



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Maria Santos Soares

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Caracterização de vesículas extracelulares em *Giardia Lamblia*” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Margarida Freitas, da Dra. Joaquina Sanganha e da Professora Doutora Maria do Céu Sousa apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019

Maria Santos Soares

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada "Caracterização de vesículas extracelulares em *Giardia Lamblia*" referentes à Unidade Curricular "Estágio", sob a orientação da Dra. Margarida Freitas, da Dra. Joaquina Sanganha e da Professora Doutora Maria do Céu Sousa apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2019



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Maria Santos Soares, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2014205522, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Caracterização de vesículas extracelulares em *Giardia Lamblia*” 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, 06 de setembro de 2019.

Maria Soares

AGRADECIMENTOS

Uma das etapas mais importantes da minha vida esta a chegar ao fim, manifesto o meu agradecimento a todos aqueles fizeram parte deste meu percurso académico.

À Professora Doutora Maria do Céu Sousa, por todo o apoio dado ao longo da construção da minha Monografia fornecendo com prontidão, profissionalismo e paciência todas as informações necessárias de forma a ser uma elaboração rápida e eficiente, os meus melhores agradecimentos.

À Dra. Margarida Freitas, agradeço toda a disponibilidade em me receber na sua farmácia onde fiz parte integrante de uma excelente equipa e onde aprendi imenso, seja em conhecimento científico, seja nos valores da relação interpessoal.

À Dra. Joaquina Sanganha e a toda a equipa do serviço farmacêutico do CHL, um grande obrigado por todo o empenho e preocupação a tornar o estágio hospitalar, o melhor estágio possível e aprender quais os valores para ser um bom profissional de saúde.

A todos os colegas que fui encontrando ao longo do estágio, à equipa da farmácia e ao meu colega Daniel, agradeço por me fazerem sentir importante e por me lembrarem que nunca se é tarde para marcar a diferença e seguir os sonhos, porque se não formos nós a fazê-lo, ninguém os faz.

Aos meus amigos os de sempre e o que Coimbra me deu, que me ajudaram e acompanharam durante todo o meu percurso académico e que sempre acreditaram em mim e me ergueram quando parecia estar a cair, o meu muito obrigado.

Aos meus colegas de casa de Coimbra, que se tornaram a minha família quando a minha estava longe.

Aos meus irmãos que me são as pessoas mais importantes da minha vida e com quem posso sempre contar para rir nos momentos em que o choro está mais perto.

Aos meus pais, sem os eles nunca seria o que sou. Que mais do que pais, são um exemplo a seguir e a quem um obrigado nunca será suficiente.

A Coimbra, cidade dos universitários, que me recebeu e acolheu e que me vê partir com sentimento de conquista e concretização, muito obrigado.

Obrigado a vocês todos! Levo-vos comigo para a vida!

“O sucesso é a soma de pequenos esforços, repetidos dia após dia.”

Robert Collier

ÍNDICE GERAL

Parte I - Relatórios de Estágio em Farmácia Comunitária.....	9
Lista de Abreviaturas	10
Introdução	11
Análise <i>SWOT</i>	12
Pontos Fortes	12
Localização e Espaço da Farmácia Moreira Padrão.....	12
BackOffice: Receção de encomendas, Reclamações, Devoluções e Controlo de	
Prazos de Validade.....	13
Equipa de Trabalho.....	13
Atendimento ao Balcão.....	14
Preparação dos Sistemas de Dispensação Semanal de Medicação e fornecimento	
da medicação para Lar de Idosos.....	14
Formações Internas e Externas.....	15
Relações entre Farmácias.....	16
Pontos Fracos.....	16
Baixa Confiança.....	16
Organização e Estrutura do Estágio Curricular.....	17
Dermofarmácia e Cosmética.....	18
Medicação Oftalmológica e Auricular.....	18
Oportunidades.....	19
Medicamentos Manipulados.....	19
Ações de Prestação de Serviço e Campanhas ao Público.....	19
Ameaças.....	19
Concorrência das grandes superfícies comerciais.....	19
Farmacêutico versus Técnico de Farmácia	20
O papel do Farmacêutico.....	22
Medicamentos Esgotados ou Rateados	22
Conclusão.....	24
Parte II – Relatório de Estágio em Farmácia Hospitalar	25
Lista de Abreviaturas.....	26

