação da perda de audição associada a um tipo de deficiência hereditária (GYÖRGY *et al.*, 2017). Em terapia do olho, a administração intravitreal de vexossomas em murganhos permitiu a transdução eficiente em células da retina e fotorreceptores (WASSMER *et al.*, 2017). Estes exemplos representam uma estratégia não invasiva para a utilização de exossomas na terapêutica das doenças do SNC.

8. Conclusões e perspectivas futuras

A terapêutica celular associada a exossomas é promissora e tem sido aplicada em diversas doenças neurodegenerativas, baseando-se em estratégias de manipulação de exossomas para mediar a entrega de agentes terapêuticos em células alvo através da passagem de barreiras biológicas ou pela inibição dos seus efeitos na propagação de doença.

Contudo, a grande diversidade dos mecanismos envolvidos na biogénese dos exossomas, bem como a complexidade das moléculas que transportam, constituem desafios à transposição para o uso clínico. Uma questão importante prende-se com as características únicas dos exossomas que lhes permitem diferenciarem-se de outros subgrupos de vesículas extracelulares. Neste sentido, o desenvolvimento de técnicas de purificação, análise e controlo dos processos de biogénese e encapsulação de entidades terapêuticas é urgente a fim de se conhecerem com maior detalhe as propriedades das diversas subpopulações de vesículas e os potenciais riscos biológicos tais como a transferência indesejada de material genético/proteínas ou a ativação deletéria do sistema imune. No futuro, serão necessários protocolos estandardizados, de larga escala e custo-efetivos para a produção de exossomas e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para aplicação na prática clínica. No que diz respeito às propriedades espaço-temporais e concentração, é relevante saber se os resultados dos estudos realizados em culturas de células se refletem na clínica. Relativamente à entrega de agentes terapêuticos, é fundamental identificar os mecanismos pelos quais os exossomas são internalizados por um órgão específico (MAAS, BREAKFIELD e WEAVER, 2017).

Neste trabalho, foram revistos os fundamentos que justificam a utilização promissora dos exossomas no tratamento de diversas doenças neurodegenerativas. O papel das vesículas extracelulares na comunicação entre as células do SNC, bem como nos processos fisiológicos e patológicos, abre uma janela de oportunidades para a aplicação dos exossomas em contexto clínico, o que leva a acreditar que futuramente esta estratégia estará disponível como alternativa terapêutica na abordagem às doenças do SNC.

9. Bibliografia

1. ABELS, E. R., BREAKEFIELD, X. O. - Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. **Cellular and Molecular Neurobiology**. ISSN 1573-6830. 36:3 (2016) 301–312.
2. AGGARWAL, B. B., HARIKUMAR, K. B. - Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. ISSN 1357-2725. 41:1 (2009) 40–59.
3. ALVAREZ-ERVITI, L., SEOW, Y., YIN, H., BETTS, C., LAKHAL, S., WOOD, M. - Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. **Nature Biotechnology**. ISSN 1087-0156. 29:4 (2011) 341–345.
4. ALVAREZ-ERVITI, L., SEOW, Y., SCHAPIRA, A. H., GARDINER, C., SARGENT, I., WOOD, M., COOPER, M. - Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. **Neurobiology of Disease**. ISSN 0969-9961. 42:3 (2011) 360–367.
5. EL ANDALOUSSI, S., MÄGER, I., BREAKEFIELD, X., WOOD, M. - Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**. ISSN 1474-1776. 12:5 (2013) 347–357.
6. ANGOT, E., STEINER, J., HANSEN, C., LI, J., BRUNDIN, P. - Are synucleinopathies prion-like disorders? **The Lancet Neurology**. ISSN 1474-4422. 9:11 (2010) 1128–1138.
7. ARROYO, J. D., CHEVILLETA, J., KROHA, E., RUFA, I., PRICHARD, C., GIBSON, D., MITCHELLA, P., BENNETTA, C., POGOSOVA-AGADJANYAND, E., STIREWALTD, D., TAIT, J., TEWARI, M. - Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. ISSN 0027-8424. 108:12 (2011) 5003–5008.
8. ASAI, H., IKEZU, S., TSUNODA, S., MEDALLA, M., LUEBKE, J., HAYDAR, T., WOLOZIN, B., BUTOVSKY, O., KÜGLER, S., IKEZU, T. - Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. **Nature neuroscience**. ISSN 1546-1726. 18:11 (2015) 1584–93.
9. BAIETTI, M. F., ZHANG, Z., MORTIER, E., MELCHIOR, A., DEGEEST, G., GEERAERTS, A., IVARSSON, Y., DEPOORTERE, F., COOMANS, C., VERMEIREN, E., ZIMMERMANN, P., DAVID, G. - Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes. **Nature Cell Biology**. ISSN 1465-7392. 14:7 (2012) 677–685.
10. BAKHTI, M., WINTER, C. e SIMONS, M. - Inhibition of myelin membrane sheath formation by oligodendrocyte-derived exosome-like vesicles. **Journal of Biological Chemistry**. ISSN

0021-9258. 286:1 (2011) 787–796.

11. BARTEL, D. P. - MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. **Cell**. ISSN 0092-8674. 116:2 (2004) 281–297.
12. BARTEL, D. P. - MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. **Cell**. ISSN 0092-8674. 136:2 (2009) 215–233.
13. BOBRIE, A., KRUMEICH, S., REYAL, F., RECCHI, C., MOITA, L., SEABRA, M., OSTROWSKI, M., THERY, C. - Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression. **Cancer Research**. ISSN 0008-5472. 72:19 (2012) 4920–4930.
14. BONAFEDE, R., SCAMBI, I., PERONI, D., POTRICH, V., BOSCHI, F., BENATI, D., BONETTI, B., MARIOTTI, R. - Exosome derived from murine adipose-derived stromal cells: Neuroprotective effect on in vitro model of amyotrophic lateral sclerosis. **Experimental Cell Research**. ISSN 1090-2422. 340:1 (2016) 150–158.
15. CHAI, X., DAGE, J. L., CITRON, M. - Constitutive secretion of tau protein by an unconventional mechanism. **Neurobiology of Disease**. ISSN 0969-9961. 48:3 (2012) 356–366.
16. CHALMIN, F., LADOIRE, S., MIGNOT, G., VINCENT, J., BRUCHARD, M., REMY-MARTIN, J., BOIREAU, W., ROULEAU, A., SIMON, B., LANNEAU, D., THONEL, A., MULTHOFF, G., HAMMAN, A., MARTIN, F., CHAUFFERT, B., SOLARY, E., ZITVOGEL, L., GARRIDO, C., RYFFEL, B., BORG, C., APETOH, L., RÉBÉ, C., GHIRINGHELLI, F. - Membrane associated Hsp72 from tumor derived exosomes mediates STAT3 dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid derived suppressor cells. **J. Clin. Invest.** ISSN 0021-9738. 120:2 (2010) 467–471.
17. CHEN, C. C., LIU, L., MA, F., WONG, C., GUO, X., CHACKO, J., FARHOODI, H., ZHANG, S., ZIMAK, S., SÉGALINY, A., RIAZIFAR, M., PHAM, V., DIGMAN, M., PONE, E., ZHAO, W. - Elucidation of Exosome Migration Across the Blood–Brain Barrier Model In Vitro. **Cellular and Molecular Bioengineering**. ISSN 1865-5033. 9:4 (2016) 509–529.
18. CHRISTIANSON, H. C., SVENSSON, K., KUPPEVELT, T., LI, J., BELTING, M. - Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. ISSN 0027-8424. 110:43 (2013) 17380–17385.
19. COLOMBO, M., RAPOSO, G. e THÉRY, C. - Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. **Annual review of cell and developmental biology**. ISSN 1530-8995. 30 (2014) 255–89.
20. COOPER, J. M., WIKLANDER, O., NORDIN, J., AL-SHAWI, R., WOOD, M., VITHLANI, M., SCHAPIRA, A., SIMONS, J., EL-ANDALOUSSI, S., ALVAREZ-ERVITI, L. - Systemic exosomal

- siRNA delivery reduced alpha-synuclein aggregates in brains of transgenic mice. **Movement Disorders**. ISSN 1531-8257. 29:12 (2014) 1476–1485.
21. DANZER, K., KRANICH, L., RUF, W., CAGSAL-GETKIN, O., WINSLOW, A., ZHU, L., VANDERBURG, C., MCLEAN, P. - Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers. **Molecular Neurodegeneration**. ISSN 1750-1326. 7:1 (2012) 42.
 22. DIDOT, M.-C., HALL, L., COLES, A., HARASZTI, R., GODINHO, B., CHASE, K., SAPP, E., LY, S., ALTERMAN, J., HASSLER, M., ECHEVERRIA, D., RAJ, L., MORRISSEY, D., DIFIGLIA, M., ARONIN, N., KHVOROVA, A. - Exosome-mediated Delivery of Hydrophobically Modified siRNA for Huntingtin mRNA Silencing. **Molecular Therapy**. ISSN 1525-0016. 24:10 (2016) 1836–1847.
 23. DING, X., MA, M., TENG, J., TENG, R., ZHOU, S., YIN, J., FONKEM, E., HUANG, J., WU, E., WANG, X. - Exposure to ALS-FTD-CSF generates TDP-43 aggregates in glioblastoma cells through exosomes and TNTs-like structure. **Oncotarget**. ISSN 1949-2553. 6:27 (2015) 24178–24191.
 24. DINKINS, M. B., ENASKO, J., HERNANDEZ, C., WANG, G., KONG, J., HELWA, I., LIU, Y., JR, A., BIEBERICH, E. - Neutral Sphingomyelinase-2 Deficiency Ameliorates Alzheimer’s Disease Pathology and Improves Cognition in the 5XFAD Mouse. **The Journal of Neuroscience**. ISSN 0270-6474. 36:33 (2016) 8653–8667.
 25. ESCUDIER, B., DORVAL, T., CHAPUT, N., ANDRÉ, F., CABY, M., NOVAULT, S., FLAMENT, C., LÉBOULAIRE, C., BORG, C., AMIGORENA, S., BOCCACCIO, C., BONNEROT, C., DHELLIN, O., MOVASSAGH, M., PIPERNO, S., ROBERT, C., SERRA, V., VALENTE, N., PECQ, J., SPATZ, A., LANTZ, O., TURSZ, T., ANGEVIN, E., ZITVOGEL, L. - Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. **Journal of translational medicine**. ISSN 1479-5876. 3:1 (2005) 10.
 26. FEDERICI, C., PETRUCCI, F., CAIMI, S., CESOLINI, A., LOGOZZI, M., BORGHI, M., D’LLIO, S., LUGINI, L., VIOLANTE, N., AZZARITO, T., MAJORANI, C., BRAMBILLA, D., FAIS, S. - Exosome release and low pH belong to a framework of resistance of human melanoma cells to cisplatin. **PLoS ONE**. ISSN 1932-6203. 9:2 (2014).
 27. FUHRMANN, G., SERIO, A., MAZO, M., NAIR, R., STEVENS, M. - Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins. **Journal of Controlled Release**. ISSN 1873-4995. 205 (2015) 35–44.
 28. GRAD, L. I., POKRISHEVSKY, E., SILVERMAN, J., CASHMAN, N. - Exosome-dependent and independent mechanisms are involved in prion-like transmission of propagated Cu/Zn superoxide dismutase misfolding. **Prion**. ISSN 1933-690X. 8:5 (2014) 331–5.
 29. GRANT, B. D., DONALDSON, J. G. - Pathways and mechanisms of endocytic recycling.

Nature Publishing Group. ISSN 1471-0072. 10:9 (2009) 597–608.

