



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Constança Pinto Cruz Bonito de Oliveira

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Exosomes as new therapeutic vectors for pancreatic cancer treatment” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Fátima Canedo, do Dr. André Paiva e da Professora Doutora Maria Teresa Rosete, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2020

Constança Pinto Cruz Bonito de Oliveira

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Exosomes as new therapeutic vectors for pancreatic cancer treatment” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Fátima Canedo, do Dr. André Paiva e da Professora Doutora Maria Teresa Rosete apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2020



1 2 9 0
UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Eu, Constança Pinto Cruz Bonito de Oliveira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2014197573, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Exosomes as new therapeutic vectors for pancreatic cancer treatment” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 2 de setembro de 2020.

Constança Pinto Cruz Bonito de Oliveira

(Constança Pinto Cruz Bonito de Oliveira)

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood.”

- Marie Curie

Agradecimentos

Aos meus pais, primeiramente e acima de tudo. Obrigada por me terem sempre proporcionado inúmeras oportunidades para que atingisse os meus objetivos, por me terem demonstrado amor incondicional e por me fazerem ver que somos do tamanho dos nossos sonhos.

Aos meus avós e à minha restante família, por terem sempre acreditado em mim e pelo enorme orgulho que sentem por mim.

Às novas amigas que se criaram e às amigas de sempre, porque não consigo imaginar este percurso sem cada um de vocês. Por terem estado sempre comigo, nas minhas vitórias e derrotas.

À minha distinta orientadora, à Professora Doutora Maria Teresa Rosete, por toda a disponibilidade demonstrada e por toda a transmissão de conhecimentos no decorrer da elaboração desta monografia. Obrigada por ter confiado em mim e por me ter feito acreditar que tudo é possível.

Ao Dr. André Paiva, à Dra. Ana Isabel Rebelo e à restante equipa da Farmácia Estádio. Obrigada por tudo o que me ensinaram e por me mostrarem o verdadeiro espírito de equipa e entreaajuda.

À Dra. Fátima Canedo, restante equipa da DGRM e ao INFARMED I.P., pela experiência enriquecedora e fundamental para o meu percurso profissional.

A Coimbra, cidade que me viu nascer e onde vivi os meus melhores anos académicos.

A todos, um muito obrigada. A profissional que serei no futuro, deve-se eternamente a vocês.

E para a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, não vai nada, nada, nada?
TUDO!

Índice

Parte I - Relatório de Estágio no INFARMED, I.P.

Lista de Abreviaturas	9
1. Nota Introdutória	10
2. INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.	11
2.1. A Direção de Gestão do Risco de Medicamentos (DGRM).....	11
3. A Farmacovigilância e a sua Importância	12
3.1. Gestão do Sinal e Sistema Nacional de Farmacovigilância - o portal RAM.....	13
3.2. Exemplo de Caso Prático.....	13
4. Análise SWOT	14
4.1. Pontos Fortes (<i>Strengths</i>).....	14
4.1.1. Responsabilidade, capacidade de iniciativa e comunicação, organização.....	14
4.1.2. Plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas: aplicação de conhecimentos adquiridos em unidades curriculares.....	15
4.1.3. Comunicação e contacto com as unidades de farmacovigilância do país.....	16
4.1.4. Equipa da DGRM e Multidisciplinaridade de equipas do INFARMED I.P.	16
4.1.5. Plano de Formação e Sessão de Boas Vindas aos estagiários.....	16
4.2. Pontos Fracos (<i>Weaknesses</i>).....	17
4.2.1. Duração do estágio.....	17
4.2.2. A utilização de ferramentas e Sistemas Informáticos.....	17
4.3. Oportunidades (<i>Opportunities</i>).....	18
4.3.1. Boletim de Farmacovigilância.....	18
4.3.2. Conhecimentos de inglês técnico-médico científico.....	18
4.3.3. Sessões de formação e palestras proporcionadas.....	18
4.3.4. Preparação para uma auditoria.....	19
4.3.5. Desenvolvimento de competências a nível informático.....	19
4.3.6. O portal RAM.....	20
4.4. Ameaças (<i>Threats</i>).....	20
4.4.1. Dificuldade de notificação por parte dos utilizadores do Portal RAM.....	20
4.4.2. Falta de formação das URF.....	20
4.4.3. A pandemia COVID-19.....	21
4.4.4. A falta de recursos humanos para a quantidade de trabalho existente.....	21
5. Considerações Finais	21
6. Bibliografia	23
7. Anexos	25

Parte II - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas	34
1. Nota Introdutória	35
2. A Farmácia Comunitária e a sua importância	35
3. A Farmácia Estádio® - Enquadramento	36
CASO CLÍNICO	37
4. Análise SWOT	37
4.1. Pontos Fortes (<i>Strengths</i>).....	38
4.1.1. Equipa técnica da Farmácia Estádio®.....	38
4.1.2. Heterogeneidade de utentes.....	38

4.1.3. Diversidade de funções desempenhadas.....	38
4.1.4. Aplicação de conhecimentos.....	39
4.2. Pontos Fracos (<i>Weaknesses</i>).....	39
4.2.1. Duração da fase de atendimento ao público e contacto com o público.....	39
4.2.2. Elevado número de estagiários.....	40
4.2.3. Diferenciação das cores das batas dos estagiários.....	40
4.3. Oportunidades (<i>Opportunities</i>).....	40
4.3.1. Preparação individualizada da medicação (PIM) e instalação da máquina de preparação da medicação.....	40
4.3.2. Gabinete do utente e a prestação de serviços farmacêuticos.....	41
4.3.3. Criação e adoção de novas estratégias em tempos de pandemia.....	41
4.3.4. Dispensa de medicamentos veterinários.....	42
4.4. Ameaças (<i>Threats</i>).....	42
4.4.1. Medicamentos esgotados (ex: Victan® 2 mg/ Serenal® 50 mg).....	42
4.4.2. Dificuldade na proximidade ao utente – COVID -19	42
4.4.3. Sazonalidade do estágio.....	43
4.4.4. Falta de formações das gamas e de produtos devido à pandemia.....	43
5. Considerações Finais.....	44
6. Bibliografia.....	45
7. Anexos.....	46
 Parte III – Monografia “Exosomes as new therapeutic vectors for pancreatic cancer treatment”	
Abstract.....	53
Resumo.....	54
List of Abbreviations.....	55
1. Introduction.....	57
2. Pancreatic Cancer.....	59
2.1. Physiopathology.....	59
2.2. Risk factors.....	60
2.3. Symptoms and diagnosis.....	61
2.3.1. Methods for screening.....	62
2.4. Traditional therapies and promising tailored treatment options.....	62
3. Exosomes.....	63
3.1. Definition and function of exosomes.....	63
3.2. Biogenesis of exosomes.....	64
3.3. Composition of exosomes.....	65
3.4. Exosomes intercellular communication.....	66
3.5. Potential of exosomes in disease treatment.....	67
4. Exosomes and Pancreatic Cancer.....	68
4.1. Exosomes as carriers for cancer therapy.....	68
4.1.1. Isolation and purification of exosomes.....	69
4.1.2. Incorporation of therapeutic agents into exosomes.....	70
4.1.2.1. Loading of molecules into cells.....	70
4.1.2.2. Loading of molecules into exosomes.....	70
4.2. Types of molecules that can be loaded into exosomes.....	71
5. Responses induced by therapeutical exosomes in Pancreatic Cancer.....	73

5.1. Immunomodulatory therapy.....	73
5.2. Intracellular signalling pthways interference.....	74
5.3. Tumour decreasing growth and antitumour effects.....	75
6. Future perspectives for Pancreatic Cancer treatment.....	77
7. References.....	78
8. Annexes.....	91

Parte I

Relatório de Estágio no INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.

Direção de Gestão do Risco de Medicamentos (DGRM)

Sob orientação da Dra. Fátima Canedo

Lista de Abreviaturas

AIM – Autorização de Introdução no Mercado

ATC – *Anatomical Therapeutic Chemical*

BO – *Backoffice*

COVID-19 – *Coronavirus Disease 2019*

DCI – Denominação Comum Internacional

DGRM – Direção de Gestão do Risco de Medicamentos

DHPC – *Direct Healthcare Professional Communication*

DME – *Designated Medical Event*

EMA – *European Medicines Agency*

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

FO – *Frontoffice*

GVP – *Good Pharmacovigilance Practices*

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

MedDRA – *Medical Dictionary for Regulatory Activities*

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MMR – Medidas de Minimização do Risco

OMS – Organização Mundial de Saúde

PGR – Plano de Gestão de Risco

RAM – Reação Adversa a Medicamento

RPS – Relatórios Periódicos de Segurança

SNF – Sistema Nacional de Farmacovigilância

SNS – Serviço Nacional de Saúde

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

URF – Unidade Regional de Farmacovigilância

I. Nota Introdutória

O culminar da conclusão do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), pela faculdade de farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), passa obrigatoriamente pela realização de um período de estágio curricular. A todos os finalistas, é dada a possibilidade de realização de estágios adicionais, para além do estágio em farmácia comunitária, indispensável ao término do curso.

Assim sendo, desde o dia 6 de janeiro até ao dia 11 de março de 2020, foi-me possibilitado estagiar na Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P., abreviadamente denominado de INFARMED, I.P. Durante estes cerca de dois meses, integrei a equipa de Gestão do Sistema Nacional de Farmacovigilância e Gestão do sinal, incluída na Direção de Gestão do Risco de Medicamentos (DGRM), sob a orientação da Dra. Fátima Canedo e respetiva equipa de trabalho.

Como aluna do último ano e estudante prestes a entrar no mercado de trabalho, creio que esta opção que nos é proporcionada é uma mais-valia em diversos níveis, nomeadamente, a nível pessoal e profissional, tornando-nos profissionais técnico-cientificamente mais competentes.

Ao longo destes meses, foram-me claramente proporcionadas diversas oportunidades e elevados níveis de aprendizagem, tanto nacionais como internacionais. E foi, sobretudo essencial, compreender e analisar a dinâmica interna de um instituto público de tamanha dimensão.

A realização destes estágios é o primeiro contacto que temos com uma parte mais profissional e prática da nossa área, o que por vezes pode ser assustador e desafiante. No entanto, ter feito parte desta prestigiada instituição e ter tido o apoio dos seus colaboradores, fez-me sentir muito mais segura e estou consciente de que adquiri todas as bases necessárias para o futuro que se seguirá.

O exposto relatório compreende uma apreciação crítica desta experiência profissional e atividades desenvolvidas no decurso do processo, reservando e preservando o código de conduta, atualmente em vigor, em anexo na Deliberação n.º 1141/2018 (I), respeitando o sigilo e a confidencialidade do mesmo.

Irei começar por fazer um breve enquadramento do INFARMED, I.P. e respetiva DGRM, bem como a sua interligação com a farmacovigilância; seguidamente farei uma apreciação crítica do estágio através de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*) e por fim, terminarei expressando algumas conclusões e opiniões, a reter acerca da realização deste estágio.

2. INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.

Em 1993, foi fundado sob o nome de Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento.

Em 2006, o Infarmed passou a designar-se de Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P., conjuntamente com grandes mudanças no estatuto do medicamento (2).

A sua principal missão é a “promoção da saúde pública” garantindo a segurança, qualidade e eficácia de medicamentos e produtos de saúde. Segundo o 1º e 2º artigo do Decreto-Lei n.º 46/2012 de 24 de fevereiro, este é designado como um *“instituto público, (...), integrado na administração indireta do Estado, dotado de autonomia administrativa, financeira e património próprio; prossegue as atribuições do Ministério da Saúde, sob superintendência e tutela do respetivo ministro, (...) com jurisdição sobre todo o território nacional”* (3).

A equipa dirigente é formada por um conselho diretivo (representada por um presidente, um vice-presidente e um vogal), quatro órgãos consultivos, oito direções com funções de negócio (onde se enquadra a DGRM) e, três outras estruturas com funções de suporte - como esquematizado em organograma, no Anexo I (4).

As atividades do Infarmed podem ser agrupadas nas principais áreas de atuação: na gestão de informação e comunicação, gestão de medicamentos, gestão de produtos de saúde, licenciamento de entidades, vigilância e supervisão, inspeção e controlo de qualidade, e monitorização de mercado. Sendo pontos fulcrais, a avaliação técnico-científica, a avaliação económica e participações, bem como a comprovação da qualidade (5).

2.1. A Direção de Gestão do Risco de Medicamentos (DGRM)

A DGRM é uma das unidades orgânicas com função de negócio, pertencente ao Infarmed, e cuja coordenação é assegurada pela Dra. Fátima Canedo.

As suas principais funções correspondem à coordenação e funcionamento do SNF, gestão de sistemas de alertas da União Europeia, monitorização de segurança dos medicamentos, promoção e realização de estudos epidemiológicos, coordenação de unidades de farmacovigilância nacionais, colaboração com entidades internacionais e nacionais, divulgação de informação, aconselhamento, entre outras. Estas funções encontram-se descritas detalhadamente no Anexo II, correspondente ao artigo 4º, do anexo da Portaria n.º 306/2015 de 23 de setembro, respetivo aos Estatutos (6).

Esta direção encontra-se, do ponto de vista funcional, dividida, em duas equipas: a equipa de Gestão do Sistema Nacional de Farmacovigilância (SNF) e gestão do sinal; e a equipa de Gestão de Risco e Implementação de Medidas de Minimização do Risco (MMR).

A equipa de Gestão do Risco e Implementação de MMR trabalha principalmente com materiais educacionais, comunicações dirigidas aos profissionais de saúde (DHPC), planos de gestão do risco (PGR) e relatórios periódicos de segurança (RPS). A equipa de Gestão do SNF e gestão do sinal, foca-se essencialmente nas notificações de reações adversas medicamentosas (essencialmente através do Portal RAM), comunica com as unidades regionais de farmacovigilância, identifica erros de processo e pede esclarecimentos de certas notificações, identifica e gere potenciais sinais, e elabora circulares informativas.

A primeira semana de formação passou pela apresentação de ambas equipas e do trabalho realizado por estas, bem como o contacto com o sistema de controlo de qualidade, e legislação e regulamentação em farmacovigilância, nomeadamente através das *Boas Práticas em Farmacovigilância (GVP)*.

Ambas as equipas, não obstante o facto de desempenharem funções diferentes, trabalham em conjunto, continuamente e sempre em dinâmica conjunta.

A equipa da qual fiz parte, corresponde à equipa de Gestão do SNF e gestão do sinal e por isso, no corrente relatório de estágio, focar-me-ei sobretudo no SNF e portal RAM.

O plano de formação do estágio curricular especifica os principais temas abordados no decorrer da primeira semana, de formação teórica, e apresenta-se no Anexo III.

3. A Farmacovigilância e a sua importância

Como é sabido, os medicamentos não são isentos de risco.

Relações causais entre o cloranfenicol e anemia aplásica nos anos 50, ou marcos históricos como o grande “desastre da Talidomida” em 1961, levaram a que em 1963, a Farmacovigilância passasse a ser reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como “*uma prioridade para a saúde no Mundo*” (7).

A farmacovigilância compreende uma área fundamental associada ao medicamento, uma vez que visa garantir a sua segurança e a dos que todos, com ele contactam. Tem como pilares o levantamento e gestão de sinais e a partilha de informação por todos os utentes, titulares de AIM ou profissionais de saúde - com base a manter uma permanente atualização dos dados e informações provenientes de diversificadas fontes.

O termo foi pela primeira vez descrito em 1966 pelo Centro de Farmacovigilância da OMS como, “*a notificação, o registo e a avaliação sistemática das reações adversas aos medicamentos dispensados com ou sem prescrição*” (2). No entanto, em 1972 esta definição foi alargada a “*toda a atividade tendente a obter indicações sistemáticas sobre os laços de causalidade provável*”

entre medicamentos e reações adversas numa população”. (7) É importante notar que esta definição inclui também estudos farmacoepidemiológicos.

Quando um novo medicamento é introduzido no mercado, é essencial gerir o risco e a segurança deste, em contexto real após a sua comercialização. Isto porque, muitas vezes, os estudos feitos pré comercialização não são suficientes, porque a população estudada não é suficiente nem diversificada o suficiente e assim, a farmacovigilância, revela-se particularmente importante estudando a sua segurança a longo prazo.

3.1. Gestão do Sinal e Sistema Nacional de Farmacovigilância - o portal RAM

Em Portugal, o SNF foi criado em 1992 e é atualmente um sistema “de carácter descentralizado e de notificação obrigatória” para titulares de AIM e profissionais de saúde; apresentando-se como um sistema maduro, robusto e eficiente, que opera entre várias unidades tais como, o Infarmed, as URF e a EMA (7).

Em 1999 houve a primeira reorganização deste sistema, em unidades regionais de farmacovigilância e em 2017, reorganizou-se novamente nas atuais unidades regionais. Atualmente é formado por nove URF: Guimarães, Porto, Coimbra, Beira Interior, Lisboa, Setúbal e Santarém, Algarve e Alentejo, Açores e Madeira.

Este SNF recebe notificações, sendo que estas podem ser recebidas por via indireta (titulares de AIM) ou via direta (profissionais de saúde e utentes); via *frontoffice* (notificadas diretamente no Portal RAM) ou *backoffice* (recebidas via fax ou e-mail, entre outros).

A notificação de RAM é essencial para um seguimento e monitorização da segurança de um determinado medicamento. É notório o crescimento das notificações rececionadas no SNF entre 2012 e 2020, através do Anexo IV (8); no entanto, podemos verificar que apesar desta evolução, estas ainda são notificadas maioritariamente pela indústria (nomeadamente titulares de AIM) e médicos, e não tanto por farmacêuticos.

3.2. Exemplo de Caso Prático

- **Monitorização de qualidade de casos DME, com avaliação da conformidade de diferentes parâmetros**

A primeira etapa consistiu no “download” (através do portal RAM) de uma lista de casos (das diferentes URF do país) que incluíam o termo *designated medical event* (DME) dos meses de dezembro, janeiro e fevereiro. Estes casos poderiam ser notificações recebidas via *backoffice* (BO) ou *frontoffice* (FO).

A minha função consistiu em analisar individualmente cada um desses casos, inserir o número do caso (num ficheiro *Excel* previamente preparado), diferenciados pelas correspondentes unidades de farmacovigilância, e verificar se parâmetros (tais como, por exemplo: “data de início de toma do medicamento”, “indicação terapêutica” “data de início e fim da reação adversa”, entre outros) estavam conforme, não conforme ou não aplicável (N/A).

Após a análise da conformidade, tendo em conta os erros de processamento ou pedidos de esclarecimento, era minha função contactar as unidades (geralmente por *e-mail* e sempre com o conhecimento de superiores), e informá-las / questioná-las acerca dos mesmos para que pudessem proceder à correção ou realizar o *follow-up*, na plataforma Portal RAM. Ficando sempre tudo registado.

4. Análise SWOT

Doravante irei expor uma apreciação crítica do meu estágio curricular, através de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*), tendo em conta fatores externos que se revelaram como ameaças ou como oportunidades. Por outro lado, tendo em conta fatores internos, são analisados pontos fortes ou fracos, que ajudaram ou dificultaram, respetivamente, o meu trabalho no decorrer do estágio.

4.1. Pontos Fortes (Strengths)

4.1.1. Responsabilidade, capacidade de iniciativa e comunicação, organização

Os primeiros pontos fortes correspondentes à dimensão interna deste estágio, foram as minhas capacidades cognitivas, das quais saliento as mencionadas acima.

As palavras responsabilidade e organização estiveram desde o primeiro dia bem presente em todas as tarefas que realizei no INFARMED, I.P. No entanto, saliento duas das quais, requereram toda a minha máxima atenção: a monitorização de casos do portal RAM e a revisão e atualização do “*Manual do Utilizador do Portal RAM*”. Nestas duas tarefas manifestada confiança na minha capacidade de trabalho sendo que, qualquer erro seria responsabilidade minha e poderia originar consequências para terceiros.

Saliento também a minha capacidade de iniciativa e comunicação uma vez que, desde o início me senti empolgada e esperançosa de poder participar ativamente nas atividades do departamento; inclusive, sempre ambicionei escrever um artigo ou desenvolver um *poster*,

que se relacionasse com a farmacovigilância. Assim sendo, sugerimos escrever um artigo para o Boletim de Farmacovigilância (Anexo V), que mais tarde se veio a concretizar (9).

4.1.2. Plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas: aplicação de conhecimentos adquiridos em unidades curriculares

Um dos maiores elogios que tenho a fazer à FFUC, é o seu plano de estudos do curso do MICF, sobretudo das unidades curriculares do último ano.

Como finalistas e futuras pessoas a ingressar no mercado de trabalho (e sabendo que este é bastante concorrido), qualquer valência e conhecimentos adicionais, são mais-valias na nossa formação.

Ao longo do meu estágio, deparei-me inúmeras vezes com diversos temas abordados ao longo dos últimos cinco anos e que não me eram estranhos e com os quais não estava contactar pela primeira vez.

Por exemplo, durante o meu estágio na DGRM abordamos alterações que poderiam vir a ser regulamentadas na área da farmacovigilância (nomeadamente reações adversas que poderiam surgir) tendo em conta a utilização da *cannabis* para fins terapêuticos. Unidades curriculares como Fitoterapia ou Plantas medicinais abordaram várias vezes este tema, bem como interações planta-medicamento.

Outros exemplos foram as unidades curriculares de Indicação Farmacêutica ou as diversas Farmacologias, na introdução de DCIs (denominação comum internacional) de substâncias ativas, e a classificação de ATCs (*Anatomical Therapeutic Chemical*) de medicamentos suspeitos de reações adversas. A plataforma INFOMED, neste caso específico, foi utilizada diariamente ao longo do meu estágio, sendo que já me encontrava bastante familiarizada com a mesma, devido à incentivação da sua utilização, durante todo o curso. Devido ao conhecimento e familiarização com as classes farmacoterapêuticas dos medicamentos e substâncias ativas, esta atividade diária tornou-se muito mais fácil e menos exigente.

Também a unidade curricular de Biotecnologia, foi essencial na compreensão de conceitos de palestras que nos foram concedidas.

Por último, a mais importante e a base de todo o meu estágio, a unidade curricular de Farmacovigilância e Farmacoepidemiologia. Esta unidade curricular potenciou-me um maior entendimento e compreensão de todo o estágio e de todo o trabalho desenvolvido por uma unidade de Farmacovigilância, bem como os seus conceitos teóricos que puderam ser aplicados na prática.

4.1.3. Comunicação e contacto com as unidades de farmacovigilância do país

Durante o meu estágio, foi frequente a troca de *e-mails*, pedindo esclarecimentos ou informando as diferentes URF, na resolução de questões práticas.

Este contacto, exigiu uma maior formalidade na minha eloquência e discurso, que considero que sejam um ponto forte meu. Portanto, esta tarefa veio colmatar algumas lacunas que pudessem existir e fornecer-me capacidades de comunicação adicionais em termos de rigor e profissionalismo que considero que serão importantes para o meu futuro profissional.

