



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Mariana Sofia Meireles da Rocha

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Vesículas extracelulares em protozoários flagelados – Potencial aplicação no diagnóstico e terapêutica” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação do Dr. Pedro Santos, da Dra. Marília Lopes e da Professora Doutora Maria Do Céu Sousa, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Outubro de 2020



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Mariana Sofia Meireles da Rocha

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada "Vesículas extracelulares em protozoários flagelados – Potencial aplicação no diagnóstico e terapêutica" referentes à Unidade Curricular "Estágio", sob a orientação do Dr. Pedro Santos, da Dra. Marília Lopes e da Professora Doutora Maria Do Céu Sousa, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Outubro de 2020

Eu, Mariana Sofia Meireles da Rocha, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2015229680, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Vesículas extracelulares em protozoários flagelados – Potencial aplicação no diagnóstico e terapêutica” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 30 de outubro de 2020.



(Mariana Sofia Meireles da Rocha)

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Farmácia e a todo o corpo docente e não docente, que de uma forma ou de outra me apoiaram e ensinaram durante os cinco anos do curso fazendo de mim a farmacêutica que a partir de agora serei.

À Professora Doutora Maria do Céu pelo cuidado, profissionalismo, orientação e apoio que me foi dado quer na elaboração desta monografia, quer ao longo do meu percurso.

À FARMALABOR pela amizade, espírito de equipa e todos os ensinamentos que me transmitiram sobre uma realidade que para mim era praticamente desconhecida e passou a ser desafiante.

À Farmácia da Ponte que me permitiu uma experiência tão gratificante que me levaria a apaixonar pela farmácia comunitária, se alguma dúvida houvesse.

A todos os meus amigos que me mostraram o melhor que Coimbra tinha para dar. Obrigada por me acompanharem neste percurso!

À minha irmã e minha cúmplice (o meu tesouro mais precioso!) por toda a paciência que teve comigo e por saber sempre o que fazer ou dizer para me alegrar em momentos de algum desânimo. Foi e continuará a ser um incentivo para que eu tente ser sempre mais e melhor pois sei que me toma como exemplo a seguir.

Aos meus pais que são o meu porto seguro e que sempre apoiaram as minhas decisões e me guiaram em todas as etapas da minha vida.

Aos citados e a todos os outros que direta ou indiretamente me ajudaram a ser o que sou, manifesto a mais profunda gratidão: **Obrigada!**

*Coimbra inspira a saudade
E o Choupal, o fado antigo,
Ganha alma nova a cidade
Quando se encontra um amigo.*

*Nothing in life is to be feared, it is only to be understood.
Now is the time to understand more, so that we may fear less.”*

Marie Sklodowska Curie

ÍNDICE

I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Lista de Abreviaturas.....	2
1.1. – Introdução.....	3
1.2. – Enquadramento.....	4
1.2.1. – A Empresa.....	4
1.2.2. – O Estágio.....	4
1.3. – Análise SWOT.....	5
1.3.1. – Forças.....	6
1.3.2. – Fraquezas.....	8
1.3.3. – Oportunidades.....	9
1.3.4. – Ameaças.....	11
1.4. – Considerações Finais.....	12
Bibliografia.....	13

II – RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA

Lista de Abreviaturas.....	15
2.1. – Introdução.....	16
2.2. – Enquadramento.....	17
2.3. – Análise SWOT.....	18
2.3.1. – Forças.....	18
2.3.2. – Fraquezas.....	20
2.3.3. – Oportunidades.....	22
2.3.4. – Ameaças.....	23
2.4. – Casos Práticos.....	25
2.5. – Considerações Finais.....	27
Bibliografia.....	28

III – MONOGRAFIA

Lista de Abreviaturas.....	30
Resumo.....	31
Abstract.....	32
3.1. – Introdução.....	33
3.2. – Vesículas Extracelulares (VEs).....	35
3.2.1. – Origem e Biogénese.....	35
3.2.2. – Composição.....	38
3.2.3. – Principais funções.....	41
3.3. – Parasitoses Provocadas Por Protozoários Flagelados.....	42
3.3.1. – Giardíase.....	42
3.3.2. – Tricomoníase.....	43
3.3.3. – Tripanossomose Humana.....	45
3.3.4. – Leishmaniose.....	48
3.4. – Papel Das VEs Nas Parasitoses.....	50
3.4.1. – VEs na giardíase.....	51
3.4.2. – VEs na tricomoníase.....	51

3.4.3. – VEs na tripanossomose humana.....	52
3.4.4. – VEs na leishmaniose	54
3.5. – Aplicação Das VEs Ao Diagnóstico E Terapêutica.....	55
3.5.1. – VEs como biomarcadores.....	55
3.5.2. – VEs como potenciais agentes terapêuticos.....	56
3.5.3. – Potencial uso de VEs em vacinas.....	57
3.6. – Conclusão	59
Bibliografia.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Biogénese de Exossomas.....	36
Figura 2 - Biogénese de Microvesículas	37
Figura 3 - Biogénese de Corpos apoptóticos.....	38
Figura 4 - O papel das VEs e o seu potencial uso no diagnóstico e terapêutica.....	41
Figura 5 - Ciclo de vida da <i>Giardia lamblia</i>	43
Figura 6 - Ciclo de vida de <i>Trichomonas vaginalis</i>	44
Figura 7 - Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	46
Figura 8 - Ciclo de vida <i>Trypanossoma brucei</i>	48
Figura 9 - Ciclo de vida de <i>Leishmania spp.</i>	50

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I - Características das VEs, exossomas, micropartículas e corpos apoptóticos.....	38
--	----

DUAS PALAVRAS INICIAIS...

É em tempos difíceis que é possível observar mais atentamente tudo o que nos rodeia. Este ano foi e será um ano que entrará para a história da Humanidade pelas piores razões: a morte de milhares de pessoas por falta de terapia eficaz no combate ao coronavírus, o abalo das economias mais frágeis e a sensação de eternidade na espera por uma vacina que traga a tranquilidade perdida. Mas as contrariedades são uma oportunidade para buscar novos caminhos, neste caso a vacina e terapias posteriores, assim, vimos a comunidade científica nacional e internacional a mobilizar-se para antecipar soluções eficazes. Os resultados das investigações são um sinal de esperança mesmo que a data da chegada ao mercado da vacina tão desejada continue a ser uma incógnita e a sua universalização uma decisão política com custos associados. Aguardamos esperançados que a vida humana continuará a ser uma prioridade.

O lema usado pelas Farmácias de Portugal “há luzes que nunca se apagam” foi como um hino de esperança para toda a população, a entrega ao domicílio e a dispensa de medicamentos de dispensa exclusiva hospitalar, sem custos acrescidos, garantida por muitas delas foi um contributo inovador na luta contra um inimigo que ameaçava a vida de todos mas com maior violência a dos mais fragilizados por outras doenças ou pela idade. Foram estes que mais ganharam com esse gesto e cuja sobrevivência é um prémio valioso.

A somar aos farmacêuticos que se expuseram ao risco nas farmácias comunitárias temos todos os que garantiram o funcionamento das farmácias hospitalares e o funcionamento da indústria farmacêutica tendo sempre em atenção a proteção da cadeia do medicamento. Heróis anónimos que merecem esse título tal como todos os outros profissionais e agentes da saúde pública que trabalharam para manter o equilíbrio social e minimizar os danos.

Centrando a atenção nos farmacêuticos que estão no terreno, faço-o com admiração e penso que a profissão que eu escolhi e que me escolheu a mim faz parte da linha da frente do combate a todo o tipo de doenças, não apenas do coronavírus porque o trabalho do farmacêutico não para e as doenças que já existiam continuam a existir.

A unidade de Estágio Curricular permitiu-me ter acesso a algumas etapas da cadeia do medicamento. A Monografia permitiu-me investigar e estudar sobre um tema atual, quase como se o se uma “Investigação e Desenvolvimento” de um novo medicamento se tratasse, de seguida fiz um Estágio na Indústria Farmacêutica, onde ocorre a produção do medicamento e finalmente passamos para a Farmácia Comunitária, onde através da aquisição dos medicamentos aos armazéns e a sua distribuição para a farmácia são depois dispensados a um utente para atingir algum objetivo terapêutico.

I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

FARMALABOR - GRUPO MEDINFAR



Imagem adaptada do LinkedIn do Grupo Medinfar. [Consult. 19 Mar. 2020].
Disponível na WWW:
<URL:https://www.linkedin.com/posts/medinfar_cphiworldwide2019-activity-6593067398973263872-4cuH>.

Orientado por: Dr. Pedro Santos

1 2 9 0



**UNIVERSIDADE D
COIMBRA**

LISTA DE ABREVIATURAS

AIM	Autorização de Introdução no Mercado
API	Princípio ativo, do inglês “ <i>Active Pharmaceutical Ingredient</i> ”
APIFARMA	Associação Portuguesa da Indústria Farmacêutica
AQL	Do inglês “ <i>Acceptable Quality Limit</i> ”
CIP	Do inglês “ <i>Cleaning in Place</i> ”
FLPSS	Formas Líquidas, Pastosas e Semissólidas
FS	Formas Sólidas
GMP	Boas Práticas de Fabrico, do inglês “ <i>Good Manufacturing Practice</i> ”
GQ	Garantia da Qualidade
IF	Instrução de Fabrico
IPC	Controlo em Processo, do inglês “ <i>In-Process Control</i> ”
SMED	Do inglês “ <i>Single Minute Exchange of Dies</i> ”
SWOT	Do inglês “ <i>Strengths; Weaknesses; Opportunities; Threats</i> ”

I.1. – INTRODUÇÃO

No final do século XIX começaram a surgir, em Portugal, os primeiros investimentos industriais na área dos produtos farmacêuticos (APIFARMA, 2014). Nessa altura, Portugal era um país relativamente rural, pouco industrializado e com uma população predominantemente analfabeta (Alves, 2012; APIFARMA, 2014).

Com o desenvolvimento da indústria farmacêutica houve uma importante redução da mortalidade e da morbilidade, que graças aos avanços na prevenção, no *screening*, no diagnóstico e na terapêutica de doenças até então incuráveis, os cidadãos podem esperar viver até mais 30 anos do que viveriam há um século atrás (APIFARMA, 2014; EFPIA, 2018; Ordem dos Farmacêuticos).

A produção em série de medicamentos retirou das boticas um serviço que por tradição lhes estava associado: a preparação de fármacos em doses unitárias e de forma personalizada para cada doente (APIFARMA, 2014; Ordem dos Farmacêuticos). Atualmente, a indústria farmacêutica procura opções que acrescentem valor terapêutico e que possuam rácios de custo/efetividade mais favoráveis para a população.

Quando olhamos para a evolução da indústria farmacêutica nos últimos tempos e nos apercebemos que no período de oito anos encerraram 21 empresas (APIFARMA, 2020), a candidatura ao estágio neste ramo foi uma aventura desde que decidi fazê-lo. Desejando esta experiência, aconteceram momentos de angústia provocados pela incerteza se conseguiria ser admitida, mas sempre com a firme convicção, resultante de visitas feitas, que seria um campo onde tinha muito a aprender e me sentiria bem. Tendo em conta o que acabo de registar, posso afirmar que a primeira «vitória» foi conseguir entrar e o troféu acabaria por ser a experiência em tudo excelente, como mostrarei de seguida.

I.2. – ENQUADRAMENTO

I.2.1. – A Empresa

A FARMALABOR, assim denominada desde 1999, é uma unidade industrial sediada na zona industrial de Condeixa-a-Nova (Grupo Medinfar, a).

Em 2001 foi adquirida pelo Grupo MEDINFAR, permitindo uma melhoria das instalações bem como o reforço tecnológico do aparelho produtivo nesta área altamente competitiva e garantir o crescimento estruturado da atividade fabril, permitindo um aumento da produtividade (Grupo Medinfar, b). A unidade industrial tem uma capacidade brutal anual de mais de 50 milhões de unidades repartidas entre formulações sólidas, líquidas e pastosas não estéreis e não pretende ficar por aqui (Grupo Medinfar, c).

A FARMALABOR, enquanto empresa individual, não possui nenhuma Autorização de Introdução no Mercado (AIM), sendo que a maior parte da sua atividade é a produção de produtos pertencentes ao Grupo MEDINFAR e a restante é a produção para terceiros. Ou seja, a FARMALABOR funciona como uma *Contract Manufacturing Organization*.

A sua atividade engloba o fabrico de produtos farmacêuticos, cosméticos e suplementos alimentares, produzindo algumas marcas conhecidas como o Halibut[®], Oleoban[®], Trifen[®] e DVine[®] (Silva, 2018). A empresa possui várias certificações pelas normas de Qualidade (ISO9001), Ambiente (ISO4001) e Segurança e Saúde do Trabalho (OHSAS18001), o que permite a produção de medicamentos segunda as Boas Práticas de Fabrico (GMP) (Grupo Medinfar, c). Nunca é demais lembrar que lidando com medicamento, o seu fabrico precisa de ter sempre em atenção a segurança, qualidade e eficácia dos mesmo, pois o mais pequeno deslize colocaria em causa a saúde de centenas ou mesmo milhares de pessoas.

I.2.2. – O Estágio

O estágio realizou-se entre o dia 8 de janeiro e 12 de março de 2020. Este período é mais reduzido que o normal porque o Grupo MEDINFAR, em junção comigo e com a Universidade de Coimbra achou melhor dar por concluído o estágio devido à situação de pandemia causada pelo novo coronavírus que praticamente parou Portugal.

Foi uma experiência muito enriquecedora, na medida em que o estágio na Indústria Farmacêutica é uma oportunidade única de contactar num outro setor onde o farmacêutico também desempenha um papel fundamental.

A receção na empresa foi calorosa e constou de uma pequena apresentação da empresa, a sua missão e objetivos, seguida de uma visita guiada pelas instalações.

Antes disso tive um momento formação relacionada com o meio ambiente e outro sobre a segurança no trabalho. No primeiro foi abordada a gestão de resíduos em que se fez referência ao facto de a fábrica possuir uma estação de tratamento de águas residuais, kits de contenção de derrames, os gases emitidos pelas chaminés são controlados e que eram utilizados pelo menos dois tipos de sacos de cores diferentes para os resíduos: os sacos de cor vermelha serviam para colocar os materiais contaminados como luvas, máscaras e tudo o que fosse utilizado na sala da produção que pudesse conter o princípio ativo (API); os sacos verdes destinavam-se aos materiais que podiam ser reciclados como plástico, papel e vidro.

Na formação sobre a segurança no trabalho foi apresentado o plano de segurança da empresa em que, por exemplo, no estacionamento todos os carros devem estar estacionados com a frente virada para a saída para permitir uma rápida evacuação no caso de incêndio ou outro incidente grave.

Relativamente ao meu estágio, este foi realizado na área de Produção sendo a Secção das Formas Sólidas (FS) a “minha casa”. Aqui pude contactar com todas as etapas de fabrico de um medicamento, desde a pesagem das matérias-primas segundo a instrução de fabrico (IF), a mistura, a compressão e o revestimento, ou enchimento de cápsulas ou saquetas consoante o medicamento que se queira produzir.

1.3. – ANÁLISE SWOT

O presente relatório tem como objetivo apresentar a minha experiência enquanto estagiária na FARMALABOR sob a forma de análise SWOT.

Este tipo de análise engloba duas dimensões, uma interna e uma externa. As forças (*Strengths*) e as fraquezas (*Weaknesses*) são fatores internos (do controlo do próprio ou da empresa), enquanto as oportunidades (*Opportunities*) são fatores externos (saem do controlo direto do próprio ou da empresa) que promove um crescimento positivo, e as ameaças (*Threats*) são fatores externos que afetam negativamente o desempenho e evolução na prática do exercício profissional (Gürel e Tat, 2017).

I.3.1. – FORÇAS

Integração no seio da empresa

Desde o primeiro momento, senti-me bem-vinda quer por parte dos colaboradores que trabalham na secção das FS, como pelos restantes colaboradores da unidade industrial.

O facto de haver uma grande diversidade nas idades dos colaboradores não afetou a minha integração, estando sempre prontos a responder a todas as minhas questões. Para além disso os responsáveis e supervisores da secção tentavam acompanhar o meu dia-a-dia e orientavam-me de modo a que eu pudesse conhecer todos os processos, equipamentos e especificações que fizessem parte da secção.

O estágio numa área tão dinâmica como é a Produção poderia tornar-se monótono se estivéssemos perante a repetição permanente das tarefas e se fosse produzido apenas um produto. Ora, na FARMALABOR são produzidos vários tipos de medicamentos o que torna a pesagem das matérias-primas, misturas, compressão ou enchimento e mesmo revestimento tarefas sempre iguais e sempre diferentes.

Para lá dessas tarefas, tive também a sorte de poder fazer parte de uma investigação após o fabrico de um produto, uma experiência que, tal como as outras, foi excepcional.

Higienização

Tive oportunidade de observar e mesmo participar em algumas higienizações de salas e equipamentos, tanto sumárias como completas. Uma e outras são importantes e diferentes. Faz-se uma higienização sumária quando há a mudança de um lote ou fração para outro do mesmo produto, já a higienização completa é feita quando há mudança do produto que é produzido.

Na maioria dos procedimentos de higienização, os equipamentos eram higienizados manualmente ou pelos operadores dentro da sala, ou enviados para as higienizadoras. Contudo havia equipamentos que possuíam a funcionalidade CIP automático (*Cleaning in place*) onde o processo de higienização estava descrito numa “receita” e o equipamento fazia tudo sozinho, desde puxar o detergente, usar água purificada, secar.

De modo a garantir que as salas e os equipamentos estão higienizados, todas as salas e equipamentos estavam devidamente identificados com etiquetas de acordo com o seu estado de higienização: etiqueta verde - “Limpo”; etiqueta amarela - “Para limpar”. A higienização de uma sala de produção só se encontra validada por um período limitado, sendo no caso da higienização completa de 12 dias.

O processo de higienização de uma sala de produção é muito importante para garantir a qualidade e segurança de um produto que seja produzido e, talvez seja o processo que mais tempo demora a ser realizado. Para tal, a FARMALABOR possui um sistema de higienização padronizado que se encontra validado segundo as normas e exigências do Sistema de Garantia da Qualidade e GMP.

Acesso a Documentação Interna

Ao estar na Área da Produção pude contactar diariamente com as IF dos medicamentos, registos de lotes e procedimentos operacionais, montagem e higienização dos diversos equipamentos.

Uma IF depois de devidamente preenchida e de possuir todos os testes que são realizados quer durante o processo de produção (Controlo em Processo (IPC, do inglês *in-Process Control*), quer no produto acabado (Boletim Analítico) torna-se um registo de lote.

Os registos de lotes de produtos que tenham sido anteriormente produzidos são muito importantes pois permitem a rastreabilidade e possui o histórico dos parâmetros, equipamentos e matérias-primas que foram usadas e que se podem tentar imitar caso o lote não apresente nenhum desvio e no caso de esse lote possuir um desvio ou uma reclamação pode-se fazer uma investigação para tentar descobrir o que possa ter corrido menos bem.

Realização de um procedimento operacional

Os procedimentos operacional, de montagem e de desmontagem e higienização de um novo equipamento são de extrema importância porque cada vez que um novo operador precisar de utilizar esse equipamento precisa de saber como funciona, como é higienizado e como o montar para nova utilização.

O desgaste dos equipamentos e a satisfação de novos pedidos por parte de clientes da FARMALABOR, implica a aquisição periódica de novos equipamentos e esta acarreta a necessidade de um tempo experimental para perceber o funcionamento e quais os parâmetros mais adequados para produzir lotes com a menor quantidade de defeitos.

Foi-me lançado o desafio de realizar os procedimentos operacional, de montagem e de higienização da máquina de revestimento automático *XLCota 350*[®] da Bosch[®]. Para tal precisei de assistir aos vários momentos de funcionamento e trabalho deste equipamento, desde a montagem, o processo de revestimento por filme ou açúcar, a desmontagem e a sua higienização. Essa experiência permitiu-me compreender como a fase de revestimento de um comprimido é uma etapa crítica na produção de comprimidos porque um revestimento mal

feito pode pôr em causa a qualidade e segurança do medicamento e, para além disso, não é apelativo para um utente tomar um medicamento com defeitos no revestimento, podendo fazer com que um lote inteiro de comprimidos não passe no controlo dos atributos de qualidade (AQL, do *inglês acceptable quality limit*).

I.3.2. – FRAQUEZAS

Auditorias

A indústria farmacêutica deve assegurar que os produtos produzidos são seguros, eficazes e que possuem a qualidade necessária (WHO, 2015). Para tal as auditorias possuem um importante papel em verificar a conformidade com as GMP, os requisitos regulamentares e identificar áreas de melhoria (WHO, a).

As auditorias são processos sistemáticos, documentados e podem ser externas quer internas. Estas foram frequentes durante a minha estadia, mas devido à importância que possuem e à minha inexperiência não pude acompanhar nenhuma. Assim, acabei por não perceber a dinâmica de uma auditoria.

Transposição de escala

Como seria de esperar, os equipamentos usados numa indústria são muito diferentes daqueles que são usados à escala laboratorial, como os usados nas aulas de Tecnologia Farmacêutica. Como estive maioritariamente na secção das FS tive a oportunidade de acompanhar vários processos de fabrico, desde a tamisação, mistura, granulagem, secagem, compressão ou enchimento de cápsulas e o revestimento quer por filme quer de açúcar. Também pude acompanhar o enchimento de saquetas.

Um exemplo que me marcou muito foi ter acompanhado praticamente todo o processo de fabrico de um lote de comprimidos de 1,5 milhões de unidades desde a sua mistura, compressão até ao revestimento.

Parâmetros dos diferentes equipamentos e as suas consequências

Cada equipamento por mais sofisticado que seja precisa de um operador a controlar para ter a certeza de que o que está a ser produzido está de acordo com os parâmetros esperados.

No caso do revestimento, por ter estado mais tempo nessa etapa da produção de um medicamento, desde a distância das pistolas para o leito dos comprimidos, o leque de

pulverização, o débito a que é pulverizada a solução de revestimento e mesmo a temperatura a que se encontram os comprimidos no momento do revestimento por filme pode influenciar o aspeto final do comprimido desde a uniformidade da cor, com um aspeto picotado ou com erosão nas arestas.

Mesmo na fase de compressão os parâmetros de compressão do equipamento como a força de compressão e de pré-compressão, a velocidade de compressão e as características do pó ou grânulos a comprimir como a humidade da mistura, a sua compressibilidade e o escoamento deficiente influenciam a dureza, a massa média e o aspeto final de cada comprimido como um comprimido ficar agarrado a um punção ou à matriz criando bordos irregulares.

