



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Jéssica Freitas Delgado

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Colorectal Cancer & Exosomes: Tackling Drug Resistance” referentes à unidade curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Sara Augusto, da Doutora Célia Cabral, e do Professor Doutor Sérgio Simões, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2022



UNIVERSIDADE D COIMBRA

Jéssica Freitas Delgado

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Colorectal Cancer & Exosomes: Tackling Drug Resistance” referentes à unidade curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Sara Augusto, da Doutora Célia Cabral, e do Professor Doutor Sérgio Simões, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2022

Eu, Jéssica Freitas Delgado, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2017266072, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Colorectal Cancer & Exosomes: Tackling Drug Resistance” 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, 5 de setembro de 2022.

Jéssica Freitas Delgado

(Jéssica Freitas Delgado)

“Sempre chegamos ao sítio aonde nos esperam”

- José Saramago

Agradecimentos

E chegou o fim. 5 anos de MICF, 5 anos de FFUC, 5 anos de Coimbra.

Deus Pai, nada teria sido possível sem a Sua vontade. Ansiosa por continuar a procurar cumprir os Seus grandes desígnios.

Querida Mãe, aprecio, com o coração a transbordar, o esforço e a dedicação que colocas no cumprimento daqueles que são os meus sonhos. Tia Augusta, Avô, Padrinhos, vocês são o meu porto seguro.

Doce Rodrigo, o incentivo que me dás para ser, para fazer, para ir é absolutamente inigualável. És presença constante, és atenção, és carinho.

Serpa, Mamu, Nobre. Nonô, Tecas, Maria. Vocês trouxeram mais brilho, mais leveza, mais alegria a todos estes anos. Guardo cada abraço, cada gargalhada, cada gesto.

Kate, Fredo, Rita, Bru. Os amigos são, em verdade, a família que escolhemos e foram vocês quem mo mostrou.

Professor Doutor João José Sousa, a familiaridade com que ensina brilha. Admiro a sua competência, a sua jovialidade, a sua forma de estar.

Professor Doutor João Nuno Moreira, no momento certo, as suas palavras proporcionaram-me a coragem de que precisava para traçar o caminho que pretendia. Admiro a forma como dá espaço ao raciocínio dos seus estudantes.

Professor Doutor Sérgio Simões, obrigada pela oportunidade de escrever a Monografia sob a sua alçada. Admiro o seu entusiasmo pelo saber e ensinar ciência, a sua simplicidade, a sua humildade. Foi exatamente o Orientador que eu gostava e precisava de ter tido.

FFUC, és ensino farmacêutico de alta qualidade, és magia, és Casa.

O concluir de uma aventura marca também o início da seguinte. Sei-me fruto das minhas experiências, mas principalmente de cada uma das pessoas que cruzaram o meu caminho. Agradeço-vos pela pessoa em que me tornaram e levo-vos comigo.

Coimbra, a ti!

Índice Geral

Resumo	
Abstract	

Parte I: Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Abreviaturas	12
Introdução	13
1. Farmácia Viriato	14
2. Análise SWOT	15
2.1. Pontos Fortes	15
a. Equipa	15
b. Filosofia da empresa	15
c. Farmácia-Escola	16
d. Conjunto de serviços disponibilizados.....	16
2.2. Pontos Fracos	16
a. Planos de participação	16
b. Dispensa de medicamentos sujeitos a receita médica sem receita	17
2.3. Oportunidades.....	17
a. Participação em ações de educação e promoção para a saúde.....	17
b. Repono	18
2.4. Ameaças	18
a. Sobrecarga da Farmácia com a pandemia COVID-19	18
3. Casos Clínicos	19
Conclusão	22
Bibliografia	23

Parte II: Relatório de Estágio em Investigação

Índice de Figuras	25
Abreviaturas	26
Introdução	27
1. Métodos	29
1.1. Cultura Celular	29
1.2. Ensaio de Viabilidade Celular: <i>Alamar Blue</i>	30
2. Resultados e Discussão	32
2.1. Cultura Celular	32
2.2. Tratamento das Células com os Óleos Essenciais em Estudo.....	33
2.3. Ensaio de Viabilidade Celular	33
2.4. Gráficos e Respetiva Análise	34
a. <i>L. pedunculata</i>	34
b. <i>M. cervina</i>	36
c. <i>R. segetum</i>	38
3. Análise SWOT	40

3.1. Pontos Fortes	40
a. Perspetiva de grupo de investigação	40
b. Multidisciplinaridade	40
c. Metodologia de trabalho	40
3.2. Pontos Fracos	40
a. Ausência de contacto com outros grupos de investigação	40
b. Estágio não especificamente farmacêutico sob orientação não farmacêutica	41
c. Estágio centrado na realização de um único tipo de ensaio	41
3.3. Oportunidades	41
a. Investigação no iCBR	41
b. Integração em atividades	42
3.4. Ameaças	42
a. Autonomia no desempenho de funções	42
b. Financiamento limitado	43
Conclusão	44
Bibliografia	45

Parte III: Monografia

List of Figures.....	48
Abbreviations.....	49
Introduction.....	51
1. Colorectal Cancer	52
1.1. Tumor Microenvironment: The Journey to Metastasis	52
1.2. Typical Treatment Plan	56
2. Drug Delivery and Drug Resistance: The Ultimate Dilemma.....	57
3. Exosomes	60
3.1. An Extracellular Vesicle in Cancer	60
3.2. Role in Tumor Cell Dissemination, in the Formation of the Metastatic Niche and in Drug Resistance	61
3.3. Engineered Exosomes for Therapeutic Delivery	64
4. Clinical Value of Exosomes in Colorectal Cancer	67
Conclusion and Future Directions	71
Bibliography	72

Resumo

O presente documento encontra-se subordinado à unidade curricular “Estágio” do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Divide-se em três partes: dois relatórios referentes à realização dos estágios curriculares e uma monografia intitulada “Colorectal Cancer & Exosomes: Tackling Drug Resistance”.

Primeira Parte

Em primeiro lugar, apresenta-se o relatório de estágio em Farmácia Comunitária, o qual decorreu na Farmácia Viriato, em Viseu, sob orientação da Dra. Sara Augusto. Este teve início a 3 de janeiro de 2022 e foi concluído a 19 de abril de 2022.

Segunda Parte

De seguida, encontra-se o relatório de estágio em Investigação que tive a oportunidade de realizar no Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (iCBR) da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, em Coimbra, associada ao grupo Plants4Health, sob orientação da Doutora Célia Cabral. O estágio decorreu entre o dia 2 de maio de 2022 e o dia 9 de julho de 2022.

Ambos os relatórios foram construídos sob a forma de uma análise SWOT (Pontos Fortes, Pontos Fracos, Oportunidades e Ameaças), em concordância com as orientações emitidas pela Faculdade.

Terceira Parte

Por fim, encontra-se a monografia que realizei, sob orientação do Professor Doutor Sérgio Simões, de seu título “Colorectal Cancer & Exosomes: Tackling Drug Resistance”.

O cancro colorretal é um dos tumores mais prevalentes e que mais mortes provoca por todo o mundo. Heterogeneidade, um microambiente tumoral altamente dinâmico, uma enorme propensão para o desenvolvimento de metástases e uma acentuada resistência múltipla a fármacos são os fatores que compõem o *cocktail* letal.

Exossomas são vesículas extracelulares secretadas a partir de praticamente todos os tipos de células, incluindo células cancerígenas. A evidência científica tem vindo a demonstrar a sua importância no processo de disseminação celular, crescimento tumoral, formação de metástases e mais recentemente na resistência a fármacos. Em consequência, esforços extraordinários têm sido levados a cabo com o propósito de transferir este conhecimento

para a prática clínica e, recorrendo ao valor diagnóstico, prognóstico e terapêutico dos exossomas levar não apenas esperança, mas um tratamento eficaz para os doentes com cancro colorretal.

Aqui discutimos a fisiopatologia do cancro colorretal, dos tumores primários e metastáticos, a sua progressão, as implicações dos exossomas no processo e como usar esta subtil nanopartícula como uma arma no combate ao cancro, atacando especialmente a resistência a fármacos.

Palavras-chave: Cancro colorretal, microambiente tumoral, metástases, exossomas, resistência a fármacos, entrega de fármacos, translação clínica.

Abstract

This document is subordinate to the curricular unit “Internship” of the Integrated Master’s Degree in Pharmaceutical Sciences of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra. It is divided in three parts: two reports regarding the two supervised curricular internships and a monograph entitled “Colorectal Cancer & Exosomes: Tackling Drug Resistance”.

First Part

Firstly, the report about my internship on Community Pharmacy, at Farmácia Viriato, in Viseu, under the guidance of Dr. Sara Augusto. It took place between January 3rd, 2022 and April 19th, 2022.

Second Part

Next, the second part presents the report related to my internship on Research, at Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (iCBR) of the Faculty of Medicine of the University of Coimbra, in Coimbra, integrated in the Plants4Health group, under the guidance of Célia Cabral, PhD. The internship took place between May 2nd, 2022 and July 9th, 2022.

Both reports were designed accordingly to the SWOT analysis structure (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*), as the Faculty’s regulations command.

Third Part

In the end, there is a monograph performed under the supervision of Professor Doctor Sérgio Simões, entitled “Colorectal Cancer & Exosomes: Tackling Drug Resistance”.

Colorectal cancer is one of the most prevalent and deadly tumors worldwide. Heterogeneity, a highly dynamic tumor microenvironment, an enormous propensity to develop metastasis, and a great multiple drug resistance compose the lethal cocktail.

Exosomes are extracellular vesicles secreted from almost all cell types, including cancer cells. Evidence has been showing their importance in the cell dissemination process, tumor growth, metastasis’ formation, and recently in drug resistance. As a result, extraordinary efforts are being made to transfer this knowledge into the clinical setting, and with exosomes’ diagnostic, prognostic, and therapeutic value bring not only hope but effective treatment to colorectal cancer patients.

Here we discuss the physiopathology of colorectal cancer, primary and metastatic tumors, its progression, the implications of exosomes in the process and how to use this subtle nanoparticle as a weapon to fight cancer, specifically tackling drug resistance.

Keywords: Colorectal cancer, tumor microenvironment, metastasis, exosomes, drug resistance, drug delivery, clinical translation.

Parte I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Viriato



Orientação: Dra. Sara Augusto

Abreviaturas

COVID-19 - Doença de Coronavírus 2019

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

SWOT - *Strenghts, Weaknesses, Opportunities and Threats*

Introdução

O Farmacêutico é um agente de saúde pública, com competências para executar toda e qualquer tarefa que diga respeito ao medicamento e a outras tecnologias de saúde, análises clínicas, de genética humana ou de outra natureza que, de modo semelhante, visem contribuir para a salvaguarda da saúde pública e do equilíbrio ecológico, não esquecendo as ações de educação e promoção de saúde bem como de prevenção à doença junto da população^[1].

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) prepara o estudante com conhecimento base para poder enveredar por qualquer uma das suas saídas profissionais e, como o saber teórico não deve nunca ser dissociado do saber prático, o seu plano de estudos contempla a realização de estágio curricular em Farmácia Comunitária. O meu teve lugar na Farmácia Viriato, em Viseu, entre o dia 3 de janeiro de 2022 e o dia 19 de abril de 2022.

A Farmácia Comunitária constitui o primeiro local onde os portugueses se dirigem perante questões menores de saúde tratando-se, portanto, de um ponto fulcral de acesso aos cuidados primários de saúde e, o lugar vulgarmente mais associado à atuação do Farmacêutico, a sua Casa-Mãe.

Assim, é como pequenos aprendizes que ingressamos nesta aventura que é dominar o medicamento e cuidar da saúde e do bem-estar da sociedade, agora no terreno.

I. Farmácia Viriato

Localizada na cidade de Viseu, a Farmácia Viriato conta já com 65 anos de existência e, mantendo-se fiel aos seus valores base de empatia, cuidado e compaixão tem procurado inovar-se, ano após ano, e estar à altura das exigências dos tempos modernos.

É propriedade do Dr. Nuno Tiago Saraiva e a sua direção técnica pertence à Dra. Sara Augusto, ambos Farmacêuticos. Localiza-se na Avenida da Bélgica, freguesia de São José, concelho e distrito de Viseu, nas redondezas de grandes superfícies comerciais, espaços residenciais e uma escola secundária. O horário que pratica é alargado e adequado às necessidades dos seus utentes: entre as 08h30 e as 22h de segunda a sábado e, aos domingos e feriados, entre as 09h e as 20h. A equipa técnica é constituída por treze elementos: seis Farmacêuticos e sete Técnicos de Farmácia.

A Farmácia Viriato distingue-se pelo aconselhamento farmacoterapêutico personalizado que presta, a par da multiplicidade de serviços de saúde que disponibiliza e em constante aumento. Apresenta uma vasta gama de produtos dentro das áreas da Dermocosmética, Ortopedia e Veterinária, além de que não tem medido esforços para continuamente se expandir e modernizar, não obstante, mantendo-se fiel à familiaridade por que é conhecida.

2. Análise SWOT

A análise SWOT (*Strenghts, Weaknesses, Opportunities and Threats*) que em seguida apresento procura sintetizar a minha experiência neste estágio, no que diz respeito a Pontos Fortes e Pontos Fracos, Oportunidades e Fraquezas, os dois primeiros em relação à Farmácia que me acolheu, os dois últimos relativos a forças externas que possam ter influenciado positiva ou negativamente.

2.1. Pontos Fortes

a. Equipa

Por entre os vários colaboradores que compõem a Farmácia Viriato estão presentes Farmacêuticos e Técnicos de Farmácia que trabalham em unísono pelo crescimento da empresa, tendo sempre como principal foco o utente. Cada colaborador, com uma personalidade diferente, é capaz de acrescentar valor à equipa de um modo particular, denotando-se um elevado espírito de entreatajuda e vontade de continuamente se superarem, além de que é clara a felicidade que sentem pelo que fazem e a vontade que demonstram em impactar positivamente a vida de cada utente.

Ao anterior acrescento ainda a organização dos vários elementos em diferentes grupos de trabalho (Preparação Semanal da Medicação, Medicamentos Manipulados, Marketing e Redes Sociais, Representação Externa, *Repono*) sendo que são os próprios os responsáveis pela sua gestão, garantindo, portanto, uma uniformidade na apresentação da Farmácia Viriato, assim como que todos os seus valores estejam salvaguardados.

b. Filosofia da empresa

A Farmácia Viriato apresenta-se sob o *slogan* «Somos Mais do que Medicamentos», máxima que faz transparecer a proatividade, a imensa vontade e pré-disposição para reinventar o conceito de Farmácia e responder continuamente aos desafios e necessidades que as pessoas e o mundo vão apresentando. Neste sentido, além da testagem à Doença de Coronavírus 2019 (COVID-19) realizada no espaço da Farmácia, foram também organizadas testagens massivas à população viseense em várias das suas localidades, bem como eventos e espaços de diversão noturna, algumas das quais tive a oportunidade de participar. Somam-se ainda rastreios à tensão arterial e à glicémia, ações de sensibilização e de educação e promoção para a saúde.

É ainda de salientar a preocupação da Farmácia com o bem-estar dos seus colaboradores, tendo adotado a política de uma semana de trabalho de apenas 4 dias, 10h por dia, o que permite um melhor equilíbrio entre vida profissional e pessoal.

c. Farmácia-Escola

A Farmácia Viriato é conhecida como Farmácia-Escola pelo número e pela qualidade de Farmacêuticos e Técnicos de Farmácia que tem vindo a formar ao longo das suas mais de seis décadas de existência. A título pessoal, posso confirmá-lo.

Durante todo o tempo que compreendeu o meu estágio senti um empenho e dedicação completamente fora de série na minha formação, por parte de todos os colaboradores da Farmácia, sem exceção. Além de que me foi dada inteira liberdade para aprender o tanto que quisesse e para chegar tão longe quanto pretendesse, sem qualquer limitação. Fui desafiada, mas sempre com a confiança de que tinha sempre alguém a quem recorrer.

d. Conjunto de serviços disponibilizados

A vasta panóplia de serviços disponibilizados destaca-se da maioria das farmácias, sendo que vai desde aconselhamento dermocosmético, nutricional, para a cessação tabágica e ao viajante; administração de injetáveis e vacinas; determinação de peso e altura, índice de massa corporal e massa gorda, pressão arterial, glicémia, colesterol total e triglicéridos; recolha de medicamentos fora de uso e de radiografias, e ainda entregas ao domicílio, primeiros socorros, tratamento de feridas, testes de gravidez, prestação de serviços a lar, preparação semanal da medicação e manipulação de medicamentos. Ao longo dos meses que compreenderam o meu estágio pude conhecer melhor cada um destes serviços e ser até envolvida em alguns deles, algo que considero ter sido uma grande valia à minha aquisição de competências.

2.2. Pontos Fracos

a. Planos de participação

Completo desconhecimento sobre planos de participação tornou a sua aplicação durante o atendimento bastante difícil. Os mesmos encontravam-se listados no sistema informático, no entanto, dada a vasta panóplia de opções e diferentes circunstâncias de aplicação, familiarizar-me com a sua aplicação trata-se de um processo que implica tempo e experiência de atendimento, algo que ainda não possuía.

b. Dispensa de medicamentos sujeitos a receita médica sem receita

Algumas foram as vezes em que os utentes procuravam adquirir medicamentos sujeitos a receita médica sem a apresentação da devida receita sob a justificação de que já faziam a toma há muito tempo e, mesmo fazendo todas as questões para garantir que a pessoa dominava o modo de utilização do medicamento, sempre foi algo desconfortável para mim dado não ter como garantir que aquilo que o doente me dizia era realmente verdade e que estaria em efetivo a ser acompanhado pelo médico. Nestas circunstâncias, o medicamento só podia ser dispensado se o histórico do utente na Farmácia o corroborasse.

No caso de medicamentos potencialmente aditivos, como o são as benzodiazepinas, a dispensa do medicamento só acontecia se o histórico do utente confirmasse a sua anterior prescrição, o intervalo de levantamento em Farmácia fosse coerente com uma toma regrada e mediante compromisso de regularizar o levantamento com nova receita. Contudo, situações houve em que não tinha como justificar o medicamento para o doente em questão e, mesmo procurando explicar cordialmente o meu impedimento em cedê-lo, as pessoas tornavam-se desagradáveis.

2.3. Oportunidades

a. Participação em ações de educação e promoção para a saúde

Fui convidada a participar em todas as ações que a Farmácia levou a cabo, nomeadamente testagens massivas à COVID-19, rastreios à tensão arterial e glicémia, sendo que fui ainda desafiada a construir uma apresentação de seu tema «COVID-19 e Vacinas» que pretendia dar a conhecer, do ponto de vista biotecnológico e regulamentar, a forma como as vacinas contra a COVID-19 atuam, surgiram e chegaram ao mercado num tão curto espaço de tempo, a alunos do 12º ano da Escola Secundária Viriato, em Viseu. Tratou-se de um momento que guardo com especial carinho dado ter-me sido conferida a liberdade e a confiança para preparar a apresentação de forma autónoma e, embora tenha implicado muito esforço e dedicação da minha parte, compensou sentir que os alunos ficaram envolvidos, interessados e que, tal como eu, aprenderam um pouco mais sobre o tema.