4.1.4. Equipa da DGRM e Multidisciplinaridade de equipas do INFARMED I.P.

A equipa da DGRM e a ligação entre os diversos departamentos do INFARMED, I.P., proporcionaram-me melhorias e vantagens, no decurso do meu estágio.

Foi notória a multidisciplinaridade nas várias equipas que constituem este instituto público, todas elas trabalhando em colaboração e em prol do funcionamento exemplar e da reputação da instituição.

O bom ambiente proporcionado por todos, foi vantajoso e isso influenciou o meu trabalho, na medida em que sempre senti que podia fazer questões ou apresentar sugestões. Também a equipa que trabalhou comigo, no meu departamento, mostrou-se sempre muito recetiva a ajudar quando necessário, a esclarecer dúvidas que surgissem e a ajudar-me na realização do meu trabalho.

4.1.5. Plano de Formação e Sessão de Boas Vindas aos estagiários

Outro ponto forte que saliento foi a receção e integração dos estagiários no primeiro dia de apresentação. Esta apresentação foi bastante informativa e possibilitou-nos ter um conhecimento geral acerca de como seriam os próximos meses; forneceu-nos informações do funcionamento interno do INFARMED, I.P., códigos de conduta, regulamentos e documentos institucionais, motores de busca internos, funcionamento da rede interna (*Intranet*) e divisão das suas instalações e setores.

O plano de formação da primeira semana de estágio na DGRM, que se encontra anexado, apresentou-se muito diversificado e muito enriquecedor; encontrava-se bastante organizado e reestruturado. Durante esta primeira semana, foram-nos fornecidas diversas sessões teóricas onde foi possível aprender novos conceitos e relembrar outros já existentes. Estas sessões depressa se revelaram bastante úteis e fundamentais, na realização de diversas tarefas do estágio, pois todos os conceitos se interligavam e o acompanhamento de todo o trabalho desenvolvido, ficou mais facilitado.

4.2. Pontos Fracos (*Weaknesses*)

4.2.1. Duração do estágio

Um dos pontos fracos deste estágio, na minha opinião foi a sua duração.

O estágio geralmente apresenta uma duração máxima de três meses, sendo que este ano, devido à pandemia COVID-19, este terminou ainda mais cedo. Esta decisão foi fundamentada, tendo em conta o bem de todos e a máxima de saúde pública.

No entanto, esta duração é relativamente curta tendo em conta o trabalho pedido e a qualidade das tarefas desempenhadas. Isto porque, é necessária uma fase de adaptação inicial, para nos adaptarmos aos *softwares* informáticos, à dinâmica de grupo, ao seguimento de normas na realização de processos, entre outros. Assim sendo, é pelo menos necessário um mês de adaptação, restando dois meses para a realização das tarefas; apesar de dois meses parecerem bastante tempo, muitos processos e tarefas existem espaços temporais longos e necessitam de uma continuidade ao longo do tempo.

Concluindo, devido à pouca duração do estágio, muitas vezes acabamos por realizar as mesmas tarefas, faltando tempo para incluir outras novas.

Outro aspeto apontado é o facto que, devido aos processos serem bastante prolongados e demorados (que aconteceu no meu caso), as tarefas realizadas pelos estagiários acabarem por ficar incompletas.

4.2.2. A utilização de ferramentas e Sistemas Informáticos

Uma das dificuldades com as quais me deparei no decorrer do estágio, foi a minha falta de capacidade de trabalho com ferramentas e sistemas informáticos.

Isto porque, durante a minha vida académica, sempre trabalhei muito com o *Microsoft Power Point* e *Word*, e pouco, por exemplo, com o *Microsoft Excel*. Como é sabido e de esperar, as grandes instituições utilizam muito esta última aplicação, seja para fazer listagens, cálculos, reorganização pastas, entre outros.

Para além disto, também são bastante utilizadas diversas ferramentas informáticas, de suporte ao trabalho, com o objetivo de o tornar mais simples e rápido. Também a rede interna do sistema operativo do INFARMED, I.P. – *Intranet* – foi uma novidade e necessitou de algum tempo e atenção para adaptação às suas diversas utilidades.

Não obstante, apesar de saber que este era um ponto fraco, que dizia respeito a mim e à minha preparação; todos os colaboradores se mostraram sempre muito disponíveis e atenciosos, sempre prontos a ajudar e sugerir dicas na utilização destes sistemas. Assim

sendo, este ponto fraco tornou-se mais tarde numa oportunidade para melhorar estas capacidades que considero serem competências adicionais nas quais me posso procurar envolver mais, a fim de me ajudar no meu futuro profissional.

4.3. Oportunidades (Opportunities)

4.3.1. Boletim de Farmacovigilância

A maior oportunidade que me foi fornecida no decorrer do estágio, foi a possibilidade de escrever um artigo para o Boletim da Farmacovigilância, da edição de janeiro 2020 (Anexo V), acerca das “Novas Recomendações de utilização do tofacitinib (Xeljanz®)” (9).

O boletim de farmacovigilância é publicado desde 1997, inicialmente com uma frequência trimestral e mensalmente desde 2017. Este boletim contém publicações sobre efeitos adversos dos medicamentos autorizados a nível nacional ou europeu, bem como alertas de segurança.

4.3.2. Conhecimentos de inglês técnico-médico científico

Ao longo do estágio, pude aperfeiçoar os meus conhecimentos de inglês, mais especificamente o inglês técnico-médico científico.

Por exemplo, através de efeitos adversos reportados em inglês ou termos médicos próprios, associados ao dicionário MedDRA, que geralmente eram reportados por titulares de AIM. Esta foi sem dúvida uma excelente oportunidade para completar o meu vocabulário nesta área, tendo em conta que ao longo do curso, não contactei o suficiente com estes termos.

4.3.3. Sessões de formação e palestras proporcionadas

Tive o privilégio de poder assistir a sessões de formação e palestras das quais saliento as seguintes: oportunidade de assistir a uma sessão de formação para médicos do internato em Saúde Pública (onde as diferentes áreas do INFARMED, I.P. foram explicadas e onde se debateram temas muito atuais de saúde pública, tais como a atual pandemia COVID-19 ou o desenvolvimento de estudos económicos na área da farmacoeconomia).

Outra grande possibilidade que me foi fornecida, foi assistir à comemoração do vigésimo sétimo aniversário do INFARMED, I.P., realizado no dia 15 de janeiro, e onde foram apresentadas duas palestras informativas por 2 conceituados investigadores, com os temas “Medicina de Precisão e Novas Terapêuticas: Que Desafios?” e “A Inteligência Artificial Pode Ajudar a Medicina?” (Anexo VI) (10). Palestras muito interessantes sobre assuntos já tratados

previamente ao longo do curso, especialmente neste último ano, na cadeira de Biotecnologia.

4.3.4. Preparação para uma auditoria

No decurso do estágio, foi-me dada a possibilidade de verificar como é feita uma auditoria (neste caso externa) e qual o seu processo de preparação pelas respetivas equipas. Esta foi uma experiência nova e bastante diferente que certamente se revelará essencial uma vez que, durante as carreiras profissionais é frequente realizarem-se auditorias aos colaboradores e às respetivas unidades/direções.

4.3.5. Desenvolvimento das competências a nível informático

Uma das oportunidades que me foi oferecida durante o meu estágio, foi a possibilidade de lidar diariamente com sistemas e ferramentas informáticas. Inicialmente, isto constituía uma ameaça uma vez que, tinha tido muito pouco, ou quase nenhum contacto com grandes bases de dados e registos. No entanto, durante o meu percurso acabou por se revelar uma vantagem.

Foi-me possibilitado desenvolver competências na área do *Microsoft Office Word, PowerPoint* (por exemplo, para a realização de uma apresentação para uma sessão de manhã informativa) e *Excel* (onde trabalhei mais através de listagens e análises de dados; e sobretudo, onde passei a descobrir a existência de inúmeras funcionalidades até então, desconhecidas).

A rede interna do INFARMED, I.P. é a *Intranet* e o envio e receção de *e-mails* é realizado através do *Outlook* (aplicação que uso pouco no meu dia-a-dia). Através da *Intranet*, aprendi a reportar erros técnicos e a pedir suporte à equipa informática, sempre que preciso; por exemplo, quando necessitava de autorização para aceder a notificações do Portal RAM. O *Outlook* apresentava-se como uma ferramenta para comunicação de *e-mails* internos ou externos (por exemplo, com unidades regionais de farmacovigilância), funcionando através de sistemas de cores específicos para cada unidade e cada colaborador, tornando a gestão de *e-mails* pela equipa, mais fácil.

Considero assim, que para além do INFARMED, I.P., tantas outras instituições, companhias e empresas farmacêuticas, utilizam estas mesmas ferramentas, dando-me assim um conhecimento prévio (que pode ser visto como uma vantagem) em futuras funções que vier a desempenhar.

4.3.6. O portal RAM

O portal RAM possibilitou-me entrar em contacto com formulários “online” para notificação de reações adversas por profissionais de saúde (11) e utentes (12), respetivamente, e perceber que a linguagem utilizada é diferente, adequando-se aos conhecimentos científicos de cada um (Anexo VII).

Para além disto, enquanto futura profissional de saúde e agente de saúde pública este contacto com o Portal RAM foi fundamental para no futuro, proceder a notificações de RAM de que tenha conhecimento e também sensibilizar a população e profissionais de saúde para a importância de notificar RAM. No Anexo VIII, é possível observar a infografia referente ao Portal RAM (13).

4.4. Ameaças (*Threats*)

4.4.1. Dificuldade de notificação por parte dos utilizadores do Portal RAM

Sem dúvida que a falta de formação e conhecimento na notificação de RAM por parte de profissionais de saúde, utentes e indústria, foram uma ameaça ao longo do meu estágio. Isto porque, foram constantes os erros na execução e lacunas por preencher. Muitas vezes eram notificados efeitos indesejáveis associados a suplementos ou pastas de dentes, (sem princípio ativo medicamentoso), sendo que o Portal RAM serve apenas para a notificação de medicamentos ou substâncias ativas.

Através destes erros, foi notória a falta de formação prévia de médicos ou utentes, na utilização deste portal.

4.4.2. Falta de formação das URF

O mesmo aconteceu com as unidades regionais de farmacovigilância.

Na análise da monitorização de qualidade de casos DME das respetivas unidades de farmacovigilância, notei que eram sistematicamente realizados os mesmos erros no preenchimento de parâmetros no portal RAM. Isto refletiu-se numa constante troca e receção de *e-mails* para as unidades, com envio de pedidos de esclarecimento e notificação de erros de processamento; fazendo com que, este processo se tornasse mais demoroso e difícil do que era esperado. Assim sendo, muitas vezes este ficou comprometido e nos piores cenários, mesmo inacabado.

4.4.3. A pandemia COVID-19

A pandemia COVID-19 foi claramente a maior ameaça no decorrer do estágio.

Isto porque, me impossibilitou de acabar o estágio no tempo previsto e porque me impossibilitou de aprender mais e por em prática outros conhecimentos (por exemplo, o adiamento da visita aos laboratórios do INFARMED I.P.).

Impossibilitou ainda a conclusão de trabalhos que já tinha iniciado.

4.4.4. A falta de recursos humanos para a quantidade de trabalho existente

A última ameaça encontrada, foi por fim, a falta de recursos humanos na DGRM para assegurar a finalização do meu trabalho.

Apesar de toda a equipa se ter mostrado sempre muito disponível para ajudar e esclarecer dúvidas, a finalização do meu trabalho dependia sempre da supervisão e aprovação prévia pela restante equipa. Tendo em conta que todos os colaboradores da DGRM têm um constante e elevado fluxo de trabalho, nem sempre era possível estar, constantemente e no prazo estabelecido, a confirmar o trabalho realizado por mim. Por isso, por vezes, tornou-se difícil a finalização do meu trabalho, uma vez que não dependia de mim o seu progresso e conclusão

No entanto, considero que esta ameaça tenha contribuído para o meu desenvolvimento pessoal, pois aprendi a ser mais autónoma e a gerir melhor o meu tempo.

5. Considerações Finais

O objeto de análise curricular correspondeu a cerca de dois meses de intensa aprendizagem, e foi sem dúvida uma experiência marcante no meu percurso académico e profissional.

Esta oportunidade revelou-se extremamente enriquecedora pois tive o privilégio de contactar com inúmeros profissionais extremamente competentes, melhorar as minhas capacidades de trabalho em equipa e com maior capacidade de gestão de tempo e de problemas. Aprendi a ser mais responsável e maximizei os meus conhecimentos a nível farmacêutico e, sobretudo, na área da farmacovigilância.

Graças a este estágio, adquiri uma visão muito mais abrangente acerca da importância do setor farmacêutico e a sua relação com o Serviço Nacional de Saúde (SNS), bem como com entidades internacionais tais como a Agência Europeia do Medicamento (EMA). Considero que hoje em dia, como futura profissional de saúde, procuro manter-me constantemente

atualizada através de fontes fidedignas e procuro dar o meu contributo com todas as valências que adquiri.

Relativamente à área da farmacovigilância, esta é claramente fundamental e indispensável. Isto porque, após a permanência de medicamentos no mercado, por vários anos, novos sinais e alertas de reações adversas podem ser gerados. Tendo em conta isto, trabalham em conjunto diversos profissionais e sistemas de farmacovigilância, nacionais e internacionais. A cooperação e partilha de informação são claramente as bases do sucesso de uma excelente coordenação e segurança de todos.

Assim sendo, neste estágio, foi-me permitido contactar com maior proximidade com esta realidade. Aqui, fiquei a conhecer procedimentos de farmacovigilância e a saber informar acerca da utilização do portal RAM; aprendi qual o papel exercido diariamente por um profissional de farmacovigilância; quais os processos pelos quais deve passar uma notificação (a partir do momento em que é recebida) e também, como se devem prevenir e minimizar os riscos.

Por fim, considero que este estágio foi claramente desafiante e colocou à prova as minhas capacidades e conhecimentos, práticos e teóricos. Porém posso afirmar que me sinto extremamente honrada e agradecida pela oportunidade dada, sentindo-me bem preparada para o meu futuro profissional, bem como, claramente curiosa!

6. Bibliografia

1. SAÚDE – INFARMED, I.P. – **Código de Conduta do INFARMED, I.P.** Deliberação n.º 1141/2018. Diário da República N.º 199/2018, Série II de 2018-10-16, p. 27694–27698.
2. INFARMED, I. P. – **Cronologia.** [Acedido a 18 de abril 2020]. Disponível em: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed//cronologia>
3. MINISTÉRIO DA SAÚDE – **Decreto-Lei n.º 46/2012.** Diário da República n.º 40/2012, Série I de 2012-02-24, p. 884–890.
4. INFARMED, I. P. – **Organograma do INFARMED, I. P.** Lisboa: Parque de Saúde de Lisboa, 2020 [Acedido a 15 de abril 2020]. Disponível em: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/1269448/Organograma+2019/c8343cd0-df7f-490c-84ef-15db7d43dfc2>
5. MINISTÉRIO DA SAÚDE – **Decreto-Lei n.º 97/2015.** Diário da República N.º 105/2015, Série I de 2015-06-01, p. 3453–3464.
6. MINISTÉRIOS DAS FINANÇAS E DA SAÚDE – **Portaria n.º 306/2015.** Diário da República N.º 186/2015, Série I de 2015-09-23, p. 8433–8439.
7. **FARMACOVIGILÂNCIA EM PORTUGAL: 25 ANOS** / ed. Sofia de Oliveira Martins. - [Lisboa]: INFARMED, D.L. 2018. - ISBN 978-989-8369-16-1 .
8. INFARMED, I. P. – **Desempenho do SNF desde 2012 (via direta e indireta).** [Acedido a 20 de abril 2020]. Disponível em: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/farmacovigilancia/desempenho-do-snf>
9. INFARMED, I. P. – **Boletim de Farmacovigilância: Tofacitinib (Xeljanz®) novas recomendações de utilização.** [Em linha]. [Acedido a 16 de abril 2020]. Disponível em: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/3591914/Boletim+de+Farmacovigil%C3%A2ncia/f725ecc3-0e8e-06f4-aa2d-3fe2ffe1d7bf?version=1.1>
10. INFARMED, I. P. – **Programa 27º Aniversário INFARMED , I.P.** [Acedido a 24 de abril 2020]. Disponível em: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/3506453/Programa+do+27%C2%BAAivers%C3%A1rio+do+Infarmed/09eef1f9-b352-ccb1-1177-26f81f74abb7>
11. INFARMED, I. P. – **Ficha de Notificação para Profissionais de Saúde.** [Acedido a 17 de abril 2020]. Disponível em: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/2367458/Ficha+Notifica%C3%A7%C3%A3o+PS/dd08e7a3-a3cd-b048-701e-4a1a01e19df5>

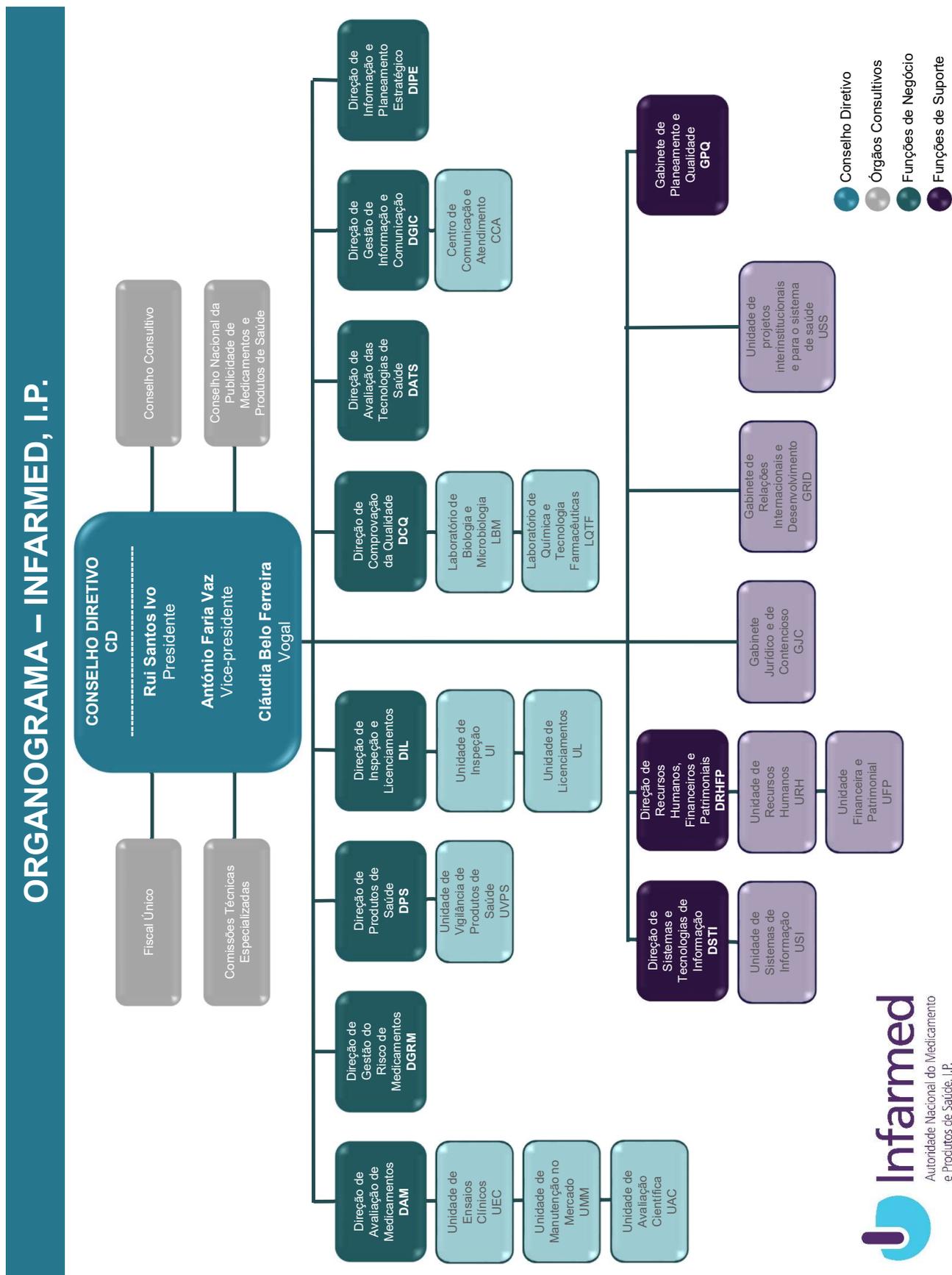
12. INFARMED, I. P. – **Ficha de Notificação para Utentes.** [Acedido a 17 de abril 2020]. Disponível em: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/2367458/Ficha+Notifica%C3%A7%C3%A3o+Utente/fba9d669-89ae-601f-af4c-aabd3bd90d47>

13. INFARMED, I. P. – **Novo portal RAM - Infografia.** [Acedido a 17 de abril 2020]. Disponível em: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/1410451/Novo%2bPortal%2bRAM%2b-%2bInfografia/2886d0e4-5084-4240-8266-d67ae97f05f4>

7. Anexos

- Anexo I

Organograma do INFARMED I.P.



- **Anexo II**

Funções da DGRM

Artigo 4.º

Direção de Gestão do Risco de Medicamentos

À Direção de Gestão do Risco de Medicamentos, abreviadamente designada por DGRM, compete:

a) Assegurar a coordenação e funcionamento do Sistema Nacional de Farmacovigilância de Medicamentos de Uso Humano, designadamente no que respeita à recolha, avaliação e divulgação da informação sobre as suspeitas de reações adversas dos medicamentos, à análise de relações de causalidade entre medicamentos e reações adversas e à identificação precoce de problemas de segurança com a utilização de medicamentos, bem como a vigilância de ensaios clínicos, através da colheita, registo e avaliação dos acontecimentos adversos ocorridos durante os mesmos;

b) Gerir o sistema de alertas de farmacovigilância da União Europeia e assegurar a participação no programa de monitorização de medicamentos da Organização Mundial de Saúde (OMS);

c) Assegurar a monitorização de segurança dos medicamentos, através dos planos de gestão de risco, bem como emitir pareceres sobre esses planos;

d) Promover e realizar estudos epidemiológicos, propor e implementar medidas de segurança e elaborar relatórios de benefício-risco;

e) Coordenar as atividades das unidades de farmacovigilância que integram o Sistema Nacional de Farmacovigilância;

f) Colaborar com outras entidades nacionais e internacionais na promoção e realização de estudos na área da epidemiologia do medicamento;

g) Assegurar a divulgação de informação de segurança para os profissionais de saúde e para o público em geral, bem como a elaboração de normas e orientações destinadas aos utilizadores dos serviços do INFARMED, I. P., no âmbito das suas atribuições;

h) Assegurar a articulação com a comissão de avaliação de medicamentos em matéria de farmacovigilância, salvo no que respeita aos relatórios periódicos de segurança;

i) Colaborar nas atividades de aconselhamento regulamentar e científico;

j) Assegurar a articulação com os sistemas de informação nacionais e europeus no âmbito das suas competências;

k) Assegurar a representação a nível nacional e internacional do INFARMED, I. P., no âmbito das suas atribuições, nomeadamente com o grupo de farmacovigilância da EMA — Agência Europeia de Medicamentos e com os centros de farmacovigilância de outras agências do medicamento.