I.3.3. – OPORTUNIDADES

Investigação de um produto

Apesar de o meu estágio ter sido maioritariamente na área da Produção eu tive a oportunidade de ir para a área da Garantia da Qualidade (GQ) onde participei numa investigação de um produto que possuía alguns desvios e reclamações. Esta investigação consistiu em pegar em todos os registos de lotes dos lotes anteriormente produzidos e comparar todos os parâmetros possíveis desde as características físicas e químicas dos excipientes e API, os equipamentos usados e os seus parâmetros, o *holding time* entre a mistura e a compressão e entre a compressão e o revestimento, os testes IPC, a quantidade de água usada na mistura. Para tornar a comparação mais fácil e eficaz utilizou-se a ferramenta *Microsoft Excel* e assim pude chegar a algumas conclusões de interessa para a FARMALABOR ao mesmo tempo que punha em prática e aprofundava os meus conhecimentos sobre essa ferramenta informática.

Esta investigação foi uma tentativa de perceber o que se podia fazer para melhorar a reprodutibilidade de um processo de fabrico. Após a análise dos dados, foi possível concluir que pequenas diferenças em parâmetros a que tinha sido dada pouca importância podem ter um impacto significativo no produto final.

Contacto com vários equipamentos e procedimentos

Embora tivesse participado antes numa visita de estudo às instalações da FARMALABOR, mal comecei o estágio, percebi que estava a entrar num mundo relativamente desconhecido que me entusiasmava e desafiava.

Na secção das FS as máquinas e equipamentos representaram todo um mundo de descobertas e novidade: pude contactar com máquinas de compressão como a Fette 1200i[®] e com o Checkmaster[®] que permite fazer o controlo (*In-Process Control*) dos comprimidos medindo a dureza, massa média, altura e diâmetro; procedimento de enchimento de cápsulas e de saquetas, granulador e estufa DIOSNA[®]. Um dos processos que tive oportunidade de ver foi o revestimento de açúcar. Trata-se de um tipo de revestimento já um pouco obsoleto e são poucos os produtos que ainda o possuem.

Apesar de ter passado a maior parte do meu tempo de estágio na secção das FS também pude fazer uma visita, apesar de rápida, à secção das Formas Líquidas, Pastosas e Semissólidas (FLPSS). Nesta secção pude observar como são produzidos os supositórios, como é feito o embalamento primário e secundário de um xarope e o enchimento de ampolas.

Kaizen

Kaizen é uma filosofia de melhoria continua com origem no Japão que significa mudar para melhor todos os dias em todas as áreas da empresa e envolvendo todos os seus colaboradores. Nesta filosofia é utilizada a palavra japonesa “*muda*” para desperdício. Entende-se por desperdício tudo o que não acrescenta valor ao cliente, ou seja, são todas as atividades desenvolvidas, numa indústria, pelas quais o cliente não está disposto a pagar (Kaizen Institute). A eliminação de tudo aquilo que não é considerado gerador de valor, permite aumentar a produtividade e, consequentemente a rentabilidade do negócio.

Enquanto estagiária da secção das FS pude observar vários momentos em que foram utilizados os fundamentos *Kaizen*:

- organização das equipas, quer através de quadros visuais, quer através de pequenas reuniões que eram feitas no início do trabalho de cada turno, onde os colaboradores eram organizados para a jornada de trabalho;
- planos semanais onde mostrava o que se devia fazer, em quanto tempo e se estavam a ser cumpridos;
- metodologia SMED (“*Single Minute Exchange of Dies*”) que visa reduzir o tempo que o equipamento se encontra parado numa mudança do produto. Em termos práticos, esta metodologia significa que o tempo de *set-up* tem de ser o mais curto possível e para isso

acontecer não se pode, por exemplo, perder tempo à procura de uma ferramenta que está do outro lado da secção. Tem de estar tudo preparado, as ferramentas e outros materiais necessários, para fazer o trabalho o mais rapidamente possível.

Como nos dias que correm querem tudo feito «para ontem» e com níveis de exigências cada vez maiores, a filosofia de melhoria contínua é realmente muito importante para melhorar processos que se achava que não podiam melhorar mais.

I.3.4. – AMEAÇAS

Resolução de problemas

A indústria farmacêutica está constantemente a ser pressionada com medidas governamentais, por parte dos clientes, que dão prazos cada vez mais curtos, e pela elevada competitividade do ramo. Assim, a área de produção é aquela em que mais se faz sentir essa pressão. O processo de fabrico de um simples comprimido é complexo. Estamos a falar de várias etapas e *holding time* que têm de ser cumpridos. Em cada etapa vários problemas podem surgir e uma resposta rápida na resolução pode ditar se o lote é aprovado ou não.

Um exemplo foi durante o revestimento de açúcar de um comprimido em que no passo do enchimento aderiam à superfície pedaços do revestimento que estavam presos ao tambor. Este defeito era considerado um defeito crítico, não passando no AQL e tendo sido necessário proceder à escolha manual dos comprimidos, rejeitando os que possuíam o defeito. Nos lotes seguintes foram tentadas várias abordagens para minimizar este defeito, desde aumentar a temperatura da solução de revestimento (xarope de açúcar), utilizar menos aplicadores para não deitar a solução diretamente no tambor, a limpeza da máquina entre frações, uma espécie de tamisação dos comprimidos para eliminar os pedaços do revestimento que se pudessem encontrar soltos até chegar à melhor solução.

Duração do estágio

O ano de 2020 foi um ano atípico na sociedade, em geral, e afetou também a duração do meu estágio com as implicações negativas que isso acarreta. Quando me estava anunciado que nas duas semanas que faltavam para a conclusão iria passar por outras secções na área da Produção, foi interrompido o meu percurso e a possibilidade de cumprir em pleno o sonho de aprender muito com a minha prática e a ajuda de quem está por dentro de muito saber reservado a poucos. Ninguém teve culpa e isso me conforta. Quem sabe se um dia não poderei voltar para aprender mais um pouco e fazer uso daquilo que aprendi?

I.4. – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estágio foi muito enriquecedor e marcante para a minha formação enquanto profissional de saúde na medida em que pude observar o “nascimento” de um medicamento, sabendo todo o trabalho que está por trás de uma caixinha que é dispensada na farmácia. Cresci muito quer a nível pessoal, quer a nível profissional pois é um estágio que exige uma certa capacidade de adaptação e pensamento crítico.

Fico satisfeita pelo enriquecimento que essa experiência trouxe à minha formação, mas também fico orgulhosamente feliz ao pensar que ajudei os operários em tudo o que podia e por ter dado um pouco do meu contributo à empresa através de todas as atividades que me foram pedidas.

Às pessoas a quem conheci e com quem trabalhei e aprendi na FARMALABOR, agradeço a forma como foram sempre prestáveis, simpáticas, disponíveis e preocupadas comigo e com as minhas dificuldades. Sem a sua ajuda e paciência o caminho seria mais difícil.

Um agradecimento especial a toda a equipa da secção de FS da FARMALABOR que me acompanhou de perto, especialmente ao Dr. Pedro Santos, à Dra. Joana Machado, à Idília Tavares e à Dina Monteiro.

Bem hajam!

BIBLIOGRAFIA

- ALVES, Luís Alberto Marques - **História da Educação – uma introdução**. Disponível em: <https://ler.letras.up.pt/uploads/ficheiros/10021.pdf>. ISBN 978-972-8932-97-8.
- APIFARMA - **A Indústria Farmacêutica em Portugal: Saber Investir, Saber Inovar - 75 anos**. Apifarma ed. ISBN 978-989-99258-0-9.
- APIFARMA - **Indústria Farmacêutica em Números 2018**, atual. 2020. [Consult. 23 mar. 2020]. Disponível em: <https://www.apifarma.pt/publicacoes/ifnumeros/Paginas/IFNumeros2018.aspx>
- EFPIA - **Building a healthier future for Europe**, atual. 2018. [Consult. 25 mai. 2020]. Disponível em: <https://efpia.eu/manifesto/>
- GRUPO MEDINFAR (a) - **Notícias - A FARMALABOR comemora 25 anos!** [Consult. 20 mar. 2020]. Disponível em: <http://www.medinfar.pt/2015/05/a-farmalabor-comemora-25-anos/#prettyPhoto>
- GRUPO MEDINFAR (b) - **Notícias - Farma 2020** [Consult. 20 mar. 2020]. Disponível em: <https://www.medinfar.pt/index.html%3Fp=7499.html>
- GRUPO MEDINFAR (c) - **Onde actuamos - FARMALABOR** [Consult. 20 mar. 2020]. Disponível em: <https://www.medinfar.pt/farmalabor/>
- GÜREL, Emet; TAT, Merba - **SWOT analysis: a Theoretical review**. The Journal of International Social Research. 10:51 (2017) 994–1006. doi: 10.17719/jisr.2017.1832.
- KAIZEN INSTITUTE - **Mission** [Consult. 23 mar. 2020]. Disponível em: <https://www.kaizen.com/about-us.html#mission>
- ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **Indústria Farmacêutica** [Consult. 20 mar. 2020]. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/industria-farmaceutica/>
- SILVA, Bárbara - **Halibut. As muitas vidas da pomada que tem nome de peixe**, atual. 2018. [Consult. 29 mai. 2020]. Disponível em: <https://www.dinheirovivo.pt/empresas/halibut-as-muitas-vidas-da-pomada-que-tem-nome-de-peixe/>
- WHO (a) - **Inspections** [Consult. 12 jun. 2020]. Disponível em: https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/inspections/en/
- WHO - **Annex 4 - General guidance on hold-time studies**. WHO Technical Report Serie. 992 (2015) 87–93.

II – RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA



Orientado por: **Dra. Marília Lopes**

1 2 9 0



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

LISTA DE ABREVIATURAS

DCI	Denominação Comum Internacional
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P.
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
MNSRM	Medicamento Não Sujeito a Receita Médica
PDCA	Do inglês “ <i>Plan, Do, Check, Action</i> ”
SWOT	Do inglês “ <i>Strengths; Weaknesses; Opportunities; Threats</i> ”

2.1. – INTRODUÇÃO

O presente relatório tem como objetivo apresentar a minha experiência enquanto estagiária na Farmácia da Ponte desde o dia 1 de junho até ao dia 20 de outubro de 2020 e será apresentado sob a forma de análise SWOT (do inglês: *Strengths; Weaknesses; Opportunities; Threats*).

O Estágio Curricular funciona como elo entre as aprendizagens teóricas adquiridas ao longo da formação académica do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) e a aplicação das mesmas em contexto profissional. Em Portugal, a área mais representativa da atuação de um farmacêutico é a farmácia comunitária, não só pela visibilidade e importância que tem junto do público, como também pela quantidade de profissionais que absorve (Pita e Bell, 2016).

Se tivermos em conta que um utente vê, em média, o farmacêutico comunitário cinco a oito vezes mais por ano do que o seu médico de família (Tsuyuki *et al.*, 2018) e que a dispensa de um medicamento errado pode levar a um grave problema de saúde, podemos perceber como é importante e de alta responsabilidade o papel do farmacêutico nos cuidados de saúde de um país, nomeadamente nos cuidados primários.

É certo que a prescrição dos medicamentos é da responsabilidade dos médicos e quando feita em suporte informático (impresa ou não) facilita o trabalho aos trabalhadores da farmácia que, ajudados por equipamento de leitura ótica, sabem exatamente o que devem entregar ao utente, mas o papel do farmacêutico não se esgota na prestação desse serviço principalmente quando o doente aparece sem qualquer receita e pede medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM). Um aconselhamento sério terá de ter em linha de conta os conhecimentos tecnológicos e terapêuticos desse medicamento e a opção só pode ser tomada por quem tem esses conhecimentos. O papel do farmacêutico é crucial.

2.2. – ENQUADRAMENTO

A Farmácia da Ponte, situada na Rua D. Afonso III, n.º 92, em Mirandela, apresenta uma imagem sólida, moderna e cuidada, inspiradora de confiança e qualidade. Encontra-se numa rua movimentada do centro da cidade. Na zona envolvente existe um centro de enfermagem com diversas especialidades, clínicas dentárias, instituições bancárias, serviços públicos como a câmara municipal, tribunal e várias lojas comerciais. Trata-se de uma situação privilegiada até por distar cerca de quinhentos metros do Hospital de Mirandela, integrado no Centro Hospital do Nordeste e menos de mil metros do Hospital Terra Quente.

Disponível para atender utentes de qualquer idade, condição social ou patologia, a maioria dos utentes habituais da farmácia encontra-se nas faixas etárias mais elevadas, de nível socioeconómico médio/baixo, residentes nas proximidades que têm uma relação de confiança e fidelidade com a instituição.

Entre os utentes ocasionais merecem destaque os turistas que, em visita a Mirandela, atraídos pelos seus encantos naturais ou arquitetónicos ou pelos seus produtos gastronómicos, como o azeite e as alheiras, aproveitam para fazer as suas compras nomeadamente MNSRM, cosméticos e outros produtos de uso pessoal. Para isso, revela-se particularmente útil a existência de um quadro onde constam as campanhas em vigor, os indicadores, as tarefas e uma tabela PDCA (*Plan, Do, Check, Action* - Planear, Fazer, Verificar e Agir) para comunicação e organização de tarefas, tudo isto dentro da filosofia *Kaizen*, que se foca na melhoria contínua, ou seja, no aperfeiçoamento da atividade e eficiência da farmácia.

O funcionamento da Farmácia da Ponte, num horário contínuo das 9h às 19h, de segunda-feira a sexta-feira, e das 9h às 13h no sábado, acrescido do serviço permanente a cada seis dias, é garantido pela Diretora Técnica, dois farmacêuticos e quatro técnicos de farmácia.

2.3. – ANÁLISE SWOT

Tal como foi descrito no Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica, a análise *SWOT* consiste em identificar as forças (*Strengths*), as fraquezas (*Weaknesses*), as oportunidades (*Opportunities*) e as ameaças (*Threats*) sentidas no decorrer do estágio curricular em Farmácia Comunitária.

2.3.1. – FORÇAS

Autonomia e confiança depositada

O início do estágio foi ocupado entre a observação de atendimentos que eram realizados pela equipa e atividades de *backoffice* como:

- dar entrada aos diferentes tipos de encomendas (diárias, instantâneas, manuais, via verde e esgotados) provenientes dos diferentes armazenistas ou vindas diretamente dos laboratórios;
- verificação das validades;
- criação e regularização de devoluções;
- organização e reposição de gavetas, lineares segundo a regra *first in, first out*;
- organização dos produtos excedentes no armazém segundo a mesma regra.

A complexidade gradual das tarefas pedidas ajudou à autoestima e pouco depois do início do estágio, consideravam-me e achava-me capaz de realizar essas tarefas autonomamente e comecei a dar entrada sozinha primeiro às encomendas mais simples e depois a qualquer tipo de encomenda pois sabia que se me deparasse com alguma situação mais complexa podia sempre contar com a ajuda de alguém ou recorrer ao Manual de Eficiência Operacional que se encontra à disposição de toda a equipa. Este manual consiste em instruções simples (*One Point Lesson*) que têm como objetivo facilitar as tarefas diárias exercidas na farmácia para haver uma minimização de erros.

Enquanto estava a avançar nas atividades de *backoffice* pude participar nas reuniões feitas através dos princípios *Kaizen* e comecei a realizar o atendimento ao público, tarefa que rapidamente consegui realizar de forma autónoma pois também aqui sabia que podia contar com o apoio de alguém quando confrontada com alguma situação que não soubesse resolver, fosse um caso clínico ou algum pormenor do *Sifarma 2000*[®].

Estas atividades revelaram-se de extrema importância porque me permitiram perceber o tipo de produtos que estão disponíveis na farmácia e o modo de funcionamento do *Sifarma 2000*[®].

Indicação farmacêutica e responsabilidade social

Os utentes dirigem-se, muitas vezes, primeiro à farmácia à procura de conselhos para os seus problemas. Nestes casos, com uma série de perguntas tentava recolher informações sobre o utente desde os sinais e sintomas, ao historial clínico. A partir daí, optava por três respostas alternativas: o aconselhamento de medidas não farmacológicas como mudança de hábitos alimentares, exercício físico, hidratação e outras que fossem relevantes para o caso; a introdução de um MNSRM tendo em conta a relação benefício-risco-custo e a qualidade, eficácia e segurança, explicando a forma como era tomado, a ação do medicamento e qual a duração do tratamento; e em situações mais graves, aconselhei o utente a dirigir-se ao seu médico de família ou outro.

Noutras situações, o facto de poder aplicar conceitos de farmacologia e conhecimento sobre as interações medicamentosas foi muito gratificante. Desde uso racional de antibióticos, à existência de cafeína em algumas formulações farmacêuticas e o seu efeito em indivíduos com hipertensão e o efeito do ibuprofeno em indivíduos asmáticos.

Para além disto, a Farmácia da Ponte pertence às Farmácias *abem*: que permite que pessoas em situação de carência económica possam comprar os medicamento que lhes são prescritos (Abem Dignitude). E colabora com lares e residências sénior na dispensa e entrega de medicamentos, tendo sempre o cuidado de registar o nome da pessoa para quem se destina o medicamento.

Gestão e administração

O meu estágio permitiu-me concluir que a Farmácia da Ponte procede diariamente a um controlo rigoroso e ponderado na gestão de *stocks* e na compra de novos produtos, atendendo sempre às necessidades e exigências dos utentes. O facto de os fornecedores principais da farmácia fazerem entrega duas vezes por dia (de manhã e à tarde) permite à farmácia não ter muito *stock* de um produto, pois se for encomendado de manhã, está disponível para ser facultado ao utente no período da tarde.

Devido à forte competitividade do mercado, a Farmácia da Ponte, dispõe de um espaço organizado, acolhedor, com boa visibilidade e sinalização dos vários setores, marcas e produtos. Para além disso, a montra é reformulada regularmente, mostrando à população em geral as promoções a decorrer. O *marketing* é reforçado no interior da farmácia com a acentuada rotatividade das prateleiras e gôndola onde o utente pode ver e/ou perguntar sobre os produtos e sentir o impulso de comprar os produtos sazonais ou para a estação que se

avizinha. Enquanto estagiária pode observar e colaborar no processo de mudança de lineares de modo a permitir a dinamização de produtos.

A farmácia dispõe o *CashLogy by Azkoyen*[®] (terminal automático de pagamento que permite efetuar pagamentos em dinheiro) que se revela uma mais-valia importante na medida em que o troco é automaticamente fornecido pela máquina, agilizando o ato de pagamento, e contribui para evitar erros de contagem.

2.3.2. – FRAQUEZAS

Plano de estudos do MICF

Pressupondo que o estágio é a primeira oportunidade de pôr em prática os conhecimentos adquiridos nos bancos da Faculdade e de os completar com a experiência em ambiente de trabalho muito próximo daquele que em que nos iremos integrar num futuro próximo, foi óbvia a falta de conhecimentos em diversas áreas, principalmente pediatria, ortopedia, oftalmologia, veterinária e suplementos alimentares. Isso leva-me a questionar se a sua abordagem no plano de estudos do MICF não seria importante, reconhecendo, embora que o nosso plano de estudos já é muito diversificado e nos garante muitos conhecimentos que são aplicáveis em várias áreas. Pedir mais será pedir o impossível? Deixo a questão a quem pode decidir, na certeza de que também estas áreas são importantes no dia-a-dia da farmácia comunitária.

A proposta anterior parte da experiência na Farmácia da Ponte, frequentada por muitos utentes vindos das aldeias vizinhas de Mirandela onde a criação de animais é uma realidade. Deparei-me com uma procura por produtos de uso veterinário, nomeadamente anticoncetivos para felinos, desparasitantes para aves, felinos e canídeos, vacinas para coelhos, entre outros e, inicialmente, não sabia responder às necessidades apresentadas.

No domínio da veterinária como nos outros referidos antes, as dificuldades foram ultrapassadas pedindo ajuda aos restantes elementos da farmácia, investigando e procurando aprimorar os meus conhecimentos.

Nomes comerciais e DCI

Aconteceu muitas vezes os utentes aparecerem na farmácia com uma ideia clara para eles dos produtos que queriam obter, mas com alguma dificuldade em se fazerem perceber sobre o nome do fármaco. O recurso à memória por parte de quem não está familiarizado com os nomes dos medicamentos levou a algumas situações em que a comunicação se tornou difícil, demorando a associar alguns nomes comerciais à sua Denominação Comum

Internacional (DCI). Recordo-me que numa situação concreta aquilo que eu percebia era “*um, cinco, três*” quando o utente queria *Cyclo 3*[®] (a máscara e os acrílicos colocados nos balcões de atendimento também não ajudam nestes casos). Percebi depois que estas aproximações sonoras são frequentes, mas não chegam a provocar mal-entendidos porque o nosso ouvido se vai adaptando a esses pedidos, principalmente quando o utente é um cliente habitual da farmácia.

Localização da Farmácia

A localização da farmácia é ambivalente: pela sua centralidade relativamente ao núcleo urbano de Mirandela, podemos considerá-la um fator positivo; por estar numa rua movimentada com trânsito nos dois sentidos, com as faixas de rodagem separadas por traço contínuo e não possuir nenhum lugar de estacionamento, os utentes, ao optarem por parar as suas viaturas na estrada, podem estar sujeitos a coimas. É esta fraqueza que ultrapassa a capacidade de resposta da farmácia e tem que conviver com ela contornando-a com um atendimento o mais rápido possível, como é prática instituída e muitas vezes lembrada pelos utentes com a expressão “*tenho muita pressa*”. Essa pressão extra, dificultou os meus primeiros atendimentos porque ainda não conseguia usar convenientemente o *Sifarma 2000*[®] e perceber o que tinha de fazer, mas com o avançar do estágio consegui melhorar os meus atendimentos de modo a responder às expectativas do utente e continuar a fazer o meu papel enquanto farmacêutica.

Receitas Manuais

A informatização dos serviços médicos com as prescrições a serem maioritariamente eletrónicas facilita muito a tarefa da farmácia pois após a inserção correta dos códigos de acesso da mesma, obtemos a informação de todos os medicamentos prescritos, número de embalagens, os planos de comparticipação já vêm inseridos e o sistema ainda alerta para a validade da prescrição.

Bem diferente é a situação quando algum utente aparece com uma receita manual. A identificação do medicamento prescrito é a primeira dificuldade, mas a responsabilidade do farmacêutico vai para lá disso: tem de verificar o número de saúde do utente, tem de inserir o plano e comparticipação correto, verificar as vinhetas e ainda confirmar se a receita está dentro da validade e com a assinatura do médico. Inicialmente, foi complicado lidar com este tipo de receitas e retirar delas a informação necessária devido à caligrafia das mesmas. A ajuda dos mais experientes e a realização deste processo várias vezes ajudaram a ultrapassar esta

dificuldade ficando mais confiante, eficiente e disponível para colaborar na correta terapêutica do utente.