Em adição, tive o gosto de interagir com diferentes profissionais da área da saúde, desde médicos a enfermeiros, o que me permitiu compreender que é possível que estas diferentes profissões se unam sinergicamente no sentido de produzir os melhores resultados em saúde.

Por último, participei ainda na Gala Solidária dos Bombeiros Voluntários de Viseu, evento que ocorre anualmente na nossa cidade, interrompido nos últimos dois anos pela pandemia, com o intuito de arrecadar fundos para a instituição, e no qual a Farmácia Viriato marcou presença para contribuir para esta tão nobre causa.

b. Repono

Farmácia *online* da Farmácia Viriato, projeto que surgiu durante a pandemia com o objetivo de garantir segurança no envio dos produtos e que disponibiliza medicamentos não sujeitos a receita médica de todas as áreas da Farmácia, nomeadamente Dermocosmética, Puericultura, Higiene e Cuidado Oral, Produtos e Medicamentos Veterinários e Ortopedia. No site são ainda apresentadas dicas semanais sobre os mais variados temas e o seu sistema de atualização de *stock* encontra-se sincronizado com o da Farmácia física, em tempo real, o que é bastante interessante.

2.4. Ameaças

a. Sobrecarga da Farmácia com a pandemia COVID-19

O meu estágio teve início em janeiro, mês em que a pandemia COVID-19 alcançou números assustadoramente elevados e em que a Farmácia se encontrava a testar centenas de pessoas diariamente. Dada a pressão vivida, e por forma a procurar ajudar como me era possível, acabei por passar a maior parte do tempo a preencher os dados das pessoas que pretendiam ser admitidas ao teste, o que condicionou a observação inicial dos atendimentos. Entretanto, com o avançar do mês e o início de fevereiro, a pandemia abrandou e pude começar a desempenhar mais tarefas.

3. Casos Clínicos

Caso I

Mulher de 63 anos dirige-se à Farmácia com queixas de enfartamento, má digestão, azia, e distensão abdominal. Refere, ainda, por vezes experienciar episódios de regurgitação e acidez.

Depois de averiguar que não tinha quaisquer patologias de base, aconselhei a toma do Neobianacid[®] que se trata de comprimidos para dissolver lentamente na boca num máximo de 3 vezes por dia conforme necessidade, após a refeição. Atua por intermédio da formação de uma película que desencadeia um efeito barreira na mucosa protegendo-a do contacto com os sucos gástricos e com substâncias irritantes. Este dispositivo médico apresenta na sua composição poliprotect, um complexo molecular com propriedades mucoadesivas, e flavonoides que sendo antioxidantes contrariam a irritação provocada pelos radicais livres, completando a sua ação^[2]. Para resolver os sintomas de refluxo gastroesofágico, aconselhei a toma do protetor gástrico Digespan[®], comprimidos gastrorresistentes de pantoprazol a 20 mg, o qual deve ser tomado em jejum, um comprimido por dia durante 2 a 3 dias consecutivos. Acrescentei que assim que verificasse o alívio completo dos sintomas, o tratamento deveria ser descontinuado, sendo que não o deveria prolongar por mais de 4 semanas sem consultar um médico. Este trata-se de um inibidor da bomba de prótons que leva à inibição da secreção de ácido clorídrico das células parietais do estômago^[3]. O mecanismo de ação de Neobianacid[®] permite a sua associação a inibidores da bomba de prótons^[2].

A somar, alertei ainda para algumas medidas não-farmacológicas que podiam servir de adjuvante ao tratamento, nomeadamente fazer refeições leves e evitar fritos, alimentos picantes e com gordura e ainda evitar deitar-se logo após a refeição.

Caso II

Um senhor dirige-se à Farmácia indicando que a sua esposa apresenta a zona inferior ao peito vermelha e que tem muita comichão. Refere ainda que a senhora apresenta excesso de peso e que além de ter os peitos descaídos, tem tendência a suar em demasia na zona em questão.

A descrição apresentada pelo esposo remete para a existência de uma infeção fúngica, dada a sua maior proliferação em zonas onde existe acumulação de humidade. Depois de confirmada a inexistência de outras patologias de pele, recomendei a aplicação de Clotrimazol Basi[®], antifúngico de aplicação tópica indicado para o tratamento de infeções fúngicas da pele^[4], e de Halibut[®], cujo princípio ativo - óxido zinco - apresenta uma ação calmante, cicatrizante

e regeneradora dos tecidos^[5]. Ambos devem ser aplicados duas a três vezes por dia, em camada fina, com ligeira fricção^[4,5]. Recomendei ainda o cuidado de manter a zona o mais seca possível ao longo do dia.

Caso III

Mãe dirige-se à Farmácia queixando-se de que o seu filho de 4 anos apresenta tosse com expectoração e o nariz entupido. Acrescenta que os episódios de tosse se agravam à noite e salienta ainda que o menino é celíaco.

Atendendo à idade e sintomas do menino, aconselhei para a tosse Grintuss Pediatric[®] em xarope cuja fórmula foi desenvolvida para ser propositadamente utilizada por crianças a partir de 1 ano de idade, capaz de acalmar rapidamente a tosse noturna, sendo ainda adequado ao uso em crianças celíacas dado não apresentar glúten na sua composição. A quantidade a tomar deve ser de 5 mL (uma colher doseadora) duas a quatro vezes ao dia, conforme necessidade, devendo a última toma ser efetuada antes de dormir^[6]. Este acalma a irritação, protege a mucosa e favorece a eliminação do muco, através da sua ação muco-reguladora promovendo a hidratação do muco, ação lubrificante e pelo efeito barreira que consegue através da formação de uma película protetora que adere à mucosa e a protege do contacto com agentes irritantes^[6]. Para a congestão nasal aconselharia Fitonasal Pediatric Spray[®] que descongestiona e protege a mucosa graças à formação de uma camada mucoadesiva e à ação antioxidante, além de que o recipiente foi ergonomicamente desenhado para o nariz dos mais pequenos e para facilitar o jato que, sendo de fluxo contínuo permite uma limpeza profunda das cavidades nasais, remoção do muco em excesso e agentes patogénicos, irritantes e alérgicos retidos no mesmo, sendo esta ação de especial importância para as crianças que ainda não são capazes de assoar o nariz adequadamente. Deve ser utilizado pelo menos duas vezes por dia, de manhã e à noite e, não contendo quaisquer descongestionantes vasoconstritores, não seca nem irrita a mucosa podendo, portanto, ser utilizado frequentemente e até por longos períodos de tempo^[7].

Caso IV

Jovem de 16 anos com diarreia desde o dia anterior em que foi almoçar a um restaurante novo. Menciona não ter tido febre.

Aconselhei a toma de Lenodiar Adult[®], dois comprimidos duas a três vezes por dia em função da gravidade, o qual será responsável por reduzir as descargas diarreicas e normalizar a consistência das fezes^[8]. Este dispositivo médico tem dupla ação protetora - através da

formação de uma película com efeito barreira que limitará o contacto com microorganismos e agentes potencialmente irritantes - e antioxidante contrariando a irritação da mucosa^[8]. Desta forma é particularmente vantajoso dado que favorece a rápida recuperação da função intestinal e o equilíbrio da flora bacteriana sem provocar obstipação^[8]. Aconselhei ainda a toma do probiótico Prolif[®] que contém a levedura *Saccharomyces boulardii*^[9] para ajudar a repôr a flora intestinal, um comprimido de 8 em 8 horas, ambos durante 3 a 5 dias. É importante fazer ainda a correção da perda de líquidos e eletrólitos, e, para tal sugeri o Dioralyte[®], em que cada saqueta deve ser dissolvida em 200mL de água ingeridos após cada dejeção diarreica ou 2 a 3 vezes por dia^[10]. Esta combinação de eletrólitos é responsável por estimular a absorção de água e eletrólitos a partir do trato gastrointestinal, prevenindo ou revertendo a desidratação que tem lugar perante a existência de diarreia^[10]. É ainda conveniente evitar o consumo de produtos lácteos e seus derivados. Se o sintoma se mantiver por mais de 7 dias ou se viesse a desenvolver febre, deve consultar o médico.

Caso V

Homem de 45 anos cujo emprego o obriga a passar longas horas de pé, queixa-se de ultimamente sentir as pernas inchadas e particularmente pesadas.

O objetivo será estimular a microcirculação e, nesse sentido aconselhei a combinação do Cedraflon[®] com o Daflon 1000[®]. O Cedraflon[®] é um creme revitalizante que apresenta na sua composição extratos puros de Cidra da Córsega em combinação com mentol, cuja associação tem uma ação tonificante e refrescante nas pernas, aliviando a sensação de fadiga e cansaço. A sua fórmula permite uma rápida absorção pela pele, a par da sua hidratação intensa, sendo compatível com uma utilização diária^[11]. Deve ser aplicado com ligeira massagem e movimentos de baixo para cima. Daflon 1000[®], indicado para o tratamento dos sintomas relacionados com insuficiência venosa, é capaz de ao nível venoso, diminuir a sua distensibilidade e estase venosas, além de que, ao nível da microcirculação, normaliza a permeabilidade capilar e reforça a sua resistência. A toma diária recomendada é de um comprimido, de preferência pela manhã^[12].

Aconselhei ainda que começasse a utilizar meias de descanso e que procurasse fazer exercício físico regular, usar roupas largas, evitar a exposição direta das pernas ao calor (sol, banhos quentes, por exemplo), massajar e enxaguar as pernas com água fria, como também elevá-las à noite antes de dormir, por exemplo, sobre uma almofada.

Conclusão

O Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos diz-nos que «*O Farmacêutico exerce a sua profissão pautando-se pelos valores da disponibilidade, atenção, dignidade para consigo e com os outros, cuidado, altruísmo, empatia, compaixão, tolerância, prudência e esperança, seja qual for o seu setor de atividade, nomeadamente garantindo a cada pessoa em contexto de saúde o cuidado humano e tecnicamente adequado à sua situação concreta, com base na melhor evidência científica disponível*»^[1] e foi precisamente a personificação desta definição que encontrei na Farmácia Viriato.

Transferir o conhecimento teórico adquirido no decorrer de cinco longos anos para a prática não é um exercício simples, todavia, o incomensurável empenho que colocaram na minha formação, o cuidado, a dedicação, a par da tamanha confiança que depositaram em mim e nas minhas capacidades é algo que guardo com especial carinho e que, por muito que procure, sempre me faltarão palavras para agradecer. Confiaram em mim, confiaram no meu conhecimento, confiaram na minha dedicação e proporcionaram-me liberdade para ser e para errar com a toda a responsabilidade, sem nunca deixarem de me proteger. Senti-me valorizada e pouco tempo passou até que já me sentisse parte da equipa. Reconheço em cada um dos colaboradores da Farmácia Viriato qualidades profissionais e pessoais exemplares que almejo, um dia, vir a reunir em mim, bem como a constante necessidade de se reinventarem e de continuamente se superarem, sem retirar o foco do que mais importa: a saúde e o bem-estar do doente.

O meu coração transborda de alegria sabendo que não podia ter escolhido melhor Farmácia para concluir esta etapa da caminhada que tem sido tornar-me Farmacêutica.

Bibliografia

1. Ordem dos Farmacêuticos – Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos. Diário da República n.º 244/2021, Série II (2021), páginas 143 – 159.
2. ABOCA - Neobianacid[®] [Acedido a 20 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.aboca.com/pt-pt/produto/neo-bianacid-acidez-e-refluxo/>
3. INFARMED, I.P – Resumo das Características do Medicamento – Digespan[®] [Acedido a 20 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
4. INFARMED, I.P – Resumo das Características do Medicamento – Clotrimazol Basi[®] [Acedido a 20 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
5. INFARMED, I.P – Resumo das Características do Medicamento – Halibut[®] [Acedido a 20 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
6. ABOCA - Grintuss[®] [Acedido a 20 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.aboca.com/pt-pt/produto/grintuss-pediatric-xarope/>
7. ABOCA - Fitonasal[®] [Acedido a 20 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.aboca.com/pt-pt/produto/fitonasal-pediatric-spray-5/>
8. ABOCA - Lenodiar[®] [Acedido a 20 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.aboca.com/pt-pt/produto/lenodiar-adult-5/>
9. INFARMED, I.P – Resumo das Características do Medicamento – Prolif[®] [Acedido a 20 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
10. INFARMED, I.P – Resumo das Características do Medicamento – Dioralyte[®] [Acedido a 20 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
11. CEDRAFLON – Cedraflon[®] [Acedido a 26 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.cedraflon.pt/#product>
12. INFARMED, I.P – Resumo das Características do Medicamento – Daflon[®] [Acedido a 20 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>

Parte II

Relatório de Estágio em Investigação

Glioblastoma: Potencial Bioativo de Óleos Essenciais



Orientação: Doutora Célia Cabral

Índice de Figuras

- Figura 1:** Esquema ilustrativo do desenho da placa. Cada placa comportava 3 linhas celulares. Eram realizadas 3 réplicas por condição, sendo que as condições em causa tratavam-se de 5 concentrações diferentes do óleo essencial em estudo, ordenadas por ordem decrescente, da esquerda para a direita; poços de controlo assinalados por CTR, em que as células se encontravam somente em contacto com o meio de cultura; poços de controlo ao solvente, DMSO, e os poços de controlo à resazurina para que pudéssemos determinar a absorvância de fundo, usando o valor como branco posteriormente no tratamento dos resultados obtidos. 32
- Figura 2:** Gráficos resultantes do ensaio *Alamar Blue* para o óleo essencial *L. pedunculata* que determina a viabilidade de cada linha celular nos três *timepoints* em estudo..... 34
- Figura 3:** Gráficos resultantes do ensaio *Alamar Blue* para o óleo essencial *M. cervina* que determina a viabilidade de cada linha celular nos três *timepoints* em estudo..... 36
- Figura 4:** Gráficos resultantes do ensaio *Alamar Blue* para o óleo essencial *R. segetum* que determina a viabilidade de cada linha celular nos três *timepoints* em estudo..... 38

Abreviaturas

GB - Glioblastoma

iCBR - Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research

L. pedunculata - *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav.

M. cervina - *Mentha cervina* L.

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

R. segetum - *Ridolfia segetum* (L.) Moris

Introdução

A Organização Mundial de Saúde indica que, em 2020, surgiram 308 102 novos casos e 251 329 foram as mortes associadas a tumores do Sistema Nervoso Central^[1]. Glioblastoma (GB) é um glioma difuso de grau IV com um prognóstico reservado^[2], constituindo o glioma primário maligno mais comum do Sistema Nervoso Central^[3] e a forma mais agressiva do conjunto dos gliomas^[4]. Trata-se de uma doença multifatorial com variáveis que vão desde a localização cerebral, células originárias, idade, género^[2].

O esquema de tratamento atualmente estabelecido envolve, em primeiro lugar, a ressecção cirúrgica do tumor, e em seguida, radioterapia em combinação com quimioterapia recorrendo ao uso do agente alquilante temozolomida^[3]. No entanto, estes tratamentos apresentam limitações, como a ressecção cirúrgica incompleta do tumor ou o desenvolvimento de multirresistência aos fármacos, o que contribui para uma reduzida eficácia terapêutica associada a reincidências do tumor^[3,5]. Elevada heterogeneidade genética, microambiente altamente imunossupressor e barreira hematoencefálica como obstáculo aos sistemas de entrega de fármacos constituem as grandes dificuldades a superar no que concerne ao tratamento do GB^[5]. Mais de 95% dos doentes morrem ao fim de 5 anos após o diagnóstico^[6], o que torna urgente o desenvolvimento de novas opções terapêuticas eficazes^[3].

O uso de produtos naturais e seus derivados em oncologia tem ganho cada vez mais expressão nas últimas décadas. Ensaios *in vitro* e *in vivo* em modelos de GB têm vindo a utilizar quer extratos quer compostos ativos isolados de plantas, incluindo produtos do seu metabolismo secundário. Os produtos naturais demonstraram múltiplos efeitos antitumorais, salientando-se os flavonóides, polifenóis, terpenos, canabinóides e os óleos essenciais^[7], no seguimento da sua atividade sobre mecanismos de defesa celular tais como sistemas enzimáticos antioxidantes, destoxificação e estimulação anti-inflamatória e ainda respostas anti-metastáticas^[4]. Integrada no grupo de investigação Plants4Health com trabalhos a decorrer no Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (iCBR), o estágio curricular a que me propus - e que teve lugar entre o dia 2 de maio de 2022 e o dia 9 de julho de 2022 -, surge precisamente neste âmbito: procurar determinar o potencial bioativo de uma seleção de óleos essenciais em linhas tumorais de GB.

Óleos essenciais são extratos voláteis obtidos a partir das partes aéreas de plantas aromáticas e são resultado do seu metabolismo secundário. Cada planta produz um óleo essencial que lhe é característico, todavia, de um modo geral, podemos caracterizar a sua composição em compostos oxigenados e hidrocarbonetos, com uma multiplicidade de grupos

funcionais presentes. Apesar da investigação no seu uso enquanto agentes anti-cancerígenos ser relativamente recente, os óleos essenciais têm demonstrado um elevado potencial antitumoral nomeadamente através de mecanismos preventivos, bem como capacidade para atuar em células cancerígenas já estabelecidas e na sua interligação com o microambiente tumoral. Estes extratos podem ser utilizados como agentes bioativos isolados - sendo que vários estudos *in vitro* têm vindo a comprovar a sua capacidade em atuar especificamente nas células-alvo, apresentando, portanto, uma citotoxicidade bastante reduzida nas células não-tumorais - ou, por outro lado, como adjuvante na melhoria da atividade citotóxica de fármacos quimioterapêuticos através do aumento da sua janela terapêutica^[8].

Lavandula pedunculata (Mill.) Cav. (*L. pedunculata*), *Mentha cervina* L. (*M. cervina*), *Ridolfia segetum* (L.) Moris (*R. segetum*) foram as plantas cujos óleos essenciais tive a oportunidade de estudar a partir de ensaios de viabilidade celular nas linhas celulares tumorais U87, H4, UI 18, U373 e A172, e na linha celular não tumoral Hek293. O óleo essencial de *R. segetum* apresenta propriedades antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral já validadas em estudos prévios^[9]; o óleo essencial de *L. pedunculata* apresenta alguma atividade antioxidante^[10]; e, por fim, o óleo essencial de *M. cervina* que é maioritariamente antioxidante e antimicrobiano^[11].