Introdução.....	27
Análise SWOT	28
Pontos Fortes.....	28
Plano de Estudos do MICF.....	28
Apresentação Oral.....	29
Auditoria da JCI.....	29
Plano de Estágio.....	32
Manipulados estéreis e não estéreis/galénica.....	32
Colaboração com toda a equipa do SF.....	32
Contacto com medicamentos de uso exclusivo hospitalar.....	33
Pontos Fracos.....	34
Estágio com carácter observacional.....	34
Cronograma e distribuição do estágio.....	34
Plano de estudos do MICF	35
Conhecimentos em Excel®.....	35
Farmácia Clínica.....	36
Oportunidades.....	36
Perspetiva de Hospital Central.....	36
Ensaio Clínicos.....	36
Farmacêutico versus Técnico de Farmácia	36
Ameaças.....	37
Elevado trabalho administrativo do Farmacêutico Hospitalar.....	37
Carreira do Farmacêutico Hospitalar.....	38
Conclusão.....	39
Parte III- Monografia “Caracterização de Vesículas Extracelulares em <i>Giardia lamblia</i> ”	40
Lista de Abreviaturas	41
Resumo/Abstract	42
Introdução.....	43
O que são Vesículas Extracelulares?	45
EVs e ESPs em infeção por <i>Giardia lamblia</i>	51
EVs no processo de enquistamento.....	53
Tratamento e Controlo da giardíase.....	57

Conclusão	59
Bibliografia.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do trofozoíto e quisto de <i>G. lamblia</i>	44
Figura 2. Representação esquemática de uma célula eucariótica demonstrando a via endocítica e a formação de exossomas	45
Figura 3. Biogénese de exossomas	48
Figura 4. Diferenciação do trofozoíto de Giardia no quisto.....	57

PARTE I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária Farmácia Moreira Padrão



Orientado por: Dra. Margarida Freitas

LISTA DE ABREVIATURAS

FMP – Farmácia Moreira Padrão

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

MSRM – Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

PCHC – Produtos Cosméticos e Higiene Corporal

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

INTRODUÇÃO

A farmácia comunitária é uma das mais variadas alternativas possíveis de saídas profissionais para um recém-licenciado do MICE, dotado de todas as ferramentas necessárias para que possa ser o melhor profissional, independentemente da área de trabalho pela qual opte. A farmácia comunitária, uma área obrigatória do estágio curricular e área profissional que oferece maior taxa de empregabilidade, permite ao estudante um contacto real com situações diárias com os utentes da farmácia, reforçando a importância da integração numa equipa de trabalho que se une de modo a atingir um objetivo comum, ultrapassando as várias dificuldades. Esta área, altamente dinâmica, exige um controlo apertado, feito através da legislação em vigor, e uma adaptação rápida ao utente, aos produtos e às necessidades da comunidade que serve.

O meu estágio em farmácia comunitária ocorreu na Farmácia Moreira Padrão, localizada no concelho da Batalha, distrito de Leiria. A FMP inclui uma equipa de catorze profissionais, entre eles farmacêuticos, técnicos de farmácia e técnicos auxiliares de farmácia. O estágio teve a duração de 4 meses, orientado pela Dra. Margarida Freitas.

O presente relatório estabelece uma análise *SWOT* onde são apresentados duas componentes principais, como estipulado previamente pelas normas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, contemplando uma componente interna, relacionada diretamente com o estagiário: os Pontos Fortes (*Strengths*) e Pontos Fracos (*Weaknesses*), e a componente externa, relacionada diretamente com a farmácia: as Oportunidades (*Opportunities*) e Ameaças (*Threats*).