- **Anexo III**

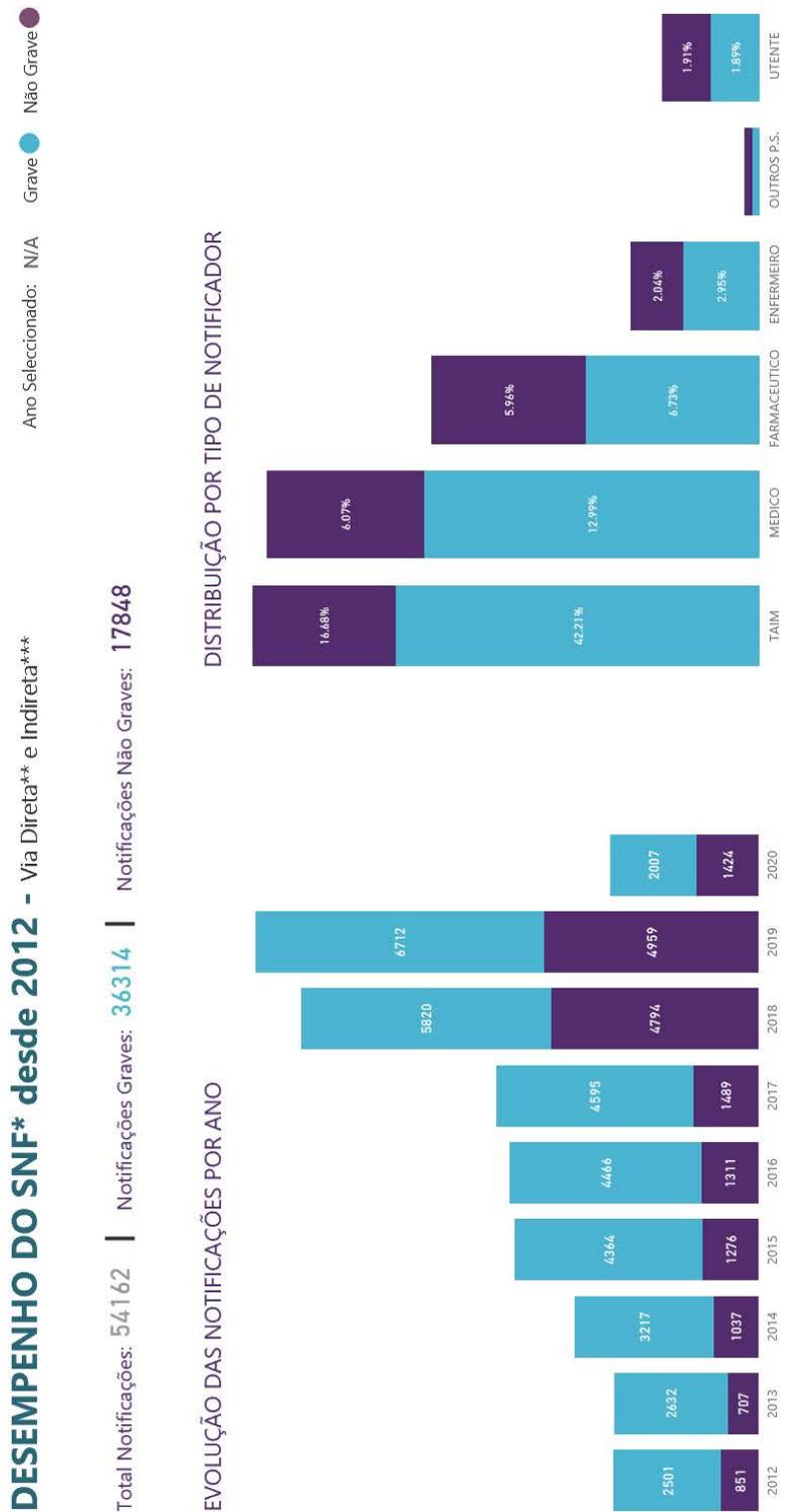
Plano de Formação Inicial

FORMAÇÃO INICIAL – 06/01/2020 – 31/03/2020
Constança Oliveira

COMPONENTE TEÓRICA				
Área de Formação	Formador	Data/Período		Rubrica do formador
GERAL				
Acolhimento e apresentação do Serviço	Fátima Canedo	06/01	Tarde	<i>[Handwritten Signature]</i>
Regulamentação e legislação	Fátima Canedo	06/01	Tarde	<i>[Handwritten Signature]</i>
Sistema de Gestão da Qualidade	Magda Pedro	07/01	Manhã	<i>[Handwritten Signature]</i>
Gestão de Risco e Implementação de MMR				
Relatórios Periódicos de Segurança (RPS)	Ana Sofia Martins	07/01	Tarde	<i>[Handwritten Signature]</i>
Plano de gestão do Risco (PGR)	Sílvia Duarte	08/01	Manhã	<i>[Handwritten Signature]</i>
Estudos de Segurança Pós Autorização (PASS)	Sílvia Duarte	08/01	Manhã	<i>[Handwritten Signature]</i>
PRAC	Márcia Silva	07/01	Tarde	<i>[Handwritten Signature]</i>
Comunicações aos Profissionais de Saúde (DHPC)	Ana Severiano	08/01	Tarde	<i>[Handwritten Signature]</i>
Materiais educacionais	Ana Severiano	08/01	Tarde	<i>[Handwritten Signature]</i>
Gestão do SNF e Gestão Sinal				
Gestão do Sinal (EPITT)	Fátima Bragança	10/01	Tarde	<i>[Handwritten Signature]</i>
Receção e análise de notificações de RAM enviadas por PS e Utentes - Portal RAM	Cristina Mousinho	09/01	Manhã	<i>[Handwritten Signature]</i>
Pesquisa de RAM	Fátima Herjy	09/01	Tarde	<i>[Handwritten Signature]</i>
Receção de XML G/NG - Verificação duplicados	Sandra Queiroz Alice Moedas	10/01	Tarde	<i>[Handwritten Signature]</i>
NUI/RA	Cristina Mousinho	09/01	Manhã	<i>[Handwritten Signature]</i>
Comunicações aos Profissionais de Saúde / Utentes – Circulares Informativas	Adriana Gamboa	10/01	Manhã	<i>[Handwritten Signature]</i>
COMPONENTE PRÁTICA – Equipa Gestão do SNS e Gestão Sinal				

• Anexo IV

Evolução de notificações por espaço temporal e tipo de notificador, no SNF



*Sistema Nacional de Farmacovigilância;
 Comunicado diretamente por profissionais de saúde (PS) e utentes (Ut); *Comunicado através dos Titulares de Autorização de Introdução no Mercado (TAIM)

Data de atualização: 20/04/2020

• **Anexo V**

Artigo escrito para a edição mensal do Boletim de Farmacovigilância

Tofacitinib (Xeljanz®)
novas recomendações de utilização

► *Continuação*

Aquelas observações desencadearam um processo de avaliação, conduzido pelo Comité de Avaliação do Risco em Farmacovigilância (PRAC) da Agência Europeia de Medicamentos (EMA) e de que resultaram novas recomendações de utilização de Xeljanz®, de modo a minimizar os riscos de TEV e infeções, conforme já divulgado pelo Infarmed através de **Circular Informativa**. O Resumo das Características do Medicamento (RCCM) e Folheto Informativo (FI) foram alterados em conformidade, nas secções de **posologia e advertências**, destacando-se as seguintes recomendações:

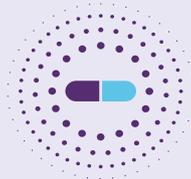
- Independentemente da indicação e da dosagem, Xeljanz® deve ser **utilizado com precaução** em doentes com **fatores de risco conhecidos de TEV** (doentes submetidos a grandes cirurgias, imobilização, enfarte do miocárdio nos 3 meses anteriores, insuficiência cardíaca, utilização de contraceptivos hormonais combinados ou de terapêutica hormonal de substituição, perturbação hereditária da coagulação, neoplasia maligna; fatores de risco adicionais: idade, obesidade (IMC ≥ 30), diabetes, hipertensão, hábitos tabágicos).
- No tratamento da **artrite reumatoide não deve ser excedida a dose recomendada**: 5 mg duas vezes por dia, no caso dos comprimidos revestidos por película, ou 11 mg uma vez por dia, no caso dos comprimidos de libertação prolongada.
- No tratamento da **artrite psoriática não deve ser excedida a dose recomendada** de 5 mg duas vezes por dia.
- **Não é recomendado o tratamento de manutenção** de doentes com **colite ulcerosa** (na dosagem de 10 mg duas vezes por dia) que tenham **fatores de risco conhecidos de TEV** (exceto se não houver terapêutica alternativa).
- Só deve ser considerado o tratamento de doentes idosos se não houver nenhuma alternativa terapêutica adequada, pois os doentes com **idade superior a 65 anos** apresentam **risco acrescido de infeções graves e mortalidade associada**.

Recomenda-se ainda a reavaliação periódica dos doentes quanto a sinais e sintomas de TEV e a interrupção da utilização de tofacitinib em caso de suspeita de TEV, independentemente da indicação ou da dose.

Como consequência da conclusão desta avaliação, foi distribuída uma **Comunicação Dirigida aos Profissionais de Saúde (DHPC)** e encontram-se em atualização os **Materiais Educacionais**, que incluem:

- Cartão de alerta do doente (entregue pelo médico)
- Guia para o médico prescriptor
- Checklist de início de tratamento para o prescriptor
- Checklist de manutenção de tratamento para o prescriptor

Carolina Maria Santos, Constança Oliveira



Portal RAM
Notificação de Reações Adversas a Medicamentos

Notifique reações adversas aqui.
Esclareça dúvidas sobre utilização do Portal aqui.

VOLUME 24
NÚMERO 1
JANEIRO 2020

boletim de FARMACOVIGILÂNCIA

Tofacitinib (Xeljanz®)
novas recomendações de utilização



Leitura Rápida

Tendo em conta evidência de risco aumentado e dependente da dose de trombose venosa profunda e fenómenos tromboembólicos venosos graves, bem como mortalidade aumentada associada a eventos cardiovasculares, infeções e neoplasias malignas, foram revistas as recomendações de utilização de tofacitinib.

Tofacitinib é um potente inibidor seletivo das Janus Cinases (JAK), nomeadamente JAK 1, 2 e 3. A sua inibição atenua a sinalização de interleucinas e interferões, resultando na modulação das respostas imunitária e inflamatória. Está indicado, em associação com metotrexato, no tratamento de adultos com artrite reumatoide moderada a grave, artrite psoriática ativa e em monoterapia, no tratamento de doentes adultos com colite ulcerosa moderada a gravemente ativa.

Após a sua introdução no mercado, foi solicitada a condução de um estudo com o objetivo de avaliar a segurança cardiovascular de Xeljanz®, nas doses de 5 e 10 mg duas vezes por dia, quando comparado com um inibidor do fator de necrose tumoral (TNF). A população em estudo envolvia doentes com artrite reumatoide com mais de 50 anos e, pelo menos, um fator de risco cardiovascular adicional (ex.: fumadores, níveis elevados de pressão arterial ou de colesterolémia, diabetes mellitus, história familiar de enfarte e doenças coronárias).

Na análise preliminar dos resultados deste estudo, observou-se que Xeljanz®, comparativamente com o ITNF, apresentava um risco aumentado e dependente da dose, de trombose venosa profunda e tromboembolismo venoso (TEV) grave (incluindo casos de embolia pulmonar, alguns dos quais fatais). Observou-se também mortalidade aumentada, maioritariamente devida a eventos cardiovasculares, infeções e neoplasias malignas.

Continua ►

FICHA TÉCNICA

Diretora: Edma Candeio
Editor: Conceição de Azevedo
Coordenadora: Ana Romão
Câmara Técnica: Edma Candeio, Ana Soverino, Ana Sofia Martins, Cristina Mesquita, Edma Romão, Filipa Morgado, Margarida Prieto, Mariana Silva, Patrícia Cabalo, Silva Duarte

Colaboradora na Edição: Inês de Almeida
Comitê Consultivo: INAVIGMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.
Parceiros: Serviço de Informação Farmacológica do Infarmed, I.P.
Telfone: 21 799 001 1000
Correio eletrónico: farmacovigilancia@infarmed.pt
ISSN: 0972-7118

Alertas e Novidades nas páginas do Infarmed

Para novidades e publicações, basta um clique. Seguir o link e registre-se aqui!

in | tw | f | yt

SNS REATORES NACIONAL DE SAÚDE

REPÚBLICA PORTUGUESA SAÚDE

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

- **Anexo VI**

Vigésimo sétimo aniversário INFARMED I.P. – Programa

27 ANIVERSÁRIO
15 | janeiro | 2020

Auditório do INFARMED
Edifício Tomé Pires
Parque de Saúde de Lisboa

PROGRAMA

15h00 – Sessão de Abertura

Marta Temido
Ministra da Saúde

Rui Santos Ivo
Presidente do Conselho Diretivo do INFARMED, I.P.

15h30 – Desafios do Futuro

Medicina de Precisão e Novas Terapêuticas: Que Desafios?

Maria Carmo-Fonseca
Instituto de Medicina Molecular

A Inteligência Artificial Pode Ajudar a Medicina?

Jorge Félix Cardoso
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e Centro de Investigação em Tecnologias e Serviços de Saúde

16h15 – Painel “Envolver o Cidadão”

Moderador
António Faria Vaz
Vice-presidente do Conselho Diretivo do INFARMED, I.P.

- Luis Mendão - *Grupo de Ativistas em Tratamento*
- Ana Sampaio - *Associação Portuguesa da Doença Inflamatória do Intestino*
- Bernardo Gonçalves - *myPalis*
- Margarida Oliveira - *Projeto INCLUIR do INFARMED, I.P.*
- Vasco Maria - *Presidente da Comissão de Avaliação de Medicamentos*
- José Vinhas - *Presidente da Comissão de Avaliação de Tecnologias de Saúde*
- Carlos Alves - *Presidente da Comissão Nacional de Farmácia e Terapêutica*

Conclusão
Cláudia Belo Ferreira
Vogal do Conselho Diretivo do INFARMED, I.P.

17h30 – Sessão de Encerramento

Jamila Madeira
Secretária de Estado Adjunta e da Saúde

• Anexo VII

Comparação entre ficha de notificação do profissional de saúde e utente (para notificação *backoffice*)



SISTEMA NACIONAL DE FARMACOVIGILÂNCIA
Notificação de Reações Adversas a Medicamentos
 Profissionais de Saúde

Notifique sempre que suspeitar de uma reação adversa

A. Reação adversa a medicamento (RAM)

Descrição	Data início ¹	Data fim	Duração RAM se < 1 dia
	__/__/__	__/__/__	h min
	__/__/__	__/__/__	h min
	__/__/__	__/__/__	h min
	__/__/__	__/__/__	h min

Considera a reação adversa (ou o caso, se mais do que uma reação)² grave? Sim Não

Se sim, porque considera grave?

Resultou em morte Resultou em incapacidade significativa (especifique em F.)

Colocou a vida em risco Causou anomalias congénitas

Motivou ou prolongou internamento Outra³ (especifique em F.)

Tratamento da reação adversa:

B. Medicamento(s) suspeito(s)

Nome de marca	Lote	Dose diária	Via adm.	Indicação terapêutica	Data início	Data fim
#1						
#2						

O medicamento foi suspenso devido à reação A reação melhorou após suspensão Ou manteve-se

Houve redução da posologia (especifique em F.) Suspeita de interação⁴ entre medicamentos (especifique em F.)

O mesmo fármaco foi reintroduzido Ocorreu reação adversa idêntica quando da reintrodução

São conhecidas reações anteriores ao mesmo fármaco São conhecidas reações anteriores a outros fármacos

Considera a relação causal: Definitiva (certa) Provável Possível Improvável

C. Medicamentos concomitantes, incluindo automedicação (e outro tipo de produtos)

Nome de marca	Dose diária	Via adm.	Indicação terapêutica	Data início	Data fim
#3					
#4					
#5					
#6					
#7					

D. Doente

Iniciais do nome Feminino Masculino Peso Kg Altura cm

Data de nascimento / / Ou idade à data da ocorrência da(s) RAM(s)

Como evoluiu o doente em relação à(s) RAM(s)?

Cura Em recuperação Persiste sem recuperação Morte sem relação com a reação

Cura com sequelas Desconhecida Morte com possível relação com a reação

E. Profissional de saúde

Nome

Profissão Especialidade

Local de trabalho

Contactos⁵: Telefone/Telemóvel e-mail

Data / / Assinatura v.s.f.f.

F. Comentários (Dados relevantes de história clínica e farmacológica, alergias, gravidez, exames auxiliares de diagnóstico ou outros)

Sistema Nacional de Farmacovigilância

CONFIDENCIAL

Notificação de Suspeita de Reações Adversas a Medicamentos

Utentes

Antes de preencher por favor consulte as instruções no verso deste formulário.

* A. DOENTE

Nome (Iniciais): Sexo: M F Idade:

Data de nascimento: / / Peso (kg): Altura (cm):

* B. REACÃO ADVERSA A MEDICAMENTO¹

Descrição	Data de início	Data de fim	Duração

2. Gravidade²

Esta situação causou:

- Algum desconforto, mas sem comprometer as atividades diárias habituais.
- Desconforto e/ou incapacidade (temporária ou definitiva) no desempenho das atividades diárias habituais.
- Desconforto suficiente para recorrer ao aconselhamento/consulta de um profissional de saúde.
- O recurso a hospitalização ou o prolongamento da mesma (se já se encontrava hospitalizado)
- Colocou a vida em perigo/risco (segundo opinião médica)
- Malformação à nascença
- Morte.

3. Foi necessário efetuar algum tratamento da reação adversa?

Não Sim Qual?

4. Como evoluiu o estado de saúde do doente?

Cura	Persiste sem recuperação	Morte
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

5. As reações adversas foram comunicadas a um profissional de saúde?

Não Sim Nome e Contacto:

* C. MEDICAMENTO SUSPEITO DE TER CAUSADO A REACÃO ADVERSA

Nome e completo do medicamento

Forma farmacéutica (ex: comprimido, xarope, injetável)

Dosagem³ N.º do Lote (ver embalagem) Via de administração (ex: oral, injeção, ...):

Data em que iniciou o medicamento: / / Data em que parou de usar o medicamento: / /

Foi a 1ª vez que utilizou este medicamento? Sim Não

Quantas unidades (ex: comprimidos, ampolas) do medicamento tomou/utilizou por dia?

Para que situação/doença foi utilizado o medicamento?

Parou de utilizar o medicamento? Sim Não Reduziu a dose? Sim Não Porou Sem diferença

Quando deixou de usar o medicamento ou quando reduziu a sua dose. Melhorou Porou Sem diferença

Para poder notificar uma reação adversa, é necessário fornecer alguns dados pessoais para que possa ser possível contactar o Utente que submeteu a notificação, caso haja necessidade de esclarecimentos. Os dados pessoais poderão ser consultados pelo respetivo titular e podem ser objeto de pedido de alteração, no caso de estarem incorretos ou desatualizados.

M-FV-06012

- **Anexo VIII**

Infografia do Portal RAM

Notificar Efeitos Indesejáveis de Medicamentos

Novo Portal RAM

Este Portal permite aos doentes, cuidadores e profissionais de saúde comunicarem suspeitas de efeitos indesejáveis de medicamentos (reações adversas a medicamentos - RAM), contribuindo para a monitorização contínua da segurança e para a avaliação do benefício/risco dos medicamentos.

+ Rápido
+ Fácil de preencher

Como Notificar

Portal RAM
Notificação de Reações Adversas
a Medicamentos

em www.infarmed.pt

Basta indicar:

#1
O efeito indesejável

#2
O(s) medicamento(s) suspeitos

#3
Os dados do doente

#4
Um contacto do Notificador

Garantia total de confidencialidade

Notificar ajuda a tornar os medicamentos mais seguros

E-mail: ciim@infarmed.pt
Linha do medicamento: 800 222 444
www.infarmed.pt



Parte II

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

A Farmácia Estádio[®]

Sob orientação do Dr. André Paiva

Lista de Abreviaturas

ANF – Associação Nacional de Farmácias

COVID -19 – *Coronavirus Disease 2019*

FC – Farmácia Comunitária

FE – Farmácia Estádio

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

MSRM – Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

PIM – Preparação Individualizada da Medicação

PTS – Programa de Troca de Seringas

SGQ – Sistema de Gestão da Qualidade

SNS – Serviço Nacional de Saúde

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

I. Nota Introdutória

No âmbito do plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) e de acordo com a Diretiva 2013/ 55/ EU do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de novembro de 2013, para aquisição do título de farmacêutico é obrigatória a complementação de uma formação teórica e prática; com a obrigatoriedade de realização de um estágio (1). Assim sendo, é obrigatória a realização de um período de estágio em Farmácia Comunitária (FC), subsequente à formação ministrada.

Cada vez mais, FC assume um papel preponderante, sendo uma das faces mais visíveis da profissão farmacêutica, sendo por isto, essencial a experiência e o contacto com uma farmácia.

Por esta razão, graças à experiência proporcionada pelo MICF da FFUC, realizei um estágio curricular na Farmácia Estádio (FE), em Coimbra, desde o início de maio até ao final de agosto de 2020, sob a orientação do Dr. André Paiva e colaboração de toda a restante equipa.

A realização deste estágio curricular teve como principal objetivo transmitir e fornecer as últimas valências, necessárias para a formação de um profissional de saúde qualificado, bem como consolidar os conceitos teóricos adquiridos ao longo do curso.

Isto porque, um farmacêutico não é apenas um especialista do medicamento mas também, um agente de saúde pública.

2. A Farmácia comunitária e a sua importância

De acordo com as Boas Práticas em Farmácia Comunitária, *“a principal responsabilidade do farmacêutico é para a saúde e o bem-estar do doente e do cidadão em geral, promovendo o direito a um tratamento de qualidade, eficácia e segurança”* (2). Assim sendo, inicialmente o farmacêutico comunitário era sobretudo visto como um boticário, preparando e entregando as substâncias medicamentosas. Atualmente, o seu papel assume uma importância muito maior, uma vez que, em muitos casos, as farmácias consistem nos primeiros locais que a população procura, muito antes de procurarem um hospital ou um centro de saúde. Por este motivo, as FC passaram a ser locais, não apenas de dispensa de medicamentos, mas também locais que prestam os mais diversos cuidados e serviços, para além de acompanhamento farmacêutico, educação para a saúde e promoção da saúde pública.

Por este motivo, é importante que um farmacêutico esteja em contínuo processo de aprendizagem, de modo a que possa prestar um serviço de excelência ao utente e à restante comunidade.