30. GYÖRGY, B., SAGE, C., INDZHYKULIAN, A., SCHEFFER, D., BRISSON, A., TAN, S., WU, X., VOLAK, A., MU, D., TAMVAKOLOGOS, P., LI, Y., FITZPATRICK, Z., ERICSSON, M., BREAKEFIELD, X., COREY, D., MAGUIRE, C. - Rescue of Hearing by Gene Delivery to Inner-Ear Hair Cells Using Exosome-Associated AAV. **Molecular Therapy**. ISSN 1525-0024. 25:2 (2017) 379–391.
31. GYÖRGY, B., FITZPATRICK, Z., CROMMENTUIJN, M., MU, D., MAGUIRE, C. - Naturally enveloped AAV vectors for shielding neutralizing antibodies and robust gene delivery invivo. **Biomaterials**. ISSN 1878-5905. 35:26 (2014) 7598–7609.
32. HANEY, M. J., KLYACHKO, N., ZHAO, Y., GUPTA, R., PLOTNIKOVA, E., HE, Z., PIROYAN, A., SOKOLSKY, M., KABANOV, A., BATRAKOVA, E. - Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. **Journal of Controlled Release**. ISSN 1873-4995. 207 (2015) 18–30.
33. HAQQANI, A. S., DELANEY, C., TREMBLAY, T., SODJA, C., SANDHU, J., STANIMIROVIC, D. - Method for isolation and molecular characterization of extracellular microvesicles released from brain endothelial cells. **Fluids and Barriers of the CNS**. 10:1 (2013) 4.
34. HARRIS, D. A., PATEL, S., GUCEK, M., HENDRIX, A., WESTBROEK, W., TARASKA, J. - Exosomes released from breast cancer carcinomas stimulate cell movement. **PLoS ONE**. ISSN 1932-6203. 10:3 (2015) 1–18.
35. HOWITT, J. e HILL, A. F. - Exosomes in the pathology of neurodegenerative diseases. **Journal of Biological Chemistry**. ISSN 1083-351X. 291:52 (2016) 26589–26597.
36. HSU, C., MOROHASHI, Y., YOSHIMURA, S., MANRIQUE-HOYOS, N., JUNG, S., LAUTERBACH, M., BAKHTI, M., GRØNBORG, M., MÖBIUS, W., RHEE, J., BARR, F., SIMONS, M. - Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. **Journal of Cell Biology**. ISSN 0021-9525. 189:2 (2010) 223–232.
37. HUDRY, E., MARTIN, C., GANDHI, S., GYORGY, B., SCHEFFER, D., MU, D., MERKEL, S., MINGOZZI, F., FITZPATRICK, Z., DIMANT, H., MASEK, M., RAGAN, T., TAN, S., BRISSON, A., RAMIREZ, S., HYMAN, B., MAGUIRE, C. - Exosome-associated AAV vector as a robust and convenient neuroscience tool. **Gene Therapy**. ISSN 0969-7128. 23:4 (2016) 380–92.
38. IGUCHI, Y., EID, L., PARENT, M., SOUCY, G., BAREIL, C., RIKU, Y., KAWAI, K., TAKAGI, S., YOSHIDA, M., KATSUNO, M., SOBUE, G., JULIEN, J. - Exosome secretion is a key pathway for clearance of pathological TDP-43. **Brain**. ISSN 1460-2156. 139:12 (2016) 3187–3201.
39. JEON, I., CICCHETTI, F., CISBANI, G., LEE, S., LI, E., BAE, J., LEE, N., LI, L., IM, W., KIM, M., KIM, H., OH, S., KIM, T., KO, J., AUBÉ, B., OUESLATI, A., KIM, Y., SONG, J. - Human-to-mouse prion-like propagation of mutant huntingtin protein. **Acta Neuropathologica**. ISSN 1432-

0533. 132:4 (2016) 577–592.
40. JU, S., MU, J., DOKLAND, T., ZHUANG, X., WANG, Q., JIANG, H., XIANG, X., DENG, Z., WANG, B., ZHANG, L., ROTH, M., WELTI, R., MOBLEY, J., JUN, Y., MILLER, D., ZHANG, H. - Grape Exosome-like Nanoparticles Induce Intestinal Stem Cells and Protect Mice From DSS-Induced Colitis. **Molecular Therapy**. ISSN 1525-0016. 21:7 (2013) 1345–1357.
41. KALANI, A., TYAGI, A., TYAGI, N. - Exosomes: Mediators of neurodegeneration, neuroprotection and therapeutics. **Molecular Neurobiology**. ISSN 0893-7648. 49:1 (2014) 590–600.
42. KEERTHIKUMAR, S., GANGODA, L., LIEM, M., FONSEKA, P., ATUKORALA, I., OZCITTI, C., MECHLER, A., ADDA, C., ANG, C., MATHIVANAN, S. - Proteogenomic analysis reveals exosomes are more oncogenic than ectosomes. **Oncotarget**. ISSN 1949-2553. 6:17 (2015) 15375–15396.
43. KIM, M. S., HANEY, M., ZHAO, Y., MAHAJAN, V., DEYGEN, I., KLYACHKO, N., INSKOE, E., PIROYAN, A., SOKOLSKY, OKOLIE, O., HINGTGEN, S., KABANOV, A., BATRAKOVA, E. - Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. ISSN 1549-9642. 12:3 (2016) 655–664.
44. KOOIJMANS, S., VADER, P., DOMMELEN, S., SOLINGE, W., SCHIFFELERS, R. - Exosome mimetics: A novel class of drug delivery systems. **International Journal of Nanomedicine**. ISSN 1176-9114. 7 (2012) 1525–1541.
45. KORDASIEWICZ, H. B., STANEK, L., WANCEWICZ, E., MAZUR, C., MCALONIS, M., PYTEL, K., ARTATES, J., WEISS, A., CHENG, S., SHIHABUDDIN, L., HUNG, G., BENNETT, C., CLEVELAND, D. - Sustained Therapeutic Reversal of Huntington’s Disease by Transient Repression of Huntingtin Synthesis. **Neuron**. ISSN 0896-6273. 74:6 (2012) 1031–1044.
46. LEE, M., BAN, J., KIM, K. - Adipose-derived stem cell exosomes alleviate pathology of amyotrophic lateral sclerosis in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. ISSN 1090-2104. 479:3 (2016) 434–439.
47. LEE, S., KIM, W., LI, Z., HALL, G. - Accumulation of vesicle-associated human tau in distal dendrites drives degeneration and tau secretion in an in situ cellular tauopathy model. **International Journal of Alzheimer’s Disease**. ISSN 2090-0252. 2012 (2012).
48. LIMA, L., CHAMMAS, R., MONTEIRO, R., MOREIRA, M., BARCINSKI, M. - Tumor-derived microvesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidylserine-dependent manner. **Cancer Letters**. ISSN 0304-3835. 283:2 (2009) 168–175.
49. LINDÅS, A.-C., BERNANDER, R. - The cell cycle of archaea. **Nature Reviews Microbiology**. ISSN 1740-1526. 11:9 (2013) 627–638.

50. LIU, L., DROUET, V., WU, J., WITTER, M., SMALL, S., CLELLAND, C., DUFF, K. - Trans-synaptic spread of tau pathology in vivo. **PLoS ONE**. ISSN 1932-6203. 7:2 (2012) 1–9.
51. LOPEZ-VERILLI, M. A., CAVIEDES, A., CABRERA, A., SANDOVAL, WYNEKEN, U., KHOURY, M. - Mesenchymal stem cell-derived exosomes from different sources selectively promote neuritic outgrowth. **Neuroscience**. ISSN 1873-7544. 320:February (2016) 129–139.
52. LUAN, X., SANSANAPHONGPRICHA, K., MYERS, I., CHEN, H., YUAN, H., SUN, D. - Engineering exosomes as refined biological nanoplatfoms for drug delivery. **Acta Pharmacologica Sinica**. ISSN 1671-4083. (2017) 1–10.
53. MAAS, S. L. N., BREAKEFIELD, X. O., WEAVER, A. M. - Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. **Trends in Cell Biology**. ISSN 1879-3088. 27:3 (2017) 172–188.
54. MAGUIRE, C. A., BALAJ, L., SIVARAMAN, S., CROMMENTUIJN, M., ERICSSON, M., MINCHEVA-NILSSON, L., BARANOV, V., GIANNI, D., TANNOUS, B., SENA-ESTEVEZ, M., BREAKEFIELD, X., SKOG, J. - Microvesicle-associated AAV Vector as a Novel Gene Delivery System. **Molecular Therapy**. ISSN 1525-0016. 20:5 (2012) 960–971.
55. GREY, M., DUNNING, C., GASPAR, R., GREY, C., BRUNDIN, P., SPARR, E., LINSE, S. - Acceleration of alpha-synuclein aggregation by exosomes. **Journal of Biological Chemistry**. ISSN 1083-351X. 290:5 (2015) 2969–2982.
56. MASCIOPINTO, F., GIOVANI, C., CAMPAGNOLI, S., GALLI-STAMPINO, L., COLOMBATTO, P., BRUNETTO, M., YEN, T. S., HOUGHTON, M., PILERI, P., ABRGNANI, S. - Association of hepatitis C virus envelope proteins with exosomes. **European Journal of Immunology**. ISSN 0014-2980. 34:10 (2004) 2834–2842.
57. MELO, S. A., SUGIMOTO, H., O'CONNELL, J., KATO, N., VILLANUEVA, A., VIDAL, A., QIU, L., VITKIN, E., PERELMAN, L., MELO, C., LUCCI, A., IVAN, C., CALIN, G., KALLURI, R. - Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis. **Cancer Cell**. 26:5 (2015) 707–721.
58. MINCIACCHI, V. R., FREEMAN, M. R., DI, D. - Extracellular vesicles in cancer: Exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. **Seminars in Cell and Developmental Biology**. ISSN 1084-9521. (2015) 1–11.
59. MULCAHY, L. A., PINK, R. C. e CARTER, D. R. F. - Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. **Journal of Extracellular Vesicles**. ISSN 2001-3078. 3:1 (2014) 1–14.
60. MUNAGALA, R., AQIL, F., JEYABALAN, J., GUPTA, R. - Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. **Cancer Letters**. ISSN 1872-7980. 371:1 (2016) 48–61.
61. NAZARENKO, I., RANA, S., BAUMANN, A., MCALEAR, J., HELLWIG, A., TRENDELENBURG, M., LOCHNIT, G., PREISSNER, K., ZÖLLER, M. - Cell surface tetraspanin

- Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. **Cancer Research**. ISSN 0008-5472. 70:4 (2010) 1668–1678.
62. NONAKA, T., MASUDA-SUZUKAKE, M., ARAI, T., HASEGAWA, Y., AKATSU, H., OBI, T., YOSHIDA, M., MURAYAMA, S., MANN, D., AKIYAMA, H., HASEGAWA, M. - Prion-like Properties of Pathological TDP-43 Aggregates from Diseased Brains. **Cell Reports**. ISSN 2211-1247. 4:1 (2013) 124–134.
 63. OHNO, S., TAKANASHI, M., SUDO, K., UEDA, S., ISHIKAWA, A., MATSUYAMA, N., FUJITA, K., MIZUTANI, T., OHGI, T., OCHIYA, T., GOTOH, N., KURODA, M. - Systemically Injected Exosomes Targeted to EGFR Deliver Antitumor MicroRNA to Breast Cancer Cells. **Molecular Therapy**. ISSN 1525-0016. 21:1 (2013) 185–191.
 64. PASCUCCI, L., COCCÈ, V., BONOMI, A., AMI, D., CECCARELLI, P., CIUSANI, E., VIGANÒ, L., LOCATELLI, A., SISTO, F., DOGLIA, S., PARATI, E., BERNARDO, M., MURACA, M., ALESSANDRI, G., BONDILOTTI, G., PESSINA, A. - Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: A new approach for drug delivery. **Journal of Controlled Release**. ISSN 1873-4995. 192 (2014) 262–270.
 65. PATEL, B., PATEL, J., CHO, J., MANNE, S., BONALA, S., HENSKE, E., ROEGIERS, F., MARKIEWSKI, M., KARBOWNICZEK, M. - Exosomes mediate the acquisition of the disease phenotypes by cells with normal genome in tuberous sclerosis complex. **Oncogene**. ISSN 0950-9232. 35:23 (2016) 3027–3036.
 66. PEARCE, M., SPARTZ, E., HONG, W., LUO, L., KOPITO, R. - Prion-like transmission of neuronal huntingtin aggregates to phagocytic glia in the Drosophila brain. **Nature Communications**. ISSN 2041-1723. 6 (2015) 6768.
 67. PEINADO, H., ALEČKOVIĆ, M., LAVOTSHKIN, S., MATEI, I., COSTA-SILVA, B., MORENO-BUENO, G., HERGUETA-REDONDO, M., WILLIAMS, C., GARCÍA-SANTOS, G., GHAJAR, C., NITADORI-HOSHINO, A., HOFFMAN, C., BADAL, K., GARCIA, B., CALLAHAN, M., YUAN, J., MARTINS, V., SKOG, J., KAPLAN, R., BRADY, M., WOLCHOK, J., CHAPMAN, P., KANG, Y., BROMBERG, J., LYDEN, D. - Corrigendum: Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. **Nature Medicine**. ISSN 1078-8956. 22:12 (2016) 1502–1502.
 68. PODOLAK, I., GALANTY, A. e SOBOLEWSKA, D. - Saponins as cytotoxic agents: A review. **Phytochemistry Reviews**. ISSN 1568-7767. 9:3 (2010) 425–474.
 69. POLS, M. S., KLUMPERMAN, J. - Trafficking and function of the tetraspanin CD63. **Experimental Cell Research**. ISSN 0014-4827. 315:9 (2009) 1584–1592.
 70. PUSIC, A. D., PUSIC, K., CLAYTON, B., KRAIG, R. - IFN γ -stimulated dendritic cell exosomes