2.3.3. – OPORTUNIDADES

Preparação de manipulados

Com a evolução da indústria farmacêutica, a preparação de medicamentos personalizados para cada utente por parte da farmácia é praticamente residual. No entanto, durante o meu percurso pela Farmácia da Ponte tive a oportunidade de preparar várias soluções de álcool a 70° com ácido bórico à saturação, uma solução alcoólica de ácido salicílico a 12% e a solução à base de álcool que era usada na farmácia para a desinfeção de superfícies, tendo sempre em atenção as Boas Práticas de Preparação de Medicamentos Manipulados (Portaria n.º 594/2004) e aplicando os conhecimentos adquiridos em Farmácia Galénica.

Pude também preencher a Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados onde consta os prazos de utilização e as condições de conservação, o material de acondicionamento e o cálculo do preço de venda ao público.

Parâmetros bioquímicos

São vários os serviços prestados na farmácia na área dos cuidados de saúde, desde consultas de nutrição, podologia, osteopatia até à medição de parâmetros bioquímicos.

Foi no Gabinete que comecei a ter um contacto mais personalizado com os utentes da farmácia pois a privacidade permitiu uma comunicação mais confortável sobre os seus problemas e necessidades sentidas, extravasando algumas vezes o campo da saúde e falando de si e da família. Foi no mesmo espaço que pude, não só praticar as técnicas de medição da tensão arterial, glicémia, colesterol total, triglicéridos e hemoglobina, como também melhorar o meu aconselhamento farmacêutico com um maior enfoque no utente.

Novo Módulo de Atendimento

No final de setembro, a Farmácia da Ponte iniciou a transição do *Sifarma 2000*[®] para o novo módulo de atendimento *Sifarma*[®].

Este módulo veio facilitar o atendimento devido às novas funcionalidades oferecidas pelo sistema e que o tornam mais intuitivo: é possível voltar atrás se nos esquecermos de algo; editar os diferentes componentes; fazer atendimentos complexos, ou seja, associar mais do que um utente ao atendimento; criar faturas diferentes consoante o IVA ou por utente;

separar os medicamentos pagos a pronto ou a crédito na mesma venda. Isto não era possível de fazer no *Sifarma 2000*[®] numa só venda, perdendo-se muito tempo no atendimento.

2.3.4. – AMEAÇAS

Doença provocada pelo novo coronavírus

Todo o meu estágio aconteceu num período marcado pela infeção pelo novo Coronavírus (SARS-CoV-2) e com todas as implicações que isso causou para a equipa da farmácia e para os utentes: acrílicos no balcão, controlo do acesso, uso de máscaras, desinfeção das mãos várias vezes ao dia, desinfeção do espaço (Direção-Geral de Saúde, 2020).

Teve implicações, desde logo, no início do meu estágio que estava previsto começar em abril e teve de ser adiado para depois do período de confinamento, começando no início de junho, ou seja, dois meses depois. Ao sermos duas estagiárias a fazer estágio em simultâneo, na farmácia tivemos horários por turnos, ou seja, numa semana uma trabalhava no período da manhã e na semana seguinte passava para o período da tarde.

Desvalorização da imagem do estagiário

Como a relação dos utentes com a farmácia é por natureza ocasional, só a repetição das “visitas” acaba por criar uma relação de proximidade e confiança entre quem atende e quem é atendido. Ao longo do estágio apercebi-me que nem todos os utentes se sentem à vontade para ser atendidos por um estagiário encarado como desconhecedor, inexperiente e passível de cometer alguma falha grave. Houve mesmo alguns utentes que solicitaram ser atendidos por um membro efetivo, ou até mesmo um farmacêutico em específico, recusando o meu atendimento com o argumento que os outros os conheciam há muito tempo.

Entrada em vigor da Portaria n.º 284-A/2016

De acordo com o Artigo 17º da Portaria n.º 284-A/2016, "As farmácias apenas podem dispensar um máximo de duas embalagens, por linha de prescrição, ou de quatro embalagens, no caso das embalagens em dose unitária, por mês".

Sendo muitos dos utentes da Farmácia da Ponte de aldeias, estando muitas vezes isolados e precisando de transportes específicos para chegarem a Mirandela foi complicado explicar que só poderiam levar duas caixas dos medicamentos a quem estava habituado a levar para casa a totalidade dos medicamentos prescritos. Contudo as farmácias podem, mediante justificações que estão previstas na Portaria, dispensar uma quantidade superiores,

nomeadamente quando a quantidade de embalagens necessárias para cumprir o tratamento é superior a duas embalagens por mês, extravio, perda ou roubo de medicamentos e em caso de dificuldade de deslocação à farmácia ou de ausência prolongada do país.

Medicamentos esgotados

Os medicamentos esgotados são uma realidade frequente em todas as farmácias. Explicar isso aos utentes foi uma tarefa difícil pois quando me ouviam dizer que determinado medicamento estava esgotado achavam ou que havia uma má gestão de *stock* por parte da farmácia ou que eu não o queria dispensar. A dificuldade de compreensão, descontentamento ou desconfiança foi particularmente notória quando se tratava de medicação crónica, em que os doentes estavam habituados às marcas e aspeto das embalagens que adquiriam.

Um exemplo de um medicamento que esteve esgotado durante um longo período foi o *Victan*[®] 2 mg, medicamento este que ainda não possui genérico no mercado. A situação tornou-se tão preocupante a nível nacional que o INFARMED viu-se obrigada a emitir uma circular a pedir aos médicos prescritores para tentarem alterar a terapêutica porque este ia continuar esgotado até ao quarto trimestre do ano (n.º 134/CD/100.20.200 de 21/07/2020).

2.4. – CASOS PRÁTICOS

Caso Prático 1

Utente do sexo masculino, na casa dos 65 anos pede para fazer a medição dos triglicerídeos porque já se tinham passado três meses desde a última medição.

Foi feita a determinação dos triglicerídeos e do colesterol total tendo-se obtido, respetivamente, 300 mg/dL e 270 mg/dL.

Com algumas perguntas, percebi que o utente tinha deixado de tomar a atorvastatina de 40 mg desde que o urologista lhe prescreveu a tansalúsina 0,4 mg porque achava que iria fazer interação com o novo medicamento e porque o médico na altura da prescrição da tansalúsina 0,4 mg não referiu a toma da atorvastatina 40 mg. Achou, assim, que já não era para continuar. O aconselhamento farmacêutico consistiu no esclarecimento do uso da terapêutica, promovendo a adesão à atorvastatina para reduzir o risco de um outcome negativo, como um problema cardiovascular, e na adoção de um estilo de vida mais saudável como reduzir o consumo de gorduras, evitar fritos e produtos de charcutaria e praticar exercício físico regular.

Mesmo assim, foi aconselhado a visitar o médico e exprimir as suas dúvidas.

Caso Prático 2

Utente do sexo masculino com cerca de 30 anos que se encontrava em Mirandela de férias, dirigiu-se à farmácia devido a hemorroidas.

Foram colocadas várias questões para tentar avaliar a situação: se havia muito tempo que tinha aparecido o problema; se havia sangramento; se tomava algum medicamento; se tinha levantado pesos ultimamente...

Na resposta a estas questões o utente referiu que ainda não havia sangramento, havendo apenas desconforto, prurido e uma ligeira dor no momento defecatório. Referiu ainda que não queria tomar nenhum comprimido porque estava de férias e não tinha capacidade para se lembrar da toma correta de comprimidos. Sugeri o uso de uma pomada retal contendo tribenosídeo e lidocaína, em que o tribenosídeo melhora o tónus vascular e possui propriedades anti-inflamatórias e cicatrizantes e a lidocaína funciona como analgésico local; disse-lhe para aplicar duas vezes por dia, de manhã e à noite, nos primeiros dias e posteriormente aplicar apenas uma vez por dia até os sintomas melhorarem (INFARMED, a). Para além da pomada, ainda aconselhei o uso de toalhetes húmidos adequados para a higiene da zona anal contendo produtos naturais como aloé vera (*Aloe barbadensis*), hamamélia (*Hamamelis virginiana*) e

castanheiro-da-índia (*Aesculus hippocastanum*) porque têm uma ação anti-inflamatória, cicatrizante e venotópica.

Aconselhei também a manutenção de fezes moles através da ingestão de alimentos ricos em fibras e líquidos; a diminuição do consumo de alimentos condimentados como enchidos e da ingestão de álcool. Numa situação de crise aguda poderia lavar a região do canal anal com água fria, pois esta provoca um efeito vasoconstritor.

Caso Prático 3

Casal jovem dirigiu-se à farmácia solicitando a pílula do dia seguinte. Perguntei quando tinha sido a última menstruação, se usava algum método contraceptivo oral ou não, se nos últimos 6 meses já tinha tomado alguma vez a pílula do dia seguinte, entre outras questões.

Depois de considerar a situação acabei por ceder a contraceção hormonal de emergência contendo levonorgestrel, advertindo que não é 100% eficaz na prevenção de uma gravidez indesejada e poderia provocar alguns efeitos indesejados como aumento da sensibilidade mamária, vômitos, tonturas, dores pélvicas (INFARMED, b). Para além disso, a contraceção hormonal de emergência pode provocar alterações menstruais, atrasando ou adiantado, cerca de um a dois dias e caso o atraso na menstruação fosse superior a cinco dias deveria ser feito um teste de gravidez (Pacheco *et al.*, 2015).

Já no final do atendimento recomendei o uso de um método barreira como o preservativo durante pelo menos os sete dias seguintes à toma e aconselhei o contacto com o médico para propor um método contraceptivo de uso regular, como uma pílula combinada.

2.5. – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O meu percurso pela Farmácia da Ponte pode ser dividido em três momentos distintos: a um primeiro momento de receio de falhar perante a novidade das tarefas que me foram sendo pedidas, seguiu a fase de estímulos positivos vindos da direção e dos restantes elementos que me ajudaram a perceber que era capaz de as realizar com sucesso chegando com alguma rapidez à fase em que me sentia segura e confiante em todas as funções que fui chamada a desempenhar. Assim, posso registar com agrado que a experiência de estágio me permitiu crescer tanto a nível profissional, como a nível pessoal, como comunicacional e emocional.

Agradeço a cada utente e a cada membro da equipa pela forma como contribuíram para o desenvolvimento das minhas competências, pelas experiências partilhadas, pela disponibilidade e amizade e por me proporcionarem as ferramentas necessárias ao exercício da atividade farmacêutica. Bem hajam!

BIBLIOGRAFIA

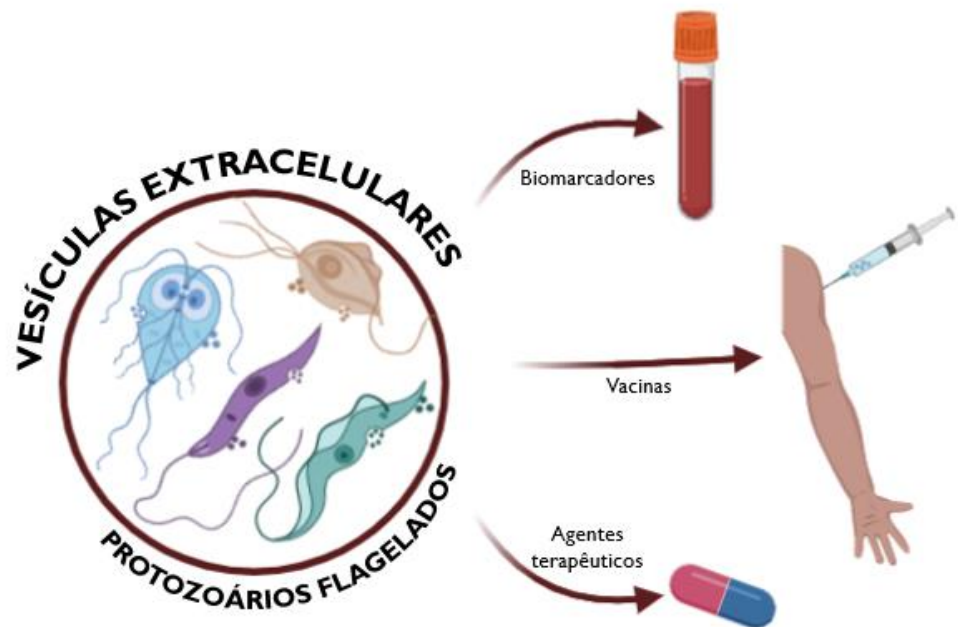
- ABEM DIGNITUDE - **Como funciona** [Consult. 28 set. 2020]. Disponível em: <https://abem.dignitude.org/como-funciona/>
- Norma n° 0003/2020. **Normas e Circulares Normativas (20-03-22)** [Consult. 24 abr. 2020]. Disponível em: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0032020-de-19032020.aspx>
- INFARMED, I. P. - **Circular informativa n.º 134/CD/100.20.200 de 21/07/2020** [Consult. 15 ago. 2020]. Disponível em: https://www.infarmed.pt/web/infarmed/infarmed/-/journal_content/56/15786/3753383
- INFARMED, I. P. (a) - **Resumo das Características do Medicamento - Procto-Glyvenol 50 mg/g + 20 mg/g Creme rectal** [Consult. 28 set. 2020]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
- INFARMED, I. P. (b) - **Resumo das Características do Medicamento - Postinor** [Consult. 28 set. 2020]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/>
- PACHECO, Amália; COSTA, Ana Rosa; MARTINS, Isabel; PALMA, Fátima; SOUSA, Filomena; ALMEIDA, Maria Do Céu; BOMBAS, Teresa - **Recomendações sobre Contraceção de Emergência. Sociedade Portuguesa da Contraceção.** (2015).
- PITA, João Rui; BELL, Victoria - **A farmácia em Portugal nos últimos 30 anos: algumas reflexões sobre a farmácia de oficina ou comunitária.** Debater a Europa. 15:2016) 197–215. doi: 10.14195/1647-6336_15_11.
- PORTARIA N.º 284-A/2016 - **Diário da República n.º 212/2016** [Consult. 28 set. 2020]. Disponível em: <https://dre.pt/web/guest/pesquisa/-/search/75660778/details/normal?l=1>
- PORTARIA N.º 594/2004 - **Diário da República n.º 129/2004** [Consult. 28 set. 2020]. Disponível em: <https://dre.pt/pesquisa/-/search/261875/details/maximized>
- TSUYUKI, Ross T.; BEAHM, Nathan P.; OKADA, Hiroshi; HAMARNEH, Yazid N. AL - **Pharmacists as accessible primary health care providers: Review of the evidence.** Canadian Pharmacists Journal. 151:1 (2018) 4–5. doi: 10.1177/1715163517745517.



— MONOGRAFIA

VESÍCULAS EXTRACELULARES EM PROTOZOÁRIOS FLAGELADOS

Potencial aplicação no diagnóstico e terapêutica



Orientada por: Professora Doutora Maria do Céu Sousa

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
BspA	do inglês “ <i>Bacteroides surface protein A</i> ”
DST	Doença sexualmente transmissível
ESCRT	do inglês “ <i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i> ”
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês “ <i>Human Immunodeficiency Virus</i> ”
IL	Interleucina
ILVs	Vesículas intraluminais, do inglês “ <i>Intraluminal Vesicle</i> ”
LV	Leishmaniose Visceral
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade, do inglês “ <i>Major Histocompatibility Complex</i> ”
miRNA	microRNA, do inglês “ <i>micro Ribonucleic Acid</i> ”
mRNA	RNA mensageiro, do inglês “ <i>messenger Ribonucleic Acid</i> ”
MVBs	Corpos multivesiculares, do inglês “ <i>Multivesicular Bodies</i> ”
MVs	Microvesículas
ncRNA	RNA não codificante, do inglês “ <i>non-coding Ribonucleic Acid</i> ”
OMS	Organização Mundial da Saúde
qPCR	do inglês “ <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> ”
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês “ <i>Ribonucleic Acid</i> ”
rRNA	RNA ribossomal, do inglês “ <i>ribosomal Ribonucleic Acid</i> ”
SNC	Sistema Nervoso Central
syn.	Sinónimo
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa, do inglês “ <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> ”
VEs	Vesículas Extracelulares

RESUMO

As vesículas extracelulares (VEs) são um grupo heterogêneo de vesículas que são libertadas naturalmente das células quer em condições normais quer em condições patológicas. São constituídas por proteínas, lípidos, ácidos nucleicos e outras biomoléculas que lhes dão a capacidade de interagirem com os diversos tipos de células, mantendo a homeostase, modulando o sistema imunológico, ou, no caso de agentes patogénicos, permitir a sua sobrevivência perante mudanças de fatores ambientais.

As doenças parasitárias, na sua maioria, são doenças negligenciadas, isto é, são doenças endémicas de regiões mais pobres, onde o fraco investimento em saúde, associado à falta de uma terapêutica eficaz e de meios de diagnóstico atempados, causam milhões de mortes em todo o mundo.

As VEs dos parasitas representam uma esperança para o futuro controlo e diagnóstico das doenças infecciosas. O facto de as VEs serem produzidas naturalmente pelas células, terem um papel importante na comunicação celular e interações parasita-hospedeiro e estarem presentes em vários fluidos biológicos, são características importantes e por isso, tem surgido um interesse crescente na aplicação das VEs como biomarcadores para o diagnóstico das diferentes parasitoses, como meio de terapêutica ou mesmo para futuras vacinas.

Embora exista uma grande biodiversidade de parasitas, neste trabalho apenas será referido o potencial papel das EVs de um grupo muito específico, os protozoários flagelados ao qual pertencem *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma spp.* e *Leishmania spp.*

Palavras-chave: Vesículas extracelulares, exossoma, protozoários flagelados, parasitoses, biomarcadores, terapêutica, vacinas.

ABSTRACT

Extracellular vesicles (EVs) are a heterogeneous population of vesicles that are naturally released from cells under both normal and pathological conditions. The EVs contain proteins, lipids, nucleic acids and other biomolecules that give them the ability to interact with a variety of cell types, maintaining homeostasis, modulating the immune system, or, in the case of infectious agents, allow them to survive in the presence of environment changes.

Most parasitic diseases are neglected diseases. These diseases are endemic to underdeveloped regions, associated with poverty, where the low investment in health, associated with the lack of effective therapy and diagnosis means, cause millions of deaths worldwide.

The parasites EVs represent hope for the future control and diagnosis of infectious diseases. The fact that EVs are naturally produced by the cells, have an important role in cellular communication and parasite-host interactions and are present in various biological fluids, are important characteristics and, therefore, a growing interest has emerged in the application of EVs as biomarkers for the detection of parasitic disease, as a therapy agent, or even as a future vaccine.

There is a great biodiversity of parasites, but throughout this work only EVs of very specific group will be mentioned, the flagellated protozoa, that includes *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma spp.* and *Leishmania spp.*

Keywords: Extracellular vesicles, exosome, flagellated protozoa, parasitic disease, biomarkers, therapeutics, vaccine.

3.1. – INTRODUÇÃO

A evolução do ser humano sempre andou lado a lado com as infeções causadas por parasitas. De facto, alguns parasitas foram-nos transmitidos pelos nossos antecessores primatas e outros foram adquiridos dos diferentes animais durante a nossa evolução, migração e práticas agrícolas (Cox, 2002; Montaner *et al.*, 2014).

As parasitoses encontram-se predominantemente em zonas tropicais e subtropicais do planeta. No entanto, devido às alterações climáticas que provocaram a disseminação de vetores ou hospedeiros intermediários, ao aumento de viagens internacionais, aos conflitos armados e à migração de seres humanos e animais, tem havido aumento na disseminação de algumas parasitoses em países desenvolvidos (Momčilović *et al.*, 2019). Assim, as infeções parasitárias tanto ocorrem em países desenvolvidos como em regiões mais pobres, sendo que os parasitas são diretamente responsáveis por mais de um milhão de mortes no mundo todos os anos (Ofir-Birin e Regev-Rudzki, 2019; Wu *et al.*, 2019).

Existem dois grupos de parasitas que podem causar doenças no ser humano: os ectoparasitas, organismos que vivem no exterior do hospedeiro, como na pele, unhas ou pelos, de que fazem parte os artrópodes parasitas (ex.: *Pediculus humanus*, *Sarcoptes scabiei*); os endoparasitas, parasitas que vivem no interior do hospedeiro, dos quais fazem parte os helmintas que são vermes multicelulares (ex.: *Ascaris lumbricoides*, *Taenia saginata*) e os protozoários que são parasitas eucariotas unicelulares (ex.: *Giardia lamblia*, *Trypanosoma brucei*) (Marcilla *et al.*, 2014; Ofir-Birin e Regev-Rudzki, 2019). Sendo que será deste último, e mais especificamente nos protozoários flagelados, que incidirá esta monografia.

As infeções parasitárias são, normalmente, mais difíceis de controlar do que as infeções de outra etiologia, com exceção de algumas viroses. Este facto deve-se a vários fatores, entre os quais:

- o aparecimento de resistências às terapêuticas existentes;
- o fraco investimento em saúde nas zonas endémicas, especialmente na saúde pública;
- a incapacidade de diagnosticar precocemente a maioria das parasitoses, devido a um período relativamente longo sem sintomatologia após a contaminação;
- a existência de invertebrados, seja como hospedeiros intermediários ou como vetores, os quais dependem de fatores ambientais muitas vezes imprevisíveis, podendo levar ao aparecimento de resistências aos produtos usados para limitar o seu número, como inseticidas e pesticidas (Ângelo, 2010).

O desenvolvimento de novas terapêuticas mais eficazes implica um melhor conhecimento das interações parasita-hospedeiro, considerando a forma como o parasita se adapta e manipula o hospedeiro, sendo o seu principal objetivo a sobrevivência e a proliferação da espécie (Coakley *et al.*, 2015; Gavinho *et al.*, 2018).

Recentemente as vesículas extracelulares (VEs) têm sido propostas como um novo elemento capaz de modular a interação hospedeiro-parasita (Gavinho *et al.*, 2018).

As VEs foram descritas pela primeira vez há vários anos. Pensava-se que eram apenas um mecanismo de eliminação de proteínas e outras moléculas desnecessárias às células e que não possuíam nenhum impacto significativo nas células vizinhas (Eliaz *et al.*, 2017; Srivastava *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2019). Com o avançar da ciência demonstrou-se que as VEs transportam biomoléculas ativas como proteínas, RNA mensageiro (mRNA), enzimas metabólicas, fatores de crescimento, fragmentos de ADN, entre outras, que contribuem para a sua função fisiológica ou patológica (Jadli *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020).

Recentemente começou-se a realizar estudos que demonstram que os parasitas produzem VEs com múltiplas funções: participam na comunicação parasita-parasita permitindo regular o crescimento e sobrevivência da população, são um importante fator de virulência, ajudam o agente patogénico na evasão ao sistema imunológico, inibem a resposta imune através da ativação da apoptose das células do sistema imunológico, afetam a proliferação celular e o metabolismo neuronal (Cronemberger-Andrade *et al.*, 2020; Eliaz *et al.*, 2017; Ofir-Birin e Regev-Rudzki, 2019; Rai e Johnson, 2019).