3. A Farmácia Estádio® - Enquadramento

A FE encontra-se na Rua D. João III, no nº11, integrada no edifício do Estádio Cidade de Coimbra e atualmente a direção técnica encontra-se assumida pela Dr.^a Ana Isabel Costa Neves Rebelo desde Junho de 2001.

É uma farmácia com mais de cerca de 60 anos de existência e renome tendo iniciado como uma pequena farmácia, que mais tarde se veio a expandir para as atuais instalações. Atualmente conta com cerca de 12 colaboradores, inseridos nas mais diversas áreas.

A farmácia faz parte do grupo *maisfarmácia*, é aderente da Associação Nacional de Farmácias (ANF) e rege-se por um Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) de acordo com a norma **NP EN ISO 9001:2015** (2). Este sistema é suportado por documentação de apoio à sua implementação, manutenção e melhoria, sendo evidenciado através de registos da Qualidade. Assim sendo, um dos principais objetivos da farmácia é a aposta na melhoria contínua dos seus serviços, através da *“prestação de um serviço de excelência, promovendo a satisfação e fidelização do cliente”* (3).

A FE oferece diversos serviços para além de aconselhamento farmacêutico; nomeadamente o fornecimento de consultas de Podologia e de Nutrição; a preparação de manipulados (mediante prescrição médica); a preparação individual da medicação (PIM) - para instituições ou para utentes; avaliações de medições de parâmetros bioquímicos, entre os quais: medição de glicémia, triglicéridos e colesterol; e medição de pressão arterial. Por fim, a farmácia realiza ainda a administração de injetáveis ou vacinas, passíveis de serem administrados em FC.

Para além destes serviços, a FE participa ativamente em campanhas do grupo e projetos de saúde pública, nomeadamente: no Programa de Troca de Seringas (PTS) (Anexo I); a Valormed (Anexo II); e na promoção e utilização do cartão SAÚDA/ Cartão das Farmácias Portuguesas que permite a acumulação de pontos, nas Farmácias aderentes, que podem consequentemente ser trocados por produtos de saúde ou originar vales de desconto no ato da compra. O PTS tem como principal objetivo evitar a partilha de seringas, contribuindo assim, essencialmente, para a diminuição de VIH e Hepatite B e C, entre outros objetivos. Os utilizadores de drogas injetáveis, podem assim dirigir-se à farmácia, depositando as suas seringas utilizadas e recebendo um *“kit redução de riscos”* (Anexo I), que

inclui duas seringas, dois toalhetes desinfetantes, dois filtros, duas ampolas de água bidestilada, dois recipientes (caricas), duas carteiras de ácido cítrico e um preservativo (4). A Valormed, iniciada em 1999 (5) faz parte de uma colaboração entre diversos organismos, tendo como finalidade a recolha de embalagens de medicamentos utilizados ou fora do prazo; e a sua posterior recolha e tratamento. Assim sendo, os utentes são sensibilizados para esta temática, com a presença de um contentor na entrada da farmácia (Anexo II). Feita esta breve contextualização, através do presente relatório irei dar a conhecer a minha experiência profissional na Farmácia Estádio, através de uma análise SWOT. Reservando e preservando o sigilo e a confidencialidade de assuntos tratados no decorrer da mesma.

CASO CLÍNICO

Utente, do sexo feminino, cerca de 30 anos. Vem pedir um medicamento para o desconforto urinário; apresentava sintomas de ardor, comichão e aumento da frequência urinária durante o dia. Após analisar o caso, constatei que provavelmente seriam sintomas de uma possível infeção urinária, ao qual a utente me responde que já tinha marcado consulta mas esta seria só nos próximos dias. Devido à pandemia COVID-19 não se queria deslocar às urgências previamente e por isso, decidiu recorrer à farmácia para “aliviar os sintomas”.

Assim sendo, foi-lhe aconselhado um suplemento alimentar à base de arando vermelho rico em proantocianidinas denominado Cysticlean[®] 240 PAC (para a prevenção e tratamento da cistite e bem estar das vias urinárias) (7) ; e um gel de lavagem íntima antisséptico da marca Lactacyd[®] (aconselhado para o uso em situações aumentadas de risco de infeções) (8) .

Foi aconselhada a toma de uma cápsula, por dia e por último, foram-lhe recomendadas medidas não farmacológicas. Nomeadamente, a ingestão de um elevado número de líquidos (sobretudo água) com valores compreendidos entre 1, 5L - 2L, todos os dia, evitar a utilização de peças de roupa desconfortáveis e muito apertadas e lavagem íntima com água tépida.

4. Análise SWOT

Através da seguinte análise SWOT – acrónimo anglo-saxónico para *Strengths*, *Weaknesses*, *Opportunities* e *Threats* – procuro agrupar os aspetos fundamentais do estágio que contribuíram para o meu processo de aprendizagem, nomeadamente através de uma dimensão interna (Pontos Fortes e Pontos Fracos) e uma dimensão externa (Oportunidades e Ameaças).

4.1. Pontos Fortes (Strengths)

4.1.1. Equipa técnica da Farmácia Estádio®

A equipa técnica da FE é uma equipa jovem, formada por excelentes profissionais, que desempenham um brilhante trabalho nas mais diversas atividades da farmácia.

À equipa da farmácia estou muito grata, porque sinto que contribuíram para melhorar o meu conhecimento científico e crescimento a nível profissional. Mostraram-se sempre prontos para partilhar conhecimentos de carácter técnico-científico, esclarecer dúvidas e sugerir melhorias no decorrer do meu trabalho. Senti que depositaram confiança nas minhas capacidades, tendo-me sido dada bastante autonomia no decorrer do estágio, nomeadamente no período de atendimento ao balcão.

Para além disto, proporcionaram a realização de diversas atividades extralaborais desenvolvidas pelo departamento de recursos humanos, com o principal objetivo de integrar os estagiários e promover a criação de laços interpessoais. Estes laços, mais tarde vieram a transmitir-se na boa dinâmica de trabalho da FE, graças à boa relação entre todos e espírito de entreatajuda.

4.1.2. Heterogeneidade de utentes

Durante o meu estágio, um dos pontos fortes foi o contacto com um diverso número de utentes, heterogeneamente diversos. Isto é, para além dos habituais clientes que vinham adquirir a sua medicação habitual, muitos outros procuravam um atendimento mais personalizado. Assim sendo, contactei com clientes que necessitavam de produtos específicos para as mais diversas situações; muitas das vezes, confrontando-me com produtos que nem sabia que existiam e ainda com utentes oriundos de outros países.

A excelente localização da FE, perto de clínicas, ginásios e escolas, deu-me a possibilidade de entrar em contacto com os mais diversos casos clínicos, que contribuíram para uma experiência de estágio mais alargada e enriquecedora.

4.1.3. Diversidade de funções desempenhadas

No decorrer do estágio, foi-me permitido experienciar as mais diversas áreas de atuação na farmácia comunitária, tanto a nível de *backoffice* como *frontoffice*.

A nível de *backoffice*, durante o meu período de estágio, rececionei encomendas; aprovisionei e armazenei medicamentos e produtos de saúde; preparei pedidos de entrega ao domicílio; realizei PIMs para diversas instituições e observei a preparação de manipulados.

A nível de *frontoffice*, tive um contacto mais direto com os utentes, dispensando MSRSM ou dando aconselhamento para MNSRSM e ainda realizando a avaliação de parâmetros bioquímicos e pressão arterial.

Todas estas atividades permitiram-me ter uma ideia geral de todo o sistema que envolve a farmácia, contribuindo assim para uma experiência diversificada, durante os cerca de quatro meses que aqui estagiei.

4.1.4. Aplicação de conhecimentos

Considero que durante todo o meu período de estágio, a fase mais desafiante e emocionante foi a fase de atendimento ao público. Esta fase envolve um enorme sentido de responsabilidade e uma elevada capacidade de demonstração e confiança (sendo que, muitas da vezes, não dominava determinados assuntos e por isso o sentido de ajuda por parte da equipa da farmácia foi essencial).

No entanto, esta aplicação de conhecimentos é também a parte mais gratificante, onde podemos pôr em prática tudo o que aprendemos nos últimos cinco anos; desde já destaco a importância da cadeira de Indicação Farmacêutica, que considero, essencialmente, que nos proporciona bases fundamentais para este estágio.

Sem dúvida, este foi um dos pontos mais difíceis mas seguramente dos mais fortes, porque realmente senti que o utente recebia todas as informações necessárias, para o êxito da terapêutica.

Assim sendo, anteriormente encontra-se descrito um caso prático que sucedeu no decorrer do meu estágio.

4.2. Pontos Fracos (Weaknesses)

4.2.1. Duração da fase de atendimento e contacto com o público

Como explicado anteriormente, foram diversas as funções desempenhadas no decorrer do estágio, obtendo assim um plano de estágio bem estruturado, gradualmente envolvendo cada vez mais responsabilidades.

No entanto, e como também mencionado acima, a fase de atendimento ao público é a mais emocionante e onde a prática passa a ser aplicada. Assim sendo, na minha opinião, durante o tempo que experienciei ao balcão (individualmente ou a ouvir atendimentos de colegas), aprendi bastante e penso que poderia ter aprendido ainda mais. Por esta razão, creio que durante um estágio desta dimensão temporal, o tempo de atendimento ao balcão e aconselhamento farmacêutico, deveriam ser alongados.

4.2.2. Elevado número de estagiários

O elevado número de estagiários acabou por se revelar também um ponto fraco deste estágio. Isto porque, comprometeu em alguns momentos uma aprendizagem mais completa. A principal razão relacionou-se com a dificuldade de dar a mesma atenção a todos, acabando por explicar aprofundadamente certos assuntos a uns, e não tanto pormenorizadamente a outros. Esta discrepância revelou-se essencialmente no período em que estávamos por turnos, uma vez que com vários estagiários tornava-se difícil gerir uma preparação igual em turnos diferentes.

4.2.3. Diferenciação das cores das batas dos estagiários

A FE é conhecida pelos seus estagiários, que apresentam uma bata verde, diferente da restante equipa, que utiliza batas brancas. Tendo isto em consideração, senti que este ponto era sobretudo um ponto fraco, apesar de também poder ser um ponto forte. Por um lado, esta logística acaba por ser positiva, uma vez que os utentes acabam por ter mais paciência e compreensão com os estagiários, percebendo que ainda está a decorrer todo um processo de aprendizagem.

Por outro lado, esta abordagem acaba por ter um efeito negativo no utente e no estagiário, ou porque o utente apresenta uma desconfiança no estagiário e nos seus conhecimentos; ou porque desmotiva o próprio estagiário, que muitas vezes sabe porque tem os conhecimentos e as bases, mas não lhe é dada a oportunidade para o demonstrar.

Apesar disto, a equipa da FE sempre depositou enorme confiança em nós, motivando-nos e tranquilizando os utentes que se sentiam pouco seguros com os nossos atendimentos; estando sempre à disposição para nos auxiliar no que fosse preciso.

4.3. Oportunidades (*Opportunities*)

4.3.1. Preparação individualizada da medicação (PIM) e instalação da máquina de preparação da medicação

Uma das maiores oportunidades que me foi dada neste estágio foi a PIM (Anexo III). A FE realiza a PIM para diversas instituições, bem como para alguns utentes.

No início do meu estágio esta preparação era feita manualmente, por nós (estagiários) em conjunto com farmacêuticos aptos para isso. No entanto, no início de Junho, a FE instalou uma máquina de preparação da medicação (Anexo IV) que veio a permitir a otimização do

processo, revelando-se uma vantagem, através do controlo e registo de *stocks*, prazos de validade e lotes de medicação de utentes.

Na minha opinião, a PIM, constituiu uma grande oportunidade durante o meu estágio, pois pude contactar com os mais variados medicamentos, passando a associar as substâncias ativas às marcas comerciais; a reconhecer medicamentos por embalagens (revelando-se particularmente útil na fase de atendimento ao público) e ainda a ter um contacto mais direto com o próprio medicamento. Por último, possibilitou-me ainda ter uma perceção de medicação mais comum de ser prescrito em certas faixas etárias, e as possíveis interações medicamentosas, onde o farmacêutico exerce um papel preponderante na sua identificação e intervenção.

4.3.2. Gabinete do utente e a prestação de serviços farmacêuticos

O gabinete do utente e a prestação de serviços farmacêuticos ao utente, tais como, a avaliação de parâmetros bioquímicos e antropométricos, constituiu uma oportunidade de ter formação para determinações de glicémia, colesterol, triglicéridos e pressão arterial, uma vez que a farmácia disponibiliza à população estes serviços. No entanto, foi também uma oportunidade, sobretudo, para estreitar laços com o utente. Isto porque, constituem momentos em que o utente se sente mais à vontade, permitindo assim ao farmacêutico ter mais tempo para se dedicar ao aconselhamento farmacêutico, verificando a adesão à terapêutica, analisando e interpretando casos clínicos e sugerindo medidas não farmacológicas, de acordo com cada caso.

4.3.3. Criação e adoção de novas estratégias em tempos de pandemia

O meu estágio realizou-se durante a ainda atual, pandemia COVID-19. Assim sendo, as farmácias tiveram que se adaptar, de modo a conseguirem continuar a proporcionar os seus serviços de excelência.

Na FE foram criadas e adotadas novas estratégias para o contínuo processo de satisfação do cliente. Desde já destaco, as entregas ao domicílio e a dispensa de medicamentos hospitalares (de utentes em ambulatório) na farmácia. Esta última abordagem demonstrou-se muito interessante para a minha formação profissional porque foi uma oportunidade de alargar os meus conhecimentos. Possibilitou-me entrar em contacto com medicamentos hospitalares, nomeadamente com substâncias ativas não passíveis de serem comercializadas em FC, fazer o registo da dispensa no Sifarma2000® e avaliar sinais sugestivos de agravamento da doença, relacionados com o uso do medicamento.

4.3.4. Dispensa de medicamentos veterinários

A dispensa de medicamentos veterinários acabou por se revelar uma oportunidade, apesar da minha relutância inicial, relativamente a este ponto.

Apesar de sentir que tinha poucas bases na área de dispensa de medicamentos e produtos veterinários, toda a equipa se mostrou sempre bastante suscetível para me ajudar, tendo aprendido bastante acerca desta área na farmácia. Este fator constituiu uma oportunidade para perceber que, na FE, existe uma linha de apoio aos farmacêuticos para aconselhamento de produtos veterinários de venda livre (por exemplo, desparasitantes) (Anexo V) promovendo deste modo uma utilização correta e segura dos mesmos.

4.4. Ameaças (Threats)

4.4.1. Medicamentos esgotados (ex: Victan[®] 2mg/ Serenal[®] 50mg)

Durante o decorrer do meu estágio, foram inúmeras as vezes que os utentes vinham à farmácia com prescrições, sendo que alguns dos medicamentos prescritos se encontravam esgotados. De entre estes medicamentos, saliento o Victan[®]2mg (loflazepato de etilo) e o Serenal[®] 50mg (oxazepam), que foram os que mais interferiram com o decorrer do meu estágio, encontrando-se indisponíveis por tempo indeterminado.

Ambos são medicamentos para os quais não existe um medicamento igual ou um genérico. Para além disto, ainda que pudessem existir outras opções de MNSRM com efeito similar, e onde o farmacêutico pudesse desenvolver um papel crucial muitas das vezes, os utentes já estavam bastante habituados àquela medicação, reportando grandes dependências e rejeitando as alternativas fornecidas. Assim sendo, esta situação de medicamentos esgotados levou a que muitos procurassem Victan[®] 2mg, nomeadamente em Espanha (6).

Esta realidade põe em causa a credibilidade da farmácia e o próprio farmacêutico, uma vez que representa uma ameaça à terapia continuada, devido a motivos alheios à própria farmácia.

4.4.2. Dificuldade na proximidade ao utente – COVID-19

No decorrer do estágio outra problemática associada a motivos externos à farmácia, foi a dificuldade na aproximação ao utente, devido à pandemia. Devido à implementação de medidas de diminuição do risco de propagação do vírus, foram implementados acrílicos nos balcões assim como tornado obrigatório o uso de máscara ou viseira, no interior do espaço. Estas medidas levaram a um aumento da dificuldade de comunicação entre o farmacêutico e

o utente, originando algumas vezes erros no pedido de MNSRM durante o atendimento. Por exemplo, situações onde os produtos se apresentavam com nomes muito semelhantes tais como o caso da “cecrisina®” e da “cetirizina”.

4.4.3. Sazonalidade do estágio

A sazonalidade do estágio foi também outro motivo influenciador do meu percurso durante o estágio.

Durante o período que estagiei na FE, contactei sobretudo com situações características do espaço temporal em que me enquadrava, nomeadamente durante a época da Primavera e do Verão (sobretudo). Durante esta fase, observei e realizei aconselhamento farmacêutico direcionado maioritariamente a alergias ou a picadas de insetos. No entanto, infelizmente, o contacto com afeções típicas do período do Outono e Inverno (nomeadamente constipações e síndromes gripais) ficou um pouco mais incompleto em termos de aprendizagem.

4.4.4. Falta de formações das gamas e de produtos devido à pandemia

Para um bom trabalho em FC, é necessário que o farmacêutico seja capaz de estar em constante atualização e tenha um bom conhecimento científico dos diversos produtos de saúde, medicamentos, produtos de dermocosmética e tantos outros, que existem na farmácia. Isto é fundamental para depositar uma maior confiança nos utentes que os adquirem.

Desde modo, as farmácias são privilegiadas com formações oferecidas pelos laboratórios, muitas vezes através dos seus delegados e representantes. No entanto, devido à situação atual que nos encontramos, durante o meu estágio, o contacto com estas entidades foi diminuído, reduzindo assim a oportunidade de poder adquirir conhecimentos de produtos e tecnologias inovadoras, e conhecimentos técnico-científicos em relação a determinados temas.

Penso então que esta foi uma limitação durante o decorrer do estágio, no entanto, por motivos alheios à farmácia. Assim sendo, pretendo ainda destacar que apesar de não ter tido a oportunidade de assistir a estas formações, como muitos colegas meus assistem todos os anos, a FE procurou sempre criar alternativas. A equipa técnica esteve sempre disposta a explicar e a dar a conhecer as mais diversas gamas (nomeadamente a nível de dermocosmética e suplementos alimentares), bem como a incentivar-nos a ouvir *webinars*, realizados pelas próprias marcas.

5. Considerações Finais

Este estágio curricular possibilitou-me complementar conhecimentos em diversas áreas, oferecendo-me valências para construir uma atitude deontológica e eticamente correta em FC. Ao longo do estágio procurei aprender a adequar a minha postura, nível de linguagem e discurso científico, facilitando a comunicação e garantindo a máxima compreensão, por parte dos utentes. Deste modo, foi-me permitido adquirir a confiança e empatia dos mesmos, diariamente, atuando não só como futura farmacêutica mas também como agente de saúde pública.

Refletindo acerca dos últimos quatro meses, sinto que aprendi bastante e evolui nos mais diversos níveis, tendo esta sido uma experiência marcante no meu percurso académico e profissional.

Do meu ponto de vista, estou segura que este estágio é essencial para compreender o verdadeiro papel de um farmacêutico comunitário e do compromisso que todos os dias é assumido para com a profissão e para com os utentes, sendo a vertente humana a chave para o sucesso.

Acabo este estágio com um grande sentimento de orgulho na minha futura profissão e em todos os conhecimentos que adquiri nos últimos tempos. Sinto-me honrada e agradecida pela oportunidade que me foi dada, possibilitando-me toda uma experiência que acredito que será essencial para o meu futuro.

Termino assim, agradecendo, essencialmente à Farmácia Estádio e a toda a sua equipa, pois tenho a certeza que tudo o que me ensinaram me tornará numa melhor profissional no meu futuro. Sem vocês nada disto teria sido possível. Muito obrigada!

6. Bibliografia

1. MINISTÉRIO DA SAÚDE – **Diretiva 2013/55/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Novembro de 2013**. [Acedido a 28 de agosto 2020]. Disponível na Internet: http://www.acss.min-saude.pt/wp-content/uploads/2017/05/Diretiva_2013_55_EU.pdf
2. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS – **Boas Práticas Farmacêuticas para a Farmácia Comunitária, 3ª edição (2009)**. [Acedido a 30 de agosto 2020]. Disponível na Internet: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/boas_praticas_farmaceuticas_para_a_farmacia_comunitaria_2009_20853220715ab14785a01e8.pdf
3. FARMÁCIA ESTÁDIO – **Manual de Acolhimento e Integração (2019)**.
4. SERVIÇO NACIONAL DE SAÚDE (SNS). SPMS. – **Programa de Troca de Seringas**. [Acedido a 30 de agosto 2020]. Disponível na Internet: <https://www.sns.gov.pt/noticias/2016/09/02/programa-de-troca-de-seringas/>
5. VALORMED – **Quem somos**. [Acedido a 30 de agosto 2020]. Disponível na Internet: <http://www.valormed.pt/paginas/2/quem-somos/>
6. JORNAL i – **Medicamento esgotado deixa farmacêuticos desesperados**. [Acedido a 31 de agosto 2020]. Disponível na Internet: https://ionline.sapo.pt/artigo/707025/medicamento-esgotado-deixa-portugueses-desesperados?seccao=Portugal_i
7. **CYSTICLEAN® 240mg PAC** – [Acedido a 31 de agosto 2020]. Disponível na Internet: https://ginix.pt/produto/cysticlean/?gclid=Cj0KCQjww7L6BRDxARIsAGj-34riVWFOKFenCSatp2_AqLYFGVO-gfK3w7pQdpyG9r4-vpyLAhO4OgMaAqipEALw_wcB
8. **LACTACYD PHARMA ANTISETICO®** – [Acedido a 31 de agosto 2020]. Disponível na Internet: <https://www.lactacyd.pt/lactacyd/portfolio/lactacyd-pharma-antiseptico/>

7. Anexos

- Anexo I

“Kit redução de riscos” - Programa de troca de seringas (PTS) usadas



- **Anexo II**

Programa VALORMED



- **Anexo III**

Preparação Individualizada da Medicação (PIM) – Diferentes tipos:

(A) PIM para utente de uma instituição



(B) PIM para utente da farmácia



- **Anexo IV**

Máquina de preparação da medicação para as instituições



- **Anexo V**

Linha de apoio para farmacêuticos, de aconselhamento de produtos de uso veterinário de venda livre



Parte III

Monografia

“Exosomes as new therapeutic vectors for pancreatic cancer treatment ”

Sob orientação da Professora Doutora Maria Teresa Rosete

Figure Index

Figure 1. Summarized risk factors involved in Pancreatic Cancer.....	61
Figure 2. Structure and composition of an exosome.....	66
Figure 3. Strategy for cancer treatment using exosomes.....	69

Table Index

Table I. Methods to control PC progression through new targetable mechanisms.....	59
Table II. Comparison between different techniques used in the isolation and loading of exosomes.....	91

Abstract

Pancreatic cancer, also known as the “silent killer,” is one of the deadliest cancers with a very short rate of survival. It received this name due to the disease’s fast progression, during which one does not usually show symptoms in its early stage. This absence of symptoms can lead to a late diagnosis associated with an advanced metastasis process, for which therapy is not effective. Even though extensive research efforts are being developed by the scientific and clinical communities all over the world, the 5 year survival rate has not increased significantly. Notwithstanding, these achievements were useful to acquire knowledge regarding new risk factors, genetic mutations, molecular mechanisms and novel therapeutics. Novel therapeutics deserve special attention in this type of cancer because it is very common for patients to present resistancy to chemotherapy treatments. In this way, the development of new therapeutic strategies is particularly relevant. Interestingly, exosomes are presented as a promising strategy, working as delivery systems, since that they can transport and release their cargoes after fusing with the membrane of pancreatic cells. The exosomes present advantages over liposomes because they are less toxic and reach higher levels in the bloodstream. Thus, exosomes work as molecules’ carriers that can inhibit oncogenes, activate tumour suppressor genes, and induce immune responses as well as control cell growth.