I. Métodos

No que concerne à execução laboratorial, os métodos que tive a oportunidade de executar foram cultura celular e ensaios de viabilidade celular.

I.1. Cultura Celular

Por cultura celular entende-se o procedimento que envolve o isolamento de células obtidas a partir de tecidos ou órgãos com origem animal ou vegetal e sua manutenção *in vitro*, em condições adequadas ao seu crescimento^[12].

Os tipos de células utilizados em cultura celular pertencem essencialmente a duas categorias diferentes: cultura primária ou linha celular^[12]. Cultura primária refere-se à cultura iniciada a partir de células, tecidos ou órgãos, retiradas diretamente de um organismo, sendo assim considerada até ao momento em que for subcultivada e imortalizada com sucesso pela primeira vez^[13]. Depois deste momento, passará a ser considerada uma linha celular, o que implica que as novas células formadas pertençam sempre à mesma linhagem de células presentes na cultura primária^[13]. Dentro das linhas celulares podemos ainda distinguir as linhas celulares finitas e as linhas celulares contínuas. Uma linha celular finita é aquela que apenas é capaz de ser submetida a um número limitado de passagens celulares, depois do qual entrará em senescência; por seu turno, uma linha celular contínua é aquela que é capaz de ser submetida a um número ilimitado de passagens celulares^[13]. Todavia, com o aumento do número de passagens celulares, verifica-se uma alteração na morfologia das células bem como em algumas das suas características, sendo importante estabelecer uma periodicidade adequada para a passagem celular de maneira que sejamos capazes de manter a reprodutibilidade dos ensaios, como também de monitorizar o seu estado^[14].

A cultura de células, assim como todo o manuseamento dos compostos em contacto com as mesmas, têm de ser realizados em ambiente asséptico e que mimetize as condições *in vivo*. Neste sentido, todos os procedimentos são realizados numa sala de cultura própria para o efeito, em câmara de fluxo laminar, havendo sempre o cuidado de esterilizar todos os materiais e desinfetar todas as superfícies com etanol a 70%. Devem seguir-se as boas práticas de trabalho em câmara de fluxo laminar.

As linhas celulares com as quais tive a oportunidade de trabalhar foram as U87, H4, U118, U373 e A172, linhas celulares tumorais, e as Hek293, linha celular não tumoral, as quais, todas elas, crescem em monocamada e em conformação aderente. U87 é uma linha celular com morfologia epitelial isolada a partir de gliomas malignos de um doente do sexo masculino, com

diagnóstico provável de glioblastoma^[15]. H4 é uma linha celular com morfologia epitelial proveniente de neuroglioma humano^[16]. U118 é uma linha celular que apresenta morfologia mista, isolada a partir de um doente do sexo masculino diagnosticado com astrocitoma/glioblastoma^[17]. U373 é uma linha celular de glioblastoma astrocitoma humano derivada de um tumor maligno e apresenta a morfologia típica dos astrócitos^[18]. A172 é uma linha celular isolada a partir do tecido cerebral de um doente do sexo masculino com glioblastoma^[19]. Estas células constituem uma boa representação da realidade tumoral de um glioma, com diferentes linhas celulares que apresentam diferentes graus de complexidade genética, procurando, portanto, mimetizar a acentuada heterogeneidade que o caracteriza. Hek293 é uma linha celular não tumoral, do tipo epitelial proveniente do tecido renal embrionário^[20] que tem aqui o papel de servir como termo comparativo, para percebermos se os compostos-teste são seletivos para as células de interesse e procurar prever os efeitos *off-target*.

Subcultivo ou passagem celular consiste na remoção do meio de cultura do frasco e transferência de uma quantidade adequada de células para meio fresco com o intuito de eliminar os produtos tóxicos do normal metabolismo celular, por forma a que as células tenham nutrientes e espaço suficientes para se continuarem a multiplicar^[14]. Quando se trata de células que crescem em monocamada e em conformação aderente é crucial conhecer o comportamento da curva de crescimento normal da linha celular^[14], por forma a conhecer o seu *doubling time* e, em última instância prever o seu estado de confluência e o momento ideal para o seu subcultivo^[12].

1.2. Ensaio de Viabilidade Celular: Alamar Blue

Com o intuito de avaliar o potencial bioativo de óleos essenciais, em primeiro lugar, importa averiguar a sua citotoxicidade a par da sua seletividade para as células-alvo, por intermédio de ensaios de *screening*.

Os ensaios de viabilidade celular visam, tal como o nome indica, determinar a viabilidade celular perante a sua anterior exposição a um composto cuja toxicidade à concentração em estudo se desconheça. O ensaio *Alamar Blue* é um dos métodos mais utilizados para o estudo da viabilidade celular e da citotoxicidade, sendo que consiste na capacidade em detetar o ambiente redutor de uma célula metabolicamente viável^[21]. A resazurina é uma substância não tóxica, solúvel em água, estável no meio de cultura e que apresenta a capacidade de permear as membranas celulares^[21]. Trata-se de um composto de cor azul, não fluorescente que é reduzido a resorufina, um composto de coloração rosa altamente fluorescente; esta redução

acontece na sequência do corante, que por ser altamente dicromático, se comporta como um agente intermediário aceitador de elétrons na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, interferindo com o normal percurso dos mesmos. Assim, a alteração de coloração que se verifica indica um compromisso ao nível do metabolismo celular, não garantindo que houve efetiva interrupção na cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria^[21], o que indicaria morte celular.

2. Resultados e Discussão

2.1. Cultura Celular

Dado que trabalhei com células que crescem em conformação aderente, o primeiro passo é sempre o destacamento celular do frasco de cultura. O destacamento pode ser realizado recorrendo a um agente químico, tripsina, ou a um agente mecânico, raspador. A tripsina é capaz de promover o destacamento químico na medida em que sendo uma endopeptidase quebra as ligações aminoácido-aminoácido, entre os resíduos de lisina-arginina, em específico. A tripsina é bem tolerada por todas as linhas celulares à exceção das U118, as quais devem ser destacadas com recurso ao raspador, devido à sua maior sensibilidade.

Segue-se a contagem de células em hemocítmetro com o intuito de conseguirmos calcular o volume de suspensão celular a preparar para o número de poços que tínhamos em estudo.

Plaques as células consiste em pipetar o volume pretendido de suspensão celular, por forma a garantir que todos os poços apresentam a densidade celular pretendida. No caso, o esquema de placa utilizado encontra-se esquematizado na Figura 1.

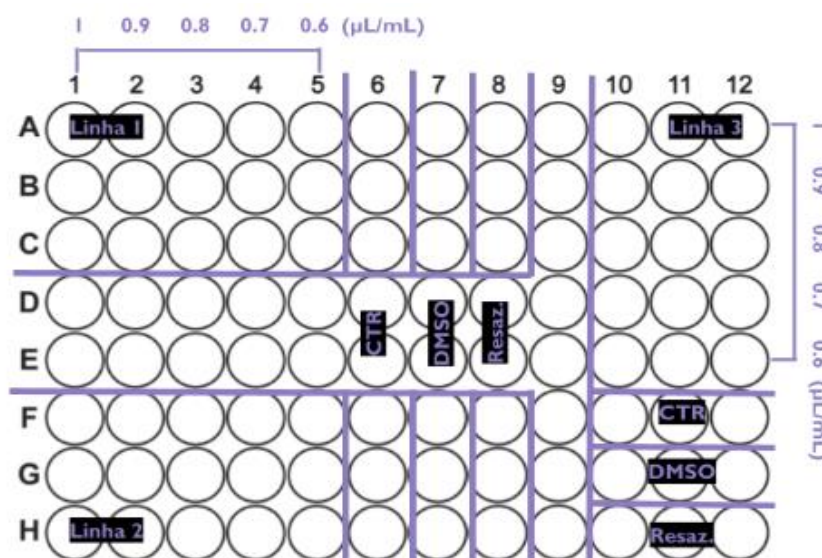


Figura 1: Esquema ilustrativo do desenho da placa. Cada placa comportava 3 linhas celulares. Eram realizadas 3 réplicas por condição, sendo que as condições em causa tratavam-se de 5 concentrações diferentes do óleo essencial em estudo, ordenadas por ordem decrescente, da esquerda para a direita; poços de controlo assinalados por CTR, em que as células se encontravam somente em contacto com o meio de cultura; poços de controlo ao solvente, DMSO, e os poços de controlo à resazurina para que pudéssemos determinar a absorvância de fundo, usando o valor como branco posteriormente no tratamento dos resultados obtidos.

2.2. Tratamento das Células com os Óleos Essenciais em Estudo

As concentrações em estudo foram, para todos os óleos essenciais, as seguintes: 1,0; 0,9; 0,8; 0,7 e 0,6 $\mu\text{L}/\text{mL}$. A sua preparação consistiu, em primeiro lugar pela de maior concentração, a partir da adição do volume pretendido de óleo essencial, seguido de igual volume de DMSO responsável pela dissolução do primeiro, ao que se segue o acrescento em pequenos incrementos do volume de meio necessário para perfazer a concentração pretendida para o volume necessário. Por forma a promover a efetiva e completa solubilização do óleo essencial na solução em preparação recorreremos ao equipamento de ultrassons, durante o tempo necessário para que, a olho nu e contraluz, não se observasse a formação de micelas em suspensão perante leve agitação, entre cada adição de meio.

A partir desta solução-mãe as restantes concentrações foram preparadas perfazendo o volume com meio. Segue-se o tratamento das células com as respetivas concentrações e o preenchimento dos restantes poços em função das condições em causa.

2.3. Ensaio de Viabilidade Celular

Para a realização deste ensaio foi preparada uma solução de resazurina em meio, da qual foi retirado um volume de 100 μL para adicionar a cada poço deixando, em seguida, a placa a incubar. O tempo de incubação depende de vários fatores, nomeadamente o estado e quantidade de células. Células saudáveis, em crescimento normal, são capazes de metabolizar a resazurina mais depressa.

A placa encontrava-se pronta a ser lida quando os poços referentes ao controlo haviam sofrido alteração de coloração de azul arroxeadado para rosa, o que indica que as células se encontram viáveis e foram capazes de metabolizar a resazurina transformando-a em resorufina, daí a alteração da coloração. Tal encontra-se concordante com o esperado na medida em que as células correspondentes a estes poços, não tendo sido sujeitas a qualquer estímulo, multiplicar-se-ão normalmente. Neste momento procede-se à leitura da absorvância da placa a dois comprimentos de onda, 570 e 600 nm, e os resultados são tratados como percentagem do controlo, obtidos através da fórmula:

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{Abs sample (570-600)} - \text{Abs Branco (570-600)}}{\text{Abs CTR (570-600)} - \text{Abs Branco (570-600)}} \times 100\%$$

2.4. Gráficos e Respetiva Análise

a. *L. pedunculata*

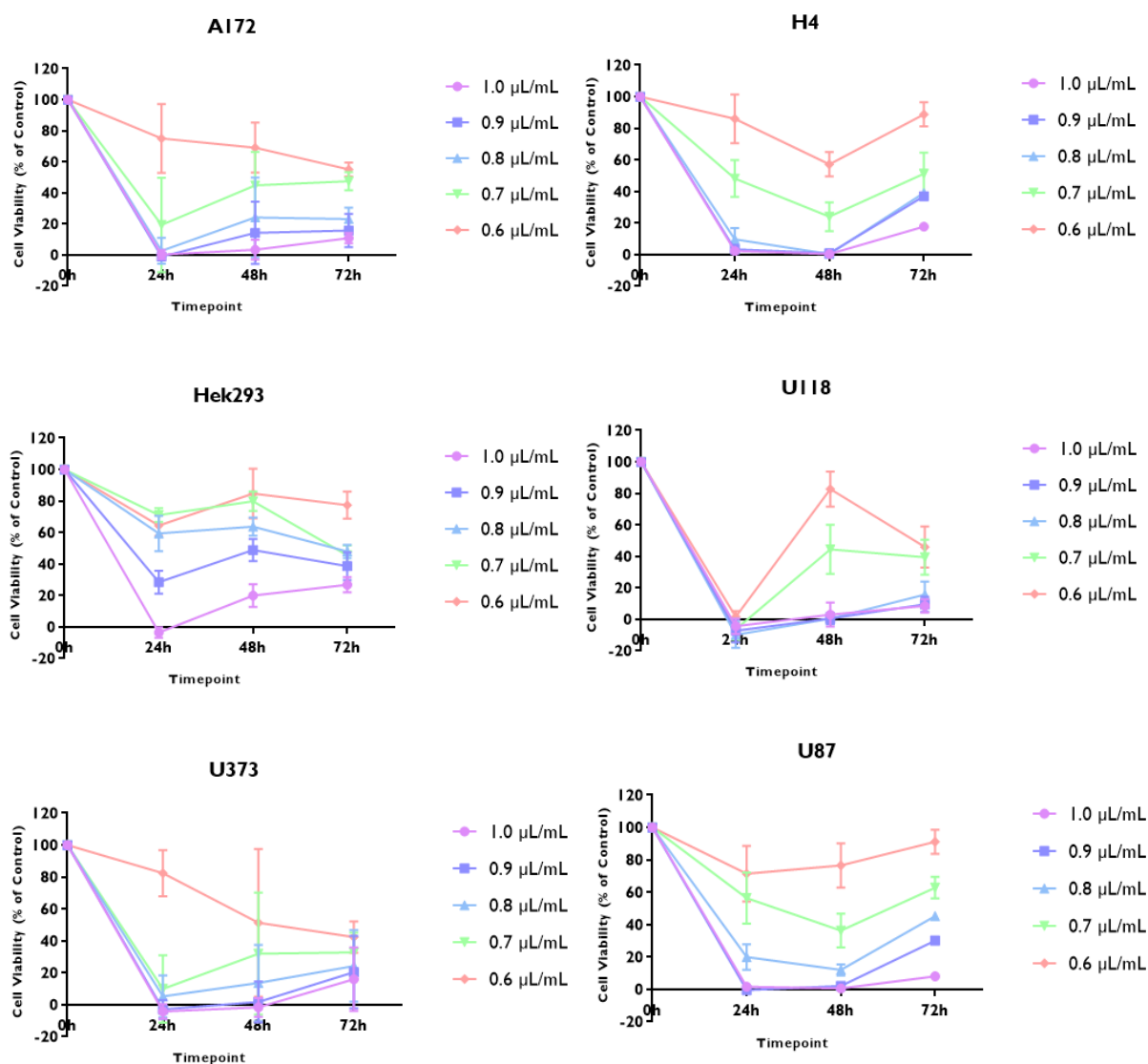


Figura 2: Gráficos resultantes do ensaio *Alamar Blue* para o óleo essencial *L. pedunculata* que determina a viabilidade de cada linha celular nos três *timepoints* em estudo.

No geral, quanto maior a concentração do óleo essencial de *L. pedunculata* administrado às células, menor a viabilidade celular. Não obstante, no que ao tempo de exposição concerne, aqui representado pelos diferentes *timepoints*, a comparação já não é tão linear.

No caso da linha celular A172 verifica-se que, para todas as concentrações, existe uma redução da viabilidade celular às 24h seguida de recuperação às 48h. A única exceção observa-se para 0,6 µL/mL, em que se denota uma contínua diminuição da viabilidade celular até às 72h. Em relação à linha celular H4, constata-se uma diminuição contínua da viabilidade celular até às 48h para todas as concentrações, ao que se segue uma ligeira recuperação às 72h. Após

tratamento da linha celular Hek293, verifica-se uma redução da viabilidade celular às 24h para todas as concentrações, seguido de uma recuperação das células após 48h e, novamente, uma ligeira diminuição da viabilidade celular às 72h, à exceção da concentração de 1,0 µL/mL onde se denota uma recuperação crescente ao longo dos três *timepoints*. Relativamente às células U118, constata-se que o óleo teve um efeito citotóxico significativo às 24h, no entanto verificou-se uma recuperação das células às 48h mais acentuada nas menores concentrações (0,6 e 0,7 µL/mL) e bastante mais ligeira nas maiores concentrações (0,8; 0,9; 1,0 µL/mL), seguido de uma nova diminuição dos valores de viabilidade celular às 72h para as concentrações de 0,6 e 0,7 µL/mL e continuação da recuperação de viabilidade celular para as maiores concentrações. Na linha celular U373, as diferentes concentrações do óleo essencial provocaram uma diminuição da viabilidade celular às 24h, decréscimo este bastante acentuado, exceto para a concentração de 0,6 µL/mL onde a viabilidade celular decresce apenas cerca de 20% (dos 100% para aproximadamente 80%); a concentração de 0,6 µL/mL induz uma contínua diminuição da viabilidade celular ao longo dos três *timepoints*, ao passo que as células tratadas com as concentrações 0,8; 0,9 e 1,0 µL/mL denotam uma contínua recuperação no tempo, sendo as 72h o *timepoint* que apresenta, para as três, o maior valor de viabilidade celular; no que concerne à concentração de 0,7 µL/mL, em oposição, verificamos uma recuperação em cerca de 20% de viabilidade celular das 24 para as 48h, ao que se seguiu uma nova diminuição da viabilidade celular às 72h. Por último, a linha celular U87 demonstra um comportamento bastante semelhante perante o tratamento com as várias concentrações: redução da viabilidade celular às 24h para as concentrações 0,6; 0,9 e 1,0 µL/mL, seguida de contínua recuperação das células ao longo dos restantes *timepoints*; para as restantes concentrações (0,7 e 0,8 µL/mL) verifica-se uma diminuição da viabilidade celular até às 48h e recuperação às 72h.