Do mesmo modo, as VEs produzidas pelas células do hospedeiro podem ter um papel de anti-infeção através da inibição direta da proliferação do agente patogénico ou induzindo uma resposta imunológica, por exemplo através da apresentação de antigénios (Coakley *et al.*, 2015).

O facto das VEs poderem ser isoladas em diversos fluídos biológicos, serem quantitativa e qualitativamente diferentes num estado normal ou num estado de doença e terem uma elevada estabilidade, faz das VEs excelentes biomarcadores e com potencial uso no diagnóstico de certas doenças (Zhou *et al.*, 2020). Para além disso, como as VEs possuem um papel importante e próximo do sistema imunológico, na sua indução, modulação e inibição, poderão ser usadas em vacinas (Zhang *et al.*, 2018).

Assim pretende-se compreender a contribuição das VEs nas interações parasita-hospedeiro e o seu potencial uso no diagnóstico e terapêutica das parasitoses.

3.2. – VESÍCULAS EXTRACELULARES (VEs)

Em 2013, o prémio Nobel da Medicina foi atribuído a James Rothman, Randy Schekman e Thomas Südhof pela descoberta dos mecanismo de regulação do transporte vesicular e pela demonstração do papel essencial das VEs na fisiologia celular (NobelPrize.org., 2013; Srivastava *et al.*, 2020; Twu e Johnson, 2014).

VEs é um termo geralmente usado para descrever partículas que são naturalmente libertadas pelas células, limitadas por uma bicamada lipídica e que não conseguem replicar-se (não possuem um núcleo funcional) (Théry *et al.*, 2018).

São várias as nomenclaturas usadas para descrever as diferentes VEs. Podem ser baseadas no seu tamanho (microvesículas, MVs; micropartículas e nanopartículas), origem (oncossoma) ou simplesmente devido à sua presença fora das células (exossoma, exovesícula, ectossoma) (Colombo *et al.*, 2014). A nomenclatura mais aceite é a baseada no tamanho da vesícula e no seu mecanismo de formação: exossomas, MVs e corpos apoptóticos (D'Souza-Schorey e Schorey, 2018; Srivastava *et al.*, 2020).

Outra nomenclatura foi proposta por Théry *et al.* (2018) na *guideline* para o estudo de VEs (MISEV2018), tendo classificado as VEs apenas com base no seu tamanho: em VEs pequenas (*small*), VEs médias (*medium*) e VEs grandes (*large*) com um tamanho de respetivamente <100 nm, <200 nm e >200 nm. Esta nomenclatura surgiu devido à falta de conhecimento específico dos mecanismos moleculares de biogénese necessários para poder distinguir-se experimentalmente as VEs (Takakura *et al.*, 2020).

3.2.1. – Origem e Biogénese

As VEs geralmente representam todo o tipo de vesículas que podem ser libertadas por qualquer tipo de célula nucleada (normais ou tumorais) quer *in vivo*, quer *in vitro* e tanto por células procarióticas como eucarióticas (Jaiswal e Sedger, 2019; Paranaíba *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2019). Normalmente as VEs são libertadas por células em condições de *stress*, no entanto, a apoptose/morte celular nem sempre é um requisito para a formação de VEs (Burger *et al.*, 2013). Acredita-se que as VEs são formadas por múltiplos mecanismos, mas em todos os casos a membrana lipídica tem de ser induzida a formar-se, quer através da via endossomal para formar exossomas ou através do rearranjo da membrana citoplasmática para formar as MVs e corpos apoptóticos (Maas *et al.*, 2017). A formação de exossomas e MVs pelas células é um processo dependente de energia (Gavinho *et al.*, 2018).

3.2.1.1. – Exossomas

Os exossomas são as VEs com menor tamanho (até 150 nm) e com origem endossomal, sendo esta a característica que permite a sua diferenciação das MVs e dos corpos apoptóticos (Chaput e Théry, 2011; D'Souza-Schorey e Schorey, 2018).

O processo de formação dos exossomas apresenta três etapas (Figura 1): formação do endossoma precoce; maturação em corpos multivesiculares (MVBs); e libertação dos exossomas. A formação de um endossoma precoce ocorre através da invaginação da membrana citoplasmática com endocitose de macromoléculas extracelulares (Wu *et al.*, 2019). De seguida há a formação das vesículas intraluminais (ILVs), através de invaginação para o interior do lúmen dos endossomas precoces, ocorrendo assim o processo de maturação dos endossomas precoces em endossomas tardios, ou também chamados MVBs (Almeida e Loboda-Cunha, 2012; Niel, Van *et al.*, 2018). Durante esta etapa, certas proteínas são incorporadas na membrana, enquanto que alguns componentes do citoplasma são “encapsulados” dentro das ILVs (Zhang *et al.*, 2019).

O mecanismo melhor descrito para a formação de ILVs é através do *Endosomal Sorting Complex Required for Transport* (ESCRT), que é composto por quatro complexos proteicos ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II e ESCRT-III (Maas *et al.*, 2017). De forma simplificada, o complexo ESCRT-0 reconhece e sequestra proteínas transmembranares ubiquitinadas da membrana endossomal (Henne *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2019). A seguir, os complexos ESCRT-I e ESCRT-II promovem a invaginação da membrana e finalmente, o complexo ESCRT-III promove a fissão da nova vesícula (Kalra *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019). Para além deste mecanismo, dependente de ESCRT, também há outro mecanismo independente de ESCRT para a formação dos exossomas e acredita-se que estes dois mecanismos possam coexistir na mesma célula e nas diferentes subpopulações de MBVs (Zhou *et al.*, 2020).

Após a maturação dos MVBs, estes são encaminhados para a membrana citoplasmática onde se fundem e libertam os exossomas para o espaço extracelular (Hessvik e Llorente, 2018; Zhang *et al.*, 2018).

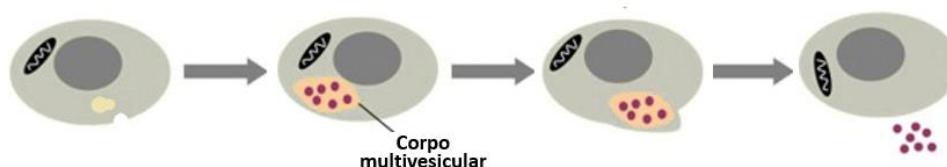


Figura 1 - Biogénese de Exossomas. Os exossomas são formados por invaginação da membrana, dando origem a vesículas intraluminais que acumulam dentro dos corpos multivesiculares. De seguida ocorre a fusão dos corpos multivesiculares com a membrana citoplasmática e consequente libertação dos exossomas para o espaço extracelular. (Adaptado de Burger *et al.*, 2013)

3.2.1.2. – Microvesículas

Apesar da biogénese e de funções diferentes, às vezes não é possível distinguir completamente os exossomas das MVs, tomando por referência o tamanho, pois as MVs podem medir entre 100 a 1000 nm ou, no caso dos oncosomas (produzidos por células cancerígenas), até 10 μm , e os exossomas podem atingir a dimensão das MVs menores (D'Souza-Schorey e Schorey, 2018; Mantel e Marti, 2014; Niel, Van *et al.*, 2018).

A formação de MVs começa com uma reorganização do citoesqueleto da membrana citoplasmática que vai dar-lhe origem, devido ao aumento da concentração de cálcio no interior da célula (Figura 2) (Burger *et al.*, 2013; Hosseini-Beheshti e Grau, 2018). As enzimas dependentes de cálcio, como flipases e a calpaína, quando o cálcio intracelular aumenta, levam ao rearranjo na assimetria da membrana de fosfolípidos com a exposição de fosfatidilserina e outros fosfolípidos carregados negativamente, que normalmente se encontram na face interior da membrana. Consequentemente a membrana dobra-se e ocorre a reestruturação da camada de actina do citoesqueleto, favorecendo a extrusão da membrana plasmática, seguida de fissão da célula-mãe com consequente libertação para o espaço extracelular das MVs (Niel, Van *et al.*, 2018; Wiklander *et al.*, 2019).



Figura 2 - Biogénese de Microvesículas. As microvesículas são formadas a partir de um processo de extrusão da membrana citoplasmática, seguida de fissão da célula-mãe e consequente libertação para o espaço extracelular. (Adaptado de Burger *et al.*, 2013)

3.2.1.3. – Corpos apoptóticos

Os corpos apoptóticos são muito maiores que os exossomas ou as MVs, ($> 1 \mu\text{m}$) e são formados por todo o tipo de células (Burger *et al.*, 2013). A característica mais importante que permite distinguir corpos apoptóticos dos exossomas e MVs é o facto de serem gerados a partir de células que se encontram em apoptose (Hosseini-Beheshti e Grau, 2018).

A apoptose, enquanto morte celular programada, é um processo intrínseco que, uma vez desencadeado e independentemente dos estímulos desencadeadores, conduz a um tipo específico de destruição celular com condensação da cromatina, fragmentação do ADN presente no núcleo, rutura do núcleo, alterações da permeabilidade da membrana citoplasmática e contração celular (Jadli *et al.*, 2020; Kalra *et al.*, 2016).

Na apoptose celular, as modificações típicas da membrana citoplasmática com formação de projeções citoplasmáticas (*blebs*) e exteriorização da fosfatidilserina com posterior fragmentação em corpos apoptóticos, previnem o extravasamento de conteúdos celulares potencialmente tóxicos, ativos enzimaticamente ou imunológicos para a matriz extracelular, prevenindo a destruição tecidual, a inflamação e uma reação autoimune (Figura 3) (Doonan e Cotter, 2008; Kalra *et al.*, 2016; Sambade, 2012).



Figura 3 - Biogênese de Corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são libertados das células durante as últimas etapas do processo de apoptose celular de modo a que os restos da célula possam ser facilmente eliminados pelas células do sistema imunitário. (Adaptado de Burger *et al.*, 2013)

3.2.2. – Composição

Na sua composição geral, os diferentes subtipos de VEs têm em comum o facto de possuírem uma bicamada lipídica e conterem proteínas, lípidos e ácidos nucleicos (Tabela I) (Théry *et al.*, 2018). O conteúdo específico de cada VEs é dependente da sua biogénese e da célula que lhe deu origem e é influenciado pelo estado fisiológico ou patológico da célula (Niel, Van *et al.*, 2018; Wiklander *et al.*, 2019). Dependendo do tipo de célula, as VEs vão possuir proteínas específicas dessa célula, importantes para as suas funções, bem como componentes de um agente patogénico se a célula foi infetada (Niel, Van *et al.*, 2018; Schorey e Harding, 2016).

Tabela I - Características das VEs: exossomas, micropartículas e corpos apoptóticos. (Adaptado de Agrahari *et al.*, 2018; Jadli *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2019)

	Caraterística	Exossomas	Micropartículas	Corpos apoptóticos
Biogénese	Tamanho	<150 nm	100 -1000 nm	>1 μ m
	Origem	Endossomal	Membrana de células viáveis	Células apoptóticas
	Mecanismo de Formação	Fusão dos MVBs com a membrana citoplasmática e libertação das ILVs.	Extrusão da membrana citoplasmática, seguida de fissão e secreção para o espaço extracelular	Formação de <i>blebs</i> aquando da apoptose celular
Composição	Proteínas	CD63, CD9, Alix, TSG10, HSP70	Integrinas, P-selectina metaloproteinases	Anexina V, histonas (e fragmentos de organelos celulares)
	Lípidos	Ceramida, colesterol, esfingomiéline	Fosfatidilserina na face externa, colesterol, esfingolípido	Fosfatidilserina na face externa
	Ácidos Nucleicos	mRNA, miRNA	mRNA, miRNA, ncRNA	mRNA, miRNA, rRNA, fragmentos de ADN

3.2.2.1. – Proteínas

De modo geral, as VEs possuem uma grande abundância de proteínas do citoesqueleto, do citoplasma, da membrana citoplasmática, bem como proteínas envolvidas no transporte e fusão, enquanto que as proteínas provenientes de organelos intracelulares são menos abundantes (Colombo *et al.*, 2014; Yáñez-mó *et al.*, 2015).

No início, achava-se que cada subtipo de VEs possuía proteínas específicas que poderiam ser usadas como marcadores de identificação dessas vesículas. Atualmente tudo indica que os diferentes subtipos de VEs podem conter as mesmas proteínas, mas com diferenças na sua proporção relativa (Lötvall *et al.*, 2014; Yáñez-mó *et al.*, 2015). Adicionalmente, sabe-se também que na mesma célula podem ser produzidos VEs, por exemplo exossomas, com diferentes composições (Meldolesi, 2018).

Os exossomas são tipicamente ricos em proteínas que estão envolvidas na resposta ao stress, através das *heat shock proteins* (HSP70, HSP90), na formação dos MVBs (Alix, TSG101), bem como no transporte e fusão membranar (Anexinas e Rab) (Tabela I). Contêm também tetraspaninas (CD9, CD63, CD81 e CD82), componentes do citoesqueleto (como a actina e a tubulina) e proteínas transmembranares como o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (Yáñez-mó *et al.*, 2015; Zaborowski *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019). As tetraspaninas CD9, CD63 e CD81 eram anteriormente consideradas os marcadores específicos para os exossomas, contudo, também foram observadas nas MVs e nos corpos apoptóticos (Yáñez-mó *et al.*, 2015).

As MVs uma vez que têm origem na membrana citoplasmática da célula-mãe, normalmente são ricas em proteínas diferentes das que estão presentes nos exossomas, como integrinas, glicoproteína Ib (GPIb), P-selectina e metaloproteinases (Lv *et al.*, 2019; Niel, Van *et al.*, 2018). De facto, as MVs transportam mais proteínas com modificações pós-tradução, como glicoproteínas e fosfoproteínas, quando comparadas com os exossomas (Zaborowski *et al.*, 2015).

Os corpos apoptóticos vão possuir organelos celulares e material nuclear no seu interior, o que os permite distinguir das restantes VEs (Jadli *et al.*, 2020). Este facto faz com que os corpos apoptóticos possuam uma maior quantidade de histonas e de outras proteínas citosólicas (Colombo *et al.*, 2014).

3.2.2.2. – Lípidos

A membrana das VEs consiste numa bicamada fosfolipídica semelhante à membrana citoplasmática da célula-mãe (Lv *et al.*, 2019; Yáñez-mó *et al.*, 2015; Zaborowski *et al.*, 2015).

Os exossomas são ricos em colesterol, esfingomiéline (esfingolípido), ceramida, ácido araquidónico e outros ácidos gordos saturados. Também possuem fosfatidilserina que tanto pode ser encontrada na face interior como na face exterior da bicamada fosfolipídica (Meldolesi, 2018; Record *et al.*, 2014; Théry *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2019).

As MVs são ricas em colesterol, esfingosina-1-fosfato (esfingolípido) e ceramida, sendo esta composição semelhante à dos exossomas (Lv *et al.*, 2019). Contudo, as MVs são mais ricas em fosfatidilserina na face externa da membrana porque as alterações causadas pelas enzimas dependentes de cálcio, que resultam na reorganização da bicamada fosfolipídica, induzem a translocação da fosfatidilserina da face interna para a face externa (Agrahari *et al.*, 2018; Meldolesi, 2018).

Do mesmo modo, a membrana dos corpos apoptóticos também possui à superfície fosfatidilserina que se liga à anexina V, esta ligação permite o reconhecimento por parte das células fagocíticas, possibilitando a sua eliminação (Akers *et al.*, 2013).

3.2.2.3. – Ácidos nucleicos

Para além de proteínas e lípidos, as VEs também possuem ácidos nucleicos na sua composição, incluindo sequências de ácidos ribonucleicos (RNA) e, em alguns casos, de ácido desoxirribonucleico (ADN) (Niel, Van *et al.*, 2018). O conteúdo em RNA das VEs pode alterar significativamente, dependendo do estado da célula (Crescitelli *et al.*, 2013).

Nos exossomas estão presentes pequenas sequências de RNA, incluído mRNA e microRNA (miRNA) e apresentam pequena quantidade ou mesmo ausência de RNA ribossómico (rRNA) (Colombo *et al.*, 2014; Crescitelli *et al.*, 2013; Yáñez-mó *et al.*, 2015).

Em relação à presença de ADN nos exossomas, os estudos têm sido contraditórios, uma vez que o ADN genómico encontra-se presente maioritariamente no núcleo e não interage com os MVBs (Parayath *et al.*, 2020).

Nas MVs as sequências de RNA também são abundantes principalmente miRNA, mas também mRNA e RNA não codificante (ncRNA). Contudo, também foi detetado ADN mitocondrial nas MVs (Lv *et al.*, 2019; Meldolesi, 2018; Wu *et al.*, 2019).

Nos corpos apoptóticos pode-se encontrar rRNA, miRNA, mRNA e fragmentos de ADN (Crescitelli *et al.*, 2013).

3.2.3. – Principais funções

A função das VEs vai depender do tipo de célula que lhes deu origem e da sua composição (Schorey e Bhatnagar, 2008). Uma vez libertadas para o meio extracelular, vão circular pelos diferentes fluidos do corpo, modulando o metabolismo quer de células de proximidade, quer de células mais distantes e de diferentes tecidos (Dini *et al.*, 2020; Toro, De *et al.*, 2015).

As VEs estão envolvidas na regulação de muitos processos fisiológicos como reparação tecidual, estimulação do sistema imunológico e na gravidez. No entanto também podem estar associadas a processos patológicos como na formação e progressão de tumores, progressão de doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares e doenças infecciosas (Figura 4) (Mantel e Marti, 2014; Toro, De *et al.*, 2015).

Recentemente as VEs ganharam especial atenção na comunidade científica devido ao papel importante que possuem na comunicação intercelular e na modulação da resposta imunitária em condições normais ou patológicas (Jadli *et al.*, 2020; Nair e Salomon, 2018).

A comunicação é uma característica biológica que facilita a transmissão célula-a-célula de sinais e assegura a manutenção da homeostase ou da resposta a estímulos em condições de *stress* nos organismos multicelulares (Schorey e Harding, 2016). Para além das células eucarióticas, as VEs também podem ser produzidas por células vegetais e agentes patogénicos, incluindo bactérias, parasitas, vírus e fungos (Zhou *et al.*, 2020). Assim, do mesmo modo, os organismos unicelulares libertam pequenas moléculas para poderem comunicar. Estas moléculas funcionam como sensores que permitem avaliar as condições nutricionais e o *stress* ambiental. A comunicação intercelular permite aos microrganismos adaptar o seu crescimento de modo a otimizar a sobrevivência da população (Babatunde *et al.*, 2020).

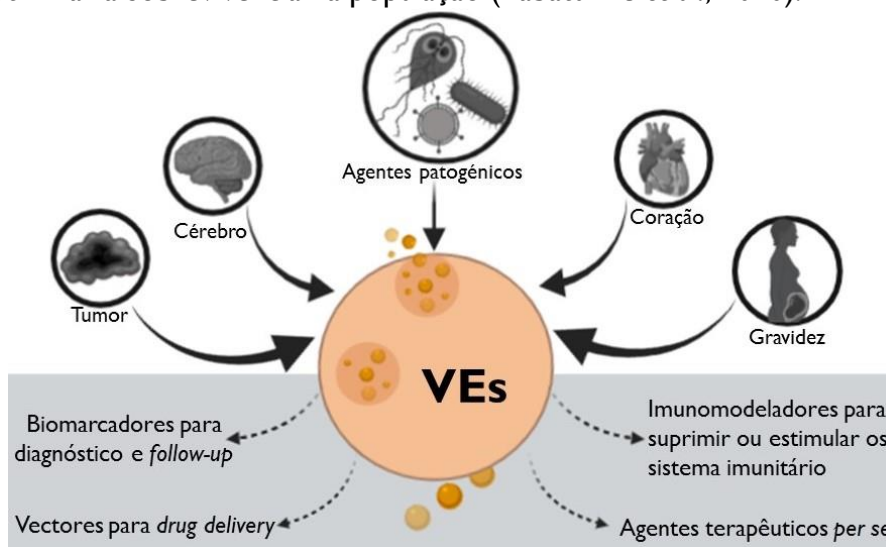


Figura 4 - O papel das VEs e o seu potencial uso no diagnóstico e terapêutica. Dada a importância das VEs em condições normais ou patológicas, estas estão a ser estudadas pelo seu potencial uso. As doenças infecciosas são um campo importante de pesquisa, não só devido ao aparecimento de resistências, mas também devido a problemas de toxicidade causados pelas terapêuticas existentes. (Adaptado de Toro, De *et al.*, 2015)

3.3. – PARASIToses PROVOCADAS POR PROTOZOÁRIOS FLAGELADOS

Os protozoários constituem um grupo de microrganismos com grande diversidade morfológica e fisiológica. São estruturalmente eucariotas unicelulares, em que cada célula funciona como unidade capaz de desempenhar todas as funções metabólicas, e caracterizam-se por não possuírem parede celular (Cox, 2010; Ferreira e Sousa, 2010).

Os protozoários não são formas de vida simples e as suas adaptações incluem, muitas vezes, ciclos de vida complexos e formas de entrar no organismo hospedeiro especializadas, através da via sexual ou de vetores (Cox, 2010; Gunn e Pitt, 2012).

Os protozoários que infetam o Homem pertencem a três filós: Sarcomastigophora, Apicomplexa e Microspora. No filo Sarcomastigophora, os protozoários apresentam estruturas externas de locomoção, tais como flagelos, pseudópodes e cílios, que definem respetivamente três classes, Mastigophora, Sarcodina e Ciliophora (Ângelo, 2010). Os géneros *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Giardia* e *Trichomonas* pertencem à primeira classe.

3.3.1. – Giardíase

A giardíase é uma infeção intestinal com prevalência global causada pelo parasita extracelular *Giardia lamblia* (syn. *Giardia duodenalis*, *Giardia intestinalis* ou *Lamblia intestinalis*). Sendo esta espécie, dentro do género *Giardia*, a única que infeta o ser humano (Evans-Osses et al., 2015; Yaoyu e Xiao, 2011).

A infeção em humanos pode ser assintomática ou produzir uma doença moderada autolimitada, associada a diarreia, esteatorreia, má absorção de nutrientes, dor abdominal, náuseas, fadiga e perda de peso (Cernikova et al., 2018; Machado et al., 2010; Vivancos et al., 2018). A prevalência e incidência de giardíase é de até 7% em países industrializados e até 50% nos países em desenvolvimento. No entanto, é considerada uma doença reemergente nos países industrializados devido ao aumento da incidência em centros de dia e creches (Vivancos et al., 2018; Yaoyu e Xiao, 2011). Os fatores de risco da giardíase incluem qualquer tipo de atividade que possa aumentar a ingestão de quistos infetantes como atividades recreativas na água, contacto com animais, viagens para locais sem adequado tratamento de águas e má higienização de alimentos ingeridos crus (Esch e Petersen, 2013; Vivancos et al., 2018).