However, much scientific and clinical studies are still needed regarding the entire process, from isolation and purification of exosomes, to their *design* and transformation into anti-oncogenic drug delivering systems, particularly to target cells.

Keywords: exosomes, pancreatic cancer, cancer therapy, delivery system.

Resumo

O cancro do pâncreas, também conhecido como o "assassino silencioso", é um dos cancros mais mortíferos, com uma taxa de sobrevivência muito curta. Recebeu este nome devido a uma rápida progressão da doença, muitas vezes não apresentando sintomas no seu estado inicial. Esta ausência de sintomatologia poderá conduzir a um diagnóstico tardio associado a um avançado processo de metastização, para o qual a terapêutica não apresenta eficácia. Embora extensos esforços de investigação estejam a ser desenvolvidos pelas comunidades científicas e clínicas de todo o mundo, a taxa de sobrevivência de cinco anos não aumentou significativamente. Não obstante, estas conquistas foram úteis para adquirir conhecimentos em relação a novos fatores de risco, novas mutações genéticas, mecanismos moleculares e novas terapias inovadoras.

Novas terapias merecem especial atenção neste tipo de cancro, pois é muito comum os doentes apresentarem resistência à quimioterapia. Neste sentido, assume particular relevância o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Curiosamente, os exossomas são apresentados como uma estratégia promissora, funcionando como sistemas de entrega, uma vez que podem transportar e libertar as suas cargas após fusão com a membrana das células pancreáticas. Os exossomas apresentam vantagens relativamente aos lipossomas pois são menos tóxicos e atingem níveis mais elevados na corrente sanguínea. Assim sendo, os exossomas funcionam como portadores de moléculas que podem inibir oncogenes, ativar genes supressores de tumores e induzir respostas imunes, além de controlarem o crescimento celular.

No entanto, ainda são necessários mais estudos científicos e clínicos, considerando todo o processo, desde o isolamento e purificação dos exossomas, ao seu *design* e transformação em sistemas de entrega de fármacos anti-oncogénicos, particularmente às células-alvo.

Palavras-Chave: exossomas, cancro do pâncreas, terapêutica do cancro, sistema de entrega.

List of Abbreviations

3'UTR – 3' Untranslated Region
AKT – Serine/ threonine-protein kinase B
APCs – Antigen-Presenting Cells
AT – Ataxia-Telangiectasia
BRCA2 – Breast Cancer Gene 2
CDKN2A – Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CF – Cystic Fibrosis
CNS – Central Nervous System
CT – Computer Tomography
DCs – Dendritic Cells
DDSs – Drug Delivery Systems
DNA – Deoxyribonucleic Acid
dsDNA – Double Stranded DNA
EGFR – Epidermal Growth Factor Receptor
EMT – Epithelial-Mesenchymal Transition
ESCRT – Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
ESE – Early-Sorting Endosome
EUS – Endoscopic Ultrasonography
EVs – Extracellular Vesicles
FAMMM – Familial Atypical Multiple Mole Melanoma syndrome
FAP – Familial Adenomatous Polyposis
GEM – Gemcitabine
GTPases – Guanosine Triphosphatases
HBOC – Hereditary Breast and Ovarian Cancer syndrome
HNPCC – Lynch syndrome
HP – Hereditary pancreatitis
HSP – Heat Shock Proteins
ILs – Interleukins
ILVs – Intraluminal Vesicles
INF γ – Interferon-gamma
IPMN – Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm
KRAS – Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LPS – Lipopolysaccharide

LSEs – Late-Sorting Endosomes
MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinase
MCN – Mucinous Cystic Neoplasm
MHC – Major Histocompatibility Complex
miRNA – Micro Ribonucleic Acid
MPS – Mononuclear Phagocyte System
MSCs – Mesenchymal Stem Cells
MVBs – Multivesicular Bodies
PALB2 – Partner and Localiser of BRCA2
PanIN – Pancreatic Intraepithelial Neoplasia
PBS – Phosphate-Buffered Saline
PC – Pancreatic Cancer
PDAC – Pancreatic Ductal Adenocarcinoma
PJs – Peutz-Jeghers syndrome
PM – Plasma Membrane
PSCs – Pancreatic Stellate Cells
PTX – Paclitaxel
RNA – Ribonucleic Acid
ROS – Reactive Oxygen Species
SEB – Staphylococcal Enterotoxin B
SEC – Size-Exclusion Chromatography
shRNA – Short Hairpin Ribonucleic Acid
siRNA – Small Interfering Ribonucleic Acid
SMAD3 – SMAD Family Member 3
SMAD4 – SMAD Family Member 4
ssDNA – Single Stranded DNA
TAMs – Tumour-Associated Macrophages
TGF- β – Transforming Growth Factor- β
TP53 – Tumour Protein P53
VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor

I. Introduction

The mortality and incidence of cancer are facing increasing growth on a large scale worldwide. Targeted and immune therapies against cancer have been developed as alternative treatments to overcome the side effects and toxicity of systemic chemotherapy, because most chemotherapeutic agents are extremely harmful for both cancerous and healthy cells (ZHANG *et al.*, 2019).

Pancreatic cancer (PC) ranks thirteenth place for incidence and is the seventh most lethal cancer in the world (GLOBOCAN OBSERVATORY, 2019), with 93% of patients dying within 5 years of diagnosis (NIPP *et al.*, 2018) and according to statistics, by 2030 PC will likely become the second most common cause of cancer-related deaths (THOBIE *et al.*, 2018).

Through life, the risk of developing PC is of 1.49%, which corresponds to about 1 in 67 cases, with the peak of age between 60 to 80 years old (BECKER *et al.*, 2014).

Reports indicate that PC is more frequent in developed countries (VEISANI *et al.*, 2018), and has, less than a 20% one-year survival rate (GIAMPIERI *et al.*, 2019). Additionally, the incidence seems to be increasing in the western world. SAAD *et al.* tried to prove this theory by studying the age-standardised incidence rates in the United States between 1973 and 2014 and found surprising increases of 1.03% per year (SAAD *et al.*, 2018). Additional research, followed by WONG *et al.* even demonstrated that developed countries, in comparison with developing countries, presented higher incidences (WONG *et al.*, 2017). This can be explained by different lifestyles and risk factors associated with either type of country.

Socioeconomic development is often associated with the ageing and growth of the population, as well as a higher prevalence of some risk factors (**Figure 1**) that have an important role in the rising prominence of cancer (BRAY *et al.*, 2018). Along with age, geriatric issues, medical comorbidities, poverty-stricken nutrition, low cognitive function (along with limited social and family support) are responsible for the higher incidence rate of PC (NIPP *et al.*, 2018). According to studies, one-third to two-fifths of new cancer cases could be avoided by changing daily lifestyle habits and reducing exposure to environmental risk factors (THOBIE *et al.*, 2018; BRAY *et al.*, 2018).

Different socioeconomic levels have an important influence in therapeutic approaches and premature diagnosis causing disparities in the costs, quality, and access to treatments. Reduced access to chemotherapy, inefficient health care systems, low survival rates and recurrence of pancreatic cancer are mainly associated with low socioeconomic conditions and status (THOBIE *et al.*, 2018).

Better outcomes have been presented when patients are treated at high-volume institutions and undergo surgery along with chemotherapy. Other factors, such as ethnicity and education, according to academics, seem to play an important role (MAKAR *et al.*, 2019; SHAIB *et al.*, 2018). For example, the problem with a low level of education seems to be the negligence of symptoms that can be important, and require medical attention. Individuals from rural areas are also more likely to struggle with language and cultural barriers as well as time away from work given that they need to spend time in treatments and are too fragile to continue workings. The inability to work can result in job loss, having as a consequence, a loss of incomes. However, it is important to underline that association with all these factors remains still unclear and requires further study (MAKAR *et al.*, 2019; SHAIB *et al.*, 2018).

Epidemiologically, it seems that PC mortality rates are higher in males, African Americans (**Figure 1**), and groups with low socioeconomic status (SMITH *et al.*, 2013).

MARQUES DA COSTA *et al.* studied the PC mortality rate in Portugal, from 1991 to 2015 since it is a type of tumour with persistent growth in mortality in Europe (MARQUES DA COSTA *et al.*, 2020).

Their analysis showed that deaths attributed to malignant pancreatic cancer doubled from 701 to 1415 during this period, with an increment of approximately 3% per year. Age-adjusted mortality rates were an important factor, higher in males than in females. Geographic inequalities were also notable, with the highest rates of incidence and increase in mortality occurring in the Azores Islands and Alentejo. This seems to be related to the risk factors of PC. Azores and Alentejo show the highest population of active smokers and obese individuals in Portugal.

It is expected that from 2035 onwards, each year, more than 2000 people will die due to PC in the world. Therefore, it is extremely necessary to work together to raise awareness regarding the importance of precocious diagnosis and risk factors among the Portuguese population and worldwide, as well as to develop new therapeutic strategies.

Exosomes play a main role in intercellular and intertissue communication by cargoes contained inside the membrane (TRAN *et al.*, 2019). Exosomes, nanosized vesicles, can be secreted by different types of cells, being able to represent a fundamental tool for diagnostics and therapeutics (BATRAKOVA and KIM, 2015). It is important to understand how exosomes are formed, their function, where and how they can be used as novel drug delivery systems and how the future of science, and more specifically, patients, can benefit from this research.

Therefore, this thesis will explore the state of the art of exosomes as new therapies for pancreatic cancer moving forward.

2. Pancreatic Cancer

PC is well known as a disease of ageing. It is more often to appear at increased rates in older adults. A large majority is diagnosed at a late stage of the condition with the lack of early symptoms and when the only available treatments, in many cases, are the palliative ones.

20% of patients can undergo surgery for resectable tumours (WERNER *et al.*, 2013); however, recurrence is very frequent (GROOT *et al.*, 2018) in these types of cancer and patients rarely surviving for more than two years following the initial diagnosis (KARACHRISTOS and ESNAOLA, 2014; ARTINYAN *et al.*, 2011). Therefore, precocious diagnosis and detection of precursor lesions seem to be essential in decreasing cancer morbidity and mortality (NIPP *et al.*, 2018) as well as other targetable mechanisms listed in **Table I**.

Table I – Methods to control PC progression through new targetable mechanisms.
(Adapted from (Ansari *et al.*, 2016; Hanahan and Weinberg, 2011))

Targetable Mechanisms in Pancreatic Cancer:
• Controlling invasion and metastasis
• Controlling angiogenesis
• Identifying genome instability and mutations through genome mapping
• Avoiding resisting cell death
• Disabling replicative immortality
• Controlling tumour-promoting inflammation
• Allowing immune destruction through immunotherapy
• Regulating cellular energetics
• Disclosing growth suppressors
• Controlling proliferative signalling

2.1. Physiopathology

The pancreas is an organ that resides deep in the abdomen. It is covered by the stomach and the liver and it is formed by two types of separate functional units; the exocrine and endocrine pancreas. The exocrine part of the pancreas is constituted by acinar and duct cells and acts by sending digestive enzymes to the small intestine. The endocrine part is

composed by four specialized cell types that all together form the Islets of Langerhans, which act by regulating the metabolism of the body; for example, controlling and regulating the normal levels of glucose in the blood. Nevertheless, most tumours evolve from pancreas exocrine tissues (80% of the pancreas tissue mass).

Although the pancreas is composed by head, body, and tail, the majority of the cancers are more prone to develop in the epithelial cells that cover the pancreatic ducts of the head or neck of the pancreas. Further infiltration can be followed by spreading into the tissues, including the spleen and peritoneal cavity, and metastasis to the lungs and liver (HEZEL *et al.*, 2006).

PC can be also referred to as “Pancreatic Ductal Adenocarcinoma” (PDAC) once the cells under the microscope, can be seen with a glandular-like appearance (adeno) embedded in an extensive fibrotic stroma (PORUK *et al.*, 2013). PDAC is the major form of pancreatic tumour cases (more than 85%) (HEZEL *et al.*, 2006).

In PDAC there are three known human precursors: pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN), mucinous cystic neoplasm (MCN) and intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN). The latter two precursors are the less common lesions, while the most common lesion is PanIN (NOË and BROSENS, 2016). According to the most recent studies, less common stages of PDAC can present a colloid, adenosquamous or sarcomatoid histology and is though that exocrine dysfunction and pancreatitis, can present an essential role in the development of PDAC due to the release of reactive oxygen species (ROS) and cytokines, among other molecules (HEZEL *et al.*, 2006).

2.2. Risk Factors

Risk factors associated with PC are tobacco consumption and chronic medical conditions, such as *diabetes mellitus*, chronic pancreatitis, and obesity. Smoking habits are responsible for 30% of the condition’s occurrence and are the most important environmental risk factor associated with the condition (BECKER *et al.*, 2014). Also, individuals with a high body mass index, chronic pancreatitis, *diabetes mellitus*, a high-fat diet, a high red meat consumption, an inactive lifestyle, as well as certain abdominal surgeries or infections are more prone to develop PC (VEISANI *et al.*, 2018; SMITH *et al.*, 2013).

The majority of PC cases seem to be isolated, with only 10% associated with hereditary reasons of a family history of pancreatic cancer. In fact, familial PC can only be considered as such, if two or more first-degree relatives have had the disease (HRUBAN *et al.*, 2010). In these cases, genetic susceptibility and germline mutations are undoubtedly evidenced.

Conditions like hereditary breast and ovarian cancer syndrome (HBOC), familial adenomatous polyposis (FAP), hereditary pancreatitis (HP), cystic fibrosis (CF), Lynch syndrome (HNPCC), ataxia-telangiectasia (AT), Peutz-Jeghers syndrome (PJs) and familial atypical multiple mole melanoma syndrome (FAMMM), are associated with a higher probability to develop PC (BECKER *et al.*, 2014).

Plus, crucial findings have been made in molecular features. Genetic mutations, such as the *KRAS* mutation, telomere shortening, *CDKN2A* mutations and mutations into the tumour suppressors (like *TP53* loss and *SMAD4* mutations), reveal the importance that activated oncogenes and inactivated tumour suppressor genes have in uncontrolled cell growth and suppressor immune responses in PC development (NOË and BROSENS, 2016). *Breast Cancer Gene 2 (BRCA2)* and *Partner and Localiser of BRCA2 (PALB2)* (**Figure 1**) seem to be two of the most correlated mutated genes, associated with familial PC (ILIC and ILIC, 2016).

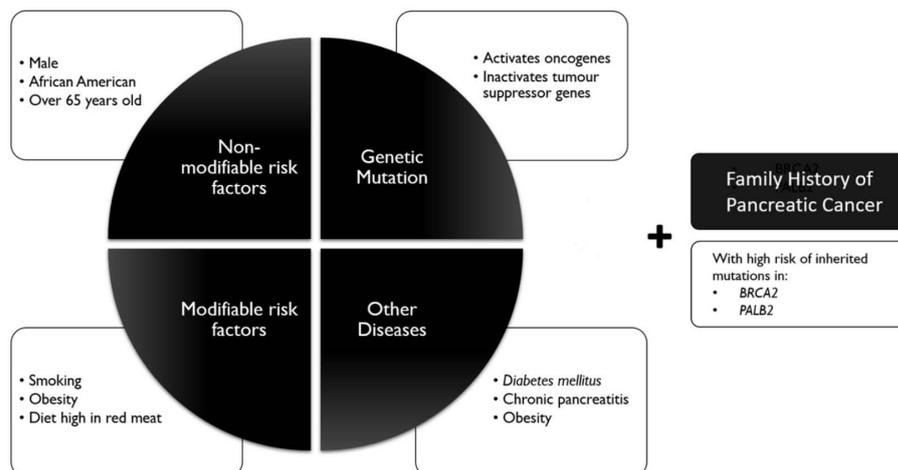


Figure 1 – Summarized risk factors involved in Pancreatic Cancer. Genetic mutations can activate oncogenes or inactivating tumour suppressor genes. Modifiable risk factors such as smoking and obesity also play a major role in the development of PC. Individuals with inherited mutations in *BRCA2* gene and *PALB2* gene, are also at higher risk for developing PC.

2.3. Symptoms and Diagnosis

PC symptoms are subtle and progress very fast. Usually, symptoms start with fatigue, nausea, malaise, weight loss, and mid-epigastric pain diffusing to the back. In the advanced stage, when the tumour can extend to the duodenum or stomach, it commonly causes gastric outlet obstruction as well as a characteristic sign in the head of the pancreas known as Jaundice, (causing a yellowing of the skin). Jaundice is caused because of the compression of

the common bile duct. Symptoms are very insidious and, in many cases, the diagnosis is made on a late stage of the disease progression, when there are only options for decreasing the patient's pain level – but no cure (BECKER *et al.*, 2014).

Many imaging methods can be used for the diagnosis. Computer tomography (CT) is still the most used method, thanks to its capacity to show low attenuation mass in areas of the pancreas (KLAUB *et al.*, 2013); but there are other imaging methods, like endoscopic ultrasonography (EUS), magnetic resonance and endoscopic retrograde cholangiopancreatography (WU *et al.*, 2019).

2.3.1. Methods for screening

Ideal screening methods need to be cost-effective, practical and easy to manage. For example, CA19-9, a carbohydrate-associated antigen and serum marker for PC, has been used in clinics and has become the preferred marker in monitoring tumour progression and treatment outcomes. Unfortunately, its sensitivity and specificity for early-stage are very reduced (GOONETILLEKE and SIRIWARDENA, 2007). Problems with the lack of this antigen in some patients, as well as changed higher levels induced by cholestasis, make this method inadequate to be used in screening (DUFFY *et al.*, 2010). Consequently, there is a need to find other biomarkers that are able to screen PC at an early stage because 90% of all PC cases are sporadic no hereditary and therefore difficult to predict (NITSCHKE *et al.*, 2011).

2.4. Traditional therapies and promising tailored treatment options

Embracing treatments for cancer consists of a combination of chemotherapeutic agents, surgery, and radiotherapy (ZHANG *et al.*, 2019).

In PC, treatments include the use of Gemcitabine (GEM) as first-line treatment. GEM can be used in monotherapy or in combination with another drug, for unresectable or metastatic PC. Mostly common associations are GEM plus ABAXANE or GEM plus FOLFIRINOX. ABAXANE can be also known as nab-Paclitaxel or albumin-bound paclitaxel. FOLFIRINOX is a combination of different types of drugs, used as a therapeutical protocol known as the mixture of leucovorin, 5-fluorouracil, irinotecan and oxaliplatin (HILL and CHUNG, 2020).

However, the outcomes for treatments with GEM are very poor and the survival rates are less than 9 months for monotherapy and between 10 to 11 months, for chemotherapy combinations. Due to this, it is extremely important to find new therapeutic options that create positive responses to treatments in order to achieve satisfactory results and increase patient's life expectancy once diagnosed with the disease (GIAMPIERI *et al.*, 2019).

50 to 80% of tumour volume in PC is due to the abundant stromal reaction around islands of cancer cells (APTE *et al.*, 2015). Pancreatic stellate cells (PSCs), when activated, are responsible for the production of this collagenous stroma (APTE *et al.*, 2004). Dense stroma is formed by fibroblasts, collagen, matrix proteins and hyaluronic acid that together form a barrier and impede the delivery of therapeutic agents (HILL and CHUNG, 2020) For this reason, in recent years, stroma targeting, key signalling pathways targeting, immunotherapy, cancer metabolism targeting, stem cell therapy and nanotechnology have all been considered achievable approaches for the interruption of cancer progression and metastasis (ANSARI *et al.*, 2016). Other attempts, such as integrating precision medicine, have also been made and study genetic alterations (HILL and CHUNG, 2020) specifically with the use of nanotechnology and tailored treatments.

3. Exosomes

3.1. Definition and function of exosomes

Exosomes are considered a subtype of extracellular vesicles (EVs) along with microvesicles and apoptotic bodies.

Exosomes, with a size between 40-100 nm in diameter, are the smallest of all the EVs and are acquired from endosomes. Microvesicles (100-500 nm in diameter) bud from the plasma membrane of the cells, while apoptotic vesicles or bodies are formed by cells that have died and are considered the biggest of the three groups (with a size from 500 to 1000 nm in diameter) (BATRAKOVA and KIM, 2015).

Exosomes were first described in the '80s in reticulocytes when releasing transferrin receptors via small vesicles (JOHNSTONE *et al.*, 1984). For a long time, they were thought to be “waste bags” of cells that removed excess or unnecessary membrane proteins, as well as other components, in order to keep the cell’s homeostasis. However, in the last decades, these small vesicles have been arousing interest in the scientific community, thanks to their ability to determine intracellular regulatory processes of the cells with which they interact.

These small vesicles can induce cellular immune responses and act as mediators in cell-to-cell communication (GIAMPIERI *et al.*, 2019) because they contain proteins, RNA, DNA, and lipids that are crucial for this contact (BATRAKOVA and KIM, 2015). They can also interact with targeted peptides, antibodies, and other biomolecules (YONG *et al.*, 2019) to deliver therapeutics in cancer treatments or to change the cell’s phenotype.

Exosomes represent a mechanism for the paracrine-autocrine regulation and have a very characteristic and particular size and structure, with an aqueous core and rich lipid bilayer surface structure.

Besides, exosomes can present an enormous heterogeneity, often reflected on their composition, size, and impact on recipient cells and even in their cellular origin, that can dictate different exosome's phenotype. Therefore, they can be considered vectors of particular interest in new therapeutical investigation methods for a massive number of diseases due to their capacity to interact with other extracellular environments and consequently deliver cargoes or changing cell's function. However, their effects on cells can diverge. They can induce cell survival, apoptosis, and immunomodulation according to their cell surface receptors or uptake by certain cells types (TRAN *et al.*, 2019; BATRAKOVA and KIM, 2015).

3.2. Biogenesis of exosomes

Originated from the late endosomal compartment, exosomes are formed by a double invagination of the plasma membrane, resulting in the formation of multivesicular bodies (MVBs) which contain intraluminal vesicles (ILVs). These latter are then released as exosomes due to the fusion of MVBs with the plasma membrane (PM) and exocytosis (TRAN *et al.*, 2019).