- as a potential therapeutic for remyelination. **Journal of Neuroimmunology**. ISSN 0165-5728. 266:1–2 (2014) 12–23.
71. RAJENDRAN, L., HONSHO, M., ZAHN, T., KELLER, P., GEIGER, K., VERKADE, P., SIMONS, K. - Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. ISSN 0027-8424.103:30 (2006) 11172–7.
72. RANA, S., YUE, S., STADEL, D., ZÖLLER, M. - Toward tailored exosomes: The exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. ISSN 1357-2725. 44:9 (2012) 1574–1584.
73. RANI, S., RYAN, A., GRIFFIN, M., RITTER, T. - Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications. **Molecular Therapy**. ISSN 1525-0016. 23:5 (2015) 812–823.
74. RAPOSO, G., STOORVOGEL, W. - Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**. ISSN 0021-9525. 200:4 (2013) 373–383.
75. RIDDER, K., KELLER, S., DAMS, M., RUPP, A., SCHLAUDRAFF, J., TURCO, D., STARMANN, J., MACAS, J., KARPOVA, D., DEVRAJ, K., DEPBOYLU, C., LANDFRIED, B., ARNOLD, B., PLATE, K., HOGLINGER, G., SULTMANN, H., ALTEVOGT, P., MOMMA, S. - Extracellular Vesicle-Mediated Transfer of Genetic Information between the Hematopoietic System and the Brain in Response to Inflammation. **PLoS Biology**. ISSN 1545-7885. 12:6 (2014).
76. ROCHFORT, K. D., COLLINS, L., MURPHY, R., CUMMINS, P. - Downregulation of Blood-Brain Barrier Phenotype by Proinflammatory Cytokines Involves NADPH Oxidase- Dependent ROS Generation : Consequences for Interendothelial Adherens and Tight Junctions. **PLoS ONE**. 9:7 (2014).
77. SAMAN, S., KIM, W., RAYA, M., VISNICK, Y., MIRO, S., SAMAN, S., JACKSON, B., MACKEE, A., ALVAREZ, V., LEE, N., HALL, G. - Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. **Journal of Biological Chemistry**. ISSN 0021-9258. 287:6 (2012) 3842–3849.
78. SATO, Y. T., UMEZAKI, K., SAWADA, S., MUKAI, S., SASAKI, Y., HARADA, N., SHIKU, H., AKIYOSHI, K. - Engineering hybrid exosomes by membrane fusion with liposomes. **Scientific Reports**. ISSN 2045-2322. 6:1 (2016) 21933.
79. SAVINA, A., FURLÁN, M., VIDAL, M., COLOMBO, M. - Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. **Journal of Biological Chemistry**. ISSN 0021-9258. 278:22 (2003) 20083–20090.
80. SHENODA, B. B., AJIT, S. K. - Modulation of immune responses by exosomes derived from antigen-presenting cells. **Clinical Medicine Insights: Pathology**. ISSN 1179-5557. 2016

(2016) 1–8.

81. SIMÓN, D., GARCÍA-GARCÍA, E., ROYO, F., FALCÓN.PÉREZ, J., AVILA, J. - Tau overexpression results in its secretion via membrane vesicles. **Neurodegenerative Diseases**. ISSN 1660-2854. 10:1–4 (2012) 73–75.
82. SMYTH, T., PETROVA, K., PAYTON, N., PERSAUD, I., REDZIC, J., GRANER, M., SMITH-JONES, P., ANCHORDOQUY, T. - Surface functionalization of exosomes using click chemistry. **Bioconjug Chem**. 25:10 (2014) 1777–1784.
83. SORIA, F. N., PAMPLIEGA, O., BOURDENX, M., MEISSNER, W., BEZARD, E., DEHAY, B. - Exosomes, an unmasked culprit in neurodegenerative diseases. **Frontiers in Neuroscience**. ISSN 1662-453X. 11:JAN (2017) 1–12.
84. SUN, D., ZHUANG, X., XIANG, X., LIU, Y., ZHANG, S., LIU, C., BARNES, S., GRIZZLE, W., MILLER, D., ZHANG, H. - A Novel Nanoparticle Drug Delivery System: The Anti-inflammatory Activity of Curcumin Is Enhanced When Encapsulated in Exosomes. **Molecular Therapy**. ISSN 1525-0016. 18:9 (2010) 1606–1614.
85. SUTARIA, D. S., BADAWI, M., PHELPS, M., SCHMITTGEN, T. - Achieving the Promise of Therapeutic Extracellular Vesicles: The Devil is in Details of Therapeutic Loading. **Pharmaceutical Research**. ISSN 1573-904X. 34:5 (2017) 1053–1066.
86. TIAN, Y., LI, S., SONG, J., JI, T., ZHU, M., ANDERSON, G., WEI, J., NIE, G. - A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. **Biomaterials**. ISSN 0142-9612. 35:7 (2014) 2383–2390.
87. TRAJKOVIC, K., HSU, C., CHIANTIA, S., RAJENDRAN, L., WENZEL, D., WIELAND, F., SCHWILLE, P., BRÜGGER, B., SIMONS, M. - Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. **Science**. ISSN 0036-8075. 319:5867 (2008) 1244–1247.
88. VADER, P., MOL, E., PASTERKAMP, G., SCHIFFELERS, R. - Extracellular vesicles for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**. ISSN 1872-8294. 106 (2016) 148–156.
89. VICKERS, K. C., PALMISANO, B., SHOUCRI, B., SHAMBUREK, R., REMALEY, A. - MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. **Nature Cell Biology**. ISSN 1465-7392. 13:4 (2011) 423–433.
90. VICKERS, K. C., REMALEY, A. T. - Lipid-based carriers of microRNAs and intercellular communication. **Current Opinion in Lipidology**. ISSN 0957-9672. 23:2 (2012) 91–97.
91. VILLARROYA-BELTRI, C., GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, C., SÁNCHEZ-CABO, F., PÉREZ-HERNÁNDEZ, D., VÁZQUEZ, J., MARTIN-COFRECES, N., MARTINEZ-HERRERA, D., PASCUAL-MONTANO, A., MITTELBRUNN, M., SÁNCHEZ-MADRID, F. - Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. **Nature Communications**. ISSN 2041-1723. 4 (2013) 1–10.

92. WAHLGREN, J., KARLSON, T., BRISLERT, M., SANI, F., TELEMO, E., SUNNERHAGEN, P., VALADI, H. - Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes. **Nucleic Acids Research**. ISSN 0305-1048. 40:17 (2012).
93. WASSMER, S. J., CARVALHO, L., GYORGY, B., VANDENBERGHE, L., MAGUIRE, C. - Exosome-associated AAV2 vector mediates robust gene delivery into the murine retina upon intravitreal injection. **Scientific Reports**. ISSN 2045-2322. 7:February (2017) 45329.
94. WESTERGARD, T. , JENSEN, B., WEN, X., LACOVITTI, L., PASINELLI, P., TROTTI, D. - Cell-to-Cell Transmission of Dipeptide Repeat Proteins Linked to C9orf72-ALS/FTD. **Cell Reports**. ISSN 2211-1247. 17:3 (2016) 645–652.
95. WILEY, R. D., GUMMULURU, S. - Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. ISSN 0027-8424. 103:3 (2006) 738–743.
96. WILLMS, E., JOHANSSON, H., MÄGER, I., LEE, Y., BLOMBER, K., SADIK, M., ALAARG, A., SMITH, C., LEHTIÖ, J., ANDALOUSSI, S., WOOD, M., VADER, P. - Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. **Scientific Reports**. ISSN 2045-2322. 6:1 (2016) 22519.
97. WOLFERS, J., LOZIER, A., RAPOSO, G., REGNAULT, A., THÉRY, C., MASURIER, C., FLAMENT, C., POUZIEUX, S., FAURE, F., TURSZ, T., ANGEVIN, E., AMIGORENA, S., ZITVOGEL, L. - Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. **Nature medicine**. ISSN 1078-8956. 7:3 (2001) 297–303.
98. WU, X., ZHENG, T. e ZHANG, B. - Exosomes in Parkinson's Disease. **Neuroscience Bulletin**. ISSN 1995-8218. 33:3 (2017) 331–338.
99. XIN, H., LI, Y., BULLER, B., KATAKOWSKI, M., ZHANG, Y., WANG, X., SHANG, X., ZHANG, Z., CHOPP, M. - Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth. **Stem Cells**. ISSN 1066-5099. 30:7 (2012) 1556–1564.
100. XIN, H., LI, Y., CUI, Y., YANG, J., ZHANG, Z., CHOPP, M. - Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells promote functional recovery and neurovascular plasticity after stroke in rats. **Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**. ISSN 1559-7016. 33:11 (2013) 1711–5.
101. YANG, T., MARTIN, P., FOGARTY, B., BROWN, A., SCHURMAN, K., PHIPPS, R., YIN, V., LOCKMAN, P., BAI, S. - Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in Danio Rerio. **Pharmaceutical Research**. ISSN 1573-904X. 32:6 (2015) 2003–2014.

102. YUYAMA, K., SUN, H., MITSUTAKE, S., IGARASHI, Y. - Sphingolipid-modulated exosome secretion promotes clearance of amyloid- by microglia. **Journal of Biological Chemistry**. ISSN 0021-9258. 287:14 (2012) 10977–10989.
103. ZAPPULLI, V., FRIIS, K., FITZPATRICK, Z., MAGUIRE, C., BREAKFIELD, X. - Extracellular vesicles and intercellular communication within the nervous system. **Journal of Clinical Investigation**. ISSN 1558-8238. 126:4 (2016) 1198–1207.
104. ZHANG, J., LI, S., LI, L., LI, M., GUO, C., YAO, J., MI, S. - Exosome and exosomal microRNA: Trafficking, sorting, and function. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**. ISSN 2210-3244. 13:1 (2015) 17–24.
105. ZHUANG, X., XIANG, X., GRIZZLE, W., SUN, D., ZHANG, S., AXTELL, R., JU, S., MU, J., ZHANG, L., STEINMAN, L., MILLER, D., ZHANG, H. - Treatment of Brain Inflammatory Diseases by Delivering Exosome Encapsulated Anti-inflammatory Drugs From the Nasal Region to the Brain. **Molecular Therapy**. ISSN 1525-0016. 19:10 (2011) 1769–1779.
106. ZOMER, A., MAYNARD, C., VERWEIJ, F., KAMERMANS, A., SCHAFER, R., BEERLING, E., SCHIFFELERS, R., WIT, E., BERENQUER, J., ELLENBROEK, S., WURDINGER, T., PEGTEL, D., RHEENEN, J. - In vivo imaging reveals extracellular vesicle-mediated phenocopying of metastatic behavior. **Cell**. ISSN 1097-4172. 161:5 (2015) 1046–1057.

Parte II – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia de Celas
Coimbra

Lista de Abreviaturas

INFARMED I.P – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P.

IVA – Imposto de Valor Acrescentado

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MM – Medicamento manipulado

MNSRM – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

MSRM – Medicamento Sujeito a Receita Médica

RCM – Resumo das características do medicamento

PVP – Preço de Venda ao Público

SNS – Sistema Nacional e Saúde

I. Introdução

A farmácia comunitária assume um lugar preponderante no acesso do doente aos cuidados de saúde, bem como no funcionamento sustentável e completo do SNS. Hoje em dia, as funções do farmacêutico comunitário, enquanto especialista do medicamento, não se limitam à cedência do medicamento. Tendo como foco principal a pessoa do doente, o farmacêutico comunitário, no exercício da sua profissão, é responsável pelo aconselhamento e acompanhamento farmacoterapêutico, a advertência para reações adversas e interações medicamentosas, a avaliação de parâmetros bioquímicos e fisiológicos e a promoção do uso racional do medicamento através da educação para a saúde e sensibilização da população.

O estágio em farmácia comunitária representa o culminar do intenso percurso de formação do estudante de Ciências Farmacêuticas. Neste sentido, durante os meses de janeiro a abril de 2017 integrei a equipa técnica da Farmácia de Celas, sob a Direção Técnica da Dra. Cláudia Silvestre, que me permitiu desenvolver uma aprendizagem profundamente completa e enriquecedora pelas várias tarefas realizadas.

Considero que a experiência de estágio em farmácia comunitária foi essencial para a integração das competências e conhecimentos adquiridos ao longo da formação académica na prática profissional.

O presente relatório foi elaborado sob a forma de análise SWOT (*Strengths, Weaknesses Opportunities, Threats*), onde é apresentada uma abordagem crítica do meu desempenho ao longo do período de estágio, destacando os pontos fortes e fracos, a nível interno, e as oportunidades e ameaças, a nível externo.