Assim, a análise dos resultados leva-me a acreditar que o óleo essencial de *L. pedunculata* é mais eficaz a comprometer a viabilidade celular na concentração de 1,0 µL/mL para todas as linhas em estudo, sendo que as células Hek293, linha celular não tumoral, apresenta uma capacidade de recuperação superior, o que pode indicar especificidade na sua ação.

b. *M. cervina*

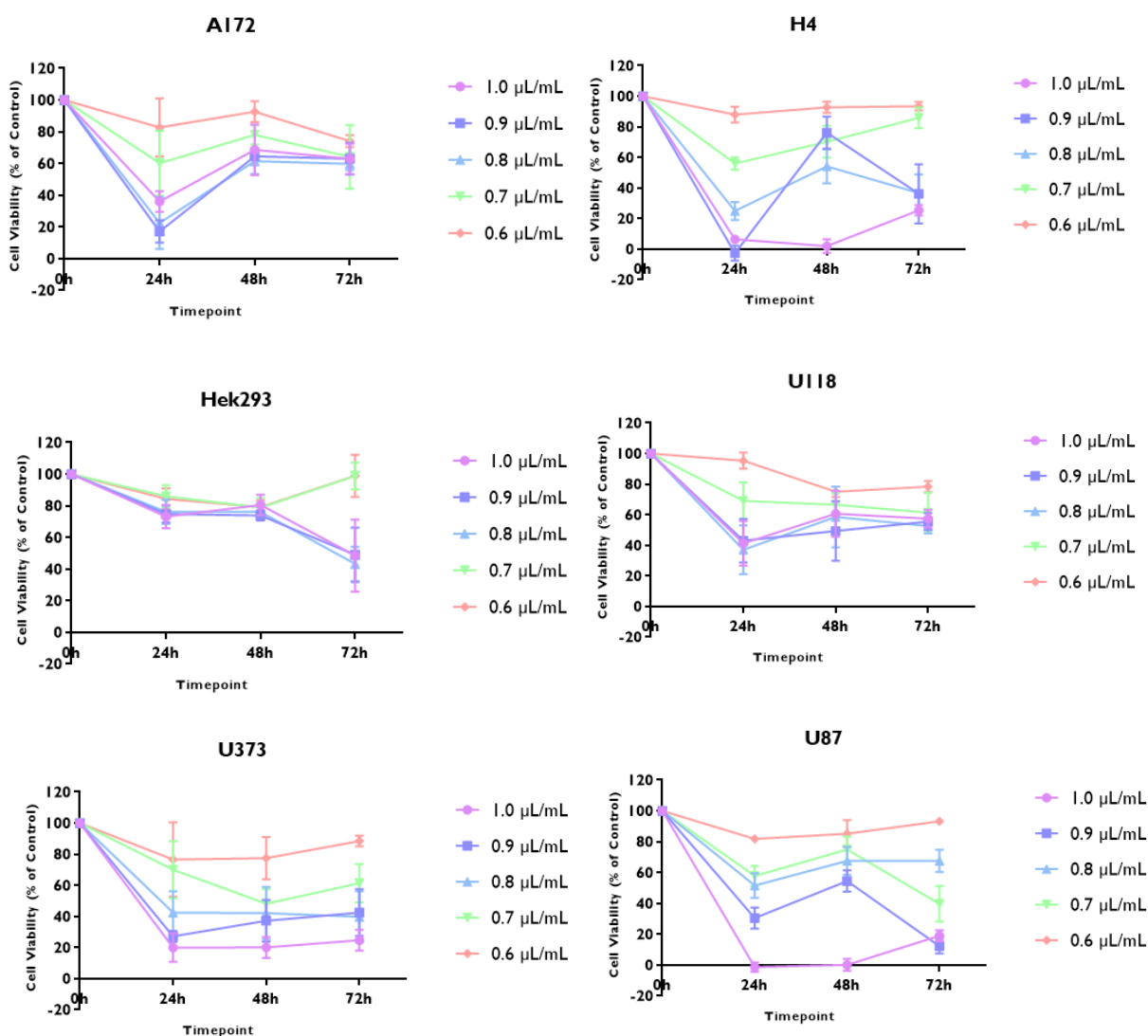


Figura 3: Gráficos resultantes do ensaio *Alamar Blue* para o óleo essencial *M. cervina* que determina a viabilidade de cada linha celular nos três *timepoints* em estudo.

O panorama geral indica que quanto maior a concentração de óleo essencial de *M. cervina* em contacto com as linhas celulares em estudo, menor a viabilidade celular e a capacidade de recuperação ao longo do tempo.

A linha celular A172 denota, para todas as concentrações, um pico mínimo de viabilidade celular às 24h, recuperação às 48h e nova diminuição da viabilidade celular às 72h. As células H4 apresentam um comportamento semelhante para o tratamento com as concentrações de 0,8 e 0,9 µL/mL; a concentração de 0,6 µL/mL não induz efeito citotóxico, verificando-se valores de viabilidade celular acima de 90% ao longo do tempo; para a concentração de 0,7 µL/mL evidencia-se uma diminuição da viabilidade celular às 24h e recuperação contínua até às 72h; 1,0 µL/mL, por sua vez, provoca antes uma redução acentuada da viabilidade celular

até às 48h; por último, a concentração de 0,9 µL/mL induz um comportamento particularmente interessante nesta linha celular: a recuperação das 24h para as 48h de quase 80% (dos 0% para os 80%) ao que se segue uma diminuição de viabilidade celular para cerca de metade. A linha celular Hek293, para as concentrações de 0,6 e 0,7 µL/mL, apresenta uma diminuição de viabilidade celular até às 48h seguida de recuperação às 72h, em valores praticamente sobreponíveis; para as células tratadas com 0,8; 0,9 e 1,0 µL/mL, observa-se, por seu turno, diminuição da viabilidade celular às 24h, recuperação às 48h e diminuição acentuada, em cerca de 30% (aproximadamente dos 80% para os 50%) às 72h. A linha celular U118, quando tratada com as concentrações de 0,6 e 0,7 µL/mL apresenta diminuição de viabilidade celular até às 48h, sendo que às 72h, para 0,6 µL/mL, temos uma ligeira recuperação, ao passo que para 0,7 µL/mL a viabilidade prossegue a sua diminuição; em relação às concentrações 0,8 e 1,0 µL/mL verifica-se uma diminuição da viabilidade celular bastante mais acentuada às 24h, recuperação às 48h e ligeira diminuição às 72h; no caso de 0,9 µL/mL após as 24h de tratamento, a recuperação mantém-se até às 72h. Por outro lado, o tratamento das células U373 com as concentrações de 0,6; 0,9 e 1,0 µL/mL de óleo essencial induz uma diminuição de viabilidade celular às 24h, bastante mais acentuada nas maiores concentrações em relação à menor, seguida de recuperação até às 72h; para 0,7 µL/mL verifica-se diminuição da viabilidade celular até às 48h, seguida de recuperação relativamente acentuada às 72h; 0,8 µL/mL promove uma redução acentuada às 24h e manutenção aproximada da mesma viabilidade. As células U87 em exposição às concentrações 0,6 e 1,0 µL/mL têm um comportamento semelhante apesar de em proporções bastante mais inferiores para a maior concentração, com uma diminuição da viabilidade às 24h seguida de recuperação até às 72h; o mesmo se sucede para 0,7 e 0,9 µL/mL com uma diferença constante de cerca 30% a mais de viabilidade para a menor concentração de entre as duas, com diminuição até às 24h, recuperação às 48h, seguida de decréscimo às 72h, para valores inferiores aos verificados inicialmente às 24h; por último, 0,8 µL/mL apresenta diminuição às 24h, recuperação até às 72h, sendo esta mais acentuada entre as 24h e as 48h.

Atendendo ao verificado, posso constatar que o óleo essencial de *M. cervina* apresenta um efeito citotóxico/antiproliferativo, induzindo uma diminuição da viabilidade celular em todas as linhas celulares, em maior extensão nas concentrações de maior valor, sendo que o impacto na linha celular Hek293, linha celular não tumoral com origem renal, é consideravelmente menos significativo o que constitui um dado bastante interessante para estudos *a posteriori*, no que à especificidade da ação bioativa concerne.

c. *R. segetum*

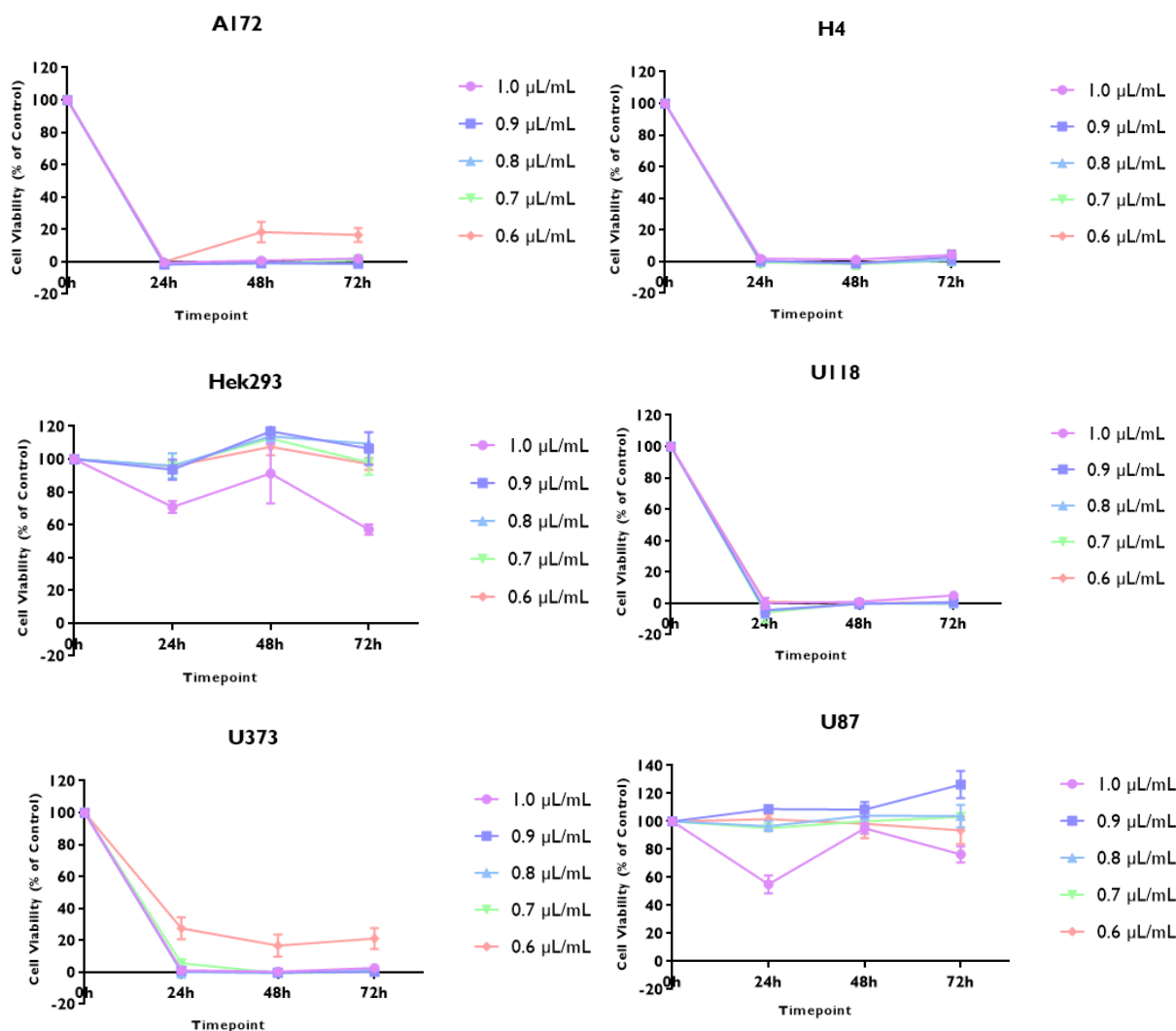


Figura 4: Gráficos resultantes do ensaio *Alamar Blue* para o óleo essencial *R. segetum* que determina a viabilidade de cada linha celular nos três *timepoints* em estudo.

Após o tratamento das diferentes linhas celulares com o óleo essencial de *R. segetum*, verificou-se, de uma forma geral, que as diferentes concentrações usadas apresentam um elevado efeito citotóxico ao longo do tempo para as linhas celulares A172, U373, U118 e H4. No entanto, o mesmo não se verifica para a linha tumoral U87 e para a linha não tumoral Hek293.

Desta forma, relativamente à linha celular Hek293, todas as concentrações parecem não afetar de forma significativa a viabilidade celular ao longo do tempo de incubação. Para todas as concentrações, exceto a mais elevada, 1,0 µL/mL, a média da viabilidade celular é de cerca de 100%. Para 1,0 µL/mL, os valores de viabilidade celular são cerca de 70%, exceto às 72h em que se verifica uma diminuição da viabilidade celular em cerca de 50%. Por último, analisando

os resultados obtidos para a linha celular U87, verificou-se que apenas a maior concentração, 1,0 $\mu\text{L/mL}$, induziu um efeito citotóxico após 24h de incubação, provocando uma redução da viabilidade celular em 40%.

À luz de tudo o que foi exposto, posso concluir que o óleo essencial de *R. segetum* apresenta um comportamento particularmente interessante dado ter a capacidade de provocar uma diminuição significativa da viabilidade celular nas linhas celulares tumorais A172, H4, U118 e U373, quando em simultâneo consegue manter a viabilidade celular na linha não tumoral, Hek293, em média nos 100% ao longo dos três *timepoints*. Os resultados obtidos para a linha celular U87 não se encontram concordantes com estas ilações, pelo que seria conveniente repetir os ensaios nesta linha em particular, por forma a procurar compreender o motivo por detrás de tamanha discrepância.

Em suma, tratando-se estes de ensaios de *screening*, com o intuito de dar continuação aos estudos, optaria precisamente pelo óleo essencial de *R. segetum* dada a sua aparente eficácia e seletividade para as linhas tumorais, sendo que realizaria ainda ensaios mais específicos para determinar se este efeito é citotóxico ou citostático por forma a melhor compreender o mecanismo através do qual atua, e depois então conjecturar de que forma será possível continuar a construir saber sobre este conhecimento.

Nota: Os resultados aqui apresentados são fruto do trabalho colaborativo de vários elementos do grupo de investigação, não tendo sido integralmente obtidos somente do trabalho que desenvolvi.

3. Análise SWOT

A análise SWOT (*Strenghts, Weaknesses, Opportunities and Threats*) que em seguida apresento procura sumariamente ilustrar a minha experiência neste estágio, no que concerne a Pontos Fortes e Pontos Fracos, Oportunidades e Fraquezas, os dois primeiros em relação ao grupo de investigação que me acolheu, os dois últimos relativos a fatores externos que possam ter influenciado positiva ou negativamente.

3.1. Pontos Fortes

a. Perspetiva de grupo de investigação

Ter sido completamente integrada no grupo proporcionou-me a oportunidade de experienciar o verdadeiro quotidiano de um Investigador, as múltiplas tarefas que lhe são atribuídas, bem como participar das várias reuniões que foram tendo lugar ao longo do período do meu estágio.

b. Multidisciplinaridade

Plants4Health é um grupo de investigação bastante multidisciplinar, em que todos os elementos apresentam um *background* científico diferente, o que se traduz em projetos profundamente disruptivos, conferindo ainda espaço para que cada pessoa possa dar o seu contributo, em relação aos vários trabalhos em curso, segundo um olhar distinto, o que, no meu entender, constitui a particularidade que mais valor acrescenta ao grupo.

c. Metodologia de trabalho

O *modus operandi* do grupo rege-se em função de tarefas e prazos a cumprir, e não por um horário tradicional fixo, o que me ofereceu uma maior flexibilidade e espaço de organização segundo os meus próprios termos, algo que deveras valorizo.

3.2. Pontos Fracos

a. Ausência de contacto com outros grupos de investigação

Apesar do grupo apresentar inúmeras colaborações com outros Investigadores e grupos de investigação, durante o meu estágio não tive a oportunidade de interagir com nenhum dos mesmos e conhecer, ainda que superficialmente, o trabalho que desenvolvem, a sua realidade e metodologias de trabalho.

b. Estágio não especificamente farmacêutico sob orientação não farmacêutica

Investigação é uma das inúmeras saídas profissionais que o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) possibilita aos seus estudantes. Não obstante, as competências que adquiri neste estágio são antes transversais a um leque de cursos enraizados na Biologia e na Botânica e não especificamente farmacêuticas como é o grande objetivo dum estágio curricular. Estudantes de cursos especializados nestes ramos estariam com certeza mais bem preparados para desempenhar as tarefas que me foram solicitadas, todavia, sendo o MICF um curso tão transversal e abrangente, apesar de alguma dificuldade inicial, depressa fui capaz de me inteirar do que era necessário e ter um bom desempenho.

A somar, não ter orientação Farmacêutica constituiu também uma menos-valia no sentido em que não pude testemunhar de que forma é que um Farmacêutico de formação base se movimenta em investigação, a forma como pensa e como leva a cabo as hipóteses em estudo.

c. Estágio centrado na realização de um único tipo de ensaio

Ter passado a totalidade do tempo do estágio a realizar as mesmas técnicas laboratoriais foi vantajoso no sentido em que pude entrosar-me por inteiro com as mesmas, compreendê-las de fio a pavio, e eventualmente tornar-me totalmente autónoma criando os meus próprios subterfúgios, métodos e rotina, ainda assim, considero que a possibilidade de aprender e executar outras técnicas teria constituído uma excelente adição. Em todo o caso, consciente da filosofia do grupo em primar pela qualidade sobre a quantidade, compreendo.

3.3. Oportunidades

a. Investigação no iCBR

O iCBR, outrora IBILI, é uma unidade de investigação multidisciplinar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra que tem por objetivo estudar os mecanismos celulares e moleculares que medeiam a fisiopatologia de doenças crónicas, a identificação de estratégias terapêuticas inovadoras e biomarcadores, bem como descobrir e implementar novas abordagens para promover a saúde e o bem-estar.

Com este estágio tive não só a oportunidade de conhecer a fundo as instalações do mesmo como compreender a sua organização e estrutura.

b. Integração em atividades

Os alunos de doutoramento com projetos em curso no iCBR organizam semanalmente seminários/palestras sobre temas particulares com convidados ou com o intuito de se proceder à apresentação e discussão de resultados, alguns dos quais tive a oportunidade de assistir com bastante gosto posto que considero tratarem-se de momentos bastante profícuos, mesmo que informais, para se ser exposto a novos temas, novas linhas de discussão e, receber novas perspetivas sobre a investigação em curso, o que pode auxiliar na descoberta de um novo redirecionamento.

Na sequência da participação do grupo na 56th Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation que teve lugar em Bari (Itália) tive ainda a oportunidade de pela primeira vez construir um *poster* científico apresentando parte dos resultados que até ao momento havia obtido.

Participação na atividade Picnic com Saúde também organizada pelos alunos de doutoramento do iCBR em conjunto com a Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra tendo sido alargada a participação a todo o Polo 3, CHUC, de entre outras entidades, onde tive a possibilidade de, com o grupo, preparar um conjunto de atividades de comunicação de ciência que, num ambiente informal e lúdico, permitissem dar a conhecer as várias vertentes do trabalho de investigação que o grupo se encontra a levar a cabo.

Por último, participei ainda no planeamento das atividades a serem realizadas no âmbito da Noite Europeia dos Investigadores 2022 a ter lugar no final do mês de setembro com o tema «Ciência para todos (SCIEVER) - Inclusão e Sustentabilidade», atividade esta que é pública e que tem lugar por toda a Europa, visando aproximar os Investigadores e o saber que produzem do público em geral com a intenção última de estimular o interesse por carreiras científicas, na qual já havia tido a oportunidade de participar na edição anterior, com imenso gosto.