The initial step in the formation of these exosomes is the first invagination of the plasma membrane, including cell-surface and soluble proteins from the extracellular surroundings, resulting in the formation of an early-sorting endosome (ESE). ESE give rise to late-sorting endosomes (LSEs) that consequently form MVBs (due to the accumulation of cargoes inside the endosome), through the endocytosis of the endosomal limiting membrane, resulting in a second invagination process. These MVBs can then follow two pathways: fuse with autophagosomes or (directly) with lysosomes and consequently be destroyed (notwithstanding, these degradation products can be recycled by the cells); or they can be transported, across cytoskeletal and microtubules and fuse with the plasma membrane, releasing the ILVS as exosomes.

Many proteins are connected with exosomes biogenesis. These proteins include the Rab proteins from the family of the guanosine triphosphatases (GTPases), such as Rab 35, Rab 11, Rab 27a and Rab27b; ESCRT proteins; CD9, CD81, CD63; as well as flotillin and annexins.

Rab 27a and Rab 27b GTPases, seem to be involved in the binding of MVBs to the plasma membrane (OSTROWSKI *et al.*, 2010). ESCRT, standing for "endosomal sorting complexes

required for transport,” is a group of cytosolic protein complexes involved in the inside budding of the early endosomal membrane and cellular contents into exosomes. However, in many cases, it has been proven that the formation of vesicles can also be due to ESCRT-independent mechanisms (SCHMIDT and TEIS, 2012; WOLLERT and HURLEY, 2010).

The sphingolipid, ceramide and tetraspanin CD63 can be involved in the formation of ILVs, as well (TRAJKOVIC *et al.*, 2008; COLOMBO *et al.*, 2013).

Exosomes are secreted in the extracellular matrix of cells, tissues and biological fluids. They are secreted by different types of cells, but especially by macrophages, B and T cells, dendritic cells, mesenchymal stem cells, or even by epithelial and endothelial cells (BATRAKOVA and KIM, 2015). In biological fluids, they can be found in blood, urine, amniotic fluid, cerebrospinal fluid, breast milk, lymph, bile, saliva, and pancreatic juice (AQIL *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2019).

Recent studies were even able to prove that MVBs can be found in plants (REGENTE *et al.*, 2012), with exosome-like nanoparticles being isolated from compressed grapes (JU *et al.*, 2013).

3.3. Composition of exosomes

Exosomes can be defined according to their size, protein, and lipid content (BATRAKOVA and KIM, 2015). Exosomes can contain different types of cell surface proteins, intracellular proteins, RNA, DNA, amino acids, and metabolites.

Their arrangement comes from their cell of origin. For example, the lipid structure on the membrane depends on the parent cell plasma membrane, and the intraluminal composition depends on their parent cytoplasmatic composition. Therefore, it is possible to have different exosomes that originate from distinct cells (THÉRY *et al.*, 2009).

Exosomes present an aqueous core and an extremely rich lipid bilayer surface structure that allows them to load both hydrophilic and lipophilic agents. Their rich lipid bilayer surface structure consists of fatty acids (mostly saturated or monounsaturated), high concentration of cholesterol, sphingomyelin, ceramides (hexosylceramides) and many others lipids.

On their surface, it is possible to find a diverse and varied range of proteins, with the majority being adhesion molecules. Cell adhesion proteins are tetraspanins (CD9, CD63, CD81 and CD 82) and $\alpha\beta$ integrins (**Figure 2**). These transmembrane proteins and vector ligands can also be surface markers characteristic of the presence of exosomes, and determine the interaction between exosomes and the recipient cells. Immunoregulator molecules, and antigen presentation proteins, such as the major histocompatibility complex (MHC) or CD86 receptor, also take part in immune specific responses derived from T-cells.

Flotillin and annexin take part in the transport and fusion functions of exosomes (TRAN *et al.*, 2019; BATRAKOVA and KIM, 2015). In the intraluminal space, is possible to find nucleic acids (mRNA, miRNA, dsDNA, ssDNA, viral DNA), cytoskeletal proteins (such as actin and tubulin), heat shock proteins (specifically HSP 70 and HSP 90), Rab GTPases, amino acids, metabolites and enzymes, and many others types of constituents.

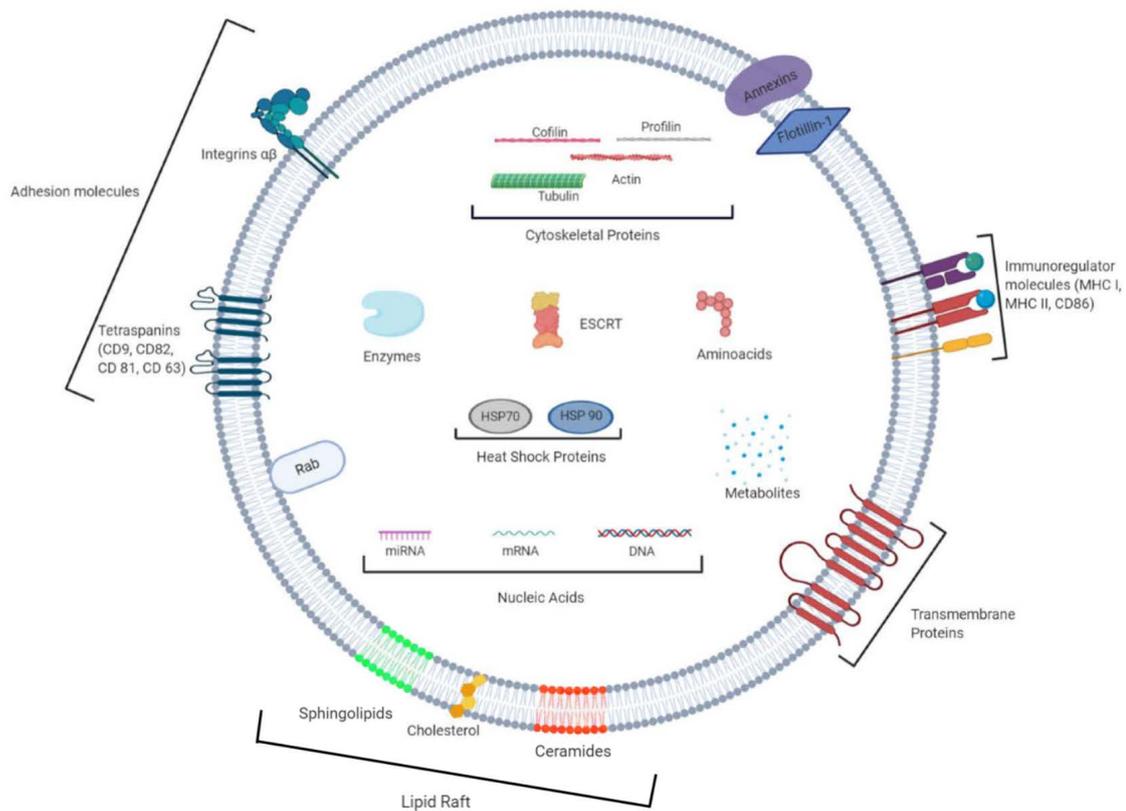


Figure 2 – Structure and composition of an exosome. Exosomes are formed by a rich lipid raft structure (including sphingolipids, cholesterol and ceramides). They do present an aqueous core that allows them to load diverse agents, hydrophilic or lipophilic, such as nucleic acids, aminoacids, enzymes and metabolites. On the surface they even have adhesion and immunoregulator molecules, as well as transmembrane proteins, that allow a connection and interaction with other molecules. Annexins and flotillin-I help in this process too.

3.4. Exosomes intercellular communication

The process of internalization of exosomes is a very energy-dependent process, with studies proving that when cells are incubated at lower temperatures, they have a lesser capacity for internalizing exosomes (FRANZEN *et al.*, 2014).

Exosomes can enter into the receiving cells mostly due to endocytosis processes (COMMISSO *et al.*, 2013). These processes allow exosomes to enter as a whole into the cells (clathrin-dependent or caveolae dependent endocytosis; macropinocytosis;

phagocytosis or through interference with lipid rafts stability of receptor-cells) (MULCAHY *et al.*, 2014). They are also able to fuse with the PM, through direct fusion, and release their content (PAROLINI *et al.*, 2009). It is even possible for them to interfere with intracellular signalling pathways through activating or inactivating them, by binding to receptors on the surface of receiving cells.

3.5. Potential of exosomes in disease treatment

Exosomes are generated by the human body, making them a perfect tool to be used in the treatment of several pathologies, such as Parkinson's or Alzheimer's, in the central nervous system (CNS). They are small and able to cross the blood-brain barrier, allowing drugs to arrive at the central nervous system and brain. For example, in Alzheimer's disease, exosomes induce amyloid- β peptide degradation (acting as "waste bags") in discarding proteins that are no longer useful for the cells. Also, given that they contain miRNAs, they can help with cell differentiation into neurons, interfering with the activity of the brain (RUFINO-RAMOS *et al.*, 2017). In cardiovascular diseases, (LAI *et al.*, 2010) through miRNAs transfer, cells can segregate exosomes that assist in cardiovascular repair by reducing myocardial ischemia, in mouse and pig models.

Through RNA transfection and anti-tumour drug loading, specific types of cancer can be targeted and treated as well as malignancies and metastasis. Overall, the biological function of exosomes depends on their formation and their cargoes, and it can vary depending on the environment in which they are located.

However, in some cases, exosomes can derive from tumour cells and contribute to progressing cancer by interfering with their normal function (ZHANG *et al.*, 2019). Therefore, the blocking of exosome secretion is also considered a strategy for the treatment of cancer.

In the next chapters, this work intends to just focus on using exosomes as delivering systems, for instance, for anti-cancer drugs and other molecules.

4. Exosomes and Pancreatic Cancer

Thanks to their characteristic size and structure, exosomes have been developed as a new therapeutic solution for many of today's diseases like cancer. Indeed, exosomes can be used as biological delivery systems thanks to their capacity to merge with other cells. Inside of the exosomes, nucleic acids, innovative drugs, and diverse molecules can be introduced and released at the moment of fusion.

Exosomes can be considered as "ideal" drug delivery systems (DDSs) since they present a safe and efficient complex when set side by side with other synthetic nanoparticles. They have a long circulation half-life, intrinsic ability to target tissues, low toxicity, low immunogenicity, biocompatibility, and seem to be capable of providing stability to drugs (AQIL *et al.*, 2019; YONG *et al.*, 2019). Another advantage is their facility to target the cell type from where they were produced (TRAN *et al.*, 2019).

However, there are several challenges associated with the use of exosomes, such as dilemmas associated with the choice of the cell of origin, large-scale production, high costs, and potential toxicity (even if they seem to present minimal or inherent toxicity) of these delivering systems (AQIL *et al.*, 2019). Moreover, in many types of cancers, this targeting is impossible as receptors differ due to the genetic and phenotypic heterogeneity of tumours (YONG *et al.*, 2019).

4.1. Exosomes as carriers for cancer therapy - Design and production of exosomes as anti-oncogenic drug delivering systems

Figure 3 is represented as a schematic approach to a strategy for cancer treatment (WAHLGREN *et al.*, 2012; KAMERKAR *et al.*, 2017).

By using specific healthy donor cells isolated from the patient, is possible to manipulate them to origin bioengineered exosomes. These exosomes can carry molecules such as drugs, tumour antigens, targeting ligands, and genetic material that can be subsequently administrated to patients' tumour cells as a vaccine.

Therefore, two main steps need to be taken into account: (1) isolation and purification of the exosomes and (2) incorporation of therapeutic agents into the exosomes.

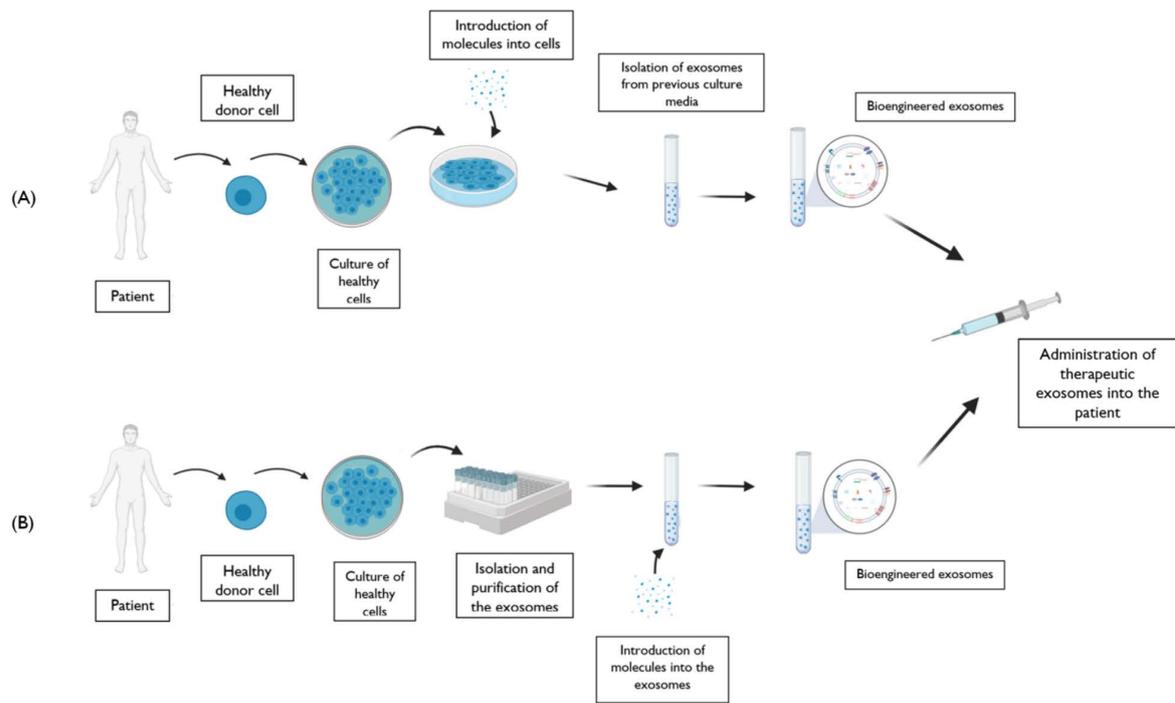


Figure 3 – Strategy for cancer treatment using exosomes. There are two distinctive strategies to produce therapeutic exosomes as shown above. In patient (A) a healthy cell is collected from the patient and replicated in an appropriate cell culture medium. The potential molecules to play a role (antigens, target molecules, miRNA and siRNA) can be introduced, *a priori*, in the cell culture medium with the possibility to originate several exosomes, already charged and ready to release the cargoes. In patient (B), naive exosomes are isolated from the culture, originated from the patient healthy cell. *A posteriori*, the naive exosomes are then loaded with the different types of molecules, and consequently ready to start performing their function.

4.1.1. Isolation and purification of exosomes

Among certain techniques that can be used to isolate exosomes, three of the most important are: ultracentrifugation, immunoaffinity isolation (also known as immunoisolation) and ultrafiltration (**Table II**) (TAURO *et al.*, 2012). However, the classic and *golden standard* of exosome's isolation seems to be the ultracentrifugation technique.

Ultracentrifugation technique is based on exosomes' precipitation through high g-forces. Steps involve multiple centrifugations with the goal to separate the living cells, precipitate the dead cells, eliminate the cell debris and obtain the exosomes after washing the pellets with a buffer solution such as phosphate-buffered saline (PBS) (THÉRY *et al.*, 2006; TAYLOR and SHAH, 2015).

Immunoaffinity isolation, or immunoisolation, is a selective method that requires a connection between antibodies and specific marker proteins present on the surface of exosomes, which consequently, separates exosomes from other types of molecules (CLAYTON *et al.*, 2001). Although this method requires just a small quantity of samples, it is

not very attractive for clinical applications since the isolation takes place at a very small scale. Moreover, it is only able to isolate a specific subclass of exosomes that have affinity for the exact biomarker (TAYLOR and SHAH, 2015).

Finally, exosomes can even be isolated according to their size. For that, a fast and fully automated protocol (HEINEMANN *et al.*, 2014) based on sequential filtration can be followed. Ultrafiltration appears to be more productive than ultracentrifugation and able to be combined with other approaches such as size exclusion chromatography (SEC) (NORDIN *et al.*, 2015).

4.1.2. Incorporation of therapeutic agents into exosomes

4.1.2.1. Loading of molecules into cells

Exosomes can be loaded with diverse molecules in two different ways: before or after their isolation.

When exosomes are loaded before their isolation (as shown at the top of **Figure 3** in A) small molecules or different types of RNA, can be loaded into the donor culture cells from which exosomes are derived. Two very well known techniques for this are the transfection-based technique and co-incubation (usually at 37°C) (BATRAKOVA and KIM, 2015).

Transfection is frequently used when loading small RNAs (miRNA or siRNA) into the cells. These small RNAs can be introduced directly (AKAO *et al.*, 2011) into the cells or with a vector able to induce miRNA or siRNA expression in targeted cells (KOSAKA *et al.*, 2010).

Another technique is co-incubation. Co-incubation is characterized by submitting certain types of molecules or chemotherapeutic compounds (e.g. paclitaxel) in confined contact with cells, originating cell-derived exosomes already loaded and ready to release these cargoes. Its most important advantage is the strong capacity to charge both hydrophilic and hydrophobic compounds. Ultraviolet light treatment contemporaneously proved to be efficient and able to induce apoptosis of the cells, originating higher volumes of release drug-loaded exosomes (PASCUCCI *et al.*, 2014).

4.1.2.2. Loading of molecules into exosomes

Besides the methods for loading molecules before exosomes' secretion, it is also possible to perform different techniques after their isolation (as shown at the bottom of **Figure 3** in B). The two most important methods are direct mixing and electroporation (e.g., using the Gene Pulser Xcell® [Bio Rad, Hercules, CA] electroporation system) (AQIL *et al.*, 2019) however, there are other methods.

Probably one of the simplest, and most useful methods to load hydrophobic substances (FUHRMANN *et al.*, 2015) into exosomes is direct mixing. This technique is usually distinguished by two stages: incubation (usually at 22°C) followed by centrifugation, between 1.5 hours to 2 hours. According to recent studies, exosomes have proven to be able to be incubated with certain solutions of substances, such as curcumin or paclitaxel (PTX) (SAARI *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2010), increasing *in vivo* and *in vitro* performances. Studies show that direct mixing seems to be easier to handle when compared to co-incubation (FUHRMANN *et al.*, 2015).

Another method is the use of an electroporation system. By using short and low-voltage pulses, pores can be created on the surface of the exosome's membrane allowing substances, such as small RNA or other hydrophilic compounds to get into the lipid bilayer membrane. Otherwise, this entry would not be possible. This technique has proven to be very useful for the incorporation of siRNA (GILLIGAN and DWYER, 2017; ALVAREZ-ERVITI *et al.*, 2011) however, studies have also proven that siRNA, as well as exosomes, can aggregate (KOOIJMANS *et al.*, 2013). Therefore, extra care must be taken, as well as the likely use of a membrane stabilizer, that has proven to be effective against aggregation (HOOD *et al.*, 2014).

Other methods like sonication (through the use of ultrasonic waves), saponin-treatment (or other detergent-like molecules), freeze-thaw cycles, and extrusion (passing EVs and substances through filters with decreasing pore sizes), have proven to be potential techniques for drug loading (HANEY *et al.*, 2015). However, more studies are needed to select the most relevant and convenient method.

Table II, shown at the end of this paper, provides an overview of the different techniques used for exosomes' isolation and loading as well as a comparison between them.

4.2. Types of molecules that can be loaded into exosomes

Studies have found that many constituents can be uploaded into exosomes, showing higher or lower therapy efficiency according to the cargoes loaded. This list may include the upload of small RNA, mRNA or DNA, proteins, small molecules, antibodies, metabolites and chemotherapeutics.

Genetic material, such as small RNA or non-coding RNA (miRNA or siRNA), can be charged into exosomes and delivered to the cells (EL ANDALOUSSI *et al.*, 2013), making them the number one of the most promising and studied therapies for the future. They can bind to a specific mRNA and cause mRNA degradation or protein translation repression, causing gene silencing. This last approach is specifically useful in many tumours when oncogenes are overexpressed (ELBASHIR *et al.*, 2001).

miRNAs are small single-strand RNAs that can have from 18 to 25 nucleotides, which can bind to the 3'UTR region (SHANG *et al.*, 2019) of complementary sequences of mRNA, causing translational repression or cleavage degradation. They can silence gene expression interfering with proto-oncogenes expression or increase tumour-suppressor genes expression by overexpressing certain miRNAs (HALKOVA *et al.*, 2015).

siRNAs (short interfering RNA), with 20 to 25 base pairs, are becoming innovative therapeutic delivery approaches for various diseases when loaded against specific mutated genes like the, *kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS)* or the *vascular endothelial growth factor (VEGF)*, the *epidermal growth factor receptor (EGFR)*, the *serine/ threonine-protein kinase B (AKT)* and even the *mitogen-activated protein kinase (MAPK)*.

Most of these mutated genes are implied in the development of different types of cancers and recent studies have shown that siRNA, delivered through milk exosomes, can silence key oncogenes in diverse types of cancers *in vitro*. Milk exosomes have proven to be good vehicles in harsh conditions and stable at a low pH of gastric conditions (AQIL *et al.*, 2019).

Beyond genetic material, other kinds of molecules, like small molecules and proteins that are reported to be efficient include, cytoskeletal proteins, transmembrane proteins and chemotherapeutic drugs (gemcitabine, doxorubicin or paclitaxel). The most interesting fact is that, when included in exosomes, the majority of these substances has proven to be more efficient rather than when acting alone. Accordingly, doxorubicin is a chemotherapeutic drug that has proven to be more efficient inside exosomes (ExoDOX), rather than alone. ExoDOX demonstrated a higher stability and accumulation in the tumour when more concentrated (HADLA *et al.*, 2016).

Incorporation of these drugs into exosomes can be a way to enhance circulation time and to confer protection against degradation.

Alvarez-Erviti *et al.* proved that siRNA, when incorporated in exosomes, could achieve higher percentages of effective therapies in the CNS as opposed to when it is not, included in EVs (ALVAREZ-ERVITI *et al.*, 2011). Encapsulated curcumin (SUN *et al.*, 2010) was also described to have a stronger anti-inflammatory action than when just by itself.

Thus, exosomes can exert function autonomously through mechanisms of secretion, signalling, and communication, or by acting as carriers of payloads.

5. Responses induced by therapeutical exosomes in Pancreatic Cancer

5.1. Immunomodulatory therapy

Exosomes can be collected from body fluids or originated from cells.

So far, mesenchymal stem cells (MSCs), and immature dendritic cells (DCs) are favourable exosome donor cells isolated from the patient (**Figure 3**). Another alternative can be the acquisition and purchase of different types of cell lines like HeLa and HEK-293, and murine melanoma cell lines (AQIL *et al.*, 2019).

These cells can be managed *in vitro* to target specific PC cells and to produce specific immune responses. For example, by putting DC in contact with cancer peptides, *in vitro*, it is possible to originate DC-derived exosomes that can present tumour antigens via MHC (**Figure 2**). MHC I presents antigens to CD8/ CTL and the MHCII presents antigens to CD4/ T helper cells, correspondently. Consequently, effector T cells and NK cells are activated, generating cytotoxic responses into the tumour (VIAUD *et al.*, 2009; PITT *et al.*, 2014).