2. Farmácia de Celas

A Farmácia de Celas localiza-se em Coimbra, na Estrada de Coselhas, junto às circulares interna e externa da cidade. O seu horário de funcionamento é, de segunda a sexta-feira, das 9:00 às 19:30, e ao sábado, das 9:00 às 13:30. A cada 20 dias, a farmácia encontra-se em horário de serviço permanente, de forma a atender às necessidades dos utentes. Relativamente aos utentes, a farmácia é frequentada por um público bastante heterogéneo, de diferentes faixas etárias e localidades, pelo que a fidelização dos utentes é um constante desafio.

No que diz respeito aos recursos humanos, a equipa da farmácia é constituída por cinco elementos, Cláudia Silvestre (Proprietária e Diretora Técnica), Catarina Moreira (Farmacêutica Adjunta Substituta), Rita Teixeira (Farmacêutica), Cristina Melo (Técnica de Farmácia) e Isabel Marques (Auxiliar). Cada elemento tem funções e responsabilidades bem

definidas para garantir o bom funcionamento da farmácia e a satisfação dos utentes. O aconselhamento farmacêutico de elevada qualidade da equipa da Farmácia de Celas está associado ao gosto pela profissão, conhecimento, formação e experiência, bem como toda a dedicação na resolução dos problemas de saúde dos utentes.

O utente pode encontrar diversos serviços farmacêuticos tais como a administração de vacinas, cessação tabágica, teste de gravidez, workshops de amamentação, avaliação da pressão arterial e nível de colesterol, bem como serviços de podologia e consultas de nutrição. Existe ainda o serviço de entrega ao domicílio para os utentes que por algum motivo estão impossibilitados de se deslocarem à farmácia. Todos os serviços farmacêuticos visam acompanhar o utente e transmitir-lhe informações importantes para a promoção da saúde e o uso correto do medicamento.

3. Análise SWOT

3.1 Pontos fortes

3.1.1 Metodologia Kaizen

A filosofia Kaizen tem por base a melhoria contínua, visando implementar metodologias que permitam uma maior agilidade e organização, a eliminação de desperdícios e o aumento da rentabilidade. A integração de toda a equipa da Farmácia de Celas neste projeto passa pela realização de pequenas reuniões com o preenchimento de um quadro dividido em atividades a decorrer, sugestões de melhoria, objetivos e resultados alcançados, constituindo um espaço de partilha de ideias e estratégias de comunicação que promovam a rentabilidade da farmácia, melhor organização do espaço e motivação da equipa. Neste sentido, todos os elementos da equipa da Farmácia de Celas estão envolvidos na melhoria através da tomada de medidas para corrigir os problemas. Uma vez que desconhecia a existência deste projeto, considero que a filosofia Kaizen foi uma mais valia para o meu estágio, na medida em que me permitiu desenvolver o meu espírito crítico.

3.1.2 Plano de estágio e processo de aprendizagem

O estágio curricular em farmácia comunitária introduz o estudante na realidade da prática farmacêutica comunitária, sendo encarado como um grande desafio, na medida em que é o momento de colocar as competências técnicas e científicas em prática. A minha aprendizagem

ao longo do estágio curricular foi gradual, tendo sido essencial a ajuda constante de toda a equipa da Farmácia de Celas que me integrou perfeitamente e me possibilitou adquirir a autonomia e confiança necessárias para a realização de um bom trabalho.

No início do estágio, comecei por conhecer os diferentes espaços da farmácia, a equipa e os serviços farmacêuticos prestados. A receção das encomendas e respetiva arrumação constituiu o meu primeiro contacto com os medicamentos e o seu local de armazenamento na farmácia. Ambas as funções são de extrema importância, na medida que exigem um controlo rigoroso dos documentos que acompanham a encomenda, estado de acondicionamento do produto, prazo de validade e preço de venda ao público (PVP), sendo que este, no caso do medicamento ser um MSRM, é fixo e regulado pelo Infarmed I.P. Caso o medicamento se trate de um MNSRM o seu preço é calculado e estabelecido pela farmácia, contemplando a margem de lucro e o IVA. Ao proceder à arrumação, fui assimilando os produtos do inventário da farmácia, nomeadamente as categorias expostas ao utente na sala de atendimento.

Procurei ocupar os momentos em que estava menos ocupada a consultar a informação e documentação disponível na farmácia, nomeadamente protocolos de intervenção farmacêutica sobre as medidas farmacológicas e não farmacológicas adequadas a cada patologia.

Relativamente ao atendimento, fui acompanhando o atendimento ao utente feito pelos elementos da equipa, estando particularmente atenta à comunicação farmacêutico-utente e ao modo de funcionamento do sistema Sifarma. Após estar familiarizada com toda a dinâmica do atendimento ao utente, dispensa do medicamento e transmissão de informações do uso correto do mesmo, passei para o atendimento ao utente, sempre com a supervisão de um elemento da equipa. O apoio por parte da equipa quando surgiam dificuldades no processamento da receita ou no aconselhamento ao utente foi uma grande ajuda para que, ao longo do tempo, fosse adquirindo a autonomia e confiança necessárias para realizar um correto atendimento, centrado na pessoa do doente e nas suas necessidades.

Os casos clínicos que se seguem correspondem a situações que me confrontei no decurso do estágio e que realçam a importância do correto aconselhamento farmacêutico:

I. Tratamento da varicela em pediatria

Um utente de aproximadamente 35 anos deslocou-se à Farmácia de Celas para comprar Zovirax (aciclovir) suspensão oral, fazendo-se acompanhar da respetiva receita médica, afirmando que o medicamento se destinava ao filho de 4 anos. Após perguntar ao senhor o peso da criança, consultei o RCM do medicamento e indiquei a posologia

recomendada pelo médico prescritor. Ao avaliar a situação, alertei o utente para a possibilidade da criança desenvolver febre, temperatura axilar superior a 37,2°C ou rectal superior a 37,6°C, na medida em que a varicela é uma infeção que frequentemente origina estados febris. Uma vez que a maioria dos estados febris são autolimitados, expliquei ao utente as medidas não farmacológicas como a utilização de roupas ligeiras e a ingestão de líquidos, de forma a repor as perdas por transpiração e prevenir a desidratação da criança. Do mesmo modo, indiquei ao doente a administração ao filho de paracetamol, em xarope, para baixar a febre. De imediato, o utente solicitou um frasco de xarope de paracetamol para estar prevenido e agradeceu toda a atenção dispensada.

II. Tratamento da secura ocular

Uma senhora com cerca de 50 anos dirigiu-se à Farmácia de Celas, solicitando Edolfene (flurbiprofeno) colírio, referindo que um familiar seu costumava usar as referidas gotas para os olhos. Ao questionar a utente sobre a existência de dor, visão turva ou sensibilidade ao nível ocular, a senhora respondeu apenas que ultimamente sentia ardor, irritação e desconforto nos olhos. Neste sentido, informei a senhora de que o medicamento solicitado era um anti-inflamatório, sujeito a receita médica e que, de acordo com os sinais apresentados, não era o medicamento indicado para a situação em causa: secura ocular. Assim, após pedir opinião a uma farmacêutica, indiquei à utente o dispositivo médico Bepanthe gotas oftálmicas (hialuronato de sódio e dexpanthenol) indicado na secura ocular, aplicando 1 gota em cada olho, 3 a 5 vezes ao dia. Adicionalmente aconselhei a utente sobre o modo correto de aplicar as gotas nos olhos, tendo especial atenção aos cuidados de higiene.

Durante o meu estágio na Farmácia de Celas desempenhei diferentes tarefas, incluindo a preparação de alguns MM, a verificação da entrada e saída de medicamentos psicotrópicos, a regularização de devoluções e a conferência do receituário, em que me foram explicados os elementos-chave necessários à validação e aceitação das receitas pelo Estado, bem como os subsistemas de saúde e regimes de partilha. Com o intuito de melhorar a gestão de stocks, colaborei também na contagem física e no controlo rigoroso do prazo de validade dos medicamentos e produtos de saúde, contribuindo para a minha aprendizagem dado o constante contacto com os nomes comerciais dos medicamentos.

3.1.3 Formação contínua

Paralelamente a todo o processo de aprendizagem dentro da farmácia, estive presente

em várias formações, dinamizadas pelas empresas farmacêuticas, que contribuíram para adquirir maior domínio nas características de determinado medicamento ou produto de saúde e, assim, comunicar e informar melhor o doente. Todas as formações que tive oportunidade de assistir foram muito importantes para adquirir conhecimentos em áreas como os medicamentos de uso veterinário, colírios e gotas auriculares, dermocosmética e puericultura.

3.1.4 Dinamização da farmácia

A Farmácia de Celas procura explorar diferentes estratégias para rentabilizar todos os recursos e oportunidades de mercado, de forma a despertar a atenção do utente. A renovação constante do espaço de atendimento e da montra, realização de campanhas de divulgação de novos produtos e a presença ativa na rede social *Facebook* promovem a aproximação dos utentes à Farmácia de Celas.

Durante o meu estágio curricular, acompanhei a alteração do espaço da farmácia com o objetivo de identificar as diferentes secções da farmácia e organizar os lineares por categorias, a fim de melhorar a disposição e proporcionar ao utente uma escolha mais fácil, indo de encontro às suas necessidades. Neste sentido e a título de exemplo, no linear da higiene buco-dentária, os produtos que anteriormente estavam dispostos por marca comercial, foram organizados de acordo com os diferentes problemas de higiene oral, tornando-se mais visível para o utente o problema de saúde para o qual está indicado cada produto e mais ágil para o farmacêutico no momento do aconselhamento.

3.1.5 Localização

A Farmácia de Celas encontra-se num local privilegiado, à entrada da cidade de Coimbra e próximo das unidades hospitalares Idealmed, Hospital Pediátrico e Hospitais da Universidade de Coimbra, pelo que a população da farmácia é muito heterogénea, surgindo situações muito distintas no dia-a-dia da farmácia. A proximidade da Farmácia de Celas ao seu principal distribuidor PLURAL CRL torna possível o rápido acesso ao medicamento numa situação de rutura de stock.

3.1.6 Equipa

A Farmácia de Celas é constituída por uma equipa muito competente, dedicada e dinâmica, destacando-se pelo seu espírito de entreatajuda e cooperação. O profissionalismo e a entrega à profissão estão associados a um serviço de excelência, tendo como prioridade o

doente e as suas necessidades. O ambiente acolhedor e a boa disposição de todos os elementos foi essencial para a minha integração na equipa, bem como toda a disponibilidade para esclarecer questões e ajuda nas dificuldades que iam surgindo durante o estágio.

3.1.7 Medicamentos manipulados

A preparação e dispensa de MM, embora cada vez em menor número, ainda é uma realidade na Farmácia de Celas. Como parte da gestão da qualidade, fui responsável pela informatização das fichas de preparação dos MM que periodicamente são preparados na farmácia. Esta ferramenta informática torna possível agilizar o preenchimento do documento com a informação necessária sobre o doente, as matérias primas e quantidades, bem como o cálculo do preço de custo do MM. Relativamente à preparação de medicamentos, acompanhei os membros da equipa responsáveis pela preparação de várias formulações tais como suspensões, cápsulas e pomadas. Assim, todo o processo de preparação foi-me explicado, desde o controlo de qualidade e registo, acondicionamento e rotulagem, bem como a consulta de bibliografia sobre a preparação de MM, uma vez que é responsabilidade do farmacêutico garantir a qualidade da preparação. Tive a oportunidade de preparar alguns medicamentos de uso pediátrico, nomeadamente suspensões orais e pomadas, tendo aplicado os ensinamentos das unidades curriculares de Farmácia Galénica e Tecnologia Farmacêutica.

3.1.8 Sistema Sifarma e Receituário

O Sifarma 2000 é o sistema informático implementado na Farmácia de Celas, constituindo uma ferramenta de elevada utilidade para o farmacêutico, na medida em que apresenta uma grande variedade de funcionalidades. Relativamente ao aconselhamento farmacêutico, este sistema informático permite consultar informações como a posologia de determinado medicamento, reações adversas e interações medicamentosas. Neste sentido, permite prestar um correto acompanhamento farmacêutico na medida em que possibilita criar uma ficha para cada utente, visualizar o seu histórico de medicação e registar informações como o perfil comercial do utente que incentivam a comunicação e intervenção no atendimento. No que diz respeito à gestão diária da farmácia, o sistema informático permite avaliar o stock, consultar estatísticas, fazer a receção de encomendas e devolução de produtos, consultar listas de controlo de prazos de validade e rotação de stock, faturação, gestão do receituário, emissão de verbetes, entre outras funções.