3.4. Ameaças

a. Autonomia no desempenho de funções

Tratar-se de um estágio tão particular que requer conhecimentos tão específicos fez com que a minha evolução tivesse sido um tanto mais moderada ao longo do tempo do que aquilo que fazia conta. Apenas conquistei a autonomia necessária para levar a cabo as minhas tarefas de forma completamente autónoma na última metade do estágio.

b. Financiamento limitado

O facto de o financiamento do grupo ser limitado implicou que houvesse a necessidade de se fazer uma melhor e maior gestão do material, no sentido de sermos mais conscienciosos com os gastos desnecessários. Colateralmente, isso levou a que a pressão para não errar fosse ligeiramente maior, no sentido de evitar desperdício de tempo e recursos.

Conclusão

GB é um tumor particularmente agressivo e para o qual as opções terapêuticas são escassas e ineficazes. Perspetivar a utilização de óleos essenciais como solução, bem como colocar esforços e recursos no sentido de os explorar é, no meu entender, bastante ousado. Com recurso a ensaios de viabilidade celular, em particular o *Alamar Blue*, levei a cabo, em colaboração com outros elementos do grupo de investigação, ensaios de *screening* a três óleos essenciais (*L. pedunculata*, *M. cervina* e *R. segetum*), a diferentes concentrações (0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$), nas linhas celulares que correspondem à típica assinatura dos gliomas, em particular do GB (A172, U118, U373, H4 e U87), bem como numa linha não tumoral com origem renal (Hek293) para, de certa forma averiguar, desde logo, possíveis efeitos *off-target*.

Considero a opção de realizar o meu estágio curricular em Investigação, uma área de estágio não tradicional das Ciências Farmacêuticas, um tanto arrojada e, apesar do meu enorme fascínio pela descoberta científica, a par de uma incomensurável sede de saber, o início foi particularmente difícil. Não obstante, o zelo, a prontidão e o empenho que foram aplicados no meu processo de aprendizagem por cada elemento do grupo de investigação - em especial, pela Doutora Célia Cabral, pela Mariana Magalhães e pelo Mário Pedro Marques, a quem reitero aqui o meu obrigada -, a par da capacidade de aprender autonomamente com que o MICF me dotou, demonstraram-se cruciais para o meu sucesso. Tive a oportunidade de experienciar na primeira pessoa, o típico quotidiano de um Investigador, aperfeiçoar técnicas científicas, aprimorar o espírito crítico e destreza em laboratório, refinar a minha capacidade de resolução de problemas, análise de resultados e, o mais gratificante de tudo: alcançar a autonomia.

Tratou-se de uma bonita oportunidade para fazer ciência e de, mesmo que em curta medida, contribuir para a descoberta daquela que será, quiçá, a cura desta temida doença. Ainda é muito o conhecimento e o caminho a desbravar, mas com um enorme sentido de responsabilidade para com os doentes e o futuro de todos, com dedicação e compromisso, não existe impossível que a pouco e pouco não desvaneça.

Bibliografia

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION – Globocan 2020. The Global Cancer Observatory, 2020. [Consultado a 28 de agosto de 2022] *Brain, central nervous system*. Disponível na Internet: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/31-Brain-central-nervous-system-fact-sheet.pdf>
2. ALDOGHACHI, A. F., ALDOGHACI, A. F., BREYNE, K., LING, K.-H., CHEAH, P.-S. - Recent Advances in the Therapeutic Strategies of Glioblastoma Multiforme. *Neuroscience*. 491 (2022), 240–270.
3. MAGALHÃES, M., MANADAS, B., EFFERTH, T., CABRAL, C. - Chemoprevention and therapeutic role of essential oils and phenolic compounds: Modeling tumor microenvironment in glioblastoma. *Pharmacological Research*. 169 (2021), 105638.
4. ABBAS, M. N., KAUSAR, S., CUI, H. - Therapeutic potential of natural products in glioblastoma treatment: targeting key glioblastoma signaling pathways and epigenetic alterations. *Clinical and Translational Oncology*. 22(7) (2020), 963–977.
5. WU, W., KLOCKOW, J. L., ZHANG, M., LAFORTUNE, F., CHANG, E., JIN, L., WU, Y., DALDRUP-LINK, H. E. - Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance. *Pharmacological Research*. 171 (2021), 105780.
6. ARCELLA, A., SANCHEZ, M. - Natural substances to potentiate canonical glioblastoma chemotherapy. *Journal of Chemotherapy*. 33(5) (2021), 276–287.
7. ERICES, J. I., TORRES, Á., NIECHI, I., BERNALES, I., QUEZADA, C. - Current natural therapies in the treatment against glioblastoma. *Phytotherapy Research*. 32(11) (2018), 2191–2201.
8. BLOWMAN, K., MAGALHÃES, M., LEMOS, M. F. L., CABRAL, C., PIRES, I. M. - Anticancer Properties of Essential Oils and Other Natural Products. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018 (2018), 1–12.
9. BEEBY, E., MAGALHÃES, M., LEMOS, M. F. L., PIRES, I. M., CABRAL, C. - Cytotoxic effects of *Ridolfia segetum* (L.) Moris phytoproducts in cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 267 (2021), 113515.
10. VAIRINHOS, J., MIGUEL, M. G. - Essential oils of spontaneous species of the genus *Lavandula* from Portugal: a brief review. *Zeitschrift Für Naturforschung C*. 75(7–8) (2020), 233–245.
11. HELAL, I. M., EI-BESSOUMY, A., AL-BATAINEH, E., JOSEPH, M. R. P., RAJAGOPALAN, P., CHANDRAMOORTHY, H. C., AHMES, S. ben H. - Antimicrobial

Efficiency of Essential Oils from Traditional Medicinal Plants of Asir Region, Saudi Arabia, over Drug Resistant Isolates. *BioMed Research International*. 2019 (2019), 1–9.

12. Wilson, Keith; Walker, John - (2010). *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*. 7th Edition. Cambridge University : Press. Cambridge, 2010, p. 55-69.

13. Price, P. J. - Best Practices for Media Selection for Mammalian Cells. In *Vitro Cellular & Developmental Biology*. *Animal* 53 (2017), 673-681.

14. Gibco Cell Culture Basics Handbook. ThermoFisher Scientific. [Consultado a 1 de agosto de 2022]. Disponível em <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Handbooks/gibco-cell-culture-basics-handbook.pdf>

15. ATCC – Ficha de Produto – U87 MG – HTB-14™ [Consultado a 3 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.atcc.org/products/htb-14>

16. ATCC – Ficha de Produto – H4 – HTB-148™ [Consultado a 3 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.atcc.org/products/htb-148>

17. ATCC – Ficha de Produto – UI 18 MG – HTB-15™ [Consultado a 3 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.atcc.org/products/htb-15>

18. MERCK KGaA – Ficha de Produto – U-373 MG (Uppsala) cell line [Consultado a 28 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/product/sigma/08061901>

19. ATCC – Ficha de Produto – A172 [A172] – CRL-1620™ [Consultado a 3 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.atcc.org/products/crl-1620>

20. ATCC – Ficha de Produto – 293 [HEK-293] – CRL-1573™ [Consultado a 4 de setembro de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.atcc.org/products/crl-1573>

21. RAMPERSAD, S. N. - Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors*. 12(9) (2012), 12347-12360.

Parte III

Monografia

Colorectal Cancer & Exosomes: Tackling Drug Resistance



Orientação: Professor Doutor Sérgio Simões

List of Figures

- Figure 1:** Fundamental components of the tumor microenvironment. Adapted from^[9]. 53
- Figure 2:** Colorectal cancer metastasis: the journey of circulating tumor cells and other components of the pre-metastatic niche. Disseminated cancer cells from the primary tumor reach the liver via blood circulation and enter through the hepatic portal vein together with bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs), tumor-derived factors and immune cells that prepare the liver microenvironment for the formation of micro-metastasis by circulating tumor cells (CTCs). TAMs – Tumor-Associated Macrophages, TANs – Tumor-Associated Neutrophils, Treg – Regulatory T Cells. Adapted from^[21]. 56
- Figure 3:** Characteristics to consider in colonic drug delivery. Variability between healthy and non-healthy people can interfere in colon-specific drug delivery due to physiological and pathological factors (pH variations, alterations in GI transit time, mucus barriers, disease location in the colon and gut microbiota). GI – gastrointestinal. Adapted from^[24]. 58
- Figure 4:** Biogenesis and release of exosomes. First, an early endosome is formed through the inward budding of the plasma membrane, followed by late endosome's formation containing multiple non-coding RNAs and proteins. The maturation of the late endosome originates MVBs. MVBs, ultimately, fuse with the plasma membrane and release ILVs as exosomes. To control the activity of the target cell exosomes can be taken up by them through fusion with the plasma membrane or through endocytosis, or even interact via “receptor-ligand”. MVB – multivesicular bodies, ILV – intraluminal vesicles, miRNA – microRNA, lncRNA – long noncoding RNA. Adapted from^[36]. 61
- Figure 5:** Properties of exosomes that makes them suitable for drug delivery. Adapted from^[44]. 64

Abbreviations

5-FU - 5-fluorouracil

C26 - mouse colon adenocarcinoma

CAFs - Cancer-Associated fibroblasts

CAPOX - capecitabine/oxaliplatin

circRNA - Circular RNAs

CRC - Colorectal cancer

FOLFIRI - 5-fluorouracil/leucovorin/irinotecan

FOLFOX - 5-fluorouracil/leucovorin/oxaliplatin

FOLFOXIRI - 5-fluorouracil/leucovorin/oxaliplatin/irinotecan

GI - Gastrointestinal

HSPC111 - hypothetical protein HSPC111

IL - Interleukin

lncRNAs - Long non-coding RNAs

MHC - Major Histocompatibility Complex

miRNA - MicroRNA

MUC1 - mucin 1, cell surface associated

MUTYH - mutY DNA glycosylase

NF- κ B - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

PDCD10 - Programmed Cell Death 10

STAT - Signal Transducer and Activator of Transcription

TAMs - Tumor-Associated Macrophages

TGF- β - Transforming Growth Factor- β

Th - T helper Cell

TME - Tumor Microenvironment

TNF - Tumor Necrosis Factor

Treg - Regulatory T cells

VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor

WHO - World Health Organization

Wnt - wingless-type MMTV integration site family

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the second cause of cancer-related deaths. According to World Health Organization (WHO), in 2020, there were 1 931 590 new cases and 935 173 patients died^[1]. When it comes to distant metastasis, 25% of CRC patients present them in progression by the time of the diagnosis, but only 10% have a chance to survive and, 25% of patients without metastasis are prone to develop them in two years^[2].

Most cases are sporadic, only around a quarter of the patients show family history even so, several studies have demonstrated that both sporadic and hereditary forms are genetically compelled through mutations in DNA structure^[3] being even more relevant among younger patients, where the prevalence of germline mutations can be up to 33%^[4]. Hereditary CRC syndromes are phenotypically divided into two groups: polyposis, which includes familial adenomatous polyposis and mutY DNA glycosylase (*MUTYH*)-associated polyposis, and nonpolyposis syndromes (e.g. Lynch Syndrome)^[3,4].

Exosomes are nanosized extracellular vesicles involved in many physiological and pathological processes, including CRC. They are detectable in body fluids and accumulating evidence shows that exosomes from CRC cells promote proliferation, migration, and invasion of cancer cells, other than affect both immune system activity and angiogenesis. Furthermore, they have recently emerged as potentially involved in the process of gaining resistance to cytotoxic and targeted agents commonly used in clinical practice to treat patients with metastatic CRC^[5].

I. Colorectal Cancer

I.1. Tumor Microenvironment: The Journey to Metastasis

Tumor microenvironment (TME) is the concept that tries to elucidate the dynamic environment where cancer cells are located and, being the sophisticated and complex system that it is, enables CRC cells to survive, evade the immune system and create the ideal surroundings for them to grow and metastasize^[2,6]. The most heterogeneous TMEs are correlated to more aggressive tumor phenotypes and an absence of response to anticancer therapy^[7].

The TME includes a broad variety of components constantly interacting with each other^[6,8]: tumor epithelial cells^[8]; infiltrating cells of the innate and adaptive immune system^[9] for instance, cancer-associated fibroblasts (CAFs)^[8,10], myeloid-derived suppressor cells, and neutrophils^[10] as well as their inflammatory mediators^[11]; stromal cells^[12] and proteins^[13], blood and lymphatic vessels^[14]. TME composition is markedly different among cancer types, and even between patients with the same tumor type^[14]. Chemokines and cytokines are released by tumor cells to support the trafficking of suppressive immune cells to break into the TME and induce the transformation of fibroblasts into CAFs, responsible for tumor proliferation and progression and, at the same time, suppress effector T cell function and spread^[15]. They are implicated in inflammation, tumor survival, metabolic reprogramming, and angiogenesis^[10] hence supporting invasion and metastasis^[7]. Transforming Growth Factor- β (TGF- β) activation in TME leads to the differentiation of mesenchymal stem cells to CAFs triggering phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 and its nuclear localization via Janus kinase/STAT pathway^[12].

Myeloid cells differentiate into macrophages, dendritic cells, and neutrophils^[16]. There are two types of tumor-associated macrophages (TAMs) based on their activation status: M1, classically activated with anti-tumor activity, and M2, alternatively activated with pro-tumorigenic effect due to the production of interleukin (IL)-10, IL-6 and TGF- β ^[3,6,16] and recruit of T helper cell (Th)2 and regulatory T cells (Treg). During a normal immune response, most macrophages differentiate into the M1 phenotype to inhibit CRC in addition to being involved in the Th1 cytokine response^[16]. Their recruitment is made through chemokines, cytokines, and complement components that can also lead to a particular activation status^[6]. M2 TAMs promote immune evasion, stimulate invasion and metastasis^[13], in essence, tumor progression, through multiple pathways: production of both epidermal growth factor and fibroblast growth factor-1, secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A to

promote angiogenesis, and release of matrix metalloproteinases^[16]. Dendritic cells are a key component of the adaptive immune response and are crucial for T-cell-mediated cancer immunity^[16]. They are known for their plasticity and when in immunosuppressive environments acquire a tolerogenic phenotype^[3]. Abnormal dendritic cells seem to foster tumor cell proliferation^[16]. As soon as an inflammation process starts, neutrophils are the firsts to arrive^[13]. They secrete enzymes and cytokines responsible to sustain the inflammatory response and mobilize other immune cells of the innate immune system^[13]. Tumor-associated neutrophils are, usually, related to poor prognosis^[13]. In the TME there are two types: N1, with an antitumor phenotype, and N2, with a protumoral phenotype^[12], polarizations that occur in response to environmental signals^[10]. Neutrophils can both promote and suppress tumor formation and progression^[16].

Endothelial cells are the major component of vascular vessels and can produce endothelial growth factor receptors and other growth factor receptors to reinforce angiogenesis, which is fundamental for cancer progression due to allowing oxygen and nutrients supplies while removing toxic metabolites. Simultaneously, angiogenesis provides a route for tumor cell dissemination and metastasis' formation^[16].

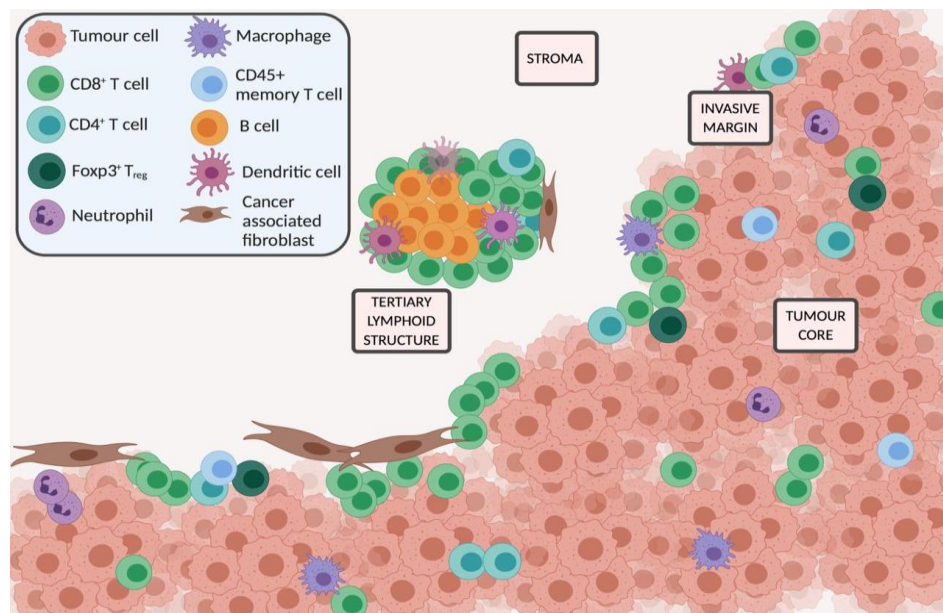


Figure 1: Fundamental components of the tumor microenvironment. Adapted from^[9].

The non-cellular portion of TME comprises extracellular matrix compounds, other than physical and chemical parameters such as fluid flux, oxygen tension, pH, and interstitial pressure. Low oxygen tension is involved in increased cell invasiveness and angiogenesis, switching cells to anaerobic metabolism, and enhancing genetic instability; therefore, hypoxia

is closely connected with tumor progression and dissemination^[17]. With a pH ranging from 6.0 to 6.8, its extracellular activity is favorable for cancer progression^[2].

Alongside cancer progression, TME is dynamically altered following its nuances^[16], tumor cells go through metabolic reprogramming to maintain malignant features and fitness, other than the switch from aerobic glycolysis to the preferably mitochondrial metabolism for the production of ATP as a result of the exposure to environmental stress, namely hypoxia or drugs^[18], in order to generate enough energy to meet the proliferation demands in a hypoxic and nutrient deficient microenvironment^[2]. In other respects, dysbiosis of gut microbiota also contributes to tumor growth and development by inducing a chronic inflammatory state and immune response, producing toxic and genotoxic metabolites, affecting the host metabolism, and regulating stem cell dynamics^[8].

There are three known molecular mechanisms of CRC tumorigenesis: adenoma-carcinoma sequence, de novo carcinogenesis and inflammation-related carcinogenesis^[10]. Tumorigenesis is a multiphase operation, whose progression relies on a successional gathering of mutations within tissue cells^[7]. Tumor initiation is triggered by the activation of different stromal, endothelial, and mesenchymal cells and fibroblasts^[7]. When it comes to inflammation-related carcinogenesis, tumor initiation is provoked by the DNA damage induced by reactive oxygen species and reactive nitrogen intermediates whose levels also increase in pre-malignant epithelial cells, changing the epigenetic modification of tumor suppressor genes^[10]. Nevertheless, an unhealthy lifestyle and a diet based on frequent, and abundant consumption of alcohol and red meat, may induce dysbiosis, decrease commensal bacterial strains, and, simultaneously, raise of detrimental bacterial strains^[19]. Persistent inflammation activates proliferation and antiapoptotic properties, therefore promoting tumor progression^[10].