Another study exposed the importance of the carrying and releasing function of HSP in the activation of T cell responses (CHEN *et al.*, 2006). The above studies confirm the direct stimulation of the immune system by exosomes.

Meanwhile, additional studies about T cell proliferation and activation have been made by HOSSEINI *et al.* using exosome - *staphylococcal enterotoxin B*. *Staphylococcal enterotoxin B* (SEB) is a potent antigen that has demonstrated the capacity to regulate T cells recruitment and simultaneously activate certain apoptotic pathways, namely, the Fas-mediated apoptotic pathway (HOSSEINI *et al.*, 2014).

However, exosomes can follow a different direction and present these tumour antigens to DC cells, the primordial antigen-presenting cells (APCs) (YIN *et al.*, 2014), following an indirect stimulation of the immune system and inducing primary immune responses against tumour-associated antigens. Through the maturation of DC cells, lymphocyte proliferation is promoted and high levels of INF γ (interferon γ) and ILs (interleukins, IL 2 and IL 10), are released, which once again, promotes the apoptosis of tumour cells and recruitment of other immune system cells.

However, clinical trials involving these therapies many times fail due to the tumoral environment in PC (BATRAKOVA and KIM, 2015). Tumour cells are not very immunogenic and the tumoral environment is composed by a dense stroma (characterized by collagen, matrix proteins and fibroblasts), surrounded by an

overwhelming immunosuppressive background, difficulting the development of effective anti-cancer immunotherapy drugs (MOFFITT *et al.*, 2015; GORE and KORC, 2014). Therefore, to be able to enhance an antitumour immune response and prevent metastasis, the combination of immunostimulants (such as vaccines, represented in **Figure 3**) with inhibitors of the immunosuppressive environment could be a solution (XIAO *et al.*, 2017).

Hence, strategies for immunotherapy can be based in active immunization through the development of cancer vaccines (**Figure 3**), the indirect stimulation of the immune system, and the combining of previously activated T-cells (by exosomes), with passive immunization, such as monoclonal antibodies. For instance, catumaxomab combined with activated T-cells has proved to be able to eradicate pancreatic cancer stem cells (UMEBAYASHI *et al.*, 2014).

5.2. Intracellular signalling pathways interference

A certain number of mutations are overexpressed in PC, which can interfere with the normal signalling and function of pancreatic stem cells and, lead to several diverse pathways that can sustain, tumour growth.

In 2008, 24 different PC cancers were discovered, containing 63 different somatic genetic mutations (JONES *et al.*, 2008). Tumour suppressor genes like *TP53*, *SMAD4* and *CDKN2A* seem to be mutated in at least 50% of PC patients, leading to a loss of apoptosis response (WADDELL *et al.*, 2015).

KRAS is a predominant proto-oncogene in PC that, once mutated, can promote cell proliferation and activate transcription factors, leading to uncontrolled cell division growth. This gene is mutated in 90% of PC patients (BAILEY *et al.*, 2016) and consists on the substitution of a glycine residue by an aspartate, in codon 12 (*KRAS^{G12D}*) (KHVALEVSKY *et al.*, 2013). EGFR overexpression seems to be interconnected with *KRAS^{G12D}* and is responsible for cancer metastases (ARDITO *et al.*, 2012).

The transforming growth factor- β (TGF- β) is another signalling pathway involved in PC proliferation and metastasis associated with high levels of TGF- β in the tumour tissues and serum (DING *et al.*, 2019). *SMAD3* plays a significant role in the TGF- β -mediated EMT (epithelial-mesenchymal transition), acting as an intracellular direct mediator (YAMAZAKI *et al.*, 2014).

Therefore, approaches have been made in an attempt to find new strategies to inhibit these pathways. Exosomes derived from purified human foreskin fibroblasts cultures and expressing shRNA or siRNA (si*KRAS^{G12D}* iExo) were tested by KAMERKAR *et al.* to target

the specific oncogenic *KRAS*. They were proven to reduce metastasis in mouse models and decrease *KRAS*^{G12D} mRNA levels in human PANC-1 cells, with exosomes' entry into PC cells being favoured when associated with macropinocytosis (KAMERKAR *et al.*, 2017).

Further advances were made through the use of human umbilical cord mesenchymal stromal cells (hucMSCs) derived exosomes when loaded with miR-145-5P (145-exo).

miR-145-5P is a tumour suppressor found to be downregulated in PC, and it is thought to be extremely important in PC since it targets the expression of *SMAD3* and consequently the activation of the TGF- β pathway. To prove this, DING *et al.* studied the influence of engineered exosomes, expressing miR-145-5P, when injected via intratumoral injection in mice models. The results of this study were analysed using quantitative real-time PCR, showing an inverse correlation between miR-145-5P levels and *SMAD3* expression, proving that 145-exo are able to deliver miR-145-5P through endocytosis *in vitro* and *in vivo* models, decreasing tumour growth (DING *et al.*, 2019).

Drug efflux and chemoresistance can be adjusted using miRNA delivery. In addition, creating or forcing exosomes to express characteristic miRNAs is another possibility to change phenotypes. For example, tumour-associated macrophages (TAMs) change in phenotype from an M1 to an M2 form is a mechanism from which tumour cells can escape to the immune system. Through exosomes' delivery of specific miR-155 and miR-125b-2, it is possible to reprogramme these TAMs back to an M1 form (anti-tumour phenotype) able to show an immunosuppressive function (SU *et al.*, 2016).

5.3. Tumour decreasing growth and antitumour effects

Exosome-mediated delivery of anti-cancer drugs, such as chemotherapeutics like GEM or PTX, has been proven to be more effective and have the least cardiotoxicity when included in exosomes. In fact, when comparing exosomes with liposomes of the same size, their capacity to spot cancer cells is around 10x higher, mostly due to ligand-receptor interactions (SMYTH *et al.*, 2014).

Also, in some cases, it was proven that when anti-cancer drugs are included in exosomes, higher cellular uptake, higher half-life times and higher bioavailability were detected (LI *et al.*, 2020).

GEM is nowadays being used as the number one first-line chemotherapeutic agent against PC. Autologous exosomes loaded with gemcitabine (ExoGEM) were developed to overcome the difficulties induced by the side effects at the systemic level (LI *et al.*, 2020) caused by GEM administration and chemoresistance mechanisms. When compared to gemcitabine alone, researchers were able to identify an increased apoptosis of tumour cells (KHAN *et al.*,

2011). Additionally, the injection of ExoGEM proved to be more specific than isolated GEM, targeting the drug to specific tumour sites without affecting normal tissues (LI *et al.*, 2020).

PASCUCCI *et al.* proved that by using exosomes originated by mesenchymal stromal cells, through the co-incubation drug loading method, PTX could be delivered by EVs, inhibiting the growth of cancerous tumour cells. The study proved that when PTX was released, it was able to reduce by 50% tumour growth, *in vivo*, and avoid PDAC proliferation. They also proved that exosomes, when compared with other nanoparticles, fused more easily with the plasma membrane of cancer cells (PASCUCCI *et al.*, 2014).

Furthermore, apart from chemotherapeutics, other compounds have been showing potential in fighting pancreatic cancer cells. For example, curcumin or diferuloylmethane, has started to spark interest within the scientific community thanks to its anticarcinogenic, anti-inflammatory, and antioxidant properties (MA *et al.*, 2014). Curcumin can be found in nature, such as on the rhizome of *Curcuma longa* (BIMONTE *et al.*, 2013), and studies *in vivo* and *in vitro* have discovered its pro-apoptotic action, and even synergistic effect when associated with GEM (DEVASSY *et al.*, 2015).

OSTERMAN *et al.* studied curcumin's effect and distribution with the aid of exosomal transportation from one cell to another. Results found that curcumin was able to up-regulate tumour suppressor genes, like *TP53*, and down-regulate oncogenes, which consequently downregulates transcription factors involved in PC progression by signalling pathways (OSTERMAN *et al.*, 2015). The reduction of the inhibitors of apoptosis was later verified.

Other studies also indicate that curcumin can play another role in the inhibition of miRNAs expression (TSAI *et al.*, 2015) and in the cytokines and enzymes released.

When delivered in exosomes, curcumin proved to be non-toxic, safe, and around 3x more capable to reduce inflammation rather than when on its own. Additionally, when delivered by exosomes, the solubility, stability and bioavailability of curcumin were increased and protected mice from autoimmune reactions, like LPS - induced septic shock (SUN *et al.*, 2010).

6. Future perspectives for Pancreatic Cancer treatment

Nowadays, pancreatic cancer still remains one of the most defiant and discouraging diseases that the world has ever seen.

Although more efforts and additional studies are needed, exosomes are starting to become a reality as targeted therapeutics and drug delivery systems, not only for cancers but also for neurodegenerative disorders. All of this, thanks to molecular and nano-engineering advances in precision medicine (TRAN *et al.*, 2019) that helps the scientific community to understand and develop better treatment opportunities in the future.

In recent decades, scientists have exhaustively studied ways to increase exosome's half-life in the bloodstream. For example, phosphatidylserine, an important phospholipid present on the exosome's surface, seems to be an "eat me signal" involved in phagocytosis processes, which increases the clearance of exosomes (ZHANG *et al.*, 2019). Therefore, scientific researchers like Kamerkar *et al.* demonstrated that exosomes, which expressed CD47 on their surface, would give a regulatory-mediated signal, avoiding clearance by the mononuclear phagocyte system (MPS) and allowing higher retention times in the circulation, as well as an higher efficiency (KAMERKAR *et al.*, 2017).

However, there seem to be other challenges that require particular attention. In the future, strategies to produce EVs more affordably will be needed, as well as loading cargoes with maximum safety, even if that means modifying the membrane (ZHANG *et al.*, 2019). Additionally, the lack of advanced techniques to purify exosomes with a high level of efficiency (TRAN *et al.*, 2019), impose further refinement in their isolation methods (MATHIEU *et al.*, 2019). Nevertheless, new animal models for the study of PC have been arising, namely zebrafish models (VERWEIJ *et al.*, 2019), *Drosophila*, *C.elegans* (BEER and WEHMAN, 2017) and *Xenopus* (DANILCHIK and TUMARKIN, 2017).

With more research, molecular and precise medicine can be applied in pancreatic cancer patients, according to their molecular profiling. At least 25% of patients, with the help of the the "Know Your Tumour Program" can discover their genomic profile, facilitating the development of targeted therapies to those specific mutations (PISHVAIAN *et al.*, 2018).

All of these approaches have shown that the use of exosomes in PC treatment is no longer an idea, but rather, a reality.

7. References

- AKAO, Y., IIO, A., ITOH, T., NOGUCHI, S., ITOH, Y., OHTSUKI, Y., NAOE, T. – **Microvesicle-mediated RNA molecule delivery system using monocytes/macrophages.** *Molecular Therapy*. 19 (2011) 395–399.
- ALVAREZ-ERVITI, L., SEOW, Y., YIN, H., BETTS, C., LAKHAL, S., WOOD, M. J.A. – **Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes.** *Nature Biotechnology*. 29 (2011) 341–345.
- EL ANDALOUSSI, S., MÄGER, I., BREAKFIELD, X.O., WOOD, M. J.A. – **Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities.** *Nature Reviews Drug Discovery*. 12 (2013) 347–357.
- ANSARI, D., TINGSTEDT, B., ANDERSSON, B., HOLMQUIST F., STURESSON C., WILLIAMSSON C., SASOR A., BORG, D., BAUDEN, M., ANDERSSON R. – **Pancreatic cancer: Yesterday, today and tomorrow.** *Future Oncology*. 12 (2016) 1929–1946.
- APTE, M. V., PARK, S., PHILLIPS, P.A., SANTUCCI, N., GOLDSTEIN, D., KUMAR, R.K., RAMM, G.A., BUCHLER, M., FRIESS, H., MCCARROL, J.A., KEOGH, G., MERRETT, N., PIROLA, R., WILSON, J.S. – **Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: Role of pancreatic stellate cells.** *Pancreas*. 29 (2004) 179–187.
- APTE, M. V., XU, Z., POTHULA, S., GOLDSTEIN, D., PIROLA, R.C., WILSON, J.S. – **Pancreatic cancer: The microenvironment needs attention too!** *Pancreatology*. 15 (2015) 32–38.
- AQIL, F., MUNAGALA, R., JEYABALAN, J., AGRAWAL, A.K., KYAKULAGA, A., WILCHER, S.A., GUPTA, R.C. – **Milk exosomes - Natural nanoparticles for siRNA delivery.** *Cancer Letters*. 449 (2019) 186–195.
- ARDITO, C. M., GRUNER, B. M., TAKEUCHI, K. K., LUBESADER-MARTELLATO, C., TEICHMANN, N., MAZUR, P.K., DEL GIORNO, K.E., CARPENTER, E.S., HALBROOK, C.J., HALL, J.C., PAL, D., BRIEL, T., HERNER, A., TRAJKOVIC-ARSIC, M., SIPOS, B., LIOU, G.Y., STORZ, P., MURRAY, N.R., THREADGILL, D.W., SIBILIA, M., WASHINGTON, M.K., WILSON, C.L., SCHMID, R.M., RAINES, E.W., CRAWFORD, H.C., SIVEKE, J.T. – **EGF Receptor Is Required for KRAS-Induced Pancreatic Tumorigenesis.** *Cancer Cell*. 22 (2012), 304–317.
- ARTINYAN, A., ANAYA, D.A., MCKENZIE, S., ELLENHORN, J.D.I., KIM, J. – **Neoadjuvant therapy is associated with improved survival in resectable**

pancreatic adenocarcinoma. *Cancer.* 117 (2011) 2044–2049.

BAILEY, P., CHANG, D.K., NONES, K., JOHNS, A.L., PATCH, A.M., GINGRAS, M.C., MILLER, D.K., CHRIST, A.N., BRUXNER, T.J.C., QUINN, M.C., NOURSE, C., MURTAUGH, L.C., HARLIWONG, I., IDRISOGLU, S., MANNING, S., NOURBAKHSH, E., WANI, S., FINK, L., HOLMES, O., CHIN, V., ANDERSON, M.J., KAZAKOFF, S., LEONARD, C., NEWELL, F., WADDEL, N., WOOD, S., XU, Q., WILSON, P.J., CLOONAN, N., KASSAHN, K.S., TAYLOR, D., QUEK, K., ROBERTSON, A., PANTANO, L., MINCARELLI, L., SANCHEZ, L. N., EVERS, L., WU, J., PINESE, M., COWLEY, M.J., JONES, M.D., COLVIN, E.K., NAGRIAL, A.M., HUMPHREY, E.S., CHANTRILL, L.A., MAWSON, A., HUMPHRIS, J., CHOU, A., PAJIC, M., SCARLETT, C.J., PINHO, A.V., GIRY-LATERRIERE, M., ROOMAN, I., SAMRA, J.S., KENCH, J.G., LOVELL, J.A., MERRETT, N.D., TOON, C.W., EPARI, K., NGUYEN, N.Q., BARBOUR, A., ZEPS, N., MORAN-JONES, K., JAMIESON, N.B., GRAHAM, J.S., DUTHIE, F., OIEN, K., HAIR, J., GRÜTZMANN, R., MAITRA, A., IACOBUZIO-DONAHUE, C.A., WOLFGANG, C.L., MORGAN, R.A., LAWLOR, R.T., CORBO, V., BASSI, C., RUSEV, B., CAPELLI, P., SALVIA, R., TORTORA, G., MUKHOPADHYAY, D., PETERSEN, G. M., MUNZY, D.M., FISHER, W.E., KARIM, S.A., ESHLEMAN, J.R., HRUBAN, R.H., PILARSKY, C., MORTON, J.P., SANSOM, O.J., SCARPA, A., MUSGROVE, E.A., BAILEY, U.M.H., HOFMANN, O., SUTHERLAND, R.L., WHEELER, D.A., GILL, A.J., GIBBS, R.A., PEARSON, J.V., WADDELL, N., BIANKIN, A.V., GRIMMOND, S.M. – **Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer.** *Nature.* 531 (2016) 47–52.

BATRAKOVA, E. V., KIM, M. S. – **Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery.** *Journal of Controlled Release.* 219 (2015) pp. 396–405.

BECKER, A. E., HERNANDEZ, Y.G., FRUCHT, H., LUCAS, A.L. – **Pancreatic ductal adenocarcinoma: Risk factors, screening, and early detection.** *World Journal of Gastroenterology,* 20 (2014) 11182–11198.

BEER, K. B., WEHMAN, A. M. – **Mechanisms and functions of extracellular vesicle release in vivo - What we can learn from flies and worms.** *Cell Adhesion and Migration.* 11 (2017) 135–150.

BIMONTE, S., BARBIERI, A., PALMA, G., LUCIANO, A., REA, D., ARRA, C. – **Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in an orthotopic mouse model of human pancreatic cancer.** *BioMed Research International.* 2013.

BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., SIEGEL, R.L., TORRE, L.A., JEMAL, A., –

Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 68 (2018) 394–424.

CHEN, W., WANG, J., SHAO, C., LIU, S., YU, Y., WANG, Q., CAO, X. – **Efficient induction of antitumor T cell immunity by exosomes derived from heat-shocked lymphoma cells.** European Journal of Immunology. 36 (2006) 1598–1607.

CLAYTON, A., COURT, J., NAVABI, H., ADAMS, M., MASON, M.D., HOBOT, J.A., NEWMAN, G.R., JASANI, B. – **Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry.** Journal of Immunological Methods. 247 (2001) 163–174.

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

COMMISSO, C., DAVIDSON, S.M., SOYDANER-AZELOGLU, R.G., PARKER, S.J., KAMPHORST, J.J., HACKETT, S., GRABOCKA, E., NOFAL, M., DREBIN, J.A., THOMPSON, C.B., RABINOWITZ, J.D., METALLO, C.M., VANDER HEIDEN, M.G., BAR-SAGI, D. – **Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells.** Nature. 497 (2013) 633–637.

DANILCHIK, M., TUMARKIN, T. – **Exosomal trafficking in Xenopus development.** Genesis. 55 (2017) 1–7.

DEVASSY, J. G., NWACHUKWU, I. D., JONES, P. J. H. – **Curcumin and cancer: Barriers to obtaining a health claim.** Nutrition Reviews. 73 (2015) 155–165.

DING, Y., CAO, F., SUN, H., WANG, Y., LIU, S., WU, Y., CUI, Q., MEI, W., LI, F. – **Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stromal cells deliver exogenous miR-145-5p to inhibit pancreatic ductal adenocarcinoma progression.** Cancer Letters. 442 (2019) 351–361.

DUFFY, M. J., STURGEON, C., LAMERZ, R., HAGLUND, C., HOLUBEC, V.L., KLAPDOR, R., NICOLINI, A., TOPOLCAN, O., HEINEMANN, V. – **Tumor markers in pancreatic cancer: A European Group on Tumor Markers (EGTM) status report.** Annals of Oncology. 21 (2010) 441–447.

ELBASHIR, S. M., LENDECKEL, W., TUSCHL, T. – **RNA interference is mediated by**

21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & Development.* 15 (2001) 188–200.

FRANZEN, C. A., SIMMS, P.E., VAN HUIS, A.F., FOREMAN, K.E., KUO, P.C., GUPTA, G.N. – **Characterization of uptake and internalization of exosomes by bladder cancer cells.** *BioMed Research International.* (2014) 1–11.

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

GIAMPIERI, R., PIVA, F., OCCHIPINTI, G., BITTONI, A., RIGHETTI, A., PAGLIARETTA, S., MURRONE, A., BIANCHI, F., AMANTINI, C., GIULIETTI, M., RICCI, G., PRINCIPATO, G., SANTONI, G., BERARDI, R., CASCINU, S. – **Clinical impact of different exosomes' protein expression in pancreatic ductal carcinoma patients treated with standard first line palliative chemotherapy.** *PLOS ONE.* 14 (2019) 1–17.

GILLIGAN, K. E., DWYER, R. M. – **Engineering exosomes for cancer therapy.** *International Journal of Molecular Sciences.* 18 (2017) 1–12.

GLOBOCAN OBSERVATORY, W. – **Cancer Today - World.** International Agency for Research on Cancer. (2019) 2018–2019. [Accessed 3rd July 2020]. Available at: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>

GOONETILLEKE, K. S., SIRIWARDENA, A. K. – **Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer.** *European Journal of Surgical Oncology.* 33 (2007) 266–270.

GORE, J., KORC, M. – **Pancreatic Cancer Stroma: Friend or Foe?** *Cancer Cell.* 25 (2014) 711–712.

GROOT, V. P., REZAEI, N., WU, W., CAMERON, J.L., FISHMAN, E.K., HRUBAN, R.H., WEISS, M.J., ZHENG, L., WOLFGANG, C.L., HE, J. – **Patterns, Timing, and Predictors of Recurrence Following Pancreatectomy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.** *Annals of Surgery.* 267 (2018) 936–945.

HADLA, M., PALAZZOLO, S., CORONA, G., CALIGIURI, I., CANZONIERI, V., TOFFOLI, G., RIZZOLIO, F. – **Exosomes increase the therapeutic index of doxorubicin in breast and ovarian cancer mouse models.** *Nanomedicine.* 11 (2016) 2431–2441.

HALKOVA, T., CUPERKOVA, R., MINARIK, M., BENESOVA, L. – **MicroRNAs in pancreatic cancer: Involvement in carcinogenesis and potential use for diagnosis and prognosis.** *Gastroenterology Research and Practice.* (2015) 1–11.