ANÁLISE SWOT

Pontos Fortes (Strengths)

Localização e espaço da Farmácia Moreira padrão (FMP)

A FMP está localizada na Batalha, vila situada entre a cidade de Leiria e a cidade de Fátima. Estando perto do IC2, e localizada no centro da vila, perto do Mosteiro da Batalha, num lugar com elevada visibilidade e fácil estacionamento, a FMP destaca-se perante as demais. Dado que se trata de uma zona com grande afluência populacional, a existência de estacionamento contribui para o seu maior afluxo, uma vez que esta farmácia já se encontrou noutra local onde o estacionamento era uma falha sentida para o crescimento da mesma. De referir que FMP já tem 45 anos de existência, ao cuidado da Diretora Técnica Dra. Maria Isabel Moreira Padrão, o que a torna uma entidade de referência para a população local no que se refere ao atendimento personalizado e cuidados de saúde.

A FMP é uma farmácia com um enorme espaço para atendimento ao público, permitindo que todo o trabalho seja desenvolvido nas suas áreas respetivas e as necessidades sejam atendidas, respeitando a privacidade do utente. O espaço encontra-se dividido em diversas áreas: o *BackOffice*, onde é feita a receção de encomendas e receção dos produtos farmacêuticos, que são posteriormente organizados em gavetas por ordem alfabética do princípio ativo; a zona de armazém que tem capacidade para uma elevada quantidade de produtos farmacêuticos e não farmacêuticos (Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM), Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM), Produtos Cosméticos e de Higiene Corporal (PCHC), material de laboratório, Material de penso, fraldas e expositores) contempla também a zona de cacifos onde são colocados os bens pessoais dos colaboradores; casa de banho; copa; o laboratório e a zona de preparação dos Sistemas de Dispensação da Medicação Semanal; uma sala para *workshops* e formações, tanto para os profissionais como para os utentes e o gabinete da Direção Técnica.

Na área de atendimento ao público existem sete postos de atendimento, uma casa de banho e exposição dos mais variados produtos farmacêuticos de várias linhas como a *Filorga*[®], *Caudalie*[®], *Chicco*[®], *Mustela*[®], *Uriage*[®], *Elgydium*[®], *Oral-B*[®], *Nutribén*[®], *Skinceuticals*[®], *Babe*[®] entre outros, e três gabinetes para consultas personalizadas ou para a prestação dos seguintes serviços: testes sanguíneos e exames de urina, apoio ao doente hipertenso, administração de vacinas/injetáveis, aconselhamento em aleitamento materno, consulta de

nutrição, consulta de podologia, aconselhamento dermocosmético especializado, estética avançada, fisioterapia/osteopatia, depilação definitiva ou acompanhamento psicológico.

Backoffice: Receção de Encomendas, Reclamações, Devoluções e Controlo de Prazos de Validade

De modo a poder ter um conhecimento melhor de toda a estrutura e organização da farmácia, foi-me pedido que desse auxílio na receção de encomendas. Inicialmente foi-me inculcida a tarefa de arrumar os medicamentos rececionados por ordem alfabética de princípio ativo. Os produtos não farmacêuticos eram devidamente etiquetados e arrumados nos respetivos expositores ou no armazém, caso existissem em excesso. Todo o processo de receção, verificação e introdução no *stock* de um produto me foi explicado, sendo que, apesar não ter sido uma tarefa que me foi inculcida com mais frequência, foi importante para que conhecesse a forma de organização da farmácia e o modo de aquisição dos diversos produtos que temos disponíveis.

Apesar da grande rotatividade dos produtos na FMR, como é normal, nem todos os produtos têm o mesmo nível de saída e, assim, era necessário fazer a recolha desses mesmos quando estes apresentavam prazos de validade curtos ou perto de expirar. Nesta situação, era feito um levantamento pelo sistema de todos os produtos da FMP que estavam nesta situação e a sua recolha era realizada para se proceder à devida devolução ao laboratório em questão, sempre que tal era possível

Nas situações em que eram rececionados produtos em excesso (não encomendados, não faturados, danificados, prazos de validade curtos ou expirados), procedia-se a devoluções onde, através do sistema, se devolvia o(s) produto(s) em causa com a devida justificação para o distribuidor poder recolher os mesmos.