O ciclo de vida da *G. lamblia* é monoxeno e possui duas formas distintas: o trofozoíto que adere ao epitélio da mucosa do intestino delgado através do disco ventral e que se multiplica por fissão binária; e o quisto infetante que é libertado para o meio ambiente através de fezes (Figura 5) (Einarsson et al., 2016; Evans-Osses et al., 2017; Gavinho et al., 2018). Os

trofozoítos podem encontrar-se aderentes à mucosa intestinal ou livres no lúmen do intestino que, através dos movimentos peristálticos, são arrastados para o intestino grosso sofrendo o processo de enquistamento, sendo depois libertados para o exterior na forma de quistos infantantes (Esch e Petersen, 2013). Estas formas resistentes permitem a sobrevivência do parasita fora do hospedeiro durante várias semanas a meses (Cernikova *et al.*, 2018; Einarsson *et al.*, 2016).

Teoricamente todos os mamíferos podem ser infetados por *G. lamblia*. Atualmente são conhecidos oito genótipos, também designados de *assemblages* (*assemblages* A até H), de entre os quais só os *assemblage* A e B infetam os seres humanos (Cernikova *et al.*, 2018; Esch e Petersen, 2013; Yaoyu e Xiao, 2011).

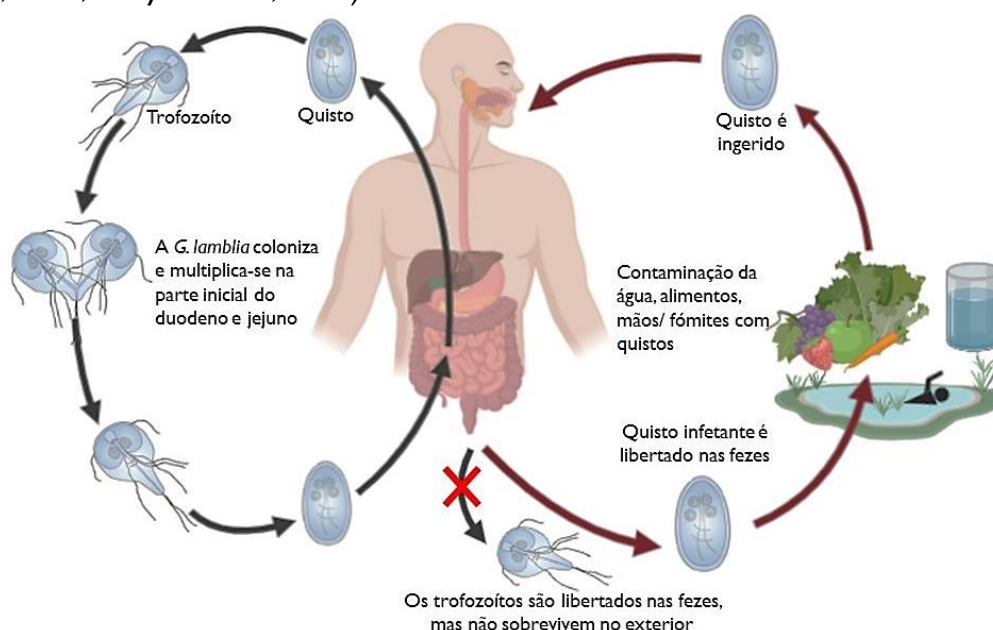


Figura 5 - Ciclo de vida da *Giardia lamblia*. A infecção começa pela ingestão de um quisto infetante, que desenquista no intestino após exposição ao pH ácido do estômago, formando-se o trofozoíto. Esta forma vegetativa vai colonizar e multiplicar-se na parte inicial do duodeno, mas quando é arrastado para as diferentes partes do intestino sofre o enquistamento. O quisto infetante é libertado nas fezes contaminando o ambiente. (Adaptado de Esch e Petersen, 2013)

3.3.2. – Tricomoniase

A tricomoníase é uma infecção do aparelho genital e urinário causada pelo agente patológico *Trichomonas vaginalis* (Nievas *et al.*, 2018).

A principal via de transmissão é através das relações sexuais, o que faz da tricomoníase uma doença sexualmente transmissível (DST), de origem não viral, comum em todo o mundo, tendo uma prevalência de aproximadamente 5,0% em mulheres com idades entre os 15 e os 49 anos (Murray *et al.*, 2016; Ryan *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2020). Na Europa estimasse que a prevalência de *T. vaginalis* varie entre 0,2% e 2,8% (Silva *et al.*, 2020). Ocasionalmente, a infecção pode ser transmitida por fômites como roupa íntima e de cama e artigos de toalete ou através da água como bidés, banheiras ou jacúzis, mas esta forma de transmissão é limitada pela

fragilidade do trofozoíto (forma infetante) no meio exterior, uma vez que o parasita não tem forma de resistência (Figura 6) (Mantel e Marti, 2014; Murray *et al.*, 2016).

T. vaginalis é um protozoário extracelular, anaeróbico que precisa de aderir às células epiteliais do trato urogenital para sobreviver, local onde fagocita uma variedade de células humanas e outros microrganismos, incluindo hemácias, leucócitos, células do epitélio vaginal, bactérias, fungos e vírus (Ryan *et al.*, 2011; Souza, de e Barrias, 2020; Twu *et al.*, 2013).

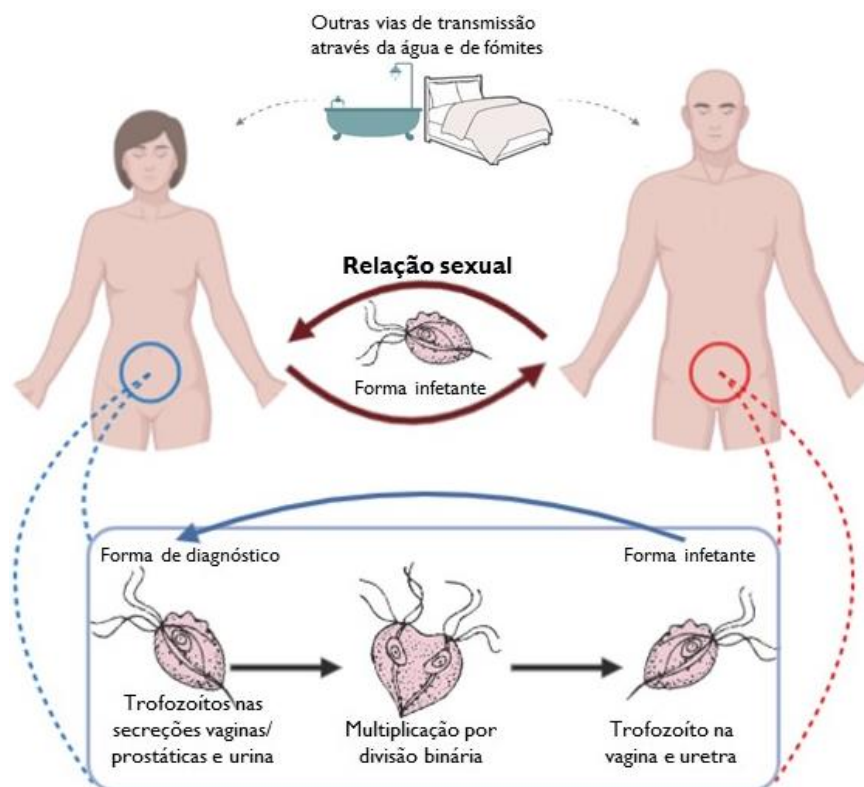


Figura 6 - Ciclo de vida de *Trichomonas vaginalis*. O trofozoíto de *T. vaginalis* coloniza e multiplica-se assexuadamente no trato urogenital de homens e mulheres. Como não possui nenhuma forma de resistência, o trofozoíto pode ser encontrado nas secreções vaginais/prostáticas e urina, sendo a forma infetante e de diagnóstico. A principal via de transmissão do trofozoíto de *T. vaginalis* é através de relações sexuais, o que faz desta infecção uma doença sexualmente transmissível. No entanto o parasita *T. vaginalis* pode ser transmitido pela água ou fômites, contudo estas vias são limitadas pela capacidade de sobrevivência do trofozoíto no meio exterior. (Adaptado de CDC, 2017)

Na maioria dos casos a infecção é assintomática, mas múltiplos sintomas e patologias podem surgir tanto em homens como em mulheres como vaginites, uretrites, prostatites, cervicites, doença pélvica inflamatória, disúria, parto prematuro, crianças com baixo peso no nascimento e infertilidade (Nievas *et al.*, 2018; Ryan *et al.*, 2011). Na mulher, os sinais clínicos mais característicos são corrimento vaginal amarelo-esverdeado que pode ser abundante e ter mau odor, coitorragia e eritema vaginal com aspecto de morango (petequiado) (Águas e Pereira da Silva, 2012; Schwebke e Burgess, 2004).

Os homens são geralmente assintomáticos sendo o reservatório principal para a infecção na mulher (Murray *et al.*, 2016).

3.3.3. – Tripanossomose Humana

Tripanossomose é uma doença que afeta tanto animais como humanos, transmitida por vetores invertebrados e causada por protozoários do género *Trypanosoma* (Barrett et al., 2003). Este género inclui algumas espécies com importância médica para o Homem como *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Dependendo da espécie de *Trypanosoma* que está envolvida é possível distinguir duas doenças: Tripanossomose Humana Americana ou doença de Chagas e a Tripanossomose Humana Africana ou doença do sono (Prayag et al., 2020; Wu et al., 2019). Estas doenças são consideradas doenças negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), afetando desproporcionalmente populações pobres e marginalizadas, sendo endémicas de países pobres da Ásia, América e África subsariana (Barrett et al., 2003; Prayag et al., 2020; WHO, 2017).

O ciclo de vida de *Trypanosoma spp.* é heteroxeno, ou seja, desenvolve-se em dois hospedeiros, um vetor biológico (a mosca TSÉ-TSÉ na doença do sono e o triatomíneo na doença de Chagas) e um hospedeiro definitivo vertebrado (humanos ou animais) (Barrett et al., 2003; Prayag et al., 2020). O parasita é transmitido pelo vetor biológico ao hospedeiro vertebrado, passando por diversas mudanças morfológicas e metabólicas para poder sobreviver aos diferentes ambientes (Prayag et al., 2020). O período de incubação do parasita depende da espécie e pode ir de semanas a meses podendo causar uma doença aguda ou crónica. Aquando da doença crónica podem ser atingidos órgãos cardíacos e gastrointestinais para a doença de Chagas e o sistema nervoso central na doença do sono.

3.3.3.1 – Doença de Chagas

Doença de Chagas foi identificada em 1909 por Carlos Chagas bem como o agente etiológico, *Trypanosoma cruzi* (Antinori et al., 2017). É a maior causa de morbilidade e mortalidade na América Latina, onde a doença é endémica (Bautista-López et al., 2017). No entanto, com o aumento da imigração e da globalização, a doença de Chagas, tem emergido como um problema de saúde na Europa, Ásia e América do Norte, também associada a transfusões de sangue, transplantes de órgãos ou, através de transmissão vertical (da mãe para o feto) (Antinori et al., 2017; Bautista-López et al., 2017).

A doença de Chagas é caracterizada por uma fase aguda e uma fase crónica. A fase aguda da doença começa a desenvolver-se num período relativamente curto após a inoculação do parasita, sendo normalmente assintomática mas pode apresentar febre, inflamação (sinal de Romaña e chagomas), dor, miocardite, hepatomegalia, adenopatias e meningoencefalites (Bautista-López et al., 2017; Rassi et al., 2010). A fase crónica pode ser assintomática ou

indeterminada, quando não se desenvolvem sintomas da doença e o eletrocardiograma e exames radiológicos estão normais, mas apresenta anticorpos contra *T. cruzi*, ou pode ser sintomática, podendo aparecer cardiopatia, problemas digestivos (megacólon, megaesófago) ou cardiodigestivos, ao fim de dez a trinta anos após a inoculação do parasita (Gutierrez *et al.*, 2009; Ramírez *et al.*, 2009; Rassi *et al.*, 2010).

O ciclo biológico de *T. cruzi* começa com a expulsão da forma tripomastigota metacíclico nas fezes do triatomíneo (Esch e Petersen, 2013). Esta forma infetante entra no hospedeiro vertebrado, ou pelo local da picada (aquando da refeição de sangue) ou através da mucosa, invadindo várias células onde se diferencia em amastigota (Figura 7) (Esch e Petersen, 2013; Rassi *et al.*, 2010). A forma amastigota multiplica-se e diferencia-se, de novo, na forma tripomastigota sendo libertada para a corrente sanguínea onde pode infetar novas células ou é ingerida por um triatomíneo numa nova picada (Esch e Petersen, 2013). No intestino médio do triatomíneo, o tripomastigota diferencia-se em epimastigota e, a última diferenciação ocorre no intestino posterior dando origem à forma infetante (Prayag *et al.*, 2020).

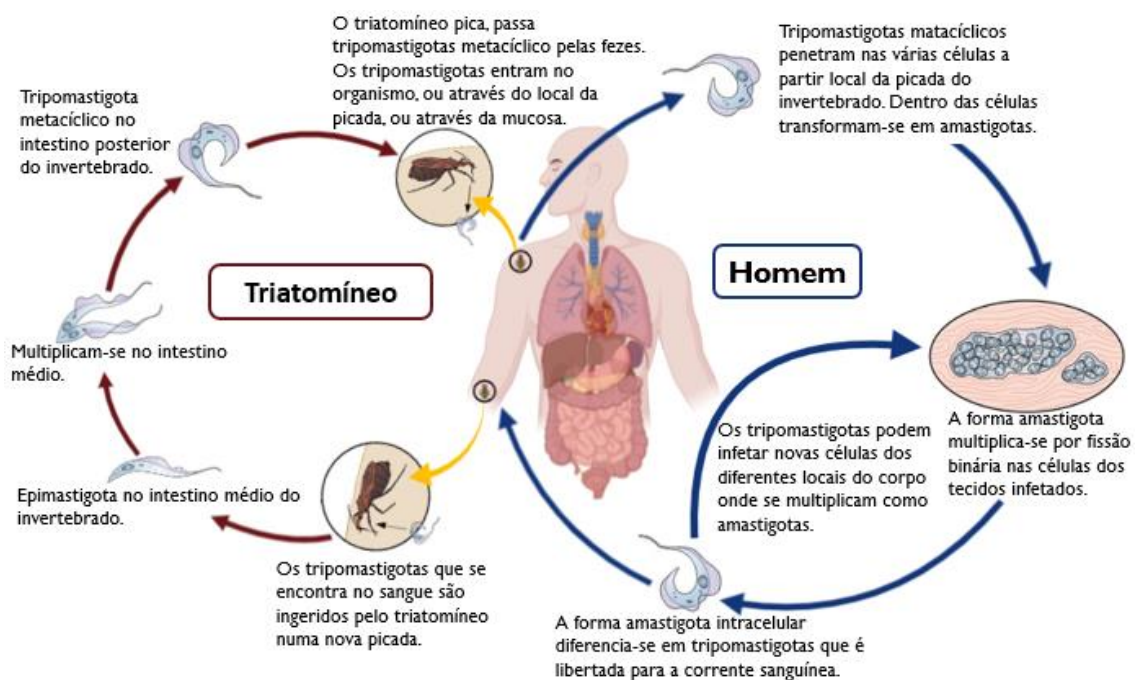


Figura 7 - Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Um triatomíneo infetado ao alimentar-se do sangue do hospedeiro vertebrado liberta a forma infetante nas fezes. O tripomastigota metacíclico entra no organismo do hospedeiro vertebrado onde vai invadir diferentes células, diferenciando-se em amastigotas. Estes amastigotas multiplicam-se assexuadamente e antes de ocorrer a rutura das células diferenciam-se em tripomastigotas que ao serem libertados para a corrente sanguínea podem infetar novas células ou serem ingeridos por um novo triatomíneo. No aparelho digestivo do triatomíneo o tripomastigota diferencia-se em epimastigota e este, por sua vez, diferencia-se em tripomastigota metacíclico. (Adaptado de CDC, 2019; Esch e Petersen, 2013)

3.3.3.2 – Doença do Sono

A doença do sono é endémica do continente Africano e está limitada à distribuição do vetor biológico (Büscher *et al.*, 2017). Existem duas formas da doença: doença crónica, provocada pelo *Trypanosoma brucei gambiense*, que é endémica da África central e ocidental; doença aguda, provocada pelo *Trypanosoma brucei rhodesiense*, que se encontra na África oriental e sul (Büscher *et al.*, 2017; Franco *et al.*, 2014). A infeção causada por *T. brucei gambiense* parece ser antroponótica, isto é, o Homem é o reservatório e o hospedeiro vertebrado, enquanto que a infeção causada por *T. brucei rhodesiense* é uma doença zoonótica, ou seja, afeta principalmente animais e o ser humano é infetado por acidente (Büscher *et al.*, 2017; Franco *et al.*, 2014).

A doença do sono envolve dois estadios, o primeiro, também conhecido por estadio hemolinfático, ocorre quando o parasita se encontra na circulação sanguínea e linfática, onde replica (Büscher *et al.*, 2017; WHO, 2016). O estadio seguinte é o meningoencefálico, onde o parasita atravessa a barreira hematoencefálica e ocorre a invasão do sistema nervoso central (SNC) (Büscher *et al.*, 2017; WHO, 2016). No estadio hemolinfático os sintomas tendem a ser inespecíficos e incluem cefaleia, perda de peso, febre irregular e fadiga (Büscher *et al.*, 2017; Kennedy, 2013).

Alguns dias após a picada do vetor aparece o “cancro tripanossómico”, lesão primária, que possui um nódulo doloroso e que é semelhante nas duas formas da doença, no entanto encontra-se mais frequentemente em doentes infetados com *T. brucei rhodesiense* (Büscher *et al.*, 2017; Kennedy, 2013; Malvy e Chappuis, 2011). Com o desenvolvimento da doença podem começar a desenvolver-se esplenomegalia, hepatomegalia e linfadenopatias como o sinal de *Winterbotton* que é característico da infeção por *T. brucei gambiense* (Kennedy, 2013). No estado meningoencefálico como o SNC é afetado, podem aparecer alterações motoras e comportamentais e distúrbios do sono devido a desregulação do ciclo circadiano, bem como demência causada pela desmielinização e atrofia dos neurónios (Kennedy, 2013; Malvy e Chappuis, 2011).

As duas subespécies de *T. brucei* apresentam um ciclo de vida idêntico (Figura 8). Durante a picada, a mosca TSÉ-TSÉ que se encontra infetada, inocula tripomastigotas metacíclicos na corrente sanguínea do hospedeiro (Büscher *et al.*, 2017; Prayag *et al.*, 2020). Uma vez dentro do hospedeiro, os tripomastigotas metacíclicos diferenciam-se em tripomastigotas que através dos vários fluidos corporais, como a linfa e o sangue, são transportados para outros locais do corpo onde se reproduzem assexuadamente por divisão binária (Büscher *et al.*, 2017; Kennedy, 2013). A mosca TSÉ-TSÉ é infetada quando pica um ser

humano ou outro mamífero, ingerindo a forma tripomastigota que se encontra em circulação no sangue (Büscher *et al.*, 2017; Kennedy, 2013).

Na mosca TSÉ-TSÉ podem distinguir-se três formas do parasita: a forma tripomastigota pró-cíclico, a epimastigota e a tripomastigota metacíclica que se encontra nas glândulas salivares da mosca TSÉ-TSÉ (Prayag *et al.*, 2020).

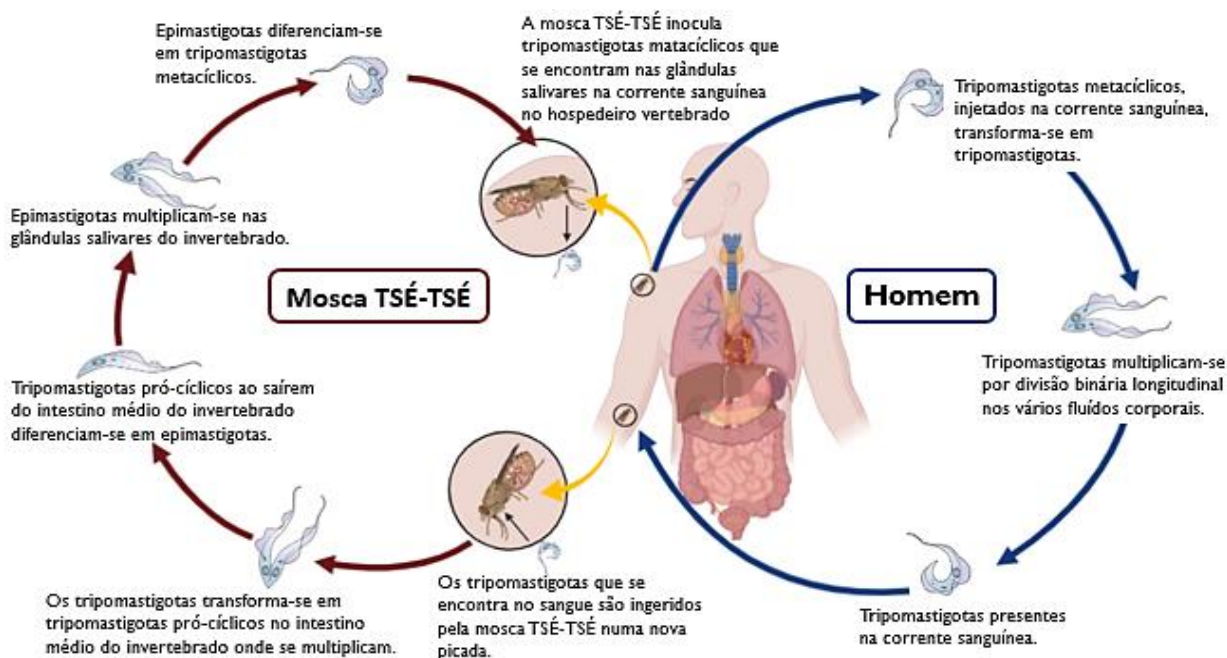


Figura 8 - Ciclo de vida *Trypanosoma brucei*. A forma tripanossoma metacíclico é injetada no hospedeiro, juntamente com fatores anticoagulantes e saliva da mosca TSÉ-TSÉ infetada. Dentro do hospedeiro vertebrado os tripomastigotas metacíclicos diferenciam-se em tripomastigotas (forma sanguínea de *Trypanosoma spp.*) que são transportados para os diferentes locais do organismo, chegando mesmo a atravessar a barreira hematoencefálica. Multiplicam-se por divisão binária. A mosca TSÉ-TSÉ fica infetada depois de ingerir tripomastigotas numa nova picada, havendo várias diferenciações ao longo do trato digestivo do inseto até formar a forma infetante tripomastigota metacíclico nas glândulas salivares. (Adaptado de CDC, 2020; Kennedy, 2013).

3.3.4. – Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença causada por parasitas intracelulares obrigatórios do género *Leishmania* que são transmitidos aos hospedeiros vertebrados por flebótomos, que são os vetor biológicos (Lipoldová e Demant, 2006; WHO, 2020). Predominantemente é uma doença zoonótica em que os principais reservatórios são animais e em que o ser humano não é um hospedeiro obrigatório (Ready, 2010).