Atualmente, o receituário encontra-se numa fase de transição, dado que foi introduzida a receita desmaterializada, isto é, receita sem papel, como modo de prescrição eletrónica, que

se baseia exclusivamente na comunicação eletrónica de dados. Deste modo, a conferência do receituário torna-se mais fácil uma vez que a quantidade de receitas para conferir é bastante menor. A receita sem papel é igualmente vantajosa para o utente que, no ato da dispensa, pode optar por aviar todos os medicamentos prescritos ou apenas uma parte, sendo possível comprar os restantes medicamentos numa outra data ou farmácia.

3.2 Pontos fracos

3.2.1 Contacto reduzido com os nomes comerciais dos medicamentos

Uma das maiores dificuldades sentidas no início do atendimento ao público foi a associação do nome comercial do medicamento à(s) substância(s) ativa(s). Foram várias as situações em que o utente solicitava determinado medicamento, mencionando o nome comercial, que não me era familiar, pelo que tinha de recorrer a um elemento da equipa ou ao Sifarma para pesquisar e reconhecer o medicamento referido pelo doente. Considero que esta lacuna se deve essencialmente ao reduzido contacto com os nomes comerciais dos medicamentos ao longo da formação do MICF.

3.2.2 Relação entre a formação académica e a prática profissional

Durante o estágio curricular, deparei-me com algumas situações em que senti limitações no aconselhamento ao doente sobre os medicamentos de uso oftálmico e afeções oculares, suplementos alimentares, dietética, medicamentos de uso veterinário e produtos de saúde utilizados na população pediátrica. Estas são áreas de elevada importância na farmácia na medida em que todos os dias os farmacêuticos comunitários são confrontados com questões deste âmbito, sendo essencial ter um bom conhecimento das alternativas terapêuticas disponíveis na farmácia. O auxílio de toda a equipa da Farmácia de Celas bem como as formações foram fundamentais para aumentar o meu conhecimento. Considero que algumas unidades curriculares do MICF deveriam ser reestruturadas, no sentido dos respetivos conteúdos serem melhor adaptados à realidade da farmácia comunitária.

3.3 Oportunidades

3.3.1 Organização de eventos temáticos

A organização de eventos temáticos no âmbito da nutrição com superalimentos possibilitou-me aprender as diferentes alternativas que estão disponíveis, associadas a uma alimentação saudável, para promoção do bem-estar. Do mesmo modo, foram organizados outros eventos que me proporcionaram conhecer melhor os produtos de saúde da farmácia, nomeadamente na área da dermocosmética, para informar melhor o utente.

3.3.2 Serviços farmacêuticos

Atualmente, na Farmácia de Celas, estão disponíveis serviços farmacêuticos que permitem satisfazer as necessidades dos utentes e ajudá-los em diversas áreas da saúde: administração de vacinas, cessação tabágica, teste de gravidez, workshops de amamentação, avaliação da pressão arterial e nível de colesterol, serviço de podologia e consulta de nutrição. Deste modo, os serviços farmacêuticos atuam como uma oportunidade para o farmacêutico, enquanto agente de saúde pública, intervir e educar o utente no que respeita à terapêutica e medidas não farmacológicas.

Ao longo do meu período de estágio, tive a oportunidade de realizar a medição da pressão arterial, frequência cardíaca e glicémia. A monitorização destes parâmetros bioquímicos é importante na medida em que avalia a adesão à terapêutica e a sua eficácia.

Os serviços farmacêuticos permitem aproximar e envolver vários profissionais de saúde, tais como enfermeiros, nutricionistas e médicos, todos com um objetivo comum: proporcionar ao doente um serviço de qualidade para melhorar o seu bem-estar.

3.3.3 Cartão Saúde

O cartão Saúde pode ser utilizado na Farmácia de Celas, farmácia aderente ao programa Saúde das Farmácias Portuguesas. Neste sentido, o cartão Saúde permite ao utente acumular pontos no cartão no ato da compra, em função de 1 ponto por cada euro, exceto em MSRM. Os pontos podem ser rebatidos em produtos e serviços que constam do catálogo de pontos e ainda em vales de dinheiro que podem ser utilizados em compras na farmácia. Desta forma, o cartão Saúde constitui uma oportunidade para aproximar e fidelizar o utente à Farmácia de Celas, na medida em que, ao explicar a dinâmica do cartão ao utente, este fica informado de quais os produtos disponíveis na Farmácia de Celas que pode trocar pelos pontos.

Durante o meu estágio curricular, o cartão Saúde foi uma ferramenta de grande utilidade na intervenção farmacêutica para complementar a visita do utente à farmácia, uma vez que em várias situações foi possível oferecer um produto de saúde ao utente de acordo com as suas necessidades e, por vezes, relacionado com a razão da sua ida à Farmácia de Celas.

3.3.4 Diversidade de utentes

A Farmácia de Celas caracteriza-se por ter uma população bastante diversificada, constituída por pessoas de diferentes faixas etárias e contextos socioculturais, nomeadamente por ser uma farmácia de passagem para os utentes que vão às consultas das unidades de saúde vizinhas. Deste modo, no decorrer do estágio, tive a oportunidade de contactar com situações muito distintas e particulares que foram fundamentais para a minha evolução. Do mesmo modo, os utentes residentes da zona onde a Farmácia de Celas está inserida possuem elevada confiança na equipa da farmácia, sendo que muitas vezes os utentes procuravam esclarecer questões relacionadas com as consultas e com o medicamento, respeitando e valorizando o papel do farmacêutico enquanto profissional de saúde.

3.3.5 Valormed

A existência do contentor da Valormed, entidade responsável pela recolha e tratamento de resíduos e embalagens de medicamentos fora de uso, permitiu-me promover o correto encaminhamento dos medicamentos fora de validade ou que o utente já não utiliza, bem como sensibilizar a população para a sustentabilidade ambiental.

3.3.6 Adequação da formação do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas à prática profissional

O MICF determina a preparação dos futuros farmacêuticos em duas etapas, curricular e estágio, separadas e sequenciais. De modo a potenciar a formação na profissão farmacêutica, considero que o início da segunda etapa se deveria encontrar mais próximo da primeira, no sentido de aproximar e adequar os conteúdos abordados nas unidades curriculares à prática profissional. Desta forma, as limitações sentidas no aconselhamento ao doente já referidas neste relatório poderão ser colmatadas.

3.4 Ameaças

3.4.1 Grandes superfícies comerciais

A liberalização do mercado dos MNSRM autoriza a venda deste tipo de medicamentos fora das farmácias, em parafarmácias e estabelecimentos nas grandes superfícies comerciais, sendo que o regime de preços praticado é um regime livre. Neste sentido, verifica-se que, pelo facto de nas grandes superfícies comerciais serem negociados melhores descontos comerciais, os preços de muitos MNSRM são inferiores, relativamente às farmácias. Por outro lado, neste tipo de estabelecimentos, por vezes, é feito um aconselhamento por indivíduos sem formação adequada e qualificada. Um incorreto aconselhamento na automedicação pode ter sérias consequências para o doente, nomeadamente o agravamento de um problema de saúde ou efeitos secundários resultantes de interações medicamentosas.

Adicionalmente, a venda de produtos de saúde de venda livre tais como medicamentos de uso veterinário, dermocosméticos e puericultura fora das farmácias põem em causa a sustentabilidade das farmácias. Hoje em dia, grande parte da rentabilidade das farmácias traduz-se na venda deste tipo de produtos de saúde, uma vez que o preço dos MSRM está em constante atualização.

3.4.2 Conjuntura atual do setor farmacêutico

Nos últimos anos, o agravamento da situação económica portuguesa levou a uma alteração profunda da realidade da farmácia comunitária. As alterações legislativas implementadas, nomeadamente a liberalização da propriedade, a venda de MNSRM fora da farmácia, as reduções de preços e estreitamento das margens, colocam em risco a sustentabilidade das farmácias.

Paralelamente, a perda de poder económico das famílias leva a que, nalgumas situações, apesar do farmacêutico explicar ao utente a importância de uma terapêutica completa, o utente tenha de optar por um medicamento em detrimento de outros, traduzindo-se em falhas de adesão à terapêutica.

Neste sentido, é imperativo responder às dificuldades e assumir uma participação mais ativa na diferenciação da atividade farmacêutica e na monitorização e prevenção da saúde da população, nomeadamente o aumento da prestação de serviços. O serviço farmacêutico traduz poupança ao nível do sistema de saúde, na medida em que evita idas desnecessárias às urgências hospitalares e promove a eficácia e segurança das terapêuticas.

3.4.3 Rutura de stocks

Durante o período de estágio, existiram situações de rutura de stock, particularmente de medicamentos esgotados nos armazenistas e de produtos de baixa rotação. Apesar da rápida capacidade da Farmácia de Celas em satisfazer os pedidos dos utentes, muitas vezes até no próprio dia, estas situações podem provocar descontentamento por parte dos utentes, uma vez que a única alternativa que têm é aguardar pela reposição de stock do medicamento de que necessitam.

3.4.4 Desvalorização do medicamento genérico

Ao longo do estágio, fui depreendendo que uma parte da população considera que o medicamento genérico tem uma qualidade inferior ao medicamento original, pelo que, em muitas situações, o utente opta pelo medicamento de marca, apesar da informação transmitida relativamente à bioequivalência, biodisponibilidade, qualidade e segurança do medicamento genérico. Neste sentido, a escolha do medicamento de marca em detrimento do genérico significa menores benefícios económicos individuais e para o SNS, resultando num impacto negativo no acesso dos cidadãos a tratamentos inovadores. O farmacêutico comunitário tem um papel crucial na educação do doente e esclarecimento de noções erradas para que o utente esteja bem informado.

4. Considerações finais

Terminado o estágio em farmácia comunitária, posso concluir que adquiri uma visão integrada do modo de funcionamento da farmácia, bem como da importância do papel do farmacêutico, como profissional de saúde em quem os doentes podem confiar no aconselhamento para a resolução dos seus problemas de saúde ou, por vezes, apenas na partilha de uma palavra de consolo. A comunicação adequada e personalizada é essencial pois só assim é possível perceber as necessidades do doente e prestar uma intervenção farmacêutica de qualidade, incluindo a promoção do uso racional do medicamento, a identificação precoce de sinais de alerta e a sensibilização da população para a promoção da saúde. Do mesmo modo, é fundamental a atualização dos conhecimentos, de acordo com a evolução do setor farmacêutico, para sermos profissionais mais informados.

Apesar do receio inicial, a experiência de estágio na Farmácia de Celas superou todas as minhas expectativas. Considero que o meu percurso na farmácia foi extremamente

enriquecedor, uma vez que me permitiu desenvolver autonomia, responsabilidade e visão crítica necessárias para a construção do meu futuro profissional. O aconselhamento farmacêutico foi a função de maior realização pessoal, devido ao contacto com os doentes, à aprendizagem em cada atendimento e à sensação de contribuir para o bem-estar do utente.

Por fim, quero agradecer a toda a equipa da Farmácia de Celas pela amizade, ajuda, ensinamentos e valores transmitidos que foram imprescindíveis para o meu crescimento tanto a nível pessoal como profissional. Certamente a resiliência, a dedicação e motivação para fazer sempre mais e melhor são vitais para realizarmos um bom trabalho e atingirmos os nossos objetivos.

5. Bibliografia

1. Ordem dos Farmacêuticos - **Modelo de Competências Farmacêuticas**. [Em linha]. [Consult. 22 jul. 2017]. Disponível em www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/fc_975194071595bc9d3b6579.pdf
2. Ordem dos Farmacêuticos - **Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos**. [Em linha]. [Consult. 22 jul. 2017] Disponível em www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/codigo_deontologico_da_of_4436676175988472c14020.pdf.
3. Kaizen Institute - **Missão do Kaizen Institute**. [Em linha]. [Consult. 22 jul. 2017] Disponível em pt.kaizen.com/home.html.
4. **Nova Receita Eletrónica**. [Em linha]. [Consult. 22 jul. 2017]. Disponível em www.receitaelectronica.pt/#/beneficios
5. **Resumo das Características do Medicamento – Edolfene**. [Em linha]. [Consult. 23 jul. 2017]. Disponível em app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=2925&tipo_doc=rcm
6. **Resumo das Características do Medicamento - Zovirax suspensão oral**. [Em linha]. [Consult. 23 jul. 2017]. Disponível em app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=9511&tipo_doc=rcm
7. **Resumo das Características do Medicamento - Ben-u-ron 40 mg/ml xarope**. [Em linha]. [Consult. 23 jul. 2017]. Disponível em: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=891&tipo_doc=rcm
8. **Serviços partilhados do Ministério da Saúde - Receita Sem Papel**. [Em linha]. [Consult. 23 jul. 2017]. Disponível em spms.min-saude.pt/product/receita-sem-papel/

Parte III – Relatório de Estágio na Direção de Gestão do Risco de Medicamentos

Autoridade Nacional de Medicamentos e Produtos de
Saúde I.P.