For late-stage development of CRC, tumor cells together with stromal cells create a microenvironment capable of fostering or restraining the outgrowth of metastasis in distant organs^[16]. 20 to 25% of patients primarily diagnosed with CRC exhibit, already, liver metastasis. During the process of CRC liver metastasis' formation, we can tell apart two specific niches: the pre-metastatic niche and the post-tumor invasion niche^[20]. In the pre-metastatic niche, primary tumor cells secrete factors to recruit nonparenchymal cells, such as hepatic stellate cells, myeloid-derived suppressor cells, and neutrophils to assist invasiveness^[20]. From here we enter the post-tumor invasion niche when circulating CRC cells access the liver sinusoids, and the seeding of metastasis in the liver takes place, divided in four dynamic and overlapping phases^[13,20]: microvascular, which starts when the cancer cells enter the liver microvasculature and encounter liver-specific defense mechanisms which leads to the phagocytosis of many by

stellate macrophages, a process that is intensified by natural killer cells^[13,20] - this hostile environment represent a trigger for clonal expansion of CRC cells employing numerous adaptive immune mechanisms like the apoptosis' evasion via physical lodgment in the hepatic sinusoid and an exacerbated secretion of cytokines such as TGF- β produced by cancer cells to spark off the hepatic stellate cells into a desmoplastic response^[21] ; pre-angiogenic phase starts with the cells that were able to escape the innate immune surveillance and begun to invade and expand within the liver parenchyma supported by quiescent hepatic stellate cells^[20], activated by the pro-inflammatory cascade previously initiated^[13], that produce extracellular matrix proteins, such as collagen, fibrillin, laminin, and fibronectin as a means to provide structure for endothelial migration, angiogenesis and the establishment of extravascular micrometastasis, driven mostly by tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha\beta$ and TGF- β , alongside, neutrophils secrete matrix metalloproteinases and elastase responsible for the degradation and remodel of the extracellular matrix aiming to facilitate tumor cell invasion^[13,20]; the angiogenic phase is the next one, metastatic cancer cells start the cooptation of surrounding vessels to gather blood supply^[13,20], or via VEGF-mediated angiogenesis^[13], with the aim of preparing for their growth, the last phase, where tumor cells proliferate and expand^[20] establishing clinically detectable metastasis^[13].

After the liver, the lungs are the second most common site for CRC metastasis^[13,16]. The colon and proximal rectum's lymphatic vessels drain into nodes of the inferior mesenteric that follow venous drainage towards the portal circulation^[13]. Next, it arrives at the internal iliac veins and straight to the systemic circulation, outflowing from the distal rectum through the middle and inferior rectal veins and bypassing the portal system; the distal rectal lymphatics follow an identical path into the internal iliac nodes^[13]. The activation of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) signaling in CRC cells reinforces TNF- α production by the host hematopoietic cells which results in a pro-inflammatory microenvironment within the lung, therefore supporting the formation of CRC metastasis^[16]. Upon resemblance with the liver, in the lungs, secretomes of tumor cells might remodel the lung microenvironment with a focus on favoring CRC lung metastasis^[16].

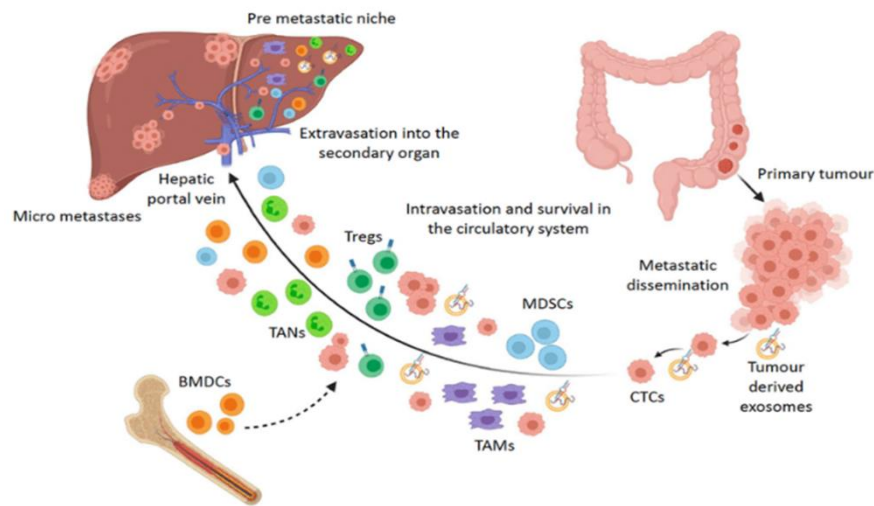


Figure 2: Colorectal cancer metastasis: the journey of circulating tumor cells and other components of the pre-metastatic niche. Disseminated cancer cells from the primary tumor reach the liver via blood circulation and enter through the hepatic portal vein together with bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs), tumor-derived factors and immune cells that prepare the liver microenvironment for the formation of micro-metastasis by circulating tumor cells (CTCs). TAMs – Tumor-Associated Macrophages, TANs – Tumor-Associated Neutrophils, Treg – Regulatory T Cells. Adapted from [21].

1.2. Typical Treatment Plan

Tumor stage, location, and patient characteristics are variables that affect the treatment and management of CRC. Usually, for early-stage CRC lesions, surgical approaches such as polypectomy, a local treatment, or transabdominal resection and anastomosis, more invasive procedures, are the chosen options based on tumor location and the extension of invasiveness^[22] with successful outcomes^[23]. Regarding advanced or metastatic cancer, surgical resection on its own isn't enough to effectively remove the tumor hence, chemotherapy is brought in, as neoadjuvant or adjuvant therapy, in order to, respectively, shrink the tumor or prevent its recurrence, before or after surgery^[22].

For metastatic CRC, the standard chemotherapy schemes are FOLFOX (5-fluorouracil/leucovorin/oxaliplatin), FOLFIRI (5-fluorouracil/leucovorin/irinotecan), CAPOX (capecitabine/oxaliplatin) and FOLFOXIRI (5-fluorouracil/leucovorin/oxaliplatin/irinotecan)^[22], that are considered equally effective treatment options for patients qualified for intensive therapy according to National Comprehensive Cancer Network guidelines^[23], considering that fluoropyrimidines, for instance, 5-fluorouracil (5-FU) and capecitabine, are the first-line chemotherapeutic agent for advanced CRC and are administered in combination with other cytotoxic agents, irinotecan and oxaliplatin, for example. For different chemotherapeutic agents, the mechanism of action is different but, in general, they perform through DNA impairment of replication, transcription and repair, therefore promoting cell death^[22].

2. Drug Delivery and Drug Resistance: The Ultimate Dilemma

Oral, parenteral and rectal are the conventional routes of administration for treating colon-specific diseases^[24]. Oral administration, although convenient, has some hurdles to overcome since it implies crossing the whole gastrointestinal (GI) tract to reach the target site, and along the way being confronted by complex physiology, a wide range of fluid volumes, pH values and transit times, and, in addition, presence of food and metabolic enzymes also contribute to unreliable and ineffective drug delivery^[25]. These conditions promote a higher rate of drug degradation that, together with systemic drug absorption from the small intestine leads to a decrease in drug availability at the disease site and, therefore, a need to increase dose intake, risking drug-related toxicity and therapeutic failure^[24,25]. Parenteral administration, despite avoiding first-pass metabolism, is more prone to cause adverse side effects. Furthermore, rectal administration is able to deliver drugs directly at the intended place, avoiding systemic absorption, however, it is not suitable for delivery to the ascending colon jeopardizing disease treatment in that area, further than presenting patient low compliance^[24].

Traditional intravenous administration for CRC treatment distributes chemotherapeutics throughout the system^[26], therefore, despite their efficacy, these agents may be associated with lack of selectivity, an improper concentration at the tumor site, severe side effects, and ultimately, drug resistance^[27] - blood flow and interstitial fluid pressure are enhanced, which seems to reduce the effectiveness of anticancer drugs^[17]. Considering that CRC cells depend on stromal factors to proliferate and invade new tissues, therapeutic agents that perform by altering the CRC environment may show effectiveness in preventing or treating metastasis^[17]. Furthermore, the efficacy of chemotherapy is compromised by the activation of antiapoptotic cellular defense mechanism, since cancer cells' exposure to chemotherapy leads to overexpression of proteins responsible for cellular antiapoptotic defense which drives to drug resistance, apart from the overexpression of drug efflux pumps, another drug resistance mechanism^[26].

The human large intestine is composed of the colon, subdivided into ascending, transverse and descending colon, and a small distal part that constitutes the rectum. Beyond having different physiological properties from the rest of the GI tract, dissimilarities are also found within the various segments of the colon itself, both physically and physiologically^[25]. Concerning pH values, the stomach has an acidic environment (pH 1-3), in the small intestine it increases to pH 5.9-7.8, and finally, in the colon it ranges from pH 5 to 8^[24]. A carbohydrate-rich diet also influences colon's pH as a result of bacterial fermentation^[25]. The mucus represents the first physical barrier in the absorption of oral dosage forms from the GI tract

and is responsible for chyme's lubrication, protection of the epithelium from mechanical injuries and for trapping foreign particulates, particulate-based drug delivery systems including, by adhesion to be removed in feces, which strongly limits the duration of sustained local drug delivery^[24]. GI transit times are another detail that can affect drug delivery^[24]. Taking into consideration the colon's elevated capacity of water-absorbing, colonic fluid volume can range from 1 to 44 mL with an average of 13 mL, which compromises drug dissolution from the dosage form and after all affect local drug bioavailability^[25]. Therefore, the viscosity of the colonic luminal contents is higher than the upper GI tract and it progressively increases from the ascending colon to the descending colon resulting in a reduced drug dissolution and mucosal absorption^[25]. Added to that, colonic microbiota suffers fluctuations induced by disease, diet or drug therapy, and bacterial drug metabolism can lead to drug inactivity, activity or toxicity which arises another concern^[24]. The attempt to deliver drugs concretely to the colon without being absorbed first in the upper GI tract enables a higher concentration of the drug to access the target with minimal systemic absorption and, finally, minimizing adverse side effects^[25].

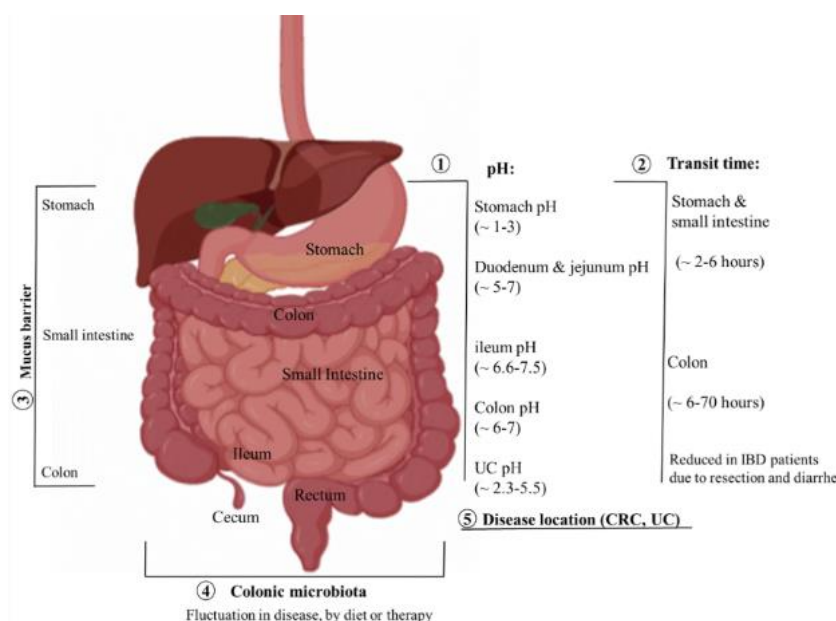


Figure 3: Characteristics to consider in colonic drug delivery. Variability between healthy and non-healthy people can interfere in colon-specific drug delivery due to physiological and pathological factors (pH variations, alterations in GI transit time, mucus barriers, disease location in the colon and gut microbiota). GI – gastrointestinal. Adapted from^[24].

In general, designing a colon-targeted oral drug delivery system^[24], the most convenient and flexible - regarding manufacture, design, patient compliance and safety - pharmaceutical form^[25], presupposes scrutinizing the GI tract anatomy, physiology, and absorption characteristics throughout each segment, apart from the differences between a healthy and a

diseased tract^[24] just as well as disease state^[26]. Release delay until the system reaches the colon^[25], pH-sensitive coating polymers, slowly degrading time-dependent polymers, and approaches based on bacterial enzymes, namely pro-drugs, and polysaccharides, are the major strategies used to be successful in this intricated venture^[24]. Conventional formulations with larger sizes are unable to penetrate the mucus layer especially due to the associated highly inflammatory environment hence, nanosized drug carriers, capable of enhancing bioavailability and permeability - because of their increased surface area and, consequently, enhance contact with biological surfaces^[24,25] -, can penetrate the site of inflammation and be uptake by inflammatory cells^[24]. 5-FU, oxaliplatin, irinotecan and doxorubicin, commonly used drugs for metastatic CRC, have low bioavailability which also intensifies the demand for new nanoscale drug delivery systems^[28].

Both drug delivery and drug resistance are a tremendous dilemma in the cancer field, nonetheless, about GI tumors, the enterprise is even greater. Nanosized drug delivery systems owing to their features and potential for surface modification have all the requirements fulfilled to graciously win the battle.

3. Exosomes

3.1. An Extracellular Vesicle in Cancer

Extracellular vesicles are a heterogeneous group classified according to their sizes, cellular compartment of origin, and location^[29]. Exosomes, microparticles, apoptotic bodies, shedding vesicles, prostasomes, prominosomes^[29], oncosomes, ectosomes^[2] and tolerosomes are, among them, the ones that have already been distinguished^[29].

Exosomes are a homogenous class of small extracellular vesicles^[29,30] concerning size (30-150 nm), density (1.13-1.19 g/mL) as well as membrane composition^[29,31], that carry different components such as proteins, lipids, DNA fragments and RNA (coding and non-coding RNAs)^[32]. The broad assortment of exosomes' content result in their complex functions^[33] and the transfer of these bioactive molecules is responsible for modulating effects on the neighboring recipient cells^[32,34] in consonance with the expression of receptors on the cell surface^[33].

They are formed through exocytosis of multivesicular bodies, a part of the endosomal system which includes primary endocytic vesicles, lysosomes, and both early and late endosomes^[29]. A three-step process came to a consensus: formation of an early endosome; maturation into a late endosome through the inward budding of the early endosomal membrane which evolves into multivesicular bodies that generate intraluminal vesicles; multivesicular bodies can undergo two distinct pathways: lysosomal degradation, or fusion with plasma membrane releasing the intraluminal vesicles into the extracellular space as exosomes^[2,32,33].

Furthermore, exosomes are skilled enough to recognize target cells, fuse with the cell membrane and release their content to induce a response^[34]. All cell types secrete exosomes into the extracellular fluids (tears, saliva, nasal secretions, blood, cerebrospinal fluid, amniotic fluid, milk, urine)^[2,34,35], but, in conformity with the cell type and individual status, their content will significantly vary, which is particularly interesting to observe along tumor growth since the content of the exosomes released reflects cancer's temporal and spatial heterogeneity^[34]. Insofar as it relates to tumors, exosomes are known to endorse their progression by enhancing angiogenesis, regulating the immune system, and promoting the remodeling of the involving parenchymal tissue^[33]. For over a decade, exosomes were thought to be simple bags of cell waste until the mid-1990s when studies showed their ability to facilitate intercellular communication, antigen presentation, and shuttling of biological agents^[2,29-31]. Moreover, they function as mirrors, reflecting the genetic, epigenetic, and conditional composition of the cells,

which unveils their true diagnostic and therapeutic value^[2]. The mechanism that commands exosomal interaction with recipient cells has not been fully disclosed, regardless, it appears to happen through fusion between the exosome and the plasma membrane of the recipient cell, followed by the content release in the cytoplasm, a process that seems to be expedited under acidic pH and hypoxic conditions, the standard of TME^[29,30].

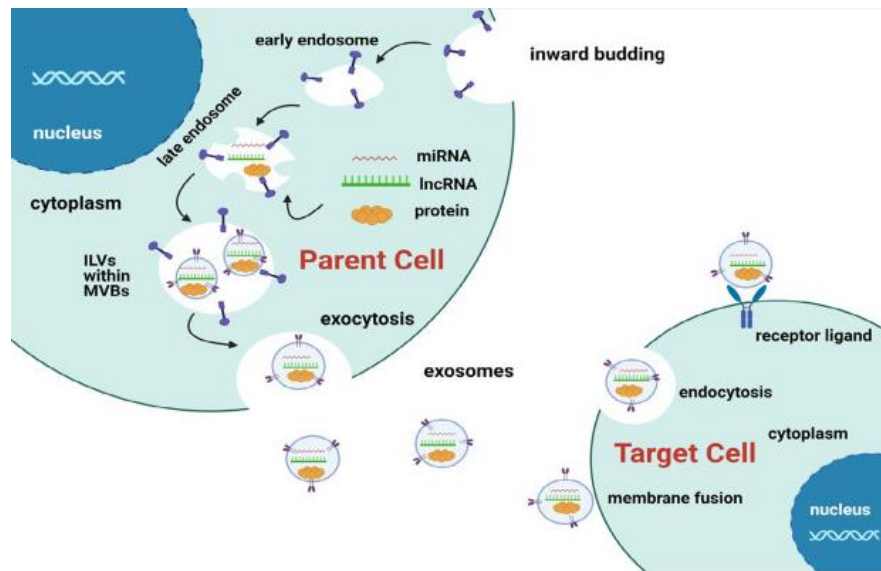


Figure 4: Biogenesis and release of exosomes. First, an early endosome is formed through the inward budding of the plasma membrane, followed by late endosome’s formation containing multiple non-coding RNAs and proteins. The maturation of the late endosome originates MVBs. MVBs, ultimately, fuse with the plasma membrane and release ILVs as exosomes. To control the activity of the target cell exosomes can be taken up by them through fusion with the plasma membrane or through endocytosis, or even interact via “receptor-ligand”. MVB – multivesicular bodies, ILV – intraluminal vesicles, miRNA – microRNA, lncRNA – long noncoding RNA. Adapted from^[36].

Exosomes are biocompatible due to their biological origin and have excellent physicochemical stability when compared with synthetic nanoparticles^[35,37], making them attractive to be used as targeted drug delivery systems^[35].

3.2. Role in Tumor Cell Dissemination, in the Formation of the Metastatic Niche and in Drug Resistance

Exosomes, after secretion, travel through the circulation, meet the target cell, fuse with the plasma membrane, and release their content which can activate critical oncogenic signaling pathways in order to modify TME, facilitate epithelial-to-mesenchymal transition and cytoskeleton reorganization, and, furthermore, boost tumor angiogenesis^[38,39]. The specific composition of exosomes depends on the parent cell type together with environmental factors such as hypoxia and extracellular acidity that play a crucial role in instigating their release^[2,39].