- HANAHAH, D., WEINBERG, R. A. – **Hallmarks of cancer: The next generation.** Cell. 144 (2011) 646–674.
- HANEY, M. J., KLYACHKO N.L., ZHAO, Y., GUPTA, R., PLOTNIKOVA, E.G., HE, Z., PATEL, T., PIROYAN, A., SOKOLSKY, M., KABANOV, A.V., BATRAKOVA, E.V. – **Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson’s disease therapy.** Journal of Controlled Release. 207 (2015) 18–30.
- HEINEMANN, M. L., ILMER, M., SILVA, L. P., HAWKE, D. H., RECIO, A., VORONTSOVA M. A., ALT, E., VYKOUKAL, J. – **Benchtop isolation and characterization of functional exosomes by sequential filtration.** Journal of Chromatography A. 1371 (2014) 125–135.
- HEZEL, A. F., KIMMELMAN, A. C., STANGER, B. Z., BARDEESY, N., DEPINHO, R. A. – **Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma.** Genes and Development. 20 (2006) 1218–1249.
- HOOD, J. L., SCOTT, M. J., WICKLINE, S. A. – **Maximizing exosome colloidal stability following electroporation.** Analytical Biochemistry. 448 (2014) 41–49.
- HOSSEINI, H. M., FOOLADI, A. A. I., SOLEIMANIRAD, J., NOURANI, M. R., MAHDAVI, M. – **Exosome/staphylococcal enterotoxin B, an anti tumor compound against pancreatic cancer.** JBUON. 19 (2014) 440–448.
- HRUBAN, R. H., CANTO, M. I., GOGGINS, M., SCHULICK, R., KLEIN, A. P. – **Update on familial pancreatic cancer.** Advances in Surgery. 44 (2010) 293–311.
- ILIC, M., ILIC I. – **Epidemiology of pancreatic cancer.** World Journal of Gastroenterology. 22 (2016) 9694–9705.
- JOHNSTONE, R. M., ADAM, M., PAN, B. T. – **The fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro.** Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology. 62 (1984) 1246–1254.
- JONES, S., ZHANG, X., PARSONS, D.W., LIN, J.C.H., LEARY, R.J., ANGENENDT, P., MANKOO, P., CARTER, H., KAMIYAMA, H., JIMENO, A., HONG, S.M., FU, B., LIN, M.T., CALHOUN, E.S., KAMIYAMA, M., WALTER, K., NIKOLSKAYA, T., NIKOLSKY, Y., HARTIGAN, J., SMITH, D.R., HIDALGO, M., LEACH, S.D., KLEIN, A.P., JAFFEE, E.M., GOGGINS, M., MAITRA, A., IACOBUZIO-DONAHUE, C., ESHLEMAN, J.R., KERN, S.E., HRUBAN, R.H., KARCHIN, R., PAPADOPOULOS, N., PARMIGIANI, G., VOGELSTEIN, B., VELCULESCU, V.E., KINZLER, K.W. – **Core signaling pathways in human pancreatic**

cancers revealed by global genomic analyses. *Science*, 321 (2008) 1801–1806.

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

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

KARACHRISTOS, A., ESNAOLA, N. F. – **Surgical Management of Pancreatic Neoplasms: What's New?** *Current Gastroenterology Reports*. 16 (2014) 1–8.

KHAN, S., JUTZY, J. M. S., ASPE, J. R., MCGREGOR, D. W., NEIDIGH, J. W., WALL, N.R. – **Survivin is released from cancer cells via exosomes.** *Apoptosis*. 16 (2011) 1–12.

KHVALEVSKY, E.Z., GABAI, R., RACHMUT, I.H., HORWITZ, E., BRUNSCHWIG, Z., ORBACH, A., SHEMI, A., GOLAN, T., DOMB, A.J., YAVIN, E., GILADI, H., RIVKIN, L., SIMERZIN, A., ELIAKIM, R., KHALAILEH, A., HUBERT, A., LAHAV, M., KOPELMAN, Y., GOLDIN, E., DANCOUR, A., HANTS, Y., ARBEL-ALON, S., ABRAMOVITCH, R., SHEMI, A., GALUN, E. – **Mutant KRAS is a druggable target for pancreatic cancer.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110 (2013) 20723–20728.

KLAUB, M., STILLER, W., PAHN, G., FRITZ, F., KIESER, M., WERNER, J., KAUCZOR, H. U., GREINACHER, L. – **Dual-energy perfusion-CT of pancreatic adenocarcinoma.** *European Journal of Radiology*. 82 (2013) 208–214.

KOOIJMANS, S. A. A., STREMERSCHE, S., BRAECKMANS, K., DE SMEDT, S. C., HENDRIX, A., WOOD, M. J. A., SCHIFFELERS, R. M., RAEMDONCK, K., VADER, P. – **Electroporation-induced siRNA precipitation obscures the efficiency of siRNA loading into extracellular vesicles.** *Journal of Controlled Release*. 172 (2013) 229–238.

KOSAKA, N., IGUCHI, H., YOSHIOKA, Y., TAKESHITA, F., MATSUKI, Y., OCHIYA, T. – **Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells.** *Journal of Biological Chemistry*. 285 (2010) 17442–17452.

LAI, R. C., ARSLAN, F., LEE, M. M., SZE, N. S. K., CHOO, A., CHEN, T. S., SALTO-TELLEZ, M., TIMMERS, L., LEE, C. N., EL OAKLEY, R. M., PASTERKAMP, G., DE KLEIJN,

- D. P. V., LIM, S. K. – **Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury.** *Stem Cell Research.* 4 (2010) 214–222.
- LI, Y. J., WU, J. Y., WANG, J. M., HU, X. B., CAI, J. X., XIANG, D.X. – **Gemcitabine loaded autologous exosomes for effective and safe chemotherapy of pancreatic cancer.** *Acta Biomaterialia.* 101 (2020) 519–530.
- MA, J., FANG, B., ZENG, F., PANG, H., ZHANG, J., SHI, Y., WU, X., CHENG, L., MA, C., XIA, J., WANG, Z. – **Curcumin inhibits cell growth and invasion through up-regulation of miR-7 in pancreatic cancer cells.** *Toxicology Letters.* 231 (2014) 82–91.
- MAKAR, M., WORPLE, E., DOVE, J., HUNSINGER, M., ARORA, T., OXENBERG, J., BLANSFIELD, J. A. – **Disparities in care: Impact of socioeconomic factors on pancreatic surgery: Exploring the national cancer database.** *The American Surgeon.* 85 (2019) 327–334.
- MARQUES DA COSTA, P., TATO MARINHO, R., CORTEZ-PINTO, H., COSTA, L., VELOSA, J. – **Twenty-Five Years of Increasing Mortality From Pancreatic Cancer in Portugal.** *Pancreas.* 49 (2020) e2–e3.
- MATHIEU, M., MARTIN-JAULAR, L., LAVIEU, G., THÉRY, C. – **Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication.** *Nature Cell Biology.* 21 (2019) 9–17.
- HILL, A., CHUNG, V. – **Pancreatic Cancer. Oncology in the Precision Medicine Era.** Springer. (2020) 97–109. ISBN 978-3-030-31471-2. Accessed: 23 of June, 2020.
- MOFFITT, R.A., MARAYATI, R., FLATE, E.L., VOLMAR, K.E., LOEZA, S.G.H., HOADLEY, K.A., RASHID, N.U., WILLIAMS, L.A., EATON, S.C., CHUNG, A.H., SMYLA, J.K., ANDERSON, J.M., KIM, H.J., BENTREM, D.J., TALAMONTI, M.S., IACOBUZIO-DONAHUE, C.A., HOLLINGSWORTH, M.A., YEH, J.J. – **Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Nature Genetics.* 47 (2015) 1168–1178.
- MULCAHY, L. A., PINK, R. C., Carter, D. R. F. – **Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake.** *Journal of Extracellular Vesicles.* 3 (2014) 1-14.
- NIPP, R., TRAMONTANO, A. C., KONG, C. Y., PANDHARIPANDE, P., DOWLING, E. C., SCHRAG, D., HUR, C. – **Disparities in cancer outcomes across age, sex, and race/ethnicity among patients with pancreatic cancer.** *Cancer Medicine.* 7 (2018) 525–535.

NITSCHKE, C., SIMON, P., WEISS, F. U., FLUHR, G., WEBER, E., GÄRTNER, S., BEHN, C. O., KRAFT, M., RINGEL, J., AGHDASSI, A., MAYERLE, J., LERCH, M. M. – **Environmental risk factors for chronic pancreatitis and pancreatic cancer.** Digestive Diseases. 29 (2011) 235–242.

NOË, M., BROSENS, L. A. A. – **Pathology of Pancreatic Cancer Precursor Lesions.** Surgical Pathology Clinics. 9 (2016) 561–580.

NORDIN, J.Z., LEE, Y., VADER, P., MÄGER, I., JOHANSSON, H.J., HEUSERMANN, W., WIKLANDER, O.P.B., HÄLLBRINK, M., SEOW, Y., BULTEMA, J.J., GILTHORPE, J., DAVIES, T., FAIRCHILD, P.J., GABRIELSSON, S., MEISNER-KOBER, N.C., LEHTIÖ, J., SMITH, C.I.E., WOOD, M.J.A., EL ANDALOUSSI, S. – **Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties.** Nanomedicine. 11 (2015) 879–883.

OSTERMAN, C. J. D., LYNCH, J. C., LEAF, P., GONDA, A., BENNETT, H. R. F., GRIFFITHS, D., WALL, N. R. – **Curcumin modulates pancreatic adenocarcinoma cell-derived exosomal function.** PLOS ONE, 10 (2015) 1–17.

OSTROWSKI, M., CARMO, N.B., KRUMEICH, S., FANGET, I., RAPOSO, G., SAVINA, A., MOITA, C.F., SCHAUER, K., HUME, A.N., FREITAS, R.P., GOUD, B., BENARROCH, P., HACOEN, N., FUKUFA, M., DESNOS, C., SEABRA, M.C., DARCHEN, F., AMIGORENA, S., MOITA, L.F., THÉRY, C. – **Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway.** Nature Cell Biology. 12 (2010) 19–30.

PAROLINI, I., FEDERICI, C., RAGGI, C., LUGINI, L., PALLESCHI, S., DE MILITO, A., COSCIA, C., IESSI, E., LOGOZZI, M., MOLINARI, A., COLONE, M., TATTI, M., SARGIACOMO, M., FAIS, S. – **Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells.** Journal of Biological Chemistry. 284 (2009) 34211–34222.

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

PISHVAIAN, M. J., BENDER, R. J., HALVERSON, D., RAHIB, L., HENDIFAR, A. E., MIKHAIL, S., CHUNG, V., PICOZZI, V. J., SOHAL, D., BLAIS, E. M., MASON, K., LYONS, E. E., MATRISIAN, L. M., BRODY, J. R., MADHAVAN, S., PETRICOIN, E. F. – **Molecular**

profiling of patients with pancreatic cancer: Initial results from the know your tumor initiative. *Clinical Cancer Research*. 24 (2018) 5018–5027.

PITT, J. M., CHARRIER, M., VIAUD, S., ANDRÉ, F., BESSE, B., CHAPUT, N., ZITVOGEL, L. – **Dendritic Cell-Derived Exosomes as Immunotherapies in the Fight against Cancer.** *The Journal of Immunology*. 193 (2014) 1006–1011.

PORUK, K. E., FIRPO, M. A., ADLER, D. G., MULVIHILL, S. J. – **Screening for pancreatic cancer: Why, how, and who?** *Annals of Surgery*. 257 (2013) 17–26.

REGENTE, M., PINEDO, M., ELIZALDE, M., DE LA CANAL, L. – **Apoplatic exosome-like vesicles: A new way of protein secretion in plants?** *Plant Signaling and Behavior*. 7 (2012) 544–546.

RUFINO-RAMOS, D., ALBUQUERQUE, P. R., CARMONA, V., PERFEITO, R., NOBRE, R. J., PEREIRA DE ALMEIDA, L. – **Extracellular vesicles: Novel promising delivery systems for therapy of brain diseases.** *Journal of Controlled Release*. 262 (2017) 247–258.

SAAD, A. M., TURK, T., AL-HUSSEINI, M. J., ABDEL-RAHMAN, O. – **Trends in pancreatic adenocarcinoma incidence and mortality in the United States in the last four decades; A SEER-based study.** *BMC Cancer*. 18 (2018) 1–11.

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

SCHMIDT, O., TEIS, D. – **The ESCRT machinery.** *Current Biology*. 22 (2012) R116–R120.

SHAIB, W. L., JONES, J. S., GOODMAN, M., SARMIENTO, J. M., MAITHEL, S. K., CARDONA, K., KANE, S., WU, C., ALESE, O. B., EL - RAYES, B. F. – **Evaluation of Treatment Patterns and Survival Outcomes in Elderly Pancreatic Cancer Patients: A Surveillance, Epidemiology, and End Results-Medicare Analysis.** *The Oncologist*. 23 (2018) 704–711.

SHANG, S., WANG, J., CHEN, S., TIAN, R., ZENG, H., WANG, L., XIA, M., ZHU, H., ZUO, C. – **Exosomal miRNA-1231 derived from bone marrow mesenchymal stem cells inhibits the activity of pancreatic cancer.** *Cancer Medicine*. 8 (2019) 7728–7740.

- SMITH, R. A., BROOKS, D., COKKINIDES, V., SASLOW, D., BRAWLWY, O. W. – **Cancer screening in the United States, 2013.** CA: A Cancer Journal for Clinicians. 63 (2013) 87–105.
- SMYTH, T. J., REDZIC, J. S., GRANER, M. W., ANCHORDOQUY, T. J. – **Examination of the specificity of tumor cell derived exosomes with tumor cells in vitro.** Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes. 1838 (2014) 2954–2965.
- SU, M. J., ALDAWSARI, H., AMIJI, M. – **Pancreatic cancer cell exosome-mediated macrophage reprogramming and the role of MicroRNAs 155 and 125b2 transfection using nanoparticle delivery systems.** Scientific Reports. 6 (2016) 1–15.
- SUN, D., ZHUANG, X., XIANG, X., LIU, Y., ZHANG, S., LIU, C., BARNES, S., GRIZZLE, W., MILER, D., ZHANG, H. G. – **A novel nanoparticle drug delivery system: The anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes.** Molecular Therapy. 18 (2010) 1606–1614.
- TAURO, B. J., GREENING, D. W., MATHIAS, R. A., JI, H., MATHIVANAN, S., SCOTT, A. M., SIMPSON, R. J. – **Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes.** Methods. 56 (2012) 293–304.
- TAYLOR, D. D., SHAH, S. – **Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes.** Methods. 87 (2015) 2–10.
- THÉRY, C., AMIGORENA, S., RAPOSO, G., CLAYTON, A. – **Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids.** Current Protocols in Cell Biology. 30 (2006) 3.22.1–3.22.29.
- THÉRY, C., OSTROWSKI, M., SEGURA, E. – **Membrane vesicles as conveyors of immune responses.** Nature Reviews Immunology. 9 (2009) 581–593.
- THOBIE, A., MULLIRI, A., DOLET, N., EID, Y., BOUVIER, V., LAUNOY, G., ALVES, A., DEJARDIN, O. – **Socioeconomic status impacts survival and access to resection in pancreatic adenocarcinoma: A high-resolution population-based cancer registry study.** Surgical Oncology. 27 (2018) 759–766.
- TRAJKOVIC, K., HSU, C., CHIANTIA, S., RAJENDRAN, L., WENZEL, D., WIELAND, F., SCHWILLE, P., BRÜGGER, B., SIMONS, M. – **Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes.** Science. 319 (2008) 1244–1247.
- TRAN, P. H. L., XIANG, D., TRAN, T. T. D., YIN, W., ZHANG, Y., KONG, L., CHEN, K.,

SUN, M., LI, Y., HOU, Y., ZHU, Y., DUAN, W. – **Exosomes and Nanoengineering: A Match Made for Precision Therapeutics.** *Advanced Materials.* 1904040 (2019) 1–8.

TSAI, C. F., HSIEH, T. H., LEE, J. N., HSU, C. Y., WANG, Y. C., KUO, K. K., WU, H. L., CHIU, C. C., TSAI, E. M., KUO, P. L. – **Curcumin Suppresses Phthalate-Induced Metastasis and the Proportion of Cancer Stem Cell (CSC)-like Cells via the Inhibition of AhR/ERK/SKI Signaling in Hepatocellular Carcinoma.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 63 (2015) 10388–10398.

UMEBAYASHI, M., KIYOTA, A., KOYA, N., TANAKA, H., ONISHI, H., KATANO, M., MORISAKI, T. – **An epithelial cell adhesion molecule- and CD3-bispecific antibody plus activated T-cells can eradicate chemoresistant cancer stem-like pancreatic carcinoma cells in vitro.** *Anticancer Research.* 34 (2014) 4509–4519.

VEISANI, Y., JENABI, E., KHAZAEI, S., NEMATOLLAHI, SH. – **Global incidence and mortality rates in pancreatic cancer and the association with the Human Development Index: decomposition approach.** *Public Health.* 156 (2018) 87–91.

VERWEIJ, F. J., REVENU, C., ARRAS, G., DINGLI, F., LOEW, D., PEGTEL, D. M., FOLLAIN, G., ALLIO, G., GOETZ, J. G., ZIMMERMANN, P., HERBOMEL, P., DEL BENE, F., RAPOSO, G., VAN NIEL, G. – **Live Tracking of Inter-organ Communication by Endogenous Exosomes In Vivo.** *Developmental Cell.* 48 (2019) 573–589.

VIAUD, S., TERME, M., FLAMENT, C., TALEB, J., ANDRÉ, F., NOVAULT, S., ESCUDIER, B., ROBERT, C., CAILLAT - ZUCMAN, S., TURSZ, T., ZITVOGEL, L., CHAPUT, N. – **Dendritic cell-derived exosomes promote natural killer cell activation and proliferation: A role for NKG2D ligands and IL-15R α .** *PLOS ONE.* 4 (2009) 1–12 .

WADDELL, N., PAJIC, M., PATCH, A.M., CHANG, D.K., KASSAHN, K.S., BAILEY, P., JOHNS, A.L., MILLER, D., NONES, K., QUEK, K., QUINN, M.C. J., ROBERTSON, A.J., FADLULLAH, M.Z.H., BRUXNER, T.J.C., CHRIST, A.N., HARLIWONG, I., IDRISOGLU, S., MANNING, S., NOURSE, C., NOURBAKHS, E., WANI, S., WILSON, P.J., MARKHAM, E., CLOONAN, N., ANDERSON, M.J., FINK, J.L., HOLMES, O., KAZAKOFF, S.H., LEONARD, C., NEWELL, F., POUDEL, B., SONG, S., TAYLOR, D., WADDELL, N., WOOD, S., XU, Q., WU, J., PINESE, M., COWLEY, M.J., LEE, H.C., JONES, M.D., NAGRAL, A.M., HUMPHRIS, J., CHANTRILL, L.A., CHIN, V., STEINMANN, A.M., MAWSON, A., HUMPHREY, E.S., COLVIN, E.K., CHOU, A., SCARLETT, C.J., PINHO, A.V., GIRY-LATERRIERE, M.G., ROOMAN, I., SAMRA, J.S., KENCH, J.G., PETTITT, J.A., MERRETT, N.D., TOON, C.,

EPARI, K., NGUYEN, N.Q., BARBOUR, A., ZEPS, N., JAMIESON, N.B., GRAHAM, J.S., NICLOU, S.P., BJERKVIG, R., GRÜTZMANN, R., AUST, D., HRUBAN, R.H., MAITRA, A., IACOBUIZIO-DONAHUE, C.A., WOLFGANG, C.L., MORGAN, R.A., LAWLOR, R.T., CORBO, V., BASSI, C., FALCONI, M., ZAMBONI, G., TORTORA, G., TEMPERO, M.A., GILL, A. J., ESHLEMAN, J.R., PILARSKY, C., SCARPA, A., MUSGROVE, E.A., PEARSON, J.V., BIANKIN, A.V., GRIMMOND, S.M. – **Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer.** *Nature*. 518 (2015) 495–501.

WAHLGREN, J., KARLSON, T. D. L., BRISLERT, M., SANI, F. V., TELEMO, E., SUNNERHAGEN, P., VALADI, H. – **Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes.** *Nucleic Acids Research*. 40 (2012) 1–12.

WERNER, J., COMBS, S. E., SPRINGFELD, C., HARTWIG, W., HACKERT, T., BÜCHLER, M. W. – **Advanced-stage pancreatic cancer: Therapy options.** *Nature Reviews Clinical Oncology*. 10 (2013) 323–333.

WOLLERT, T., HURLEY, J. H. – **Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes.** *Nature*. 464 (2010) 864–869.

WONG, M. C. S., JIANG, J. Y., LIANG, M., FANG, Y., YEUNG, M. S., SUNG, J. J. Y. – **Global temporal patterns of pancreatic cancer and association with socioeconomic development.** *Scientific Reports*. 7 (2017) 1–9.

WU, H., CHEN, X., JI, J., ZHOU, R., LIU, J., NI, W., QU, L., NI, H., NI, R., BAO, B., XAO, M. – **Progress of Exosomes in the Diagnosis and Treatment of Pancreatic Cancer.** *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 23 (2019) 1–8.

XIAO, L., ERB, U., ZHAO, K., HACKERT, T., ZÖLLER – **Efficacy of vaccination with tumor-exosome loaded dendritic cells combined with cytotoxic drug treatment in pancreatic cancer.** *Oncolimmunology*. 6 (2017) 1–16.

YAMAZAKI, K., MASUGI, Y., EFFENDI, K., TSUJIKAWA, H., HIRAOKA, N., KITAGO, M., SHINODA, M., ITANO, O., TANABE, M., KITAGAWA, Y., SAKAMOTO, M. – **Upregulated SMAD3 promotes epithelial-mesenchymal transition and predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Laboratory Investigation*. 94 (2014) 683–691.

YIN, T., SHI, P., GOU, S., SHEN, Q., WANG, C. – **Dendritic cells loaded with pancreatic cancer stem cells (CSCs) lysates induce antitumor immune killing**

effect in vitro. PLOS ONE. 9 (2014) 1–12.

YONG, T., ZHANG, X., BIE, N., ZHANG, H., ZHANG, X., LI, F., HAKEEM, A., HU, J., GAN, L., SANTOS, H. A., YANG, X. – **Tumor exosome-based nanoparticles are efficient drug carriers for chemotherapy.** Nature Communications. 10 (2019) 1–16.

ZHANG, Y. F., SHI, J. B., LI, C. – **Small extracellular vesicle loading systems in cancer therapy: Current status and the way forward.** Cytotherapy. 21 (2019) 1122–1136.

8. Annexes

Table II – Comparison between different techniques used in the isolation and loading of exosomes

Techniques for isolation and purification	Techniques for drug loading	
Ultracentrifugation	Before exosomes isolation	After exosomes isolation
<ul style="list-style-type: none"> • Classic method • Low cost and easy to implement • Long time required • Easy to be contaminated • Low output 	<p>Transfection based</p> <ul style="list-style-type: none"> • Preferential introduction of small RNAs • RNA transfected directly into cells or with a vector for expression • Levels of RNA incorporated depend on the RNA species or RNA sequence • Unstable productivity of RNA 	<p>Direct Mixing</p> <ul style="list-style-type: none"> • Simple incubation for a certain period • Able to be used for loading hydrophobic substances • More simple and easy to manage when compared to the co-incubation method • Usually at 22°C
<p>Immunoisolation</p> <ul style="list-style-type: none"> • High specificity (small amount of sample needed) • Expensive and not for large-scale preparation • Used to complement other techniques • Relatively high speed • Only for cell-free samples 	<p>Co-incubation</p> <ul style="list-style-type: none"> • Confined contact of cells with chemical compounds or small molecules • Ultraviolet light seems to be efficient when co-added • Strong capacity to load both hydrophilic and hydrophobic compounds 	<p>Electroporation</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pores formation on the exosome membrane through voltage pulses • Particularly used for hydrophilic substances • A simple and fast method • Caution with the aggregation of exosomes
<p>Ultrafiltration</p> <ul style="list-style-type: none"> • Easier, faster and more productive when compared with ultracentrifugation • Small quantities of sample are required • High productivity • Can be used to complement other techniques • Able to cause deformations 		<p>Other Methods</p> <ul style="list-style-type: none"> • Repeated freeze-thaw cycles • Sonication • Treatment with detergent-like molecules • Extrusion