A infeção por *Leishmania spp.* pode resultar em distintas manifestações clínicas dependendo do local onde a espécie se vai replicar e do sistema imunológico do indivíduo (Esch e Petersen, 2013; Kaufer *et al.*, 2017).

Leishmaniose cutânea é caracterizada por lesões primárias na pele, que se resolvem normalmente sem tratamento e com o hospedeiro a adquirir imunidade através da resposta humoral e celular (Esch e Petersen, 2013; Ready, 2010). Os agentes etiológicos são *Leishmania*

major e *Leishmania tropica* no Médio Oriente, Índia e África, e *Leishmaniose mexicana* na América (Esch e Petersen, 2013).

A leishmaniose mucocutânea resulta da disseminação sanguínea ou linfática do parasita *Leishmania braziliensis*, que afeta a mucosa oral e nasal e pode provocar a extensa destruição da cartilagem (Bañuls et al., 2007).

A leishmaniose visceral (LV) é a manifestação mais severa da doença e é provocada por *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) presente na América Central e do Sul e na bacia Mediterrânica, ou por *Leishmania donovani* presente na Índia e em África (Esch e Petersen, 2013; Kaufer et al., 2017). O cão é considerado o principal reservatório e o principal hospedeiro de *L. infantum* na Europa (Campino e Maia, 2010; Millán et al., 2014). Contudo, outros animais selvagens como roedores, a raposa (*Vulpes vulpes*), o lobo (*Canis lupus*), o lince ibérico (*Lynx pardinus*) e a gineta (*Genetta genetta*) também podem ser reservatórios de *L. infantum* (Millán et al., 2014; Souza et al., 2014). A LV manifesta-se por febre irregular, perda de peso, aumento do fígado e baço e anemia (WHO, 2020). A LV é particularmente grave nas crianças e em indivíduos imunodeprimidos levando, na maioria das vezes, à morte (Antonίου et al., 2013; Ready, 2010).

O ciclo de vida de *Leishmania spp.* envolve dois hospedeiros, o vetor biológico e o hospedeiro vertebrado. As fêmeas de flebótomos inoculam promastigotas metacíclicos na pele dos hospedeiros vertebrados onde são fagocitados pelos macrófagos e se transformam na forma amastigota que se multiplica assexuadamente até rebentar a célula e libertar as formas amastigotas que vão infetar novos macrófagos (Figura 9) (Bañuls et al., 2007; Esch e Petersen, 2013).

Consoante a espécie de *Leishmania spp.* infetante e caso o hospedeiro não consiga controlar a infeção localizada na pele (local de inoculação), as formas amastigotas podem disseminar-se através do sistema sanguíneo e linfático, invadindo outros órgãos (Lipoldová e Demant, 2006). Por sua vez, a fêmea dos flebótomos é infetada quando se alimenta do sangue de um hospedeiro vertebrado infetado (canídeos e roedores) e ingere a forma amastigota do parasita, presente no interior dos macrófagos (Lipoldová e Demant, 2006). No organismo do vetor diferenciam-se em promastigotas procíclicos que se multiplicam e que se transformam em promastigotas metacíclicos, que são a forma infetante para o hospedeiro vertebrado (Esch e Petersen, 2013).

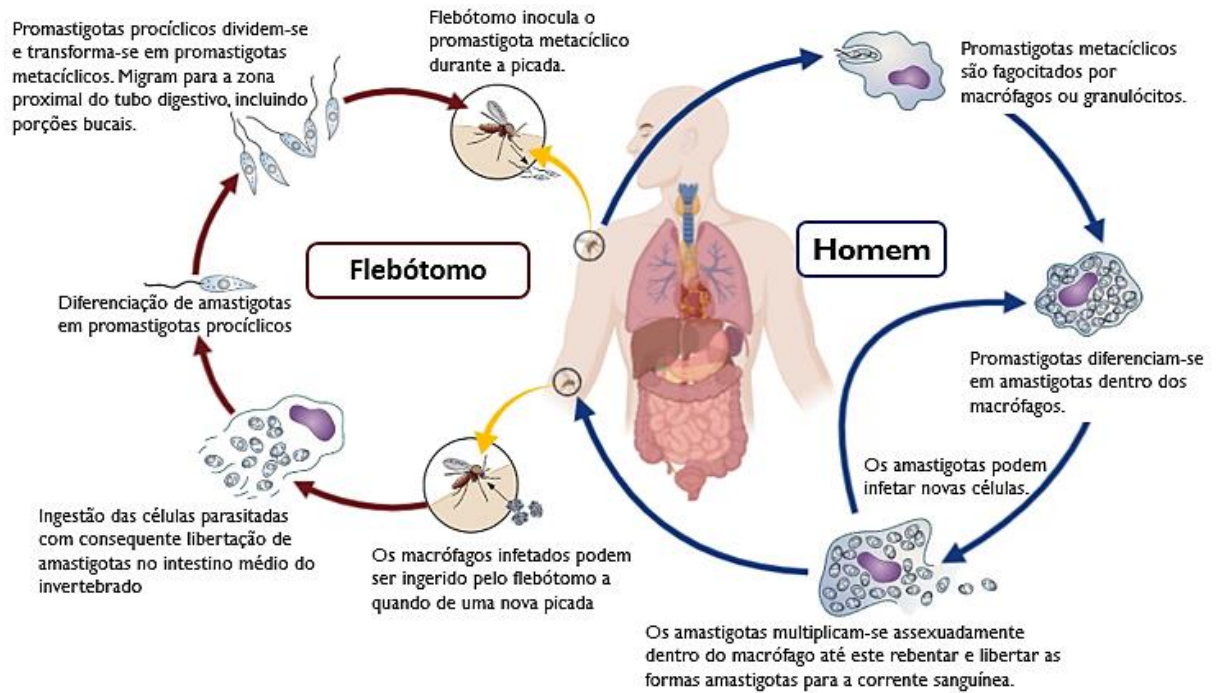


Figura 9 - Ciclo de vida de *Leishmania* spp. O parasita é transmitido ao ser humano através da picada de uma fêmea de flebótomo infectada que inocula promastigotas metacíclicas, presentes na zona proximal do tubo digestivo, na pele do hospedeiro. Estes são fagocitados por macrófagos e transformam-se na forma amastigota, que se multiplica assexuadamente. Os macrófagos infectados são ingeridos pelos flebótomos onde o parasita se diferencia na forma promastigota metacíclico. (Adaptado de CDC, 2020; Esch e Petersen, 2013)

3.4. – PAPEL DAS VEs NAS PARASIToses

Os seres humanos protegem-se dos parasitas usando uma variedade de mecanismos de defesa que se poderão agrupar em:

- imunidade inata – não é dirigido especificamente contra um determinado agente (ex.: pH, produção de muco, temperatura corporal e recetores *Toll-like*);
- imunidade adaptativa – é adquirida ao longo da vida e é dirigida contra um agente específico (ex.: resposta mediada por células e resposta humoral) (Theel e Pritt, 2016).

Por sua vez, os parasitas desenvolvem complexas estratégias de comunicação, manipulação e de evasão à resposta imunológica para poderem entrar no organismo e estabelecerem a infeção (Gavinho *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2019). As VEs derivadas dos parasitas podem manipular células-alvo através da transferência de material patogénico, imunomodulador e genético para proporcionar condições de sobrevivência e multiplicação dos parasitas (Khosravi *et al.*, 2020).

Como as VEs tanto podem ser formadas pelas células do hospedeiro, para recrutar células do sistema imunológico, como pelo agente infeccioso no decorrer da doença, exercem um efeito regulatório bidirecional, ou seja, podem promover a infeção ou tentar detê-la (Khosravi *et al.*, 2020; Schorey *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018).

3.4.1. – VEs na giardiase

O parasita *G. lamblia* durante o ciclo de vida, tem de se adaptar às diferentes condições do meio com: diferenças de osmolaridade, pH e presença de biliar (Deolindo *et al.*, 2013; Montaner *et al.*, 2014). Estudos sugerem que as VEs produzidas pela *G. lamblia* podem afetar a adesão do parasita às células epiteliais da mucosa do intestino (facilitam a adesão *in vitro*), provocar a apoptose das células do hospedeiro (estando envolvidas na comunicação parasita-hospedeiro), alterar a ativação de células dendríticas e participar no processo de enquistamento (Evans-Osses *et al.*, 2017; Midlej *et al.*, 2019; Mojoli Le Quesne, 2014; Moyano *et al.*, 2019).

O que se sabe neste momento é que tanto os trofozoítos replicativos como os trofozoítos induzidos ao processo de enquistamento podem produzir VEs, mas a natureza dos seus constituintes varia consoante a origem do seu isolamento. No entanto, alguns constituintes são comuns como as enzimas envolvidas no metabolismo geral (enolase), HSP70 e HSP90 e proteínas do citoesqueleto (tubulina) (Ma'ayeh *et al.*, 2017; Midlej *et al.*, 2019; Mojoli Le Quesne, 2014; Souza, de e Barrias, 2020).

3.4.2. – VEs na tricomoníase

A membrana de *T. vaginalis* possui três tetraspaninas que também podem ser encontradas em VEs libertadas pelas células dos mamíferos (Wu *et al.*, 2019). As tetraspaninas, presentes nas células dos mamíferos, estão envolvidas numa grande variedade de atividades como adesão, fusão, motilidade, migração e proliferação e são muitas vezes usadas como marcadores de pequenas VEs (Twu *et al.*, 2013). Assim, é possível que *T. vaginalis* produza VEs funcionais com um importante papel quer nas interações hospedeiro-parasita quer parasita-parasita (Coakley *et al.*, 2015; Nievas *et al.*, 2018; Twu *et al.*, 2013).

As VEs de *T. vaginalis* são constituídas por RNA, proteínas do citoesqueleto, proteínas da membrana e proteases que também se encontram em VEs libertadas por outras células, mas também possuem algumas proteínas específicas do parasita que poderão ser responsáveis pela patogenicidade da tricomoníase, como proteínas pertencentes à família *Bacteroides surface protein A* (BspA) que são proteínas de adesão (Handrich *et al.*, 2019; Mantel e Marti, 2014; Twu *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2019).

A adesão do parasita *T. vaginalis* às células epiteliais é crítica para a colonização do hospedeiro e para o estabelecimento da infeção (Nievas *et al.*, 2018). Na tricomoníase a infeção da vagina, uretra, endocérnix e bexiga na mulher, bem como a infeção da uretra,

próstata e epidídimo no homem, demonstra a capacidade do parasita para habitar vários tecidos do hospedeiro (Ryan *et al.*, 2011).

T. vaginalis produz e liberta VEs que ao fundirem-se com as células do hospedeiro ativam a expressão do recetor de superfície das células epiteliais, promovendo a adesão do parasita. Adicionalmente, modulam a expressão interleucinas aumentando a expressão de IL-6 e diminuindo a resposta da IL-8 (Mantel e Marti, 2014; Ofir-Birin e Regev-Rudzki, 2019). A IL-8 está envolvida no recrutamento de neutrófilos para o local de infeção e assim a sua diminuição permite o estabelecimento de uma infeção crónica (Twu *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2019). Enquanto que a IL-6 atua na resposta inflamatória aguda (Twu *et al.*, 2013). As lesões locais provocadas pelo parasita, bem como o facto de a sua transmissão ser por via sexual, aumentam o risco de transmissão do vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou de outras DST, bem como prevalência, progressão e a severidade do cancro do colo do útero e da próstata (Olmos-Ortiz *et al.*, 2017; Rai e Johnson, 2019; Vique-Sánchez *et al.*, 2020).

3.4.3. – VEs na tripanossomose humana

3.4.3.1. – *Trypanosoma cruzi*

A forma infetante tripomastigota metacíclica e a forma epimastigota do *T. cruzi* são capazes de produzir VEs, mas existem diferenças na composição dependendo da origem parasitária (Bautista-López *et al.*, 2017; Coakley *et al.*, 2015; Gavinho *et al.*, 2018; Souza, de e Barrias, 2020).

As VEs libertadas por *T. cruzi* podem ser internalizadas por outros parasitas da mesma população ou por células do hospedeiro, estando implicadas no processo de transferência de informação genética em que pequenas cadeias de RNA (miRNA e mRNA) e outras proteínas possam ser transferidas ou de um parasita para outro, ou do parasita para as células do hospedeiro, induzindo mudanças na expressão de genes (Souza, de e Barrias, 2020; Wu *et al.*, 2019). As VEs de *T. cruzi* podem atuar, também, como um mecanismo de evasão à resposta imunológica do hospedeiro (Gavinho *et al.*, 2018).

Os macrófagos e fagócitos mononucleares são a primeira linha de defesa no combate a infeções provocadas por parasitas intracelulares como é o caso de *T. cruzi* (Cronemberger-Andrade *et al.*, 2020). As VEs atuam, indiretamente, através da indução de prostaglandinas E2 pelos macrófagos, que em elevadas concentrações inibe a produção de citocinas IL-10, IL-6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e reduz a apresentação de antigénios (Babatunde *et al.*, 2020). Por sua vez, a forma tripomastigota induz a produção de VEs pelos macrófagos que vão formar complexos à superfície do parasita *T. cruzi*, protegendo-o da lise celular mediada

pelo complemento, através da inibição do C3 convertase (Hosseini-Beheshti e Grau, 2018; Mantel e Marti, 2014).

A forma tripomastigota produz, ainda, VEs que contêm antígenos, que ao serem internalizadas por fibroblastos ou cardiomiócitos se tornam alvos da resposta humoral exagerada, provocando as lesões nos tecidos características da doença (Mantel e Marti, 2014).

3.4.3.2. – *Trypanosoma brucei*

O parasita *Trypanosoma brucei* apresenta duas formas replicativas: a forma pró-cíclica, presente no vetor biológico e a forma promastigota sanguínea que se desenvolve no hospedeiro vertebrado. Estas duas formas diferem no seu metabolismo energético e na expressão de proteínas de superfície. A forma sanguínea apresenta um metabolismo que depende maioritariamente da glicólise, enquanto que a forma pró-cíclica apresenta um metabolismo energético mais complexo (Clayton e Estevez, 2010).

Um facto curioso das VEs produzidas por *T. brucei* é que inicialmente achava-se que eram apêndices associados à membrana flagelar, no entanto, hoje sabe-se que essas estruturas designadas de nanotúbulos, são constituídos por estruturas filamentosas dinâmicas que formam vesículas na membrana flagelar (Babatunde *et al.*, 2020; Souza, de e Barrias, 2020). Este processo poderá representar um novo mecanismo de formação de VEs que ainda não está completamente compreendido.

As VEs de *T. brucei* possuem várias funções: medeiam a secreção da maior parte das proteínas, incluindo proteases que funcionam no processo patológico e afetam o fornecimento de nutrientes; têm um papel importante no processamento e controle de qualidade do RNA ribossomal (rRNA); estão envolvidas na degradação do mRNA; permitem a sobrevivência do parasita dentro do hospedeiro vertebrado e do vetor biológico (Eliaz *et al.*, 2017; Gavinho *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2019).

Como já referido, as VEs produzidas por *T. brucei* tanto podem ser captadas por outros parasitas como por células do hospedeiro. Por exemplo, as VEs podem fundir-se com os eritrócitos provocando a sua lise e conseqüentemente induzir anemia (Gavinho *et al.*, 2018; Ofir-Birin e Regev-Rudzki, 2019). As VEs mediam a comunicação parasita-parasita (“motilidade social”) de modo a coordenar a forma pró-cíclica durante a sua migração do intestino médio até às glândulas salivares da mosca TSÉ-TSÉ, repelindo-a de ambientes menos favoráveis (Eliaz *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2019).

3.4.4. – VEs na leishmaniose

Atualmente sabe-se que as VEs produzidas pelas diferentes espécies de *Leishmania spp.* tem um papel importante na interação parasita-hospedeiro (Marshall *et al.*, 2018; Souza, de e Barrias, 2020). *Leishmania spp.* é capaz de sobreviver e propagar-se no hospedeiro através da alteração de vias de sinalização envolvidas na eliminação do agente patogénico, induzindo modificações nas células que não se encontram infetadas ou ativar o sistema imunológico adaptativo (Mantel e Marti, 2014; Souza, de e Barrias, 2020).

A forma amastigota e a forma promastigota de *Leishmania spp.* produzem VEs que induzem a produção de citocinas anti-inflamatórias IL-8 e IL-10 que promovem o recrutamento de neutrófilos ao local da infeção e que, por sua vez, inibem a produção de TNF- α e óxido nítrico, exacerbando a patologia (Atayde *et al.*, 2016; Coakley *et al.*, 2015; Gavinho *et al.*, 2018; Souza, de e Barrias, 2020; Wu *et al.*, 2019).

Durante o ciclo biológico de *Leishmania spp.* há mudanças de fatores ambientais como a temperatura e pH que modulam a abundância e composição das VEs produzidas (Ofir-Birin e Regev-Rudzki, 2019; Wu *et al.*, 2019). Um exemplo é o facto de o protozoário passar por um choque térmico quando é transmitido ao hospedeiro vertebrado (temperatura corporal 37°C) pela picada do flebótomo (temperatura corporal de 26°C), o que provoca o aumento de proteínas como as HSP90 (Ofir-Birin e Regev-Rudzki, 2019).

Uma molécula importante que se encontra presente nas VEs produzidas por *Leishmania spp.* é a GP63 (Olajide e Cai, 2020; Vucetic *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2019). É uma protease que está presente na superfície do parasita e é um dos fatores de virulência mais importantes porque permite a proteção do parasita das enzimas lisossomais do macrófago e permite a degradação dos componentes da matriz extracelular facilitando a migração da forma promastigota para fora das células (Atayde *et al.*, 2016; Marshall *et al.*, 2018; Schorey *et al.*, 2015; Souza, de e Barrias, 2020).

3.5. – APLICAÇÃO DAS VEs AO DIAGNÓSTICO E TERAPÊUTICA

A identificação morfológica dos parasitas durante as diferentes fases do ciclo de vida é o pilar do diagnóstico de doenças parasitárias nas regiões mais pobres e com poucos recursos (Momčilović *et al.*, 2019).

A OMS implementou várias estratégias para combater as doenças parasitárias mais negligenciadas, incluindo a melhoria do diagnóstico e tratamento, a vigilância e o controle do vetor biológico (Gavinho *et al.*, 2018; WHO, 2019). Para isso, o estudo da interação parasita-hospedeiro tem sido fundamental para demonstrar que os parasitas produzem VEs em resposta a mudanças ambientais e que têm a capacidade de modular o sistema imunológico e transportar fatores de virulência até às células alvo do hospedeiro de modo a manipular os seus ciclos de vida, ativando ou desativando vias de sinalização que estão envolvidas na morte celular (Khosravi *et al.*, 2020; Marti e Johnson, 2016).

O estudo de VEs está em rápido desenvolvimento, com a identificação de novos tipos de VEs, a descoberta de novas células e organismos capazes de produzir VEs e as suas funções, bem como o desenvolvimento de novas abordagens para a sua identificação e caracterização (Poon *et al.*, 2018). As VEs são capazes de regular funções biológicas, desde a homeostase dos tecidos, a regulação da inflamação ou o crescimento e metástases de um tumor. No caso dos parasitas, estas podem ainda afetar a dinâmica da população e permitem a mudança entre as diferentes formas de vida (Marti e Johnson, 2016; Wiklander *et al.*, 2019).

A ampla capacidade das VEs em transportarem grandes moléculas entre as células, possuírem várias funções biológicas e serem produzidas por uma grande quantidade de células, fazem das VEs uma potencial classe terapêutica e de diagnóstico.

3.5.1. – VEs como biomarcadores

Diagnósticos rápidos e viáveis de agentes infecciosos permitem aos clínicos adaptar as escolhas da terapêutica e aplicá-las o mais cedo possível (Khosravi *et al.*, 2020). A utilização de meios moleculares de diagnóstico de parasitoses poderá apresentar algumas vantagens: são altamente específicos, sensíveis e podem ser uniformizados quando comparados com a microscopia (Gavinho *et al.*, 2018). A microscopia é um método de diagnóstico barato, mas que depende muito da experiência do operador, sendo por isso um método com pouca sensibilidade e reprodutibilidade (Gavinho *et al.*, 2018; Momčilović *et al.*, 2019). As técnicas de deteção molecular, como a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), são excelentes alternativas, principalmente em locais em que o número e variedade de parasitoses é baixo porque os custos deste método são elevados (Gavinho *et al.*, 2018).

Nos organismos pluricelulares, as VEs podem atravessar as diversas barreiras biológicas, podendo ser isoladas em diversos fluidos corporais como plasma, saliva, leite materno, líquido amniótico, urina, líquido cefalorraquidiano e no lavado bronco-alveolar (Colombo *et al.*, 2014; Nair e Salomon, 2018; Toro, De *et al.*, 2015). Para além disso, as VEs apresentam características da célula que lhe deu origem, fazendo destas partículas novos biomarcadores para o diagnóstico de diferentes tipos de cancro, e para a deteção de doenças infecciosas (Khosravi *et al.*, 2020; Szempruch *et al.*, 2016).

Biomarcadores são definidos como características ou entidades que são objetivamente quantificadas e avaliadas como indicadores de um processo biológico normal, de um processo patológico ou devido a uma resposta farmacológica a determinada intervenção terapêutica (Burger *et al.*, 2013).

O uso de VEs para diagnóstico de doenças infecciosas ainda é algo muito recente, mas revela grandes potencialidades, pois os marcadores tanto podem ser derivados do agente patogénico como do hospedeiro (Khosravi *et al.*, 2020; Schorey *et al.*, 2015). Apesar de ainda não haver muitos estudos para o uso de VEs como biomarcadores em infeções por parasitas, já começaram a serem relatados investigações para *Ascaris* e *Schistosoma* (Khosravi *et al.*, 2020; Meningher *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018). Em relação a protozoários flagelados, um estudo demonstrou que as VEs que são produzidas quer pelo hospedeiro quer pelo parasita durante a fase crónica da Doença de Chagas podem ser usadas como possíveis candidatos para a avaliação da resposta à terapêutica e de possíveis *outcomes* associados à Doença de Chagas, independentemente do estado imunológico do doente (Cortes-Serra *et al.*, 2020).

A natureza das VEs permite ser um meio de transporte que não se degrada no sangue. Este facto é importante pois permite o uso de miRNA como biomarcador, pois o RNA que existe no sangue está presente dentro de VEs, permitindo o desenvolvimento de um teste mais sensível, não só para detetar o agente patogénico, mas também para fazer o *follow-up* de diversas doenças (Gavinho *et al.*, 2018; Toro, De *et al.*, 2015).