Thereby, when it comes to tumor progression, tumor metastasis, and even the acquisition of drug resistance, exosomes are highly implicated^[38].

Cancer cell-derived exosomes stimulate fibroblast differentiation towards tumor-promoting stromal myofibroblasts over a TGF- β 1-dependent pathway, accelerating angiogenesis as well as tumor growth^[38]. The highly hypoxic environment forces the continuous selection of CRC cells able to persevere in these harsh conditions resulting in a more aggressive and chemoresistant cancer phenotype^[38,39]. Angiogenic factors such as VEGF-A are secreted to promote endothelial cell migration and tumor angiogenesis. Exosomes destabilize endothelial cell junctions to increase vascular permeability and tumor cell entry in the tissue parenchyma^[30].

Research performed in mice revealed that tumor cell dissemination occurs at a very early stage of tumorigenesis, however, metastasis development is only detected at later stages of tumor development, suggesting the existence of crucial mechanisms during tumor progression aiming to promote the formation of metastasis^[30]. Prior to metastatic colonization, primary CRC cells influence the microenvironment of the intended distant organs by facilitating the formation of the pre-metastatic niche characterized by local tissue inflammation, immune suppression, stromal cell activation, and ECM remodeling^[30], however, the inherent mechanism hasn't been completely understood^[40]. Chen, J. *et al.* studied the critical role of CRC cell-derived exosomal hypothetical protein HSPC111 (*HSPC111*) that induces lipid metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts in the liver, in facilitating the formation of the pre-metastatic niche^[40]. They discovered that *HSPC111* converts fibroblasts into cancer-associated fibroblasts in order to promote metastasis, responsible for establishing a favorable environment to support colonization, growth, and liver invasion^[40]. In addition, *in vitro* assays proved that mesenchymal stromal cells derived from CRC masses, also undergo functional changes presenting higher proliferation, migration, and invasion rates, once exposed to primary or metastatic CRC-derived exosomes giving origin to spheroids generally observed in the core of a growing tumor^[38].

CRC proteomic analysis comparing the vesicular and cellular profiles suggested that exosomes are good indicators of the tumor cell state that can be propagated to the recipient cells thanks to their strong similarities^[30] and their role in the pathogenesis of the tumor metastasis^[38]. Cancer-derived exosomes from either primary or metastatic CRC cells induce specific phenotypes like proliferative or invasive CAFs by proteome reprogramming; mutant p53, via microRNA (miRNA)-1246, reprograms macrophages into tumor-supporting macrophages M2^[30]. The transfer of cancerous phenotype through tumor derived EVs

enclosing overexpressed factors affect the non-cancer cells within TME during tumor progression^[2].

Chemoresistance is a tremendous concern in CRC treatment and miRNAs have been arising as experts in reversing it, as well as a promising biomarker^[41]. miRNAs are a type of short non-coding RNA that contain 19-25 nucleotides responsible for negatively regulating gene expression; they contribute to the regulation of biological processes such as apoptosis, migration, proliferation, differentiation, and invasion^[41]. Exosomal miRNAs have been highlighted as drug-resistance mediators due to their transference into recipient cells, converting them into resistant phenotypes by targeting genes involved in the regulation of cell cycle and apoptosis, but also, as their capacity to remove chemotherapeutic agents from cancer cells or even prevent its entrance into the nucleus, drug resistance mechanisms that have already been confirmed in breast, ovarian and melanoma cancers, for instance^[38]. Several exceptional attributes characterize exosomes: the high capacity to cross biological barriers, stability in blood circulation avoiding degradation, high bioavailability and load capacity, small size, low immunogenicity, and toxicity^[41].

Drug resistance can be classified into two types: intrinsic, where cancer cells have pre-existing resistance to drugs, being capable of fostering their degradation, changing the transportation process, and decreasing their interaction with its molecular target; or acquired, cancer cells have already been in contact with the drug and become resistant to it^[41].

Over the years, efforts are being made to study the molecular pathways associated with drug resistance, including p53 mutation, overexpression of ATP-binding cassette efflux transporters, and deregulation of apoptotic and DNA repair mechanisms^[38]. Notwithstanding, when it comes to CRC, metastasis and drug resistance remain the biggest trial^[38].

The gold standard therapy for advanced CRC, FOLFOX, can improve the percentage of metastasis resection and the drastically short overall survival of around 2 years, however. 90% of oxaliplatin-sensitive CRC patients will, over time, become refractory holding to intrinsic or acquired resistance to oxaliplatin-based therapy^[42]. Xu, Y. *et al.* used gene sequencing technology to find a novel miRNA molecule that could be exosome-transferred and subsequently modulate apoptosis of its recipient cells by targeting programmed cell death 10 (*PDCD10*) gene^[42]. miRNA-46146 was the one corresponding to the expectations and can be a potential therapeutic and prognostic target, especially for therapy-refractory CRC patients^[42].

3.3. Engineered Exosomes for Therapeutic Delivery

As a matter of fact, exosomes are naturally produced by cells with the purpose of communicating with their surroundings or even with distant cells, tissues, or organs; they are indeed able to serve as carriers thanks to their biodistribution and biocompatibility^[43] nonetheless, transferring this technology in order to be applied in the clinical setting is a challenge.

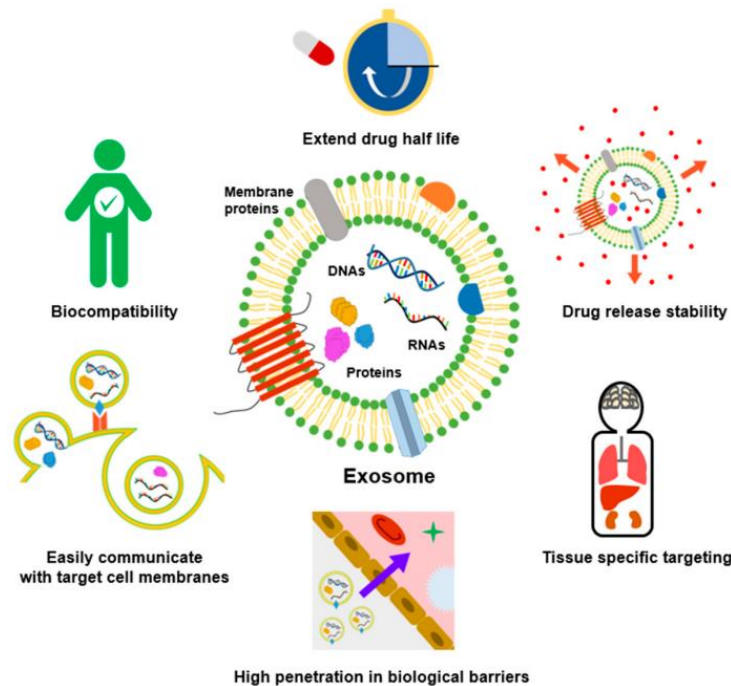


Figure 5: Properties of exosomes that makes them suitable for drug delivery. Adapted from^[44].

Exosomes can indeed be engineered at the cellular level, under natural conditions, however, successfully isolating and modifying them requires further examination^[45,46]. Their wide range of content intended to be delivered into recipient cells associated with their stable environment, the potential to be modified and the expertise to fuse with the cell's plasma membrane, turn them an excellent option for delivering therapeutic microRNAs, proteins, or even drugs directly into tumor cells^[47]. Therapeutic agents can be incorporated through two main methodologies: passive or active encapsulation^[45]. Passive cargo-loading methods are simpler and do not require active substances to be added to the system: for example, we have incubation either with exosomes or donor cells, where the therapeutic agent solely diffuses into the exosomes according to the concentration gradient or the exosomes secreted from the donor cells already contain it, respectively^[45]. Active cargo-loading methods, in turn, resort to a third-party agent: sonication, where donor cells are mixed with the drug and subsequently sonicated with the aid of a homogenizer probe, extrusion, where the mixture of donor cells

and the therapeutic agent is loaded into a syringe-based lipid extruder with a porous membrane of 100-400 nm under a controlled temperature, electroporation, which, over the application of an electrical field to exosomes, generates small pores in the exosome membrane since it disturbs the phospholipid bilayer temporarily, without compromising its integrity, or even, incubation with membrane permeabilizers such as saponin that works as a surfactant molecule able to form complexes with cholesterol in cell membranes, towards an increase in membrane permeabilization, to name a few^[45].

The process of obtaining exosomes can be endogenous or exogenous. The exogenous approach, after production in cell culture, tends to make exosome application more steadfast if the cell sourcing is not customize-modification friendly, it allows the use of different cell sources and, as a result significantly facilitates mass production^[45]. A marvelous promise is held by the power to engineer exosome content and migratory itinerary^[47]. Assays have, until now, employed viral and non-viral methods to develop parent cells capable to secrete modified exosomes or to manipulate exosome content straight away after secretion^[47]. Research has been really committed to the design of exosome content, even so, there is an intriguing will to bet on mechanisms to modify the exosome surface with a focus on promoting targeted uptake by tumor cells while avoiding healthy cells^[47]. For that reason, understanding how to control the packaging of exosome content, release, and uptake by target cells is the pivotal cue to an effective clinical translation^[47].

Immune response to exosomes, one of the major concerns of implementing cell-based therapies, could potentially be overcome under the use of allogeneic exosomes^[47], for instance, isolated from food, fruits, and plants, which have been explored as additional options owing to their guaranteed safety profiles since these exosomes are known to be commonly ingested, are scalable sources and a conscious financially move^[45]. The only disquietude is their incapacity to boost the host immune system and the absence of immunotherapy benefits^[45]. Immune cell-derived exosomes, conversely, are gaining more traction, regarding drug delivery and vaccine application, right because of their immune phagocytosis evasion, a clearing method that represents a handicap related to various exosomes' types, therefore allowing these ones to circulate longer and, as consequence, prolong their efficacy^[45].

Immunoaffinity capture, size exclusion, polymeric precipitation, ultracentrifugation, and microfluidics techniques are the basis of exosome's purification, alone or in combination, to obtain more reliable outcomes^[43]. The International Society for Extracellular Vesicles has proposed a standardized procedure able to give guidance on the subject of isolation methods and, so far ultracentrifugation is the most widely adopted and trustworthy method^[43]. It

involves a sequence of centrifugation steps that can be succeeded by a flotation-sedimentation density gradient centrifugation^[43,46]. Requiring large biological sample volumes, being a tiresome and time-consuming procedure are the characteristics that justified the appearance of commercially available polymeric precipitation mixtures that are simultaneously quick and technically easy, nevertheless, purity is compromised, and performance is inferior than ultracentrifugation's^[43,48]. In addition, vesicle clogging, and trapping are an issue that comes with the use of this method therefore, pre-treatment with proteinase to reduce fluid sample viscosity or tangential flow filtration techniques have emerged as viable options^[46]. Another dilemma is to effectively discern exosomes from non-exosomes particles in the samples obtained through the current approaches since microvesicles, apoptotic bodies and ectosomes are also extracted and present similar physicochemical properties along with the restricted knowledge surrounding molecular mechanisms of exosomes' biogenesis and release^[46,47]. Immunoaffinity isolation seems to be capable of enriching the sample in a single type of extracellular vesicle population, notwithstanding, its yield is not its strongest skill^[43]; the combination of two or more isolation methods could be another way to address the problem^[46]. A successful post-isolation modification rests on a profound understanding of exosomes' structural characteristics, and inherent cellular biology, designed to meet the needs of diagnostic and therapeutic intervention^[45].

In conclusion, the precise isolation and purification of tumor-derived exosomes from the cocktail of extracellular vesicles is not currently possible, which makes the development of novel isolation methods able to enrich individual subtypes a relevant need^[48]. Notwithstanding, the actual challenge is the scarcity of information about the proportion between exosome and non-exosome particles in the gathered samples^[46]. Implementing these nanoparticles for cancer diagnosis, treatment and prognosis in the clinical setting will be subordinate to the establishment and validation of strict standards for exosome manipulation, isolation, and characterization^[47].

4. Clinical Value of Exosomes in Colorectal Cancer

The search for potential biomarkers for both disease's diagnosis and prognosis is an endless journey, nevertheless, exosomes' cargo has given some hope^[34,43]. Their capacity to mirror the status of their progenitor cells makes them the ideal non-invasive biomarkers^[43], especially for early disease detection^[49]. A wide range of biological functions of exosomes is executed around the delivery of signaling molecules that regulate distinct cellular processes^[5]. At the same time, long noncoding RNAs (lncRNAs)^[43] and circRNA are carried by exosomes for modulation of intercellular signal transduction^[43,50]. They are stable and conserved molecules that present a covalently closed loop structure and are aberrantly and generously expressed in CRC tissues, cells, exosomes, and blood^[50]. They are known for their multiple functions, namely serving as miRNA sponges, modulating alternative splicing, transcription, and translation which capacitates them with the ability to regulate gene expression^[43,51]. Numerous circRNAs have undergone identification as either oncogenes or tumor suppressors, acting as a mediator in tumorigenesis, metastasis, and chemoradiation resistance in CRC, considering they may serve as diagnostic and prognostic biomarkers, as well as potential therapeutic targets in clinical practice^[50].

Exosomal lncRNA and miRNA-217, mainly, are distinctively expressed in the serum of CRC patients and it has been found their correlation with tumor classification, clinical-stage, and lymph node or distant metastasis, enlightening, once again, their potential as diagnostic and prognostic biomarkers^[43]. Recently, a few reports revealing post-isolation strategies to modify exosome surface have delineated methods to enable the effective track of exosomes *in vitro* or *in vivo*^[35,45], for instance, flow cytometry, microscopy, immunohistochemistry, magnetic resonance, and *in vivo* imaging system, to name a few^[35].

The analysis of tumor-derived RNAs and DNAs packaged within the exosome and, in consequence, protected from serum RNAses and DNAses' degradation, exposed different miRNAs noticeably over-expressed in CRC patients, even in an early-stage disease, and barely undetectable in healthy patients^[5,38] added to the fact that their levels decreased substantially after tumor's surgical resection^[38]. Measuring serum levels of let-7a, miRNA-1229, miRNA-150, miRNA-21, miRNA-223, and miRNA-23a, the miRNAs mentioned above, in the average-risk population as a non-invasive screening test for CRC diagnosis may be a fruitful approach^[5,38], further, because exosomes contribute too to CRC development and metastasis, their detection in biological fluids portrays as an easy and reproducible strategy to obtain pathogenic information and to identify biomarkers specific for diagnosis and prognosis^[5]. Wang, J., *et al.* proved that miRNA-125a-3p has the potential for screening patients presenting

early-stage CRC when combined with another diagnostic test^[52]. RNA is challenging for *in vivo* delivery, on account of its large proportions. Cationic liposomes, dendrimers, and cationic polymer-based particles are not suitable for clinical use because of safety, stability, and off-target issues. Exosomes are qualified to incorporate small interfering RNA or miRNA, mainly through electroporation that destabilizes the membrane of these molecules allowing them to penetrate the membrane vesicle^[45].

NCT04227886 is a clinical trial that aims to identify the biomarkers involved in the response and toxicity to neoadjuvant therapy for rectal cancer to both stratify patients and optimize the treatment approach, based on tissue RNA and plasma exosomal RNA^[53]. NCT03874559, another trial, is focused on characterizing exosomal biomarker levels in patients presenting advanced rectal cancer submitted to neoadjuvant chemoradiation therapy; the purpose is to compare rates of exosomal expression, at three different *timepoints*, before, during, and after chemoradiation therapy; the researchers will, in addition, examine the utility of these exosomes in malignant colonic organoids and models of CRC^[54].

As previously stated, extracellular vesicles are in essence, cell-created vehicles, with dexterity in transferring cargoes from one cell to another, thus supporting cell signaling^[33,37,55]. Studying them as therapeutic agents for drug delivery was the mandatory next step when this was understood^[5,33,55]. Although, most ongoing clinical trials are focused on identifying diagnostic or prognostic biomarkers, an expanding number is also studying exosomes as effective therapeutic instruments in tumors like gliomas, lung, or pancreatic cancer, but not yet in CRC^[49].

5-FU and oxaliplatin are the most frequently used chemotherapeutic options for CRC treatment, however, the chemoresistance of these drugs constitutes a major obstacle to an effective outcome, therefore, it becomes essential to discern patients that are sensitive to these drugs from the resistant ones^[37]. Exosomal cargo has been correlated with chemoresistance in CRC patients: exosomes containing lncRNA secreted by CAFs were shown to promote oxaliplatin resistance in CRC cells via activation of the β -catenin pathway, as well as both exosomal wingless-type MMTV integration site family (*Wnt*), also derived from these cells, and upregulation of miRNA-196b-5p in CRC serum exosomes were reported to support chemoresistance to 5-FU^[37]. Jin, G., *et al.*, performed an assay to detect the expression levels of 30 miRNAs aberrantly expressed during CRC progression in oxaliplatin/5-FU-resistant CRC cell lines and the corresponding secreted exosomes^[56]. The miRNAs, miRNA-21-5p, miRNA-1246, miRNA-1229-5p, miRNA-135b, miRNA-425, and miRNA-96-5p are significantly more expressed in the drug-resistant CRC cells in comparison to their parent

cells and up-regulated in exosomes from culture media of resistant cells^[56]. Among the selected miRNAs, the study demonstrated that miRNA-21-5p, miRNA-1246, miRNA-1229-5p and miRNA-96-5p could considerably distinguish between advanced CRC chemotherapy-resistant and non-resistant patients, promoting, as a result, chemosensitivity to oxaliplatin and 5-FU^[56].

Liang, G., *et al.* had the audacity to engineer exosomes to concomitantly deliver 5-FU and miRNA-21 inhibitor oligonucleotide to Her2 expressing cells with the intention of reversing resistance to this drug^[57]. The miRNA choice was attributable to its function as an oncogene overexpressed in most human malignancies, including CRC, and reported as being associated with resistance to multiple chemotherapeutic drugs such as gemcitabine, temozolomide, docetaxel and 5-FU^[57]. Results foreshadow a window of opportunity to synchronously introduce miRNA-21 inhibitor oligonucleotide and 5-FU into CRC cells to reverse drug resistance^[57] and enhance treatment efficacy.

TNF-related, apoptosis-inducing, ligand-armed exosomes can be utilized for the purpose of transferring pro-apoptotic signals to different tumor cell types with the intention of inducing cancer cell apoptosis, culminating in the suppression of tumor progression *in vivo*^[43]. Bagheri E., *et al.* embrace the challenge to develop an efficient vehicle with low immunogenicity and toxicity for the delivery of anticancer agents to tumor tissue, while enhancing permeability and retention^[58]. In this regard, they used nanosized vesicles secreted by mesenchymal stem cells to encapsulate doxorubicin, a chemotherapeutic that promotes severe cardiotoxicity, their surface was functionalized with mucin 1, cell surface associated (MUC1) aptamer and used for tumor cells targeting, and the chosen ectopic model for *in vivo* assays was C26 (mouse colon adenocarcinoma), while *in vitro* assays operated in MUC1-positive cancer cells^[58]. The result: ideal efficacy at suppressing tumor growth on MCF7 cell line *in vitro* and C26 with an acceptable safety profile when it comes to survival rate, proposing this technology as a new candidate for the clinical setting^[58].