Lista de Abreviaturas

- AIM - Autorização de Introdução no Mercado
- CHMP - Comité dos Medicamentos de Uso Humano
- CMDh – Grupo de coordenação para procedimentos por reconhecimento mútuo e descentralizados
- CIMI - Centro de Informação do Medicamento e Produtos de Saúde
- DAM - Direção de Avaliação de Medicamentos
- DATS - Direção de Avaliação de Tecnologias de Saúde
- DCQ - Direção de Comprovação da Qualidade
- DGIC - Direção de Gestão de Informação e Comunicação
- DGRM - Direção de Gestão do Risco de Medicamentos
- DHPC – Comunicações dirigidas aos profissionais de saúde
- DIL - Direção de Inspeção e Licenciamento
- DIPE - Direção de Informação e Planeamento Estratégico
- DPS - Direção de Produtos de Saúde
- DRHFP - Direção de Recursos Humanos, Financeiros e Patrimoniais
- DSTI - Direção de Sistemas e Tecnologias de Informação
- EM - Estado-Membro
- EMA - European Medicines Agency
- GVP – Good Pharmacovigilance Practices (Boas práticas em farmacovigilância)
- MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
- OF – Ordem dos Farmacêuticos
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- PASS - Estudo de segurança pós-autorização
- PRAC - Comité de Avaliação do Risco em Farmacovigilância
- PGR – Plano de Gestão de Risco
- RPS - Relatório Periódico de Segurança
- RAM – Reação Adversa a Medicamentos
- RCM - Resumo das Características do Medicamento
- SGQ – Sistema de Gestão da Qualidade
- SNF – Sistema Nacional de Farmacovigilância
- UE – União Europeia
- UNAVE - Associação para a Formação Profissional e Investigação da Universidade de Aveiro

I. Introdução

A farmacovigilância assume um papel fundamental na proteção da população e da Saúde Pública, visando monitorizar a segurança dos medicamentos, nomeadamente através da deteção, avaliação e prevenção de reações adversas a medicamentos.

Atualmente, o crescente desenvolvimento de novas terapêuticas e a necessidade de colocar à disposição do doente e dos profissionais de saúde medicamentos mais específicos, exigem a existência de meios mais sofisticados para monitorizar a sua utilização, por forma a assegurar que os seus riscos não ultrapassam os benefícios.

O Infarmed, em articulação com os profissionais de saúde, doentes, indústria farmacêutica e instituições europeias e internacionais, desenvolve uma intensa atividade na vigilância contínua dos medicamentos e na gestão dos riscos associados à sua utilização, bem como na implementação de medidas de minimização dos riscos e na sua comunicação aos profissionais de saúde, doentes e cidadãos em geral.

O presente relatório de estágio começa por apresentar o Infarmed, I.P., a DGRM e a farmacovigilância, com o intuito de contextualizar o trabalho desenvolvido ao longo de três meses nesta direção. Posteriormente, é feita uma exposição do plano de estágio, bem como das funções que me foram delegadas, seguindo-se uma análise crítica ao estágio curricular, na forma de análise SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*.

2. Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P. – Infarmed, I.P.

A Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P., abreviadamente designado por Infarmed, constitui um instituto público integrado na administração indireta do Estado Português, dotado de autonomia administrativa, financeira e património próprio. Tem por missão *regular e supervisionar os setores dos medicamentos, dispositivos médicos e produtos cosméticos e de higiene corporal, de acordo com os mais elevados padrões de proteção da saúde pública, e garantir o acesso dos profissionais de saúde e cidadãos a medicamentos, dispositivos médicos e produtos cosméticos e de higiene corporal de qualidade, eficazes e seguros*. Enquanto entidade reguladora, o Infarmed atua em múltiplas áreas de intervenção, nomeadamente na regulamentação, avaliação, autorização, fiscalização e vigilância da investigação, produção, distribuição, comercialização e utilização dos medicamentos, dispositivos médicos e produtos de saúde. Adicionalmente, possui um papel ativo no desenvolvimento de políticas que

garantam aos profissionais de saúde e aos cidadãos o acesso aos medicamentos e a todas as informações necessária à utilização racional dos mesmos.

A organização interna do Infarmed é composta por um conjunto de unidades orgânicas, divididas de acordo com funções de negócio e de suporte. São unidades orgânicas com funções de negócio: Direção de Avaliação de Medicamentos (DAM); Direção de Gestão do Risco de Medicamentos (DGRM); Direção de Produtos de Saúde (DPS); Direção de Inspeção e Licenciamentos (DIL); Direção de Comprovação da Qualidade (DCQ); Direção de Avaliação das Tecnologias de Saúde (DATS); Direção de Gestão de Informação e Comunicação (DGIC) e Direção de Informação e Planeamento Estratégico (DIPE). As quatro unidades orgânicas que apresentam funções de suporte ao instituto são: Direção de Sistemas e Tecnologias de Informação (DSTI); Direção de Recursos Humanos, Financeiros e Patrimoniais (DRHFP); Gabinete de Planeamento e Qualidade (GPQ); Gabinete Jurídico e de Contencioso (GJC). Fazem igualmente parte da estrutura do Infarmed os seguintes órgãos: Conselho Diretivo; Fiscal Único; Conselho Consultivo; Comissões Técnicas Especializadas e Conselho Nacional de Publicidade de Medicamentos e Produtos de Saúde.

3. Farmacovigilância

De acordo com a definição da OMS de 2003, farmacovigilância é a ciência e as atividades que se relacionam com a deteção, a avaliação, a compreensão e a prevenção das reações adversas ou de qualquer problema que se relacione com fármacos. Numa perspetiva regulamentar, a farmacovigilância assume-se como a atividade desenvolvida com o objetivo de possibilitar a identificação e investigação de problemas de segurança relacionados com medicamentos, de uma forma rápida e efetiva, bem como a implementação de medidas consideradas adequadas para proteção da Saúde Pública.

O pressuposto de que os medicamentos não são totalmente isentos de riscos já é conhecido desde a antiguidade e tem vindo a adquirir cada vez mais importância com a descoberta e o desenvolvimento de novos medicamentos. Foram necessários grandes acidentes, dos quais se destaca o desastre da Talidomida, na década de 60, que consistiu na ocorrência de milhares de casos de focomélica em crianças que tinham sido expostas ao medicamento durante a gestação, para despertar a atenção da comunidade científica e da população para necessidade de monitorizar a segurança dos medicamentos, após estes serem colocados no mercado.

Durante a investigação e o desenvolvimento de um novo fármaco, os ensaios clínicos realizados apresentam grandes limitações, nomeadamente o reduzido número de indivíduos

expostos ao medicamento, a exclusão de diversas patologias e medicação concomitante, bem como a reduzida inclusão de determinados grupos de doentes, como grávidas, crianças e idosos. Deste modo, não é possível conhecer detalhadamente o perfil de segurança do medicamento antes da sua entrada no mercado e utilização na prática clínica. Assim, as atividades da farmacovigilância são indispensáveis para a monitorização da segurança dos medicamentos aquando da sua utilização em grupos de doentes nos quais não foram estudados e em condições bastante diferentes do ambiente experimental. Neste sentido, foram criados sistemas de deteção, registo e avaliação de possíveis reações adversas associadas a medicamentos, para prevenir a sua ocorrência e minimizar os seus efeitos para a população.

Em Portugal, o SNF foi criado em 1992, na sequência da adesão de Portugal à Comunidade Económica Europeia. Ao longo dos anos, o SNF tem sofrido algumas alterações com vista a melhorar o seu desempenho, sendo que, atualmente, é constituído pela DGRM, responsável pela sua coordenação, e por oito Unidades Regionais de Farmacovigilância (URF): Infarmed, Guimarães, Porto, Centro, Beira Interior, Lisboa, Setúbal e Santarém, Alentejo e Algarve. Cada URF promove ações de formação junto dos notificadores e avalia as notificações de RAM das respetivas áreas geográficas. Os casos de RAM ocorridos nos Açores e na Madeira, bem como os casos ocorridos nalguns concelhos do distrito de Lisboa e Leiria são processados no Infarmed, pela DGRM.

O Sistema de Notificação Espontânea é uma metodologia utilizada em farmacovigilância que permite a geração de sinais e a formulação de hipóteses sobre possíveis efeitos adversos estarem associados à utilização de medicamentos. Desta forma, os profissionais de saúde, doentes e indústria farmacêutica têm o dever de notificar à autoridade regulamentar as RAM observadas no decorrer da prática clínica. Existem quatro critérios mínimos para uma notificação ser considerada válida: uma reação adversa, um medicamento suspeito, um doente (iniciais, idade, sexo) e um notificador (nome, contacto). O processamento das notificações corresponde à receção, validação, análise técnico-científica, pedido de dados adicionais, imputação de causalidade e tratamento da informação para a tomada de decisões. Durante todo este processo, a confidencialidade dos dados do doente é mantida. A informação relativa às notificações de RAM é enviada periodicamente aos titulares de AIM, à EMA e ainda à OMS, no âmbito do Programa Internacional de Monitorização de Fármacos. Desta forma, a notificação espontânea de RAM contribui para a deteção precoce de RAMs ainda não identificadas, a identificação de grupos de risco e a monitorização contínua de dados de segurança.

Para além do sistema de notificação espontânea, existem medidas complementares de vigilância que permitem à autoridade regulamentar obter informações sobre o perfil de

segurança dos medicamentos e proceder à avaliação da relação benefício-risco. Os RPS, elaborados pelos titulares de AIM, contêm a informação de segurança cumulativa disponível a nível mundial referente a uma substância ativa, juntamente com a avaliação científica dos riscos e benefícios, num período de tempo específico. A avaliação única dos RPS a nível europeu (PSUSA) constitui a avaliação conjunta dos diferentes medicamentos para uso humano que possuam a mesma substância ativa ou a mesma combinação de substâncias ativas por um único estado membro, que partilha a sua avaliação com os restantes estados membros.

Uma das principais ferramentas da farmacovigilância são os PGR, elaborados pelos titulares de AIM e definidos como o conjunto de atividades para identificar, caracterizar, prevenir e minimizar o risco associado à utilização de um medicamento, bem como avaliar a eficácia das intervenções propostas. Deste modo, é feita uma síntese dos riscos identificados importantes, riscos potenciais importantes, informação em falta e populações especiais e pode ser estabelecido um plano de farmacovigilância (atividades de rotina ou adicionais, como um PASS), bem como um plano de minimização do risco que pode contemplar medidas de minimização de risco de rotina (alteração do estatuto legal do medicamento, embalagem, rotulagem, folheto informativo ou RCM), aplicáveis a todos os medicamentos, ou adicionais (materiais educacionais, programas educacionais, listas de verificação para prescritores, programas de prevenção da gravidez, comunicações dirigidas aos profissionais de saúde) em situações excecionais.

Quando as atividades de farmacovigilância de rotina não são suficientes para caracterizar o risco, é necessário recorrer a estudos de segurança pós-autorização (PASS). Um estudo PASS tem como objetivo identificar, caracterizar ou quantificar um risco de segurança, confirmar o perfil de segurança do medicamento ou medir a eficácia das medidas adicionais de minimização de risco. A realização de um estudo PASS por parte do titular de AIM pode ser voluntária ou por imposição da autoridade competente.

Todas as fontes de informação supramencionadas servem de suporte à tomada de decisões que pode resultar na revogação ou suspensão da AIM do medicamento, restrições de utilização, alteração de segurança aos termos da AIM ou divulgação de informação aos profissionais de saúde.

O Comité de Avaliação do Risco em Farmacovigilância (PRAC) é constituído por membros dos Estados Membros da UE, peritos nomeados pela Comissão Europeia, bem como representantes de profissionais de saúde e de associações de doentes. Este comité é responsável pela avaliação de todos os aspetos da gestão do risco de medicamentos de uso humano, incluindo a deteção, avaliação, minimização e comunicação relacionados com o risco de ocorrência de RAM. Na sequência dessa avaliação, são emitidas recomendações que,

posteriormente, são consideradas pelo Comité dos Medicamentos de Uso Humano (CHMP), no caso de se adotarem opiniões relativas a medicamentos autorizados através de procedimento centralizado, ou pelo Grupo de Coordenação (CMDh), quando é necessário adotar uma posição sobre a utilização de medicamentos autorizados por procedimentos de reconhecimento mútuo, descentralizados ou puramente nacionais nos Estados Membros.

A estratégia para a farmacovigilância, a nível nacional, assenta no desenvolvimento e robustecimento do SNF, nomeadamente com o objetivo de reforçar a relação de parceria entre a DGRM e as URF, promover a proximidade com o notificador e aumentar a proatividade do SNF. A nível europeu, é necessário reforçar continuamente o posicionamento do Infarmed.