Equipa de trabalho

A FMP destaca-se pela equipa. Esta é composta catorze pessoas de várias idades, mas que têm em comum o profissionalismo e a simpatia no atendimento. Esta foi a razão pela qual escolhi a FMP não só como farmácia familiar, mas também como referência e exemplo para esta fase tão importante do meu curso.

Um bom ambiente de trabalho proporciona um ambiente relaxado e profissional, o que permite um melhor desempenho de cada um nas suas funções. Foi neste ambiente que foi possível uma boa integração no seio de uma equipa unida já há alguns anos, com um

acompanhamento contínuo no trabalho que desempenhei. Foi sempre possível esclarecer e dúvidas, pedir ajuda e ultrapassar dificuldades. Todo o conhecimento que ganhei, devo-o aos meus colegas de trabalho, que mesmo estando atentos aos possíveis erros, me acolheram e trataram como um membro da equipa e uma colega de trabalho.

Atendimento ao balcão

O atendimento ao público é o cerne das funções de uma farmácia comunitária. Foi esta a tarefa que preencheu a maior parte do tempo do meu estágio, sendo que primeiramente o realizei com acompanhamento, mas depois foi feita relativa autonomia, sendo que sempre que me surgiam dúvidas ou dificuldades foi sempre auxiliada.

O utente foi sempre a minha principal preocupação, por isso, tentei sempre ouvir e adequar a minha resposta às suas necessidades e esclarecer as suas dúvidas. O atendimento com receita eletrónica, com e sem papel, foi a prática mais comum, na qual a dispensa de medicação foi realizada de acordo com os procedimentos normais que o sistema permite.

Nas situações onde se efetuou aconselhamento ao utente, foi tentando prestar o melhor cuidado de saúde possível, adequando a minha linguagem ao utente e à situação em si. Achei de facto bastante interessante esta componente onde se depara com variadas situações, seja a nível da medicação dispensada como das necessidades do próprio utente. Foi também inserido no aconselhamento ao doente que foi possível aconselhar o Programa de Descontinuação de Benzodiazepinas da Tilman[®] que consiste na substituição da benzodiazepina prescrita ao doente e, muitas vezes, usadas durante largos anos, por um medicamento à base de *Passiflora incarnata*, o *StressPytol*[®]. Sendo considerado um fitomedicamento, apresenta um índice ansiolítico superior ao demonstrado pelas benzodiazepinas sem os efeitos secundários associados a estas. Todas as informações sobre o produto disponíveis e retiradas de: <https://tilmanportugal.com.pt/fito-medicamentos/stress-ansiedade> (Consultado a 26/04/2019).

Preparação dos Sistemas de Dispensação Semanal da Medicação e fornecimento da medicação para Lar de idosos

A preparação de medicação semanal para os utentes requisitantes da farmácia foi uma tarefa que tive oportunidade de observar, bem como a preparação da medicação para os lares de idosos da região e para os conventos. Esta tarefa permitiu-me integrar melhor naquilo que é a terapêutica do idoso e no conceito de polimedicados.

A dispensa semanal da medicação é realizada semanalmente de forma a preparar toda a medicação necessária para a semana seguinte ou para as duas semanas seguintes, sendo que é sempre fornecido à farmácia a lista de medicamentos e o nome do utente para quem se prepara toda a medicação. Esta preparação envolve a distribuição em dose unitária da medicação para todos os dias da semana (Segunda-feira a Domingo) nas diferentes partes do dia (Jejum, Pequeno-almoço, Almoço, Lanche, Jantar e/ou Deitar). Aqui é dispensada a medicação em *blisters* semanais com as formas farmacêuticas sólidas, podendo eventualmente, ser anexado alguma medicação à parte quando é impossível colocar a medicação no *blister* (por exemplo os sistemas transdérmicos).