Injected exosomes can effectively release their cargo into cells, providing functional payloads without being blocked by the immune system and inducing toxicity, due to their biocompatibility^[33]. Cancer vaccines aim to trigger the immune system to attack cancer cells in a more safe, reliable, and effective manner, they are usually derived from the patient's tumor cells or the antigens found on their surface that are intended to assist the immune system to identify and kill these malignant cells^[59]. In the CRC battle, multiple platforms can be employed, being exosomes one of them since tumor antigens and major histocompatibility complex (MHC) class I molecules could be proficient in introducing tumor antigens to dendritic cells and trigger CD8+ T cell-dependent anti-tumor immune responses^[59].

At the same time, exosomes also play an important role when it comes to assessing the responsiveness of the tumor cells to targeted agents^[5,49]. Matsumura, T. *et al.* discovered that expression of exosomal miRNA-19a in the serum of CRC patients is a prognostic biomarker for the early detection of tumor recurrence, independently of the clinical stage^[60].

Overall, the expanding knowledge regarding the involvement of exosomes in pathological processes gives us three auspicious directions for the treating disease game plan: inhibit exosome assembly, release and uptake; modifying harmful compositions; and blocking exosome dissemination as well as elimination from the circulatory system^[43].

Exosomes present excellent pharmacokinetic properties, bioavailability, biodistribution and the decrease of the off-target effects of free drugs, adding to their unique structural and physicochemical properties: low toxicity and immunogenicity, efficient cellular entry, intrinsic ability to cross biological barriers - such as the blood-brain barrier -, increased circulatory stability and active targeting potential, all unique features^[33,49]. Pre-clinical data is promising, however, validation collected from large clinical trials is mandatory to consolidate the relevancy of exosomes as tumor biomarkers for tracking cancer progression and determining treatment decisions, in an effort to translate their use into clinical practice^[5].

Conclusion and Future Directions

The field of exosomes has, indeed, a long way to go, nevertheless, its growth rate is remarkable, and a significant potential is associated with them. Diagnostic, therapeutic purposes and even the recent unveiling of their involvement in physiology and pathology give a new path for them to thrive in monitoring the responsiveness of the tumor to targeted drug delivery^[5,49].

As an important intercellular communication and transportation tool^[61], exosomes are true mailmen, delivering information from one cell to another, enabling their active communication. They are, implicated in tumorigenesis but it is possible to modulate them and use their powerful abilities for the benefit of CRC patients.

Efforts are being made and strategies are being developed to optimize the therapeutic efficacy of exosomes, and enhance the scale-up process, alongside the evolution of the regulatory framework that will allow clinical trials both safe and successful^[49]. Tackling drug resistance is, every heartbeat, closer to becoming a reality for patients with advanced stages of metastatic CRC, refractory to the standard therapy, using exosomes and their cargoes.

Answers are still not many compared with the Herculean number of questions hovering cancer, notwithstanding, it has been a steady progress.

Without a doubt, this is a great time to be alive.

Bibliography

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION – Globocan 2020. The Global Cancer Observatory, 2020. [Accessed on August 30TH, 2022] *Colorectal Cancer*. Available on the Internet: https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/10_8_9-Colorectum-fact-sheet.pdf
2. NABARIYA, D. K., PALLU, R., YENUGANTI, V. R. - Exosomes: The protagonists in the tale of colorectal cancer? *Biochimica et Biophysica Acta. Reviews on Cancer*. 1874(2) (2020).
3. JIN, K., REN, C., LIU, Y., LAN, H., WANG, Z. - An update on colorectal cancer microenvironment, epigenetic and immunotherapy. *International Immunopharmacology*. 89(Pt A) (2020).
4. VALLE, L., VILAR, E., TAVTIGIAN, S. v., STOFFEL, E. M. - Genetic predisposition to colorectal cancer: syndromes, genes, classification of genetic variants and implications for precision medicine. *The Journal of Pathology*. 247(5) (2019), 574–588.
5. MANNAVOLA, F., SALERNO, T., PASSARELLI, A., TUCCI, M., INTERNÒ, V., SILVESTRI, F. - Revisiting the Role of Exosomes in Colorectal Cancer: Where Are We Now? *Frontiers in Oncology*. 9 (2019).
6. JEUGHT, K. van der, XU, H. C., LI, Y. J., LU, X. bin, JI, G. - Drug resistance and new therapies in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 24(34) (2018), 3834.
7. KOUSTAS, E., SARANTIS, P., KYRIAKOPOULOU, G., PAPAVALASSILIOU, A. G., KARAMOUZIS, M. v. - The Interplay of Autophagy and Tumor Microenvironment in Colorectal Cancer—Ways of Enhancing Immunotherapy Action. *Cancers*. Vol. 11(4) (2019), 533.
8. ZHU, X., TIAN, X., JI, L., ZHANG, X., CAO, Y., SHEN, C., HU, Y., WONG, J. W. H., FANG, J. Y., HONG, J., CHEN, H. - A tumor microenvironment-specific gene expression signature predicts chemotherapy resistance in colorectal cancer patients. *Npj Precision Oncology*. 5(1) (2021), 1–14.
9. WILKINSON, K., NG, W., ROBERTS, T. L., BECKER, T. M., LIM, S. H. S., CHUA, W., LEE, C. S. - Tumour immune microenvironment biomarkers predicting cytotoxic chemotherapy efficacy in colorectal cancer. *Journal of Clinical Pathology*. 74(10) (2021), 625–634.

10. MIZUNO, R., KAWADA, K., SAKAI, Y. - Prostaglandin E2/EP Signaling in the Tumor Microenvironment of Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 20(24) (2019), 6254.
11. LIN, C. C., LIAO, T. T., YANG, M. H. - Immune Adaptation of Colorectal Cancer Stem Cells and Their Interaction With the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Oncology*, 10 (2020), 2533.
12. ITATANI, Y., KAWADA, K., SAKAI, Y. - Transforming Growth Factor- β Signaling Pathway in Colorectal Cancer and Its Tumor Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(23) (2019), 5822.
13. CHANDRA, R., KARALIS, J. D., LIU, C., MURIMWA, G. Z., PARK, J. V., HEID, C. A., REZNIK, S. I., HUANG, E., MINNA, J. D., BREKKEN, R. A. - The Colorectal Cancer Tumor Microenvironment and Its Impact on Liver and Lung Metastasis. *Cancers*. 13(24) (2021), 6206.
14. ROELANDS, J., KUPPEN, P. J. K., VERMEULEN, L., MACCALLI, C., DECOCK, J., WANG, E., MARINCOLA, F. M., BEDOGNETTI, D., HENDRICKX, W. - Immunogenomic Classification of Colorectal Cancer and Therapeutic Implications. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(10), 2229.
15. ASHRAF, J. V., NAIR, V. S., SALEH, R., ELKORD, E. - Role of circular RNAs in colorectal tumor microenvironment. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 137 (2021), 111351.
16. LI, J., CHEN, D., SHEN, M. (2022). Tumor Microenvironment Shapes Colorectal Cancer Progression, Metastasis, and Treatment Responses. *Frontiers in Medicine*. 9 (2022), 722.
17. BAHRAMI, A., KHAZAEI, M., HASSANIAN, S. M., SHAHIDSALES, S., JOUDI-MASHHAD, M., MAFTOUH, M., JAZAYERI, M. H., PARIZADE, M. R., FERNS, G. A., Avan, A. - Targeting the tumor microenvironment as a potential therapeutic approach in colorectal cancer: Rational and progress. *Journal of Cellular Physiology*. 233(4) (2018), 2928–2936.
18. PEDROSA, L., ESPOSITO, F., THOMSON, T. M., MAUREL, J. - The Tumor Microenvironment in Colorectal Cancer Therapy. *Cancers*. 11(8) (2019), 1172.
19. BARRESI, V. - Colorectal Cancer: From Pathophysiology to Novel Therapeutic Approaches. *Biomedicines*. 9(12) (2021).
20. KOW, A. W. C. - Hepatic metastasis from colorectal cancer. *Journal of Gastrointestinal Oncology*. 10(6) (2019), 1274–1298.

21. DMELLO, R. S., TO, S. Q., CHANA, A. L. - Therapeutic targeting of the tumour microenvironment in metastatic colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4) (2021), 1–18.
22. FONG, W., TO, K. K. W. (2019). Drug repurposing to overcome resistance to various therapies for colorectal cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 76(17) (2019), 3383–3406.
23. CIOMBOR, K. K., BEKAIL-SAAB, T. - A Comprehensive Review of Sequencing and Combination Strategies of Targeted Agents in Metastatic Colorectal Cancer. *The Oncologist*. 23(1) (2018), 25–34.
24. NAEEM, M., AWAN, U. A., SUBHAN, F., CAO, J., HLAING, S. P., LEE, J., IM, E., JUNG, Y., YOO, J. W. - Advances in colon-targeted nano-drug delivery systems: challenges and solutions. *Archives of Pharmacal Research*. 43(1) (2020), 153–169.
25. AMIDON, S., BROWN, J. E., DAVE, V. S. - Colon-Targeted Oral Drug Delivery Systems: Design Trends and Approaches. *AAPS PharmSciTech*. 16(4) (2015), 731–741.
26. GULBAKE, A., JAIN, A., JAIN, A., JAIN, A., JAIN, S. K. - Insight to drug delivery aspects for colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 22(2) (2016), 582.
27. HASSANZADEH, P., ARBABI, E., ROSTAMI, F. - Development of a novel nanoformulation against the colorectal cancer. *Life Sciences*. 281 (2021), 119772.
28. HONG, Y., RAO, Y. - Current status of nanoscale drug delivery systems for colorectal cancer liver metastasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 114 (2019), 108764.
29. AILUNO, G., BALDASSARI, S., LAI, F., FLORIO, T., CAVIGLIOLI, G. - Exosomes and Extracellular Vesicles as Emerging Theranostic Platforms in Cancer Research. *Cells*. 9(12) (2020), 2569.
30. LAFITTE, M., LECOINTRE, C., ROCHE, S. - Roles of exosomes in metastatic colorectal cancer. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 317(5) (2019), C869–C880.
31. HESSVIK, N. P., LLORENTE, A. - Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 75(2) (2018), 193–208.
32. BAHRAMI, A., Binabaj, M. M., Ferns, G. A. - Exosomes: Emerging modulators of signal transduction in colorectal cancer from molecular understanding to clinical application. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 141 (2021), 111882.

33. ZHAO, Y., LIU, P., TAN, H., CHEN, X., WANG, Q., CHEN, T. - Exosomes as Smart Nanoplatfoms for Diagnosis and Therapy of Cancer. *Frontiers in Oncology*, 11 (2021).
34. HERRERA, M., GALINDO-PUMARIÑO, C., GARCÍA-BARBERÁN, V., PEÑA, C. - A Snapshot of The Tumor Microenvironment in Colorectal Cancer: The Liquid Biopsy. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(23) (2019), 6016.
35. SALUNKHE, S., DHEERAJ, BASAK, M., CHITKARA, D., MITTAL, A. - Surface functionalization of exosomes for target-specific delivery and in vivo imaging and tracking: Strategies and significance. *Journal of Controlled Release*. 326 (2020), 599–614.
36. RIZK, N. I., ABULSOUD, A. I., KAMAL, M. M., KASSEM, D. H., HAMDY, N. M. - Exosomal-long non-coding RNAs journey in colorectal cancer: Evil and goodness faces of key players. *Life Sciences*. 292 (2022), 120325.
37. RAZA, A., KHAN, A. Q., INCHKALODY, V. P., MESTIRI, S., YOOSUF, Z. S. K. M., BEDHIAFI, T., EL-ELLA, D. M. A., TAIB, N., HYDROSE, S., AKBAR, S., FERNANDES, Q., AL-ZAIDAN, L., KRISHNANKUTTY, R., MERHI, M., UDDIN, S., DERMIME, S. - Dynamic liquid biopsy components as predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 41(1) (2022), 99.
38. ZHOU, J., LI, X. L., CHEN, Z. R., CHNG, W. J. - Tumor-derived exosomes in colorectal cancer progression and their clinical applications. *Oncotarget*. 8(59) (2017), 100781.
39. REN, R., SUN, H., MA, C., LIU, J., WANG, H. - Colon cancer cells secrete exosomes to promote self-proliferation by shortening mitosis duration and activation of STAT3 in a hypoxic environment. *Cell & Bioscience*. 9(1) (2019), 62.
40. ZHANG, C., WANG, X.-Y., ZHANG, P., HE, T.-C., HAN, J.-H., ZHANG, R., LIN, J., FAN, J., LU, L., ZHU, W.-W., JIA, H.-L., ZHANG, J.-B., CHEN, J.-H. - Cancer-derived exosomal HSPC111 promotes colorectal cancer liver metastasis by reprogramming lipid metabolism in cancer-associated fibroblasts. *Cell Death & Disease*. 13(1) (2022), 57.
41. MALEKI, M., GOLCHIN, A., JAVADI, S., KHELGHATI, N., MOROVAT, P., ASEMI, Z., ALEMI, F., VAGHARI-TABARI, M., YOUSEFI, B., MAJIDINIA, M. - Role of exosomal miRNA in chemotherapy resistance of Colorectal cancer: A systematic review. *Chemical Biology & Drug Design*. Early view (2021).
42. XU, Y., ZHU, M. - Novel exosomal miR-46146 transfer oxaliplatin chemoresistance in colorectal cancer. *Clinical and Translational Oncology*. 22(7) (2020), 1105–1116.

43. HE, C., ZHENG, S., LUO, Y., WANG, B. - Exosome Theranostics: Biology and Translational Medicine. *Theranostics*. 8(1) (2018), 237–255.
44. KIM, H., JANG, H., CHO, H., CHOI, J., HWANG, K. Y., CHOI, Y., KIM, S. H., YANG, Y. - Recent Advances in Exosome-Based Drug Delivery for Cancer Therapy. *Cancers*. 13(17) (2021), 4435.
45. LUAN, X., SANSANAPHONGPRICHA, K., MYERS, I., CHEN, H., YUAN, H., SUN, D. - Engineering exosomes as refined biological nanoplateforms for drug delivery. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(6) (2017), 754–763.
46. YANG, D., ZHANG, W., ZHANG, H., ZHANG, F., CHEN, L., MA, L., LARCHER, L. M., CHEN, S., LIU, N., ZHAO, Q., TRAN, P. H. L., CHEN, C., VEEDU, R. N., WANG, T. - Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - efforts for efficient exosome-based theranostics. *Theranostics*. 10(8) (2020), 3684–3707.
47. GILLIGAN, K., DWYER, R. - Engineering Exosomes for Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(6) (2017), 1122.
48. VAF AEI, S., ROUDI, R., MADJD, Z., AREF, A. R., EBRAHIMI, M. - Potential theranostics of circulating tumor cells and tumor-derived exosomes application in colorectal cancer. *Cancer Cell International*. 20(1) (2020), 288.
49. PEROCHEAU, D., TOURAMANIDOU, L., GURUNG, S., GISSEN, P., BARUTEAU, J. - Clinical applications for exosomes: Are we there yet? *British Journal of Pharmacology*. 178(12) (2021), 2375.
50. LONG, F., LIN, Z., LI, L., MA, M., LU, Z., JING, L., LI, X., LIN, C. - Comprehensive landscape and future perspectives of circular RNAs in colorectal cancer. *Molecular Cancer*. 20(1) (2021), 26.
51. TANG, X., REN, H., GUO, M., QIAN, J., YANG, Y., GU, C. - Review on circular RNAs and new insights into their roles in cancer. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 19 (2021), 910–928.
52. WANG, J., YAN, F., ZHAO, Q., ZHAN, F., WANG, R., WANG, L., ZHANG, Y., HUANG, X. - Circulating exosomal miR-125a-3p as a novel biomarker for early-stage colon cancer. *Scientific Reports*. 7(1) (2017), 4150.
53. U. S. National Library of Medicine – [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov). Fudan University: 2020. [Accessed on July 20TH, 2022] *Study on Predictive Biomarkers of Neoadjuvant Chemoradiotherapy for Rectal Cancer*, Available on the Internet: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04227886>

54. U. S. National Library of Medicine – [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov). University of Kansas Medical Center: 2019. [Accessed on July 20TH, 2022] *Exosomes in Rectal Cancer*, Available on the Internet: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03874559>
55. FAMILTSEVA, A., JEREMIC, N., TYAGI, S. C. (2019). Exosomes: cell-created drug delivery systems. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 459(1) (2019), 1–6.
56. JIN, G., LIU, Y., ZHANG, J., BIAN, Z., YAO, S., FEI, B., ZHOU, L., YIN, Y., HUANG, Z. - A panel of serum exosomal microRNAs as predictive markers for chemoresistance in advanced colorectal cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 84(2) (2019), 315–325.
57. LIANG, G., ZHU, Y., ALI, D. J., TIAN, T., XU, H., SI, K., SUN, B., CHEN, B., XIAO, Z. - Engineered exosomes for targeted co-delivery of miR-21 inhibitor and chemotherapeutics to reverse drug resistance in colon cancer. *Journal of Nanobiotechnology*, 18(1) (2020), 1–15.
58. BAGHERI, E., ABNOUS, K., FARZAD, S. A., TAGHDISI, S. M., RAMEZANI, M., ALIBOLANDI, M. - Targeted doxorubicin-loaded mesenchymal stem cells-derived exosomes as a versatile platform for fighting against colorectal cancer. *Life Sciences*. 261 (2020), 118369.
59. SHAHNAZARI, M., SAMADI, P., POURJAFAR, M., JALALI, A. - Therapeutic vaccines for colorectal cancer: The progress and future prospect. *International Immunopharmacology*. 88 (2020), 106944.
60. MATSUMURA, T., SUGIMACHI, K., IINUMA, H., TAKAHASHI, Y., KURASHIGE, J., SAWADA, G., UEDA, M., UCHI, R., UEO, H., TAKANO, Y., SHINDEN, Y., EGUCHI, H., YAMAMOTO, H., DOKI, Y., MORI, M., OCHIYA, T., MIMORI, K. - Exosomal microRNA in serum is a novel biomarker of recurrence in human colorectal cancer. *British Journal of Cancer*. 113(2) (2015), 275–281.
61. CHENG, J., WANG, X., YUAN, X., LIU, G., CHU, Q. - Emerging roles of exosome-derived biomarkers in cancer theranostics: messages from novel protein targets. *American Journal of Cancer Research*. 12(5) (2022), 2226–2248.