3.5.2. – VEs como potenciais agentes terapêuticos

Os parasitas evoluíram de modo a produzirem VEs que interagem efetivamente com o hospedeiro, da mesma forma que o hospedeiro usa a mesma via como mecanismo de defesa (Coakley *et al.*, 2015). Assim, manipular a produção ou os efeitos das VEs nas células alvo do hospedeiro é uma via promissora para melhorar o *outcome* das doenças infecciosas (Hosseini-Beheshti e Grau, 2018).

Existem diferentes maneiras de explorar o potencial terapêutico das VEs. Uma vez que as VEs possuem a capacidade de transportar cargas genéticas exógenas, conseguem atravessar facilmente barreiras fisiológicas como a BHE e são capazes de se fundir com as membranas citoplasmáticas das células alvo (Gavinho *et al.*, 2018; Wiklander *et al.*, 2019).

O facto de as VEs poderem transportar e entregar, no interior das células alvo, RNA e proteínas tem gerado grande interesse por parte dos investigadores para o uso de VEs como *drug delivery systems* (Chen *et al.*, 2020; Schorey e Harding, 2016; Wiklander *et al.*, 2019).

Por exemplo seria interessante se as VEs pudessem transportar diferentes fármacos e simultaneamente contivessem nanopartículas que permitissem o controlo da libertação do fármaco (Gavinho *et al.*, 2018). Alternativamente, as VEs poderiam passar por um processo de bioengenharia de modo a expressar à superfície moléculas como proteínas bioativas que pudessem mediar uma função biológica específica ou uma molécula capaz de neutralizar biomoléculas que se encontram em circulação e sejam nocivas para o hospedeiro (Hosseini-Beheshti e Grau, 2018; Wiklander *et al.*, 2019). As proteínas de superfície também podem ser usadas de modo a que as VEs se liguem apenas a um determinado tipo de células alvo (Wiklander *et al.*, 2019).

Mas o uso de VEs na terapêutica apresenta vários desafios que ainda têm de ser ultrapassados como: a produção de VEs, que é um dos maiores desafios devido à heterogeneidade que as VEs apresentam e baixa produtividade; o método de isolamento que é escolhido porque cada método tem as suas vantagens e desvantagens consoante o propósito para que se pretende usar as VEs; o *drug loading* que é mais fácil se a molécula for pequena e lipofílica; e, por último, a via de administração das VEs influencia a sua biodisponibilidade (Takakura *et al.*, 2020; Wiklander *et al.*, 2019).

A maior parte dos estudos das VEs como *drug delivery systems* têm sido direccionados para modelos do cancro, pois o potencial uso em doenças infecciosas é ainda pouco claro, mas do mesmo modo poder-se-ia utilizar as VEs para transportar os diferentes fármacos antiparasitários (Gavinho *et al.*, 2018; Schorey e Harding, 2016; Wiklander *et al.*, 2019).

3.5.3. – Potencial uso de VEs em vacinas

No caso das parasitoses, o uso de VEs ainda está a dar os primeiros passos (Chaput e Théry, 2011; Khosravi *et al.*, 2020).

Um dos métodos mais utilizados para a imunização nos seres humanos é o uso de vacinas. Estas dividem-se em vacinas vivas atenuadas e vacinas inativadas.

As vacinas vivas contêm o agente patogénico “vivo”, mas atenuado, ou seja, mantém a capacidade de se multiplicar no organismo do indivíduo vacinado, mas sem causar a doença, induzindo uma resposta imunitária adequada e mais duradoura (DGS, 2013). Muitas vezes estas vacinas estão contraindicadas para o uso em grávidas, mulheres a amamentar e doentes imunodeprimidos porque os estudos de segurança realizados nestas populações são muito limitados. As vacinas inativadas podem ser constituídas por frações do agente patogénico e/ou o agente patogénico inteiro inativado. Assim, o uso de vacinas com VEs poderá apresentar os aspetos positivos das vacinas vivas atenuadas evitando os riscos a estas associadas (Gavinho et al., 2018).

Há um grande número de vantagens em usar VEs em vacinas contra agentes patogénicos: apresentam conformações mais estáveis para as proteínas; possuem uma melhor distribuição pelo organismo porque podem circular nos fluídos biológicos; possuem uma mais eficiente associação entre as células do sistema imunitário e o antígeno devido à expressão de moléculas de adesão à sua superfície; ser um dos mecanismos usados naturalmente pelo corpo para transportar antígenos e outras moléculas entre as células; e, por último, as VEs não se podem dividir nem multiplicar o que significa que são mais seguras do ponto de vista infeccioso (Schorey et al., 2015; Schorey e Harding, 2016; Wiklander et al., 2019).

As VEs usadas nas vacinas podem derivar das células infetadas ou do agente patogénico (Wiklander et al., 2019). As VEs derivadas de células infetadas do hospedeiro podem ser aproveitadas para fins terapêuticos, porque as células do sistema imunitário que se encontram infetadas podem libertar VEs que contêm moléculas derivadas do agente patogénico e, assim, estimular uma resposta pró-inflamatória, com o aumento da produção de interleucinas (Gavinho et al., 2018; Ofir-Birin e Regev-Rudzki, 2019). Deste modo, as VEs podem também ser usadas como adjuvantes no combate a uma infeção (Gavinho et al., 2018).

O uso de VEs pode fornecer um novo método de comunicação e troca de antígenos entre as células do sistema imunológico podendo aumentar a imunogenicidade e possibilitando um efeito imunomodulador efetivo (Gavinho et al., 2018). Os macrófagos e células dendríticas estimuladas com VEs derivadas de parasitas são capazes de iniciar uma resposta imunológica inata e adaptativa contra o agente patogénico (Khosravi et al., 2020).

Observações clínicas e pré-clínicas indicam que vacinas com VE, como tratamento contra um agente patogénico são praticáveis e bem toleradas, mas ainda são precisos mais estudos para demonstrar efeitos eficaz nos seres humanos (Wiklander et al., 2019).

3.6. – CONCLUSÃO

Nos últimos anos tem havido um aumento exponencial de estudos que visam compreender os efeitos e potencialidades dos diversos tipos de VEs. A área da oncologia foi pioneira na possibilidade de advir algum benefício do uso das VEs e apesar dos resultados não serem definitivos e precisarem de mais estudo, as expectativas são positivas. Enquanto os estudos nesta área se iam multiplicando, abriam-se outras áreas de investigação a ritmos diferentes e com resultados ainda em fase embrionária como acontece com as doenças infecciosas.

Neste trabalho é referida a giardíase, a tricomoniase, a triponossomose humana e a leishmaniose porque a delimitação do tema assim o exigia, mas o universo de possibilidades de aproveitamento do estudo das VEs é tão amplo quanto as doenças que afetam o ser humano.

O conhecimento de como as VEs funcionam em contexto de doenças infecciosas, embora ainda limitado, perspectiva-se um futuro de esperança pois o crescimento desta área poderá conduzir a uma melhor compreensão dos mecanismos de virulência e das respostas imunológicas, bem como ao desenvolvimento de novos meios de diagnóstico e vacinas (Schorey e Harding, 2016). Tome-se como exemplo paradigmático a aplicação em *Ascaris*, *Schistosoma* e na Doença de Chagas. Apesar de bem-sucedidas as primeiras tentativas do uso das VEs como biomarcadores para o diagnóstico e para avaliação do sucesso da terapêutica destas doenças, impõem-se mais estudos. O foco atual será a otimização e implementação de um processo pré-analítico padronizado para correta manipulação de amostras, bem como o desenvolvimento e validação de novos métodos de quantificação das VEs (Burger *et al.*, 2013; Khosravi *et al.*, 2020).

Do mesmo modo as VEs como agentes terapêuticos precisam de futuras caracterizações em modelos pré-clínicos para assegurar a segurança e toxicidade, bem como os perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos para suportar o futuro uso clínico (Wiklander *et al.*, 2019).

Parece pertinente concluir que como as infeções causadas por parasitas são na sua maioria crónicas, a comunicação entre parasitas e os seus hospedeiros ocorre durante grandes períodos. Deste modo, as VEs derivadas dos parasitas que modulam o organismo do hospedeiro a favor da sua sobrevivência, são importantes para perceber as interações hospedeiro-parasita e desenvolver estratégias de alterar, inverter ou anular os *outcomes* associados às parasitoses.

Saindo do tema e porque estarmos perante uma doença nova pandémica, a COVID-19 poderá ser uma doença que alavanque estudos aprofundados das VEs, permitindo a criação de uma vacina ou uma terapêutica eficaz. Só o futuro o dirá!

BIBLIOGRAFIA

- AGRAHARI, Vivek; AGRAHARI, Vibhuti; BURNOUF, Pierre-Alain; CHEW, Chee Ho; BURNOUF, Thierry - **Extracellular Microvesicles as New Industrial Therapeutic Frontiers**. Trends in Biotechnology. 37:7 (2018) 707–729. doi: 10.1016/j.tibtech.2018.11.012.
- ÁGUAS, F.; PEREIRA DA SILVA, D. - **Infecções Vulvovaginais**. Sociedade Portuguesa de Ginecologia. (2012) 1–52.
- AKERS, Johnny C.; GONDA, David; KIM, Ryan; CARTER, Bob S.; CHEN, Clark C. - **Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies**. Journal of Neuro-Oncology. 113:1 (2013) 1–11. doi: 10.1007/s11060-013-1084-8.
- ALMEIDA, Henrique; LOBO-DA-CUNHA, Alexandre - Complexo de Golgi e Lisossomas. Em AZEVEDO, CARLOS; SUNKEL, CLAUDIO E. (Eds.) - **Biologia Celular e Molecular**. 5ª ed. Lisboa: Lidel - Edições Técnicas, 2012. ISBN 978-972-757-692-0. p. 301–319.
- ÂNGELO, Helena - Parasitas. Em FERREIRA, WANDA F.; SOUSA, JOÃO CARLOS F.; LIMA, NELSON (Eds.) - **Microbiologia**. 1ª ed. Lisboa: Lidel - Edições Técnicas, 2010. ISBN 978-972-757-515-2. p. 130–144.
- ANTINORI, Spinello; GALIMBERTI, Laura; BIANCO, Roberto; GRANDE, Romualdo; GALLI, Massimo; CORBELLINO, Mario - **Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world**. European Journal of Internal Medicine. 43 (2017) 6–15. doi: 10.1016/j.ejim.2017.05.001.
- ANTONIOU, M.; GRAMICCIA, M.; MOLINA, R.; DVORAK, V.; VOLF, P. - **The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the mediterranean region**. Eurosurveillance. 18:30 (2013) 1–8.
- ATAYDE, Vanessa Diniz; HASSANI, Kasra; SILVA LIRA FILHO, Alonso DA; BORGES, Andrezza Raposo; ADHIKARI, Anupam; MARTEL, Caroline; OLIVIER, Martin - **Leishmania exosomes and other virulence factors: Impact on innate immune response and macrophage functions**. Cellular Immunology. 309 (2016) 7–18. doi: 10.1016/j.cellimm.2016.07.013.
- BABATUNDE, Kehinde Adebayo; SUBRAMANIAN, Bibin Yesodha; AHOUIDI, Ambroise Dioum; MARTINEZ MURILLO, Paola; WALCH, Michael; MANTEL, Pierre Yves - **Role**

of Extracellular Vesicles in Cellular Cross Talk in Malaria. *Frontiers in Immunology*. 11:January (2020) 1–13. doi: 10.3389/fimmu.2020.00022.

BAÑULS, Anne Laure; HIDE, Mallorie; PRUGNOLLE, Franck - **Leishmania and the Leishmaniasis: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans.** *Advances in Parasitology*. 64 (2007). doi: 10.1016/S0065-308X(06)64001-3.

BARRETT, Michael P.; BURCHMORE, Richard J. S.; STICH, August; LAZZARI, Julio O.; FRASCH, Alberto Carlos; CAZZULO, Juan José; KRISHNA, Sanjeev - **The trypanosomiasis.** *Lancet*. 362:9394 (2003) 1469–1480. doi: 10.1016/S0140-6736(03)14694-6.

BAUTISTA-LÓPEZ, Norma L.; NDAO, Momar; CAMARGO, Vasquez - **Characterization and Diagnostic Application of Trypanosoma cruzi Trypomastigote Excreted-Secreted Antigens Shed in Extracellular Vesicles Released from Infected Mammalian Cells.** *Journal of Clinical Microbiology*. 55:3 (2017) 744–758. doi: 10.1128/JCM.01649-16.

BURGER, Dylan; SCHOCK, Sarah; THOMPSON, Charlie S.; MONTEZANO, Augusto C.; HAKIM, Antoine M.; TOUYZ, Rhian M. - **Microparticles: Biomarkers and beyond.** *Clinical Science*. 124:7 (2013) 423–441. doi: 10.1042/CS20120309.

BÜSCHER, Philippe; CECCHI, Giuliano; JAMONNEAU, Vincent; PRIOTTO, Gerardo - **Human African trypanosomiasis.** *The Lancet*. 390:10110 (2017) 2397–2409. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31510-6.

CAMPINO, Lenea; MAIA, Carla - **Epidemiologia das leishmanioses em Portugal.** *Acta Medica Portuguesa*. ISSN 16460758. 23:5 (2010) 859–864.

CDC - **DPDx - Trichomoniasis**, atual. 2017. [Consult. 1 jun. 2020]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/index.html>

CDC - **Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease)**, atual. 2019. [Consult. 15 jun. 2020]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>

CDC - **DPDx - African Trypanosomiasis (also known as Sleeping Sickness)**, atual. 2020. [Consult. 20 jun. 2020]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/sleeping-sickness/biology.html>

CDC - **DPDx - Leishmaniasis**, atual. 2020. [Consult. 22 jun. 2020]. Disponível em:

<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>

- CERNIKOVA, Lenka; FASO, Carmen; HEHL, Adrian B. - **Five facts about Giardia lamblia.** PLoS Pathogens. 14:9 (2018) 1–5. doi: 10.1371/journal.ppat.1007250.
- CHAPUT, Nathalie; THÉRY, Clotilde - **Exosomes: Immune properties and potential clinical implementations.** Seminars in Immunopathology. 33:5 (2011) 419–440. doi: 10.1007/s00281-010-0233-9.
- CHEN, Yu-Shuan; LIN, En-Yi; CHIOU, Tzyy-Wen; HARN, Horng-Jyh - **Exosomes in clinical trial and their production in compliance with good manufacturing practice.** Tzu Chi Medical Journal. 32:2 (2020) 113. doi: 10.4103/tcmj.tcmj_182_19.
- CLAYTON, Christine; ESTEVEZ, Antonio - **The exosomes of trypanosomes and other protists.** Advances in Experimental Medicine and Biology. 702 (2010) 39–49. doi: 10.1007/978-1-4419-7841-7_4.
- COAKLEY, Gillian; MAIZELS, Rick M.; BUCK, Amy H. - **Exosomes and Other Extracellular Vesicles: The New Communicators in Parasite Infections.** Trends in Parasitology. 31:10 (2015) 477–489. doi: 10.1016/j.pt.2015.06.009.
- COLOMBO, Marina; RAPOSO, Graça; THÉRY, Clotilde - **Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles.** Annual Review of Cell and Developmental Biology. 30:1 (2014) 255–289. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
- CORTES-SERRA, Nuria; MENDES, Maria Tays; MAZAGATOS, Clara; SEGUI-BARBER, Joan; ELLIS, Cameron C.; BALLART, Cristina; GARCIA-ALVAREZ, Ana; GÁLLEGO, Montserrat; GASCON, Joaquim; ALMEIDA, Igor C.; PINAZO, María Jesús; FERNANDEZ-BECERRA, Carmen - **Plasma-derived extracellular vesicles as potential biomarkers in heart transplant patient with chronic chagas disease.** Emerging Infectious Diseases. 26:8 (2020) 1846–1851. doi: 10.3201/eid2608.191042.
- COX, F. E. G. - **History of Human Parasitology.** Clinical Microbiology Reviews. 15:4 (2002) 595–612. doi: 10.1128/cmr.15.4.595-612.2002.
- COX, F. E. G. - Classification and Introduction to the Parasitic Protozoa. Major Reference Works. **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections.** (2010). doi: 10.1002/9780470688618.taw0173.
- CRESCITELLI, Rossella; LÄSSER, Cecilia; SZABÓ, Tamas G.; KITTEL, Agnes; ELDH, Maria; DIANZANI, Irma; BUZÁS, Edit I.; LÖTVALL, Jan - **Distinct RNA profiles in**

subpopulations of extracellular vesicles: Apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2:1 (2013). doi: 10.3402/jev.v2i0.20677.

CRONEMBERGER-ANDRADE, André; XANDER, Patrícia; SOARES, Rodrigo Pedro; PESSOA, Natália Lima; CAMPOS, Marco Antônio; ELLIS, Cameron C.; GRAJEDA, Brian; OFIR-BIRIN, Yifat; ALMEIDA, Igor Correia; REGEV-RUDZKI, Neta; TORRECILHAS, Ana Claudia - **Trypanosoma cruzi-Infected Human Macrophages Shed Proinflammatory Extracellular Vesicles That Enhance Host-Cell Invasion via Toll-Like Receptor 2.** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10:March (2020) 1–15. doi: 10.3389/fcimb.2020.00099.

D'SOUZA-SCHOREY, Crislyn; SCHOREY, Jeffrey S. - **Regulation and mechanisms of extracellular vesicle biogenesis and secretion.** *Essays in Biochemistry*. 62:2 (2018) 125–133. doi: 10.1042/EBC20170078.

DEOLINDO, Poliana; EVANS-OSSES, Ingrid; RAMIREZ, Marcel Ivan - **Microvesicles and exosomes as vehicles between protozoan and host cell communication.** *Biochemical Society Transactions*. 41:1 (2013) 252–257. doi: 10.1042/BST20120217.

DGS - **Compreender como as Vacinas atuam**, atual. 2013. [Consult. 25 jul. 2020]. Disponível em: <https://www.dgs.pt/ficheiros-de-upload-2013/sev2013-informacao-2-pdf.aspx>

DINI, L.; TACCONI, S.; CARATA, E.; TATA, A. M.; VERGALLO, C.; PANZARINI, E. - **Microvesicles and exosomes in metabolic diseases and inflammation.** *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 51:February (2020) 27–39. doi: 10.1016/j.cytogfr.2019.12.008.

DOONAN, Francesca; COTTER, Thomas G. - **Morphological assessment of apoptosis.** *Methods*. 44:3 (2008) 200–204. doi: 10.1016/j.ymeth.2007.11.006.

EINARSSON, Elin; MA'AYEH, Showgy; SVÄRD, Staffan G. - **An up-date on Giardia and giardiasis.** *Current Opinion in Microbiology*. 34 (2016) 47–52. doi: 10.1016/j.mib.2016.07.019.

ELIAZ, Dror; KANNAN, Sriram; SHAKED, Hadassa; ARVATZ, Gil; TKACZ, Itai Dov; BINDER, Lior; WALDMAN BEN-ASHER, Hiba; OKALANG, Uthman; CHIKNE, Vaibhav; COHEN-CHALAMISH, Smadar; MICHAELI, Shulamit - **Exosome secretion affects social motility in Trypanosoma brucei.** *PLOS Pathogens*. 13:3 (2017) doi: 10.1371/journal.ppat.1006245

- ESCH, Kevin J.; PETERSEN, Christine A. - **Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals.** *Clinical Microbiology Reviews.* 26:1 (2013) 58–85. doi: 10.1128/CMR.00067-12.
- EVANS-OSSES, Ingrid; MOJOLI, Andres; MONGUIÓ-TORTAJADA, Marta; MARCILLA, Antonio; ARAN, Veronica; AMORIM, Maria; INAL, Jameel; BORRÀS, Francesc E.; RAMIREZ, Marcel I. - **Microvesicles released from Giardia intestinalis disturb host-pathogen response in vitro.** *European Journal of Cell Biology.* 96:2 (2017) 131–142. doi: 10.1016/j.ejcb.2017.01.005.
- EVANS-OSSES, Ingrid; REICHEMBACH, Luis H.; RAMIREZ, Marcel I. - **Exosomes or microvesicles? Two kinds of extracellular vesicles with different routes to modify protozoan-host cell interaction.** *Parasitology Research.* 114:10 (2015) 3567–3575. doi: 10.1007/s00436-015-4659-9.
- FERREIRA, Wanda F.; SOUSA, João Carlos F. - Conceitos Gerais de Microbiologia. Em FERREIRA, WANDA F. CANAS; SOUSA, JOÃO CARLOS F.; LIMA, NELSON (Eds.) - **Microbiologia.** 1ª ed. Lisboa: Lidel - Edições Técnicas, 2010. ISBN 978-972-757-515-2. p. 1–22.
- FRANCO, Jose R.; SIMARRO, Pere P.; DIARRA, Abdoulaye; JANNIN, Jean G. - **Epidemiology of human African trypanosomiasis.** *Clinical Epidemiology.* 6:1 (2014) 257–275. doi: 10.2147/CLEP.S39728.
- GAVINHO, Bruno; ROSSI, Izadora Volpato; EVANS-OSSES, Ingrid; INAL, Jameel; RAMIREZ, Marcel I. - **A new landscape of host-protozoa interactions involving the extracellular vesicles world.** *Parasitology.* 145:12 (2018) 1521–1530. doi: 10.1017/S0031182018001105.
- GUNN, Alan; PITT, Sarah J. - Parasitic Protozoa, Fungi and Plants. Em **Parasitology: An Integrated Approach.** 1ª Edition ed. West Sussex: Wiley-Blackwell, 2012 Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781119968986.ch2>. p. 28–85.
- GUTIERREZ, F. R. S.; GUEDES, P. M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. - **The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease.** *Parasite Immunology.* 31:11 (2009) 673–685. doi: 10.1111/j.1365-3024.2009.01108.x.
- HANDRICH, Maria R.; GARG, Sriram G.; SOMMERVILLE, Ewen W.; HIRT, Robert P.; GOULD, Sven B. - **Characterization of the BspA and Pmp protein family of trichomonads.** *Parasites and Vectors.* 12:1 (2019) 1–15. doi: 10.1186/s13071-019-

3660-z.