4. O Estágio Curricular na Direção de Gestão do Risco de Medicamentos

A DGRM é constituída por quatro equipas coordenadas pela Diretora de Direção, Fátima Canedo: equipa de gestão do sinal, equipa de gestão do risco, equipa de gestão de notificações de RAM dos profissionais de saúde e doentes e equipa de gestão de notificações de RAM dos titulares de AIM.

O meu estágio na DGRM iniciou-se com uma sessão de acolhimento dinamizada pela DRHFP, em que foi feita uma apresentação geral do Infarmed, a sua missão, visão e documentos institucionais, bem como a entrega do manual de acolhimento com todas as informações importantes. A receção na DGRM foi feita pela Dra. Fátima Canedo, que me apresentou toda a equipa da DGRM, o plano de formação da primeira semana de estágio, bem como a regulamentação e legislação em farmacovigilância e a introdução aos módulos das GVP. A formação inicial teve a duração de uma semana e incluiu as diferentes áreas da DGRM, pelo que as várias equipas deram formação na sua área de atuação. Deste modo, a equipa de gestão das notificações de RAM dos profissionais de saúde e utentes foi responsável pela formação na receção e análise de notificações de RAM enviadas por profissionais de saúde e utentes através do Portal RAM e via formulário em papel, o processamento das RAM e *follow-up*. A equipa de gestão das notificações de RAM dos titulares de AIM apresentou o processamento de casos enviados pelos titulares de AIM e verificação de casos duplicados. A equipa de gestão do sinal apresentou as atividades necessárias para determinar se existem novos riscos associados a uma substância ativa ou medicamento ou se os riscos conhecidos se alteraram, bem como a necessidade de tomada de decisões caso surjam novas informações que afetem o perfil de segurança do medicamento. A equipa de gestão do risco engloba a

elaboração de comunicações dirigidas aos profissionais de saúde, circulares informativas, avaliação de materiais educacionais e a elaboração de respostas ou pedido de informações através de *Rapid Alert (RA)* ou *Non-Urgent Information (NUI)*. Adicionalmente, a equipa de gestão do risco é responsável pela avaliação de RPS a nível europeu no âmbito dos PSUSA, PGR de medicamentos autorizados por procedimento centralizado em que Portugal é o relator do PRAC, PASS em que Portugal é apontado como relator do PRAC e participação ativa no âmbito do PRAC. O Sistema de Gestão da Qualidade implementado no Infarmed foi apresentado pela gestora da qualidade da DGRM e baseia-se num conjunto de procedimentos dinâmicos e controlados, tendo como missão harmonizar as práticas e assegurar a melhoria contínua da eficácia do Sistema.

Durante a primeira semana de estágio, foi-me atribuído um número mecanográfico institucional e uma *password* de acesso às bases de dados e às várias aplicações informáticas do Infarmed, necessárias ao trabalho diário. Posteriormente, fui alocada à equipa de gestão do risco, em que me foram delegadas tarefas e responsabilidades bem definidas. Enquanto estagiária, as tarefas que me foram atribuídas passaram pela avaliação de materiais educacionais e validação de comunicações dirigidas aos profissionais de saúde (DHPC), elaboração de respostas a NUI, elaboração de circulares informativas e a migração dos materiais educacionais e DHPC para junto dos RCM e FI que se encontram na base de dados dos medicamentos do Infarmed – Infomed.

Os materiais educacionais são medidas de minimização de risco adicionais com o objetivo de alertar e informar os profissionais de saúde e os doentes sobre os riscos associados a um determinado medicamento. Os titulares de AIM submetem à DGRM uma proposta de materiais educacionais, de acordo com as instruções aos requerentes, disponibilizadas na página do Infarmed. Quando a DGRM recebe uma proposta de materiais educacionais, é necessário validar e aprovar o plano de implementação, incluindo o universo de distribuição, modo e data, bem como a forma e conteúdo, particularmente o enquadramento do pedido de submissão, o eventual carácter promocional, a linguagem de acordo com o público alvo e o fundamento das informações incluídas. A avaliação é feita de forma dinâmica, em articulação com o titular de AIM, e por vezes também com a Equipa da Publicidade do Infarmed, sendo feitas sugestões de alterações até se chegar a uma versão final. Neste sentido, durante o estágio procedi à avaliação de materiais educacionais de medicamentos de diferentes áreas farmacoterapêuticas. Uma vez que não possuía qualquer experiência nesta função, no início necessitei de maior apoio dos elementos da equipa até ganhar mais autonomia na avaliação dos documentos. A aprovação final é dada pela direção da DGRM, após a qual os materiais educacionais podem ser implementados, de acordo com

o plano de implementação acordado.

Quando é necessário divulgar informações importantes e recentes sobre a utilização segura e eficaz de um medicamento aos profissionais de saúde, o titular de AIM do medicamento deve submeter à DGRM uma DHPC para aprovação. Tal como para os materiais educacionais, existe um documento com as instruções aos requerentes para a submissão de DHPC. Desta forma, o titular de AIM envia uma proposta de DHPC à DGRM, sendo que a versão final é acordada entre ambas as partes para posteriormente ser distribuída aos profissionais de saúde. Na avaliação da proposta de DHPC, é importante verificar o plano de comunicação, a tradução para a língua portuguesa e a coerência do conteúdo com o RCM, mesmo que o conteúdo tenha sido acordado entre o titular de AIM e a EMA. A mensagem da carta deve ser clara e concisa, explicar o motivo da sua distribuição e fazer recomendações de utilização no sentido de minimizar os riscos associados ao medicamento.

Durante o estágio, fui também responsável pela migração dos materiais educacionais e DHPC para o Infomed, base de dados de medicamentos do Infarmed. Assim, os materiais educacionais e DHPC estão disponíveis para consulta nas fichas dos respetivos medicamentos no Infomed, junto dos RCM e FI.

Existe um sistema de comunicação partilhado pelas autoridades competentes e a EMA para a troca de informação que serve de suporte à rápida notificação de problemas de segurança relacionados com os medicamentos. Deste modo, uma autoridade competente ou a EMA podem emitir um *Rapid Alert (RA)*, a fim de divulgar informação de segurança importante para serem tomadas medidas urgentes para a proteção da saúde pública. Um *Non-Urgent Information (NUI)* é um pedido de informação requerido por um Estado-Membro (EM) para a troca de informação sobre um novo sinal ou outra informação de segurança. Na DGRM, após a receção de um pedido de NUI, a informação é recolhida e organizada para a elaboração de uma resposta a enviar ao EM requerente. Posteriormente, todas as respostas enviadas circulam por todos os EM, EMA e CE e a informação pode ser discutida no PRAC para se avaliar a necessidade de serem estabelecidas medidas de proteção da Saúde Pública.

As circulares informativas são alertas de segurança que contêm informação de segurança e decisões regulamentares sobre a mesma a serem divulgados aos profissionais de saúde e/ou público em geral. A elaboração deste tipo de circulares informativas é feita pela DGRM em articulação com o CIMI e com o CD. Neste sentido, é importante adaptar a informação ao mercado português, verificando o estado de autorização e comercialização do medicamento e das respetivas formas farmacêuticas. Após a aprovação do CD, a circular informativa é enviada por e-mail a grupos alvo e publicada na página do Infarmed.

5. Análise SWOT

5.1 Pontos fortes

5.1.1 Equipa da DGRM

Durante o estágio na DGRM, fui integrada numa equipa profissional, dedicada e trabalhadora, constituída maioritariamente por colaboradores com formação na área das Ciências Farmacêuticas. A forma acolhedora como fui recebida, o bom ambiente de trabalho e o apoio de todos os colegas no esclarecimento de dúvidas que iam surgindo à medida que ia desempenhando as minhas funções foram essenciais para a minha integração como membro da equipa. A preocupação dos colegas em transmitirem os conhecimentos e informações importantes foi essencial para a realização de um trabalho de qualidade. A equipa de gestão do risco destaca-se pela capacidade de organização e gestão do tempo, fundamentais para dar seguimento ao elevado número de processos em curso.

5.1.2 Plano de estágio

O plano de estágio teve por base formações nas diversas áreas de atuação da DGRM, na primeira semana, sendo que no restante período de estágio fui integrada na equipa de gestão do risco, onde desempenhei as minhas funções. Considero que este processo de aprendizagem foi muito enriquecedor na medida em que me possibilitou ficar com uma visão da abrangência da DGRM e da conjuntura da farmacovigilância a nível nacional e europeu, bem como aprofundar os meus conhecimentos na gestão do risco de medicamentos, particularmente nas medidas de minimização de risco. Ao longo do período em que estive na equipa de gestão de risco, as tarefas que me foram propostas foram sempre encaradas como um novo desafio, despertando o meu interesse para a procura de mais informação. A aprendizagem de conteúdos não abordados no plano curricular no MICF, inerentes ao âmbito da farmacovigilância, permitiu-me adquirir conhecimentos mais aprofundados sobre as questões regulamentares desta área de intervenção farmacêutica.

5.1.3 Formações certificadas

A participação em formações certificadas ao longo do estágio contribuiu para a integração de conteúdos relevantes na área da farmacovigilância. Tive a possibilidade de

participar no curso *Safety risk management and Pharmacovigilance*, promovido pela UNAVE em parceria com o Infarmed, no âmbito do programa *Training Programme in Pharmaceutical Medicine*. No referido curso, foi discutido o papel da farmacovigilância na perspetiva da autoridade regulamentar e da indústria farmacêutica e a importância dos sistemas de farmacovigilância ao longo do ciclo de vida do medicamento. Tive também a oportunidade de participar no curso de Farmacoepidemiologia, em que foi feita uma abordagem aos conceitos de epidemiologia e estatística aplicados à interpretação de estudos de segurança de fármacos e a realização de exercícios de aplicação tendo por base a análise crítica de estudos de avaliação do perfil de segurança de fármacos.

Adicionalmente, tive a possibilidade de assistir a uma conferência sobre a transparência e comunicação do risco, em que se concluiu que a comunicação da ciência necessita de mais transparência e mais informação sobre o medicamento e os seus riscos e benefícios. Estive também presente na conferência Autorizações especiais de medicamentos de uso humano, dinamizada pela OF em colaboração com o Infarmed.

Todas as sessões supramencionadas foram uma mais valia para aprender e consolidar conhecimentos sobre a farmacovigilância e o funcionamento do sistema regulamentar do medicamento.

5.1.4 Autonomia, responsabilidade e gestão de tempo

O trabalho que desenvolvi ao longo do período de estágio na DGRM permitiu-me desenvolver as minhas competências técnicas, nomeadamente a autonomia, o sentido de responsabilidade e a gestão do tempo na realização das minhas tarefas. Considero que o correio eletrónico que me foi atribuído foi uma ferramenta de grande utilidade para ter autonomia no contacto com os titulares de AIM, no sentido de agilizar alguns processos e estar envolvida na dinâmica de toda a equipa. Desde o início do estágio, compreendi a elevada responsabilidade que me foi atribuída no contacto com os titulares de AIM, sendo que por diversas vezes me foram colocadas questões e pedidos de esclarecimentos por parte dos titulares de AIM que necessitavam de uma resposta clara. Do mesmo modo, a gestão do tempo e priorização de tarefas de acordo com prazos estabelecidos foram fundamentais para melhorar a minha capacidade de organização no trabalho, bem como para o cumprimento das minhas obrigações.

5.1.5 Sistema de gestão da qualidade

O SGQ foi uma mais valia para agilizar as diferentes tarefas que me foram propostas ao longo do estágio. As principais atividades da equipa de gestão do risco estão descritas detalhadamente em procedimentos, associados a instruções de trabalho e modelos. No exercício das minhas atividades, recorria frequentemente à plataforma Sistema de Informação da Gestão da Qualidade (SIGQ) para consultar os procedimentos e respetivos modelos. A título de exemplo, para a avaliação de uma proposta de materiais educacionais, era consultado o respetivo procedimento com todas as fases do processo, bem como os modelos de resposta a enviar por e-mail para o diretor da DGRM e para o titular de AIM. Do mesmo modo, o registo atualizado de todas as ações realizadas permitiu-me manter a organização no trabalho do quotidiano e cumprir com os prazos estabelecidos.

5.1.6 Pontos fracos

5.1.7 Duração do estágio curricular

Considero que o período de estágio curricular atribuído à farmacovigilância e à área regulamentar é restritivo no sentido que, enquanto estagiária da DGRM, apenas consegui inteirar-me de um determinado número de funções dentro da equipa de gestão do risco, ficando com uma visão superficial das funções desempenhadas pelas outras equipas. Após o acolhimento, é necessário um período de adaptação para que o estagiário esteja familiarizado com todas as matérias relevantes e nomenclatura abordada no dia-a-dia do trabalho. Por outro lado, a fim de que o estagiário possua autonomia nas suas funções, o período de estágio limita o número de tarefas.