- HENNE, William M.; BUCHKOVICH, Nicholas J.; EMR, Scott D. - **The ESCRT Pathway**. *Developmental Cell*. 21:1 (2011) 77–91. doi: 10.1016/j.devcel.2011.05.015.
- HESSVIK, Nina Pettersen; LLORENTE, Alicia - **Current knowledge on exosome biogenesis and release**. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 75:2 (2018) 193–208. doi: 10.1007/s00018-017-2595-9.
- HOSSEINI-BEHESHTI, Elham; GRAU, Georges Emile Raymond - **Extracellular vesicles as mediators of immunopathology in infectious diseases**. *Immunology and Cell Biology*. 96:7 (2018) 694–703. doi: 10.1111/imcb.12044.
- JADLI, Anshul S.; BALLASY, Noura; EDALAT, Pariya; PATEL, Vaibhav B. - **Inside(sight) of tiny communicator: exosome biogenesis, secretion, and uptake**. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 467:1 (2020) 77–94. doi: 10.1007/s11010-020-03703-z.
- JAISWAL, Ritu; SEDGER, Lisa M. - **Intercellular vesicular transfer by exosomes, microparticles and oncosomes - Implications for cancer biology and treatments**. *Frontiers in Oncology*. 9:MAR (2019) 1–27. doi: 10.3389/fonc.2019.00125.
- KALRA, Hina; DRUMMEN, Gregor P. C.; MATHIVANAN, Suresh - **Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing**. *International Journal of Molecular Sciences*. 17:2 (2016). doi: 10.3390/ijms17020170.
- KAUFER, Alexa; ELLIS, John; STARK, Damien; BARRATT, Joel - **The evolution of trypanosomatid taxonomy**. *Parasites and Vectors*. 10:1 (2017) 1–17. doi: 10.1186/s13071-017-2204-7.
- KENNEDY, Peter G. E. - **Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness)**. *The Lancet Neurology*. 12:2 (2013) 186–194. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70296-X.
- KHOSRAVI, Mojdeh; MIRSAMADI, Elnaz Sadat; MIRJALALI, Hamed; ZALI, Mohammad Reza - **Isolation and functions of extracellular vesicles derived from parasites: The promise of a new era in immunotherapy, vaccination, and diagnosis**. *International Journal of Nanomedicine*. 15 (2020) 2957–2969. doi: 10.2147/IJN.S250993.
- LIPOLDOVÁ, Marie; DEMANT, Peter - **Genetic susceptibility to infectious disease: Lessons from mouse models of leishmaniasis**. *Nature Reviews Genetics*. 7:4 (2006) 294–305. doi: 10.1038/nrg1832.

- LÖTVALL, Jan; HILL, Andrew F.; HOCHBERG, Fred; BUZÁS, Edit I.; DI, Dolores; GARDINER, Christopher; GHO, Yong Song; KUROCHKIN, Igor V.; QUESENBERRY, Peter; SAHOO, Susmita; TAHARA, Hidetoshi; MARCA, H. - **Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles.** *Journal of Extracellular Vesicles.* 3:1 (2014). doi: 10.3402/jev.v3.26913.
- LV, Yingmei; TAN, Jin; MIAO, Yuyang; ZHANG, Qiang - **The role of microvesicles and its active molecules in regulating cellular biology.** *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 23:12 (2019) 7894–7904. doi: 10.1111/jcmm.14667.
- MA'AYEH, Showgy Y.; LIU, Jingyi; PEIRASMAKI, Dimitra; HÖRNAEUS, Katarina; BERGSTRÖM LIND, Sara; GRABHERR, Manfred; BERGQUIST, Jonas; SVÄRD, Staffan G. - **Characterization of the Giardia intestinalis secretome during interaction with human intestinal epithelial cells: The impact on host cells.** *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 11:12 (2017) doi: 10.1371/journal.pntd.0006120.
- MAAS, Sybren L. N.; BREAKFIELD, Xandra O.; WEAVER, Alissa M. - **Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles.** *Trends in Cell Biology.* 27:3 (2017) 172–188. doi: 10.1016/j.tcb.2016.11.003.
- MACHADO, Marisa; CÉU SOUSA, Maria do; SALGUEIRO, Lígia; CAVALEIRO, Carlos - **Os óleos essenciais como agentes anti-parasitários.** *Revista de Fitoterapia.* 10:1 (2010) 35–44.
- MALVY, D.; CHAPPUIS, F. - **Sleeping Sickness.** *Clinical Microbiology and Infection.* 17:7 (2011) 986–995. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03536.x.
- MANTEL, Pierre-Yves; MARTI, Matthias - **The role of extracellular vesicles in Plasmodium and other protozoan parasites.** *Cellular Microbiology.* 16:3 (2014) 344–354. doi: 10.1111/cmi.12259.
- MARCILLA, Antonio; MARTIN-JAULAR, Lorena; TRELIS, Maria; MENEZES-NETO, Armando DE; OSUNA, Antonio; BERNAL, Dolores; FERNANDEZ-BECERRA, Carmen; ALMEIDA, Igor C.; PORTILLO, Hernando A. DEL - **Extracellular vesicles in parasitic diseases.** *Journal of Extracellular Vesicles.* 3:1 (2014). doi: 10.3402/jev.v3.25040.
- MARSHALL, Skye; KELLY, Patrick H.; SINGH, Brajesh K.; POPE, R. Marshall; KIM, Peter; ZHANBOLAT, Bayan; WILSON, Mary E.; YAO, Chaoqun - **Extracellular release of**

virulence factor major surface protease via exosomes in *Leishmania infantum* promastigotes. *Parasites and Vectors*. 11:1 (2018) 1–10. doi: 10.1186/s13071-018-2937-y.

MARTI, Matthias; JOHNSON, Patricia J. - **Emerging roles for extracellular vesicles in parasitic infections.** *Current Opinion in Microbiology*. 32 (2016) 66–70. doi: 10.1016/j.mib.2016.04.008.

MELDOLESI, Jacopo - **Review Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication.** *Current Biology*. 28:8 (2018) R435–R444. doi: 10.1016/j.cub.2018.01.059.

MENINGHER, Tal; LERMAN, Galya; REGEV-RUDZKI, Neta; GOLD, Daniel; BEN-DOV, Iddo Z.; SIDI, Yechezkel; AVNI, Dror; SCHWARTZ, Eli - **Schistosomal microRNAs isolated from extracellular vesicles in sera of infected patients: a new tool for diagnosis and follow-up of human schistosomiasis.** *Journal of Infectious Diseases*. 215:3 (2017) 378–386. doi: 10.1093/infdis/jiw539.

MIDDLEJ, Victor; SOUZA, Wanderley DE; BENCHIMOL, Marlene - **The peripheral vesicles gather multivesicular bodies with different behavior during the *Giardia intestinalis* life cycle.** *Journal of Structural Biology*. 207:3 (2019) 301–311. doi: 10.1016/j.jsb.2019.07.002.

MILLÁN, Javier; FERROGLIO, Ezio; SOLANO-GALLEGO, Laia - **Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe.** *Parasitology Research*. 113:6 (2014) 2005–2014. doi: 10.1007/s00436-014-3929-2.

MOJOLI LE QUESNE, Andrés Hernán - **Caracterização dos mecanismos de microvesiculação de trofozoítos de *Giardia intestinalis* e determinação do papel das microvesículas na interação com células hospedeiras.** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz. (2014)

MOMČILOVIĆ, S.; CANTACESSI, C.; ARSIĆ-ARSENJEVIĆ, V.; OTRANTO, D.; TASIĆ-OTAŠEVIĆ, S. - **Rapid diagnosis of parasitic diseases: current scenario and future needs.** *Clinical Microbiology and Infection*. 25:3 (2019) 290–309. doi: 10.1016/j.cmi.2018.04.028.

MONTANER, Sergio; GALIANO, Alicia; TRELIS, María; MARTIN-JAULAR, Lorena; PORTILLO, Hernando A. DEL; BERNAL, Dolores; MARCILLA, Antonio - **The role of extracellular vesicles in modulating the host immune response during**

parasitic infections. *Frontiers in Immunology*. 5:AUG (2014) 1–8. doi: 10.3389/fimmu.2014.00433.

MOYANO, Sofía; MUSSO, Juliana; FELIZIANI, Constanza; ZAMPONI, Nahuel; FRONTERA, Lorena Soledad; ROPOLO, Andrea Silvana; LANFREDI-RANGEL, Adriana; LALLE, Marco; TOUZ, María C. - **Exosome Biogenesis in the Protozoa Parasite Giardia lamblia: A Model of Reduced Interorganellar Crosstalk.** *Cells*. 8:12 (2019) 1600. doi: 10.3390/cells8121600.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. - Intestinal and Urogenital Protozoa. Em **Medical Microbiology**. Eighth Ed ed. Philadelphia: Elsevier, 2016. ISBN 978-0-323-29956-5. p. 715–727.

NAIR, Soumyalekshmi; SALOMON, Carlos - **Extracellular vesicles and their immunomodulatory functions in pregnancy.** *Seminars in Immunopathology*. 40:5 (2018) 425–437. doi: 10.1007/s00281-018-0680-2.

NIEL, Guillaume VAN; D'ANGELO, Gisela; RAPOSO, Graça - **Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 19:4 (2018) 213–228. doi: 10.1038/nrm.2017.125.

NIEVAS, Yesica R.; COCERES, Veronica M.; MIDDLEJ, Victor; SOUZA, Wanderley DE; BENCHIMOL, Marlene; PEREIRA-NEVES, Antonio; VASHISHT, Ajay A.; WOHLSCHLEGEL, James A.; JOHNSON, Patricia J.; MIGUEL, Natalia DE - **Membrane-shed vesicles from the parasite Trichomonas vaginalis: characterization and their association with cell interaction.** *Cellular and Molecular Life Sciences*. 75:12 (2018) 2211–2226. doi: 10.1007/s00018-017-2726-3.

NOBELPRIZE.ORG. - **The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2013**, atual. 2013. [Consult. 19 abr. 2020]. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2013/summary/>

OFIR-BIRIN, Yifat; REGEV-RUDZKI, Neta - **Extracellular vesicles in parasite survival.** *Science*. 363:6429 (2019) 817–818. doi: 10.1126/science.aau4666.

OLAJIDE, Joshua Seun; CAI, Jianping - **Perils and Promises of Pathogenic Protozoan Extracellular Vesicles.** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10:August (2020). doi: 10.3389/fcimb.2020.00371.

OLMOS-ORTIZ, L. M.; BARAJAS-MENDIOLA, M. A.; BARRIOS-RODILES, M.; CASTELLANO, L. E.; ARIAS-NEGRETE, S.; AVILA, E. E.; CUÉLLAR-MATA, P. -

Trichomonas vaginalis exosome-like vesicles modify the cytokine profile and reduce inflammation in parasite-infected mice. *Parasite Immunology*. 39:6 (2017) 1–10. doi: 10.1111/pim.12426.

PARANAIBA, Larissa F.; GUARNERI, Alessandra A.; TORRECILHAS, Ana C.; MELO, Maria N.; SOARES, Rodrigo P. - **Extracellular vesicles isolated from Trypanosoma cruzi affect early parasite migration in the gut of rhodnius prolixus but not in Triatoma infestans**. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 114:11 (2019) 1–5. doi: 10.1590/0074-02760190217.

PARAYATH, Neha N.; PADMAKUMAR, Smrithi; AMIJI, Mansoor M. - **Extracellular vesicle-mediated nucleic acid transfer and reprogramming in the tumor microenvironment**. *Cancer Letters*. 482:March (2020) 33–43. doi: 10.1016/j.canlet.2020.04.009.

POON, Ivan K. H.; GREGORY, Christopher D.; KAPARAKIS-LIASKOS, Maria - **Editorial: The Immunomodulatory Properties of Extracellular Vesicles From Pathogens, Immune Cells, and Non-immune Cells**. *Frontiers in immunology*. 9:December (2018) 3024. doi: 10.3389/fimmu.2018.03024.

PRAYAG, Kedar; SURVE, Dhanashree H.; PAUL, Atish T.; KUMAR, Sanjay; JINDAL, Anil B. - **Nanotechnological interventions for treatment of trypanosomiasis in humans and animals**. *Drug Delivery and Translational Research*. (2020). doi: 10.1007/s13346-020-00764-x.

RAI, Anand Kumar; JOHNSON, Patricia J. - **Trichomonas vaginalis extracellular vesicles are internalized by host cells using proteoglycans and caveolin-dependent endocytosis**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 116:43 (2019) 21354–21360. doi: 10.1073/pnas.1912356116.

RAMÍREZ, Juan David; GUHL, Felipe; UMEZAWA, Eufrosina Setsu; MORILLO, Carlos A.; ROSAS, Fernando; MARIN-NETO, Jose A.; RESTREPO, Silvia - **Evaluation of adult chronic Chagas' heart disease diagnosis by molecular and serological methods**. *Journal of Clinical Microbiology*. 47:12 (2009) 3945–3951. doi: 10.1128/JCM.01601-09.

RASSI, Anis; RASSI, Anis; MARIN-NETO, José Antonio - **Chagas disease**. *The Lancet*. 375:9723 (2010) 1388–1402. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X.

- READY, P. D. - **Leishmaniasis emergence in Europe**. *Eurosurveillance*. 15:10 (2010) 29–39.
- RECORD, Michel; CARAYON, Kevin; POIROT, Marc; SILVENTE-POIROT, Sandrine - **Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiologicals**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1841:1 (2014) 108–120. doi: 10.1016/j.bbalip.2013.10.004.
- RYAN, Christopher M.; MIGUEL, Natalia DE; JOHNSON, Patricia J. - **Trichomonas vaginalis: Current understanding of host-parasite interactions**. *Essays in Biochemistry*. 51:1 (2011) 161–175. doi: 10.1042/BSE0510161.
- SAMBADE, Clara - Morte celular por apoptose. Em AZEVEDO, CARLOS; SUNKEL, CLAUDIO E. (Eds.) - **Biologia Celular e Molecular**. 5ª ed. Lisboa: Lidel - Edições Técnicas, 2012. ISBN 978-972-757-692-0. p. 553–571.
- SCHOREY, Jeffrey S.; BHATNAGAR, Sanchita - **Exosome function: From tumor immunology to pathogen biology**. *Traffic*. 9:6 (2008) 871–881. doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00734.x.
- SCHOREY, Jeffrey S.; CHENG, Yong; SINGH, Prachi P.; SMITH, Victoria L. - **Exosomes and other extracellular vesicles in host–pathogen interactions**. *EMBO reports*. 16:1 (2015) 24–43. doi: 10.15252/embr.201439363.
- SCHOREY, Jeffrey S.; HARDING, Clifford V. - **Extracellular vesicles and infectious diseases: New complexity to an old story**. *Journal of Clinical Investigation*. 126:4 (2016) 1181–1189. doi: 10.1172/JCI81132.
- SCHWEBKE, Jane R.; BURGESS, Donald - **Trichomoniasis**. *Clinical Microbiology Reviews*. 17:4 (2004) 794–803. doi: 10.1128/CMR.17.4.794-803.2004.
- SILVA, Jani; CERQUEIRA, Fátima; TEIXEIRA, Ana Luísa; CAMPAINHA, Rui; AMORIM, José; MEDEIROS, Rui - **Prevalence of Neisseria gonorrhoeae and Trichomonas vaginalis in Portuguese women of childbearing age**. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. (2020) 1–5. doi: 10.1080/01443615.2020.1736014.
- SOUZA, Tayse Domingues; TURCHETTI, Andréia Pereira; FUJIWARA, Ricardo Toshio; PAIXÃO, Tatiane Alves; SANTOS, Renato Lima - **Visceral leishmaniasis in zoo and wildlife**. *Veterinary Parasitology*. 200:3–4 (2014) 233–241. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.12.025.

- SOUZA, Wanderley DE; BARRIAS, Emile S. - **Membrane-bound extracellular vesicles secreted by parasitic protozoa: cellular structures involved in the communication between cells.** *Parasitology Research*. 119:7 (2020) 2005–2023. doi: 10.1007/s00436-020-06691-7.
- SRIVASTAVA, Akhil; AMREDDY, Narsireddy; PAREEK, Vipul; CHINNAPPAN, Mahendran; AHMED, Rebaz; MEHTA, Meghna; RAZAQ, Mohammad; MUNSHI, Anupama; RAMESH, Rajagopal - **Progress in extracellular vesicle biology and their application in cancer medicine.** *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*. e1621:January (2020) 1–20. doi: 10.1002/wnan.1621.
- SZEMPRUCH, Anthony J.; DENNISON, Lauren; KIEFT, Rudo; HARRINGTON, John M.; HAJDUK, Stephen L. - **Sending a message: Extracellular vesicles of pathogenic protozoan parasites.** *Nature Reviews Microbiology*. 14:11 (2016) 669–675. doi: 10.1038/nrmicro.2016.110.
- TAKAKURA, Yoshinobu; MATSUMOTO, Akihiro; TAKAHASHI, Yuki - **Recent Advances in Research on Particulate Formulations such as Lipoproteins, Therapeutic Application of Small Extracellular Vesicles (sEVs): Pharmaceutical and Pharmacokinetic Challenges.** *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 43:4 (2020) 576–583. doi: <https://doi.org/10.1248/bpb.b19-00831>.
- THEEL, Elitza S.; PRITT, Bobbi S. - **Parasites.** *Microbiology Spectrum*. 4:4 (2016) 1–53. doi: 10.1128/microbiolspec.DMIH2-0013-2015.
- THÉRY, Clotilde; WITWER, Kenneth W.; AIKAWA, Elena; ALCARAZ, Maria Jose; ANDERSON, Johnathon D.; ANDRIANTSITOHAINA, Ramaroson; ANTONIOU, Anna; ARAB, Tanina; ARCHER, Fabienne; ATKIN-SMITH, Georgia K. - **Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines.** *Journal of Extracellular Vesicles*. 7:1 (2018) 1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.
- THÉRY, Clotilde; ZITVOGEL, Laurence; AMIGORENA, Sebastian - **Exosomes: Composition, biogenesis and function.** *Nature Reviews Immunology*. 2:8 (2002) 569–579. doi: 10.1038/nri855.
- TORO, Julieta DE; HERSCHLIK, Leticia; WALDNER, Claudia; MONGINI, Claudia - **Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: New insights for diagnosis and therapeutic applications.** *Frontiers in Immunology*.

6:MAY (2015) 1–12. doi: 10.3389/fimmu.2015.00203.

TWU, Olivia; JOHNSON, Patricia J. - **Parasite Extracellular Vesicles: Mediators of Intercellular Communication.** PLoS Pathogens. 10:8 (2014) 8–10. doi: 10.1371/journal.ppat.1004289.

TWU, Olivia; MIGUEL, Natalia DE; LUSTIG, Gila; STEVENS, Grant C.; VASHISHT, Ajay A.; WOHLSCHEGEL, James A.; JOHNSON, Patricia J. - **Trichomonas vaginalis Exosomes Deliver Cargo to Host Cells and Mediate Host:Parasite Interactions.** PLoS Pathogens. 9:7 (2013) 22–24. doi: 10.1371/journal.ppat.1003482.

VIQUE-SÁNCHEZ, José Luis; CARO-GÓMEZ, Luis Alberto; BRIEBA, Luis G.; BENÍTEZ-CARDOZA, Claudia G. - **Developing a new drug against trichomoniasis, new inhibitory compounds of the protein triosephosphate isomerase.** Parasitology International. 76 (2020). doi: 10.1016/j.parint.2020.102086.

VIVANCOS, V.; GONZÁLEZ-ALVAREZ, I.; BERMEJO, M.; GONZALEZ-ALVAREZ, M. - **Giardiasis: Characteristics, Pathogenesis and New Insights About Treatment.** Current Topics in Medicinal Chemistry. 18:15 (2018) 1287–1303. doi: 10.2174/1568026618666181002095314.

VUCETIC, Andrea; FILHO, Alonso Da Silva Lira; DONG, George; OLIVIER, Martin - Isolation of Extracellular Vesicles from Leishmania spp. Em MICHELS, PAUL A. M.; GINGER, MICHAEL L.; ZILBERSTEIN, DAN (Eds.) - **Trypanosomatids: Methods and Protocols.** New York, NY: Springer US, 2020 Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0294-2_33 ISBN 978-1-0716-0294-2. p. 555–574.

WANG, Yifei; YUAN, Wang; KIMBER, Michael; LU, Meng; DONG, Liang - **Rapid Differentiation of Host and Parasitic Exosome Vesicles Using Microfluidic Photonic Crystal Biosensor.** ACS Sensors. 3:9 (2018) 1616–1621. doi: 10.1021/acssensors.8b00360.

WHO - **Symptoms, diagnosis and treatment**, atual. 2016. [Consult. 23 jun. 2020]. Disponível em: https://www.who.int/trypanosomiasis_african/disease/diagnosis/en/

WHO - **Neglected tropical diseases**, atual. 2017. [Consult. 17 jun. 2020]. Disponível em: https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/

WHO - **World Malaria Report 2019** Disponível em: <https://www.who.int/publications-detail/world-malaria-report-2019> ISBN 978-92-4-156572-1.

- WHO - **Leishmaniasis**, atual. 2020. [Consult. 15 jun. 2020]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- WIKLANDER, Oscar P. B.; BRENNAN, Meadhbh; LÖTVALL, Jan; BREAKFIELD, Xandra O.; ANDALOUSSI, Samir E. L. - **Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles**. *Science Translational Medicine*. 11:492 (2019) 1–15. doi: 10.1126/scitranslmed.aav8521.
- WU, Zhenyu; WANG, Lingling; LI, Jiaying; WANG, Lifu; WU, Zhongdao; SUN, Xi - **Extracellular vesicle-mediated communication within host-parasite interactions**. *Frontiers in Immunology*. 10:JAN (2019) 1–16. doi: 10.3389/fimmu.2018.03066.
- YÁÑEZ-MÓ, María; SILJANDER, Pia R.; ANDREU, Zoraida; BEDINA, Apolonija; BORRÀS, Francesc E.; BUZAS, Edit I.; BUZAS, Krisztina; CASAL, Enriqueta; CAPPELLO, Francesco; CARVALHO, Joana; COLÁS, Eva; CORDEIRO-DA, Anabela - **Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions**. *Journal of Extracellular Vesicles*. 4:1 (2015). doi: 10.3402/jev.v4.27066.
- YAOYU, Feng; XIAO, Lihua - **Zoonotic potential and molecular epidemiology of Giardia species and giardiasis**. *Clinical Microbiology Reviews*. 24:1 (2011) 110–140. doi: 10.1128/CMR.00033-10.
- ZABOROWSKI, Mikołaj P.; BALAJ, Leonora; BREAKFIELD, Xandra O.; LAI, Charles P. - **Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study**. *BioScience*. 65:8 (2015) 783–797. doi: 10.1093/biosci/biv084.
- ZHANG, Wenchao; JIANG, Xiaofeng; BAO, Jinghui; WANG, Yi; LIU, Huixing; TANG, Lijun - **Exosomes in pathogen infections: A bridge to deliver molecules and link functions**. *Frontiers in Immunology*. 9:FEB (2018) 1–12. doi: 10.3389/fimmu.2018.00090.
- ZHANG, Yuan; LIU, Yunfeng; LIU, Haiying; TANG, Wai Ho - **Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential**. *Cell and Bioscience*. 9:1 (2019) 1–18. doi: 10.1186/s13578-019-0282-2.
- ZHOU, Xiaoxue; XIE, Feng; WANG, Lin; ZHANG, Long; ZHANG, Suping; FANG, Meiyu; ZHOU, Fangfang - **The function and clinical application of extracellular vesicles in innate immune regulation**. *Cellular and Molecular Immunology*. 17:4 (2020) 323–334. doi: 10.1038/s41423-020-0391-1.