5.2 Oportunidades

5.2.1 Sensibilizar os doentes e os profissionais de saúde para a importância da notificação de reações adversas

A DGRM desenvolve iniciativas para consciencializar os profissionais de saúde e doentes da importância da notificação de reações adversas a medicamentos, bem como divulgar as plataformas disponíveis destinadas a esse efeito, como o Portal RAM. O principal objetivo é aumentar a qualidade e o número de RAM para a recolha mais eficiente de dados

de segurança relacionados com os medicamentos. Deste modo, são elaboradas e divulgadas infografias com informações relevantes no sentido de aproximar a população a esta área de intervenção da autoridade reguladora.

Paralelamente, a DGRM está integrada no projeto SCOPE (*Strengthening Collaboration for Operating Pharmacovigilance in Europe*), que promove a colaboração entre os Estados Membros da UE no funcionamento dos sistemas de farmacovigilância bem como a gestão mais eficaz da farmacovigilância. A título de exemplo, foi realizada uma campanha a nível europeu com a missão “notificar efeitos secundários torna os medicamentos mais seguros”, em que foi divulgada uma animação informativa que apelava à notificação dos efeitos secundários, a fim de se contribuir para medicamentos mais seguros para benefício de toda a sociedade. No âmbito do projeto SCOPE, foi também desenvolvido um módulo de *e-learning* destinado a profissionais de saúde, com informações e orientações sobre a notificação de RAM e casos práticos de aplicação, realçando o impacto da notificação na avaliação da segurança dos medicamentos.

5.2.2 Boletim de Farmacovigilância

O Boletim de Farmacovigilância é elaborado pelos elementos da DGRM e/ou URF e tem como público-alvo médicos, farmacêuticos e outros profissionais de saúde. Esta publicação mensal contém informação sobre efeitos adversos dos medicamentos autorizados, a nível nacional e europeu, bem como informação detalhada sobre os Alertas de Segurança emitidos pelo Infarmed e compilação dos materiais educacionais e DHPC publicados no Infomed. Neste sentido, o Boletim de Farmacovigilância surge como um meio de comunicação de diversos assuntos relacionados com a segurança dos medicamentos para que, nas várias áreas da saúde, os profissionais de saúde estejam melhor informados.

5.2.3 Comunicação do risco através de novas plataformas

As exigências da população têm sofrido profundas alterações, exigindo uma adaptação dos meios de comunicação para ir de encontro às necessidades e transmitir os conteúdos. Neste sentido, a DGRM desenvolve infografias para divulgar a informação sobre advertências e restrições de utilização relacionadas com o risco de determinado medicamento, num formato e linguagem adequados aos doentes e ao público em geral. As infografias disponibilizadas no site do Infarmed são uma oportunidade para comunicar a informação de uma forma simples, concisa, apelativa e de fácil leitura para o doente, transmitindo as

mensagens-chave sobre esse assunto. Adicionalmente, são realizadas campanhas informativas em formato de vídeo, disponibilizados na internet. Tendo como exemplo a campanha “qual o significado do triângulo invertido?”, esta ação de sensibilização realizada em parceria com a EMA teve como objetivo divulgar um vídeo educativo sobre a identificação dos medicamentos que necessitam de uma monitorização especial.

5.2.4 Redistribuição do Sistema Nacional de Farmacovigilância

No início do presente ano, o Sistema Nacional de Farmacovigilância sofreu uma reestruturação, passando a incluir oito unidades regionais coordenadas pela DGRM, atuando esta também como unidade. Neste sentido, surge a oportunidade de desenvolver uma farmacovigilância com maior cobertura populacional, menor dispersão geográfica e maior envolvimento dos profissionais de saúde. Adicionalmente, o envolvimento das universidades e centros de investigação permitirá a elaboração de estudos e fomentar o pensamento crítico na área da farmacovigilância e farmacoepidemiologia.

5.2.5 Candidatura portuguesa à Agência Europeia do Medicamento

No seguimento da saída do Reino Unido da UE, as agências europeias que até ao momento tinham a sua sede naquele país serão obrigadas a realocar-se noutros países da UE. A EMA constitui uma importante agência reguladora na área da saúde, no que diz respeito à avaliação, supervisão e monitorização de segurança dos medicamentos desenvolvidos e comercializados na UE. A candidatura portuguesa é indiscutivelmente uma oportunidade para o desenvolvimento científico e económico do país, representando um compromisso de Portugal com a ciência e com a saúde. A escolha de Portugal como país acolhedor da agência terá um impacto direto na economia do país, na medida em que proporcionará a atração das indústrias farmacêuticas e melhores investimentos para a investigação e desenvolvimento de novos medicamentos, bem como na área dos ensaios clínicos, traduzindo-se no melhor acesso dos doentes à inovação terapêutica.

5.2.6 Detecção de reações adversas a medicamentos através das redes sociais

Recentemente, especialistas em farmacovigilância têm estudado a possibilidade de utilizar a informação pública em redes sociais, fóruns ou blogues, na monitorização da

segurança dos medicamentos. De facto, as redes sociais são utilizadas pelos doentes para a partilha e discussão de assuntos da área da saúde, nomeadamente eventos adversos e experiências pessoais relacionadas com a toma de medicamentos que o doente por vezes não comunica ao seu médico, enfermeiro ou farmacêutico. Apesar de algumas limitações, tais informações poderão ser exploradas para a deteção de sinais e, eventualmente, detetar RAM em tempo real. Do mesmo modo, os dados provenientes das redes sociais poderão constituir uma oportunidade para revelar novas informações de segurança sobre o uso dos medicamentos na prática diária, bem como detetar informações sobre o uso de medicamentos *off-label*, na gravidez, em crianças ou idosos. Contudo, ainda existem desafios associados a esta técnica de identificação de RAM, designadamente a qualidade dos dados do doente, a identificação e rastreabilidade de um doente específico por razões de privacidade e a dificuldade em usar técnicas de reconhecimento de texto, devido aos termos não-clínicos utilizados pelos doentes para descrever um problema de saúde.

5.3 Ameaças

5.3.1 Falta de recursos humanos para a carga de trabalho

Durante o meu estágio na DGRM, foi possível verificar a carência de recursos humanos adequados ao elevado volume de trabalho existente. Apesar deste facto, é notório o esforço da equipa para cumprir com as suas obrigações e desempenhar as suas funções nos mais elevados padrões de qualidade. Entre os motivos para a falta de meios humanos, encontram-se as restrições orçamentais que limitam a abertura de concursos públicos para a contratação de colaboradores, bem como a transferência de profissionais para a indústria farmacêutica.

5.3.2 Subnotificação de reações adversas a medicamentos

A subnotificação de RAM constitui uma preocupação em farmacovigilância bem como um problema de Saúde Pública. O facto de um elevado número de RAM não ser devidamente notificado ao SNF tem impacto no aumento da morbilidade e mortalidade. Estudos realizados com o intuito de compreender os fatores que influenciam a subnotificação sugerem, entre várias razões, a falta de conhecimento dos profissionais de saúde sobre o sistema de farmacovigilância, o desconhecimento das exigências de notificação e a pesada carga de trabalho associada à falta de tempo. Neste sentido, é urgente desenvolver medidas de incentivo à notificação espontânea, como a implementação de formações periódicas e

dinâmicas de grupo para educar os profissionais de saúde a preencher os formulários de notificação, a fim de alterar a atitude dos profissionais de saúde perante a notificação de RAM e, assim, diminuir a subnotificação.

6. Considerações finais

O presente relatório de estágio curricular é o culminar de três meses de intensa aprendizagem na DGRM. A oportunidade de realizar um estágio no Infarmed foi encarada como um grande desafio, que me permitiu desenvolver competências indispensáveis para o meu percurso profissional nesta área de intervenção farmacêutica, bem como compreender o funcionamento de uma Autoridade Nacional do Medicamento e a sua interação com as demais instituições europeias e internacionais, indústria farmacêutica, profissionais de saúde e doentes.

Enquanto futura profissional de saúde, considero que o papel do farmacêutico na farmacovigilância engloba a participação ativa nos sistemas de farmacovigilância, a colaboração na realização de estudos de farmacoepidemiologia, a comunicação e educação da segurança dos medicamentos e ainda a notificação de suspeitas de reações adversas a medicamentos aquando da prestação de serviços farmacêuticos e acompanhamento farmacoterapêutico.

Por fim, acredito que a esta experiência de estágio foi muito gratificante, na medida em que me possibilitou integrar o trabalho diário de uma equipa com colaboradores extremamente profissionais e dedicados, que me transmitiram conhecimentos e competências, tais como a organização, a autonomia, a responsabilidade, a gestão de tempo, o empenho na resolução de problemas e o trabalho em equipa, essenciais para o meu futuro como profissional de saúde.

7. Bibliografia

1. HARPAZ R., DUMOUCHEL, W., SHAH, N., MADIGAN, D., RYAN, P., FRIEDMAN, C. - Novel datamining methodologies for adverse drug event discovery and analysis. **Clin Pharmacol. Ther.** 91:3 (2012) 1010-1021.
2. HAZELL L., SHAKIR S. - Under-reporting of adverse drug reactions: a systematic review. **Drug Saf.** 29:5 (2006) 385-396.
3. Infarmed - **Farmacovigilância em Portugal**. Lisboa: Infarmed – Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento, Ministério da Saúde, 2003. ISBN 972-8425-48-1
4. Infarmed - **INFARMED: o futuro preparado**. Porto: Porto Editora, 2015. ISBN 978-972-0-06359-5
5. Infarmed, I. P. - **Comunicações dirigidas aos profissionais de saúde**. [Em linha]. [Consult. 31 jul. 2017]. Disponível em <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/comunicacoes-dirigidas-aos-profissionais-de-saude>
6. Infarmed, I. P. - **EMA/Triângulo invertido – 2013**. [Em linha]. [Consult. 31 jul. 2017]. Disponível em www.infarmed.pt/web/infarmed/-/ema-triangulo-invertido-2013?inheritRedirect=true.
7. Infarmed, I. P. - **Estrutura e Organização**. [Em linha]. [Consult. 31 jul. 2017]. Disponível em www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/estrutura-e-organizacao.
8. Infarmed, I. P. - **Materiais educacionais**. [Em linha]. [Consult. 31 jul. 2017]. Disponível em www.infarmed.pt/web/infarmed/materiais-educacionais.
9. Infarmed, I. P. - **Pharmacovigilance Risk Assessment Committee (PRAC)**. [Em linha]. [Consult. 31 jul. 2017]. Disponível em www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/farmacovigilancia/prac.
10. Infarmed, I. P. - **Relatórios periódicos de segurança - conclusões da avaliação única**. [Em linha]. [Consult. 31 jul. 2017]. Disponível em www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/farmacovigilancia/informacao-seguranca/relat_peri_seguranca_conclusoes.
11. Infarmed, I.P. – **Boletim de Farmacovigilância: Restruturação do Sistema Nacional de Farmacovigilância**. [Em linha]. [Consult. 31 jul. 2017]. Disponível em www.infarmed.pt/documents/15786/1983294/Boletim+de+Farmacovigil%C3%A2ncia%2C+Volume+21%2C+n%C2%BA%2C+fevereiro+de+2017/230b0a35-f78c-4aec-aba4-081b4a5a97a9?version=1.1.
12. Infarmed, I.P. – **Boletim de Farmacovigilância: Valproato / Ácido Valproico**

- uso na gravidez e em mulheres em idade fértil. [Em linha]. [Consult. 31 jul. 2017]. Disponível em www.infarmed.pt/documents/15786/1983294/Boletim+de+Farmacovigil%C3%A2ncia%2C+Volume+21%2C+n%C2%BA6%2C+junho++de+2017/796ac0b7-2194-4c31-9d23-d3541c0405fa?version=1.0.

13. PAGOTTO, C., VARALLO, F., MASTROIANNI, P. - Impact of Educational Interventions on Adverse Drug Events Reporting. **Int J Technol Assess Health Care**. 29:4 (2013) 410-7.
14. SARKER, A., GINN, R., NIKFARJAM, A., O'CONNOR, K., SMITH, K., JAYARAMAN, S., UPADHAYA, T., GONZALEZ, G. - Utilizing social media data for pharmacovigilance: A review. **J Biomed Inform**. ISSN: 1532-0464. 54 (2015) 202-212.
15. VARALLO, FR., GUIMARÃES, O., ABJAUDE, SA., MASTROIANNI, C. - Causes for the underreporting of adverse drug events by health professionals: a systematic review. **Rev Esc Enferm USP**. ISSN 0080-6234. 48:4 (2014) 739-747.