Quanto à medicação para os lares de idosos ou conventos, a medicação era preparada para envio todas as semanas, em vários dias, conforme pedidos via *email* ou *fax* de forma a que sejam entregues atempadamente para os idosos iniciarem as tomas na altura certa. Esta preparação é crucial e cada vez mais importante pois a intervenção da farmácia, mais propriamente do farmacêutico preparador, permite uma extensa redução nos erros de medicação nomeadamente a nível de tomas incorretas, duplicações da medicação, insucesso da terapêutica, sobredosagem, entre outros, impedindo uma *compliance* reduzida e, conseqüentemente, terapias incorretas. É necessário apostar neste tipo de preparações de forma a poder intervir mais ativamente nesta faixa etária, onde a polimedicação é persistente e os erros associados são maiores. Este tipo de intervenção é um sinal da maior integração da farmácia no seio da comunidade como cuidado primário de saúde, mudando a imagem da farmácia, não só como um espaço de venda, mas também como um espaço de prática clínica.

Formações internas e externas

Uma profissão dedicada à saúde e com o objetivo de prestar sempre os melhores cuidados possíveis à comunidade exige sempre uma formação contínua, de modo a que os avanços na ciência sejam sempre conhecimento de quem quer oferecer saúde. Como tal, é importante que, quer como estudantes, quer como profissionais, estejamos sempre atualizados. Uma das formas para tal é através de formações internas, promovidas pela farmácia, através dos delegados de informação médica, quer externas, fornecidas pelas mais diversas instituições e empresas.

Durante o meu estágio, tive a oportunidade de fazer formações internas, sendo que estas se realizavam na FMP, nas quais a delegada de informação médica expunha os vários produtos alusivos à formação em causa. Para além disso, também tive oportunidade de fazer formações externas, que aconteceram em Coimbra. Achei de facto importante estas

formações porque vieram colmatar e preencher algumas lacunas de informação que tinha, sendo uma ferramenta proveitosa para melhorar os meus conhecimentos no local de estágio e, eventualmente, no meu futuro.

As formações internas nas quais participei foram:

- Formação em medicamentos de uso veterinário;
- Formação Tilman®;
- Formação Depot®;
- Formação O`right®;
- Formação EcogeneticsN®.

As formações externas nas quais participei foram:

- Formação Skinceuticals®;
- Formação Nestlé®: Academia de farmácia;
- Congresso científico NEF/AAC: Doenças (Re) Emergentes, um problema de saúde pública.

Relação entre farmácias

Com o crescimento das exigências do mercado e com a crise ainda a fazer-se sentir no setor, há necessidade de manter sempre uma relação com outras entidades concorrentes de forma a trabalhar e colaborar para o sucesso de ambas. Na FMP senti bastante proximidade com outras farmácias, nomeadamente nas ajudas em obter determinados produtos que se encontram esgotados ou rateados.

Pontos Fracos (Weaknesses)

Baixa confiança

O estágio é um momento de aprendizagem, onde somos obrigados a adaptar-nos às diversas situações do dia-a-dia de um farmacêutico, pondo em prática o conhecimento adquirido durante os anos de faculdade. O atendimento ao balcão, tarefa principal de um farmacêutico de oficina, é o local onde esta adaptação é mais difícil pois as situações que surgem são diversas e, muitas vezes, a informação que temos sobre o utente é reduzida e subjetiva, no entanto, a capacidade de resposta tem que ser rápida.

Como tal, a falta de experiência foi uma dificuldade sentida perante estas ocasiões o que é expetável, mas contribuiu para uma baixa confiança como estagiário o que muitas vezes era refletida durante a execução das tarefas acabando por ser mais prejudicial para o meu desempenho do que apenas aceitar que tal inexperiência é algo normal e, apenas com a prática, é que tais situações são superadas com mais facilidade.

Apesar de sempre ter tido o á vontade necessário para colocar questões sobre quaisquer dúvidas que me surgiam, poderia ter mostrado uma atitude mais ponderada e mais calma face à dificuldade que senti. É algo que tem de ser superado a cabo de mostrar mais confiança para o exterior, sem nunca ter receio de perguntar quando surgem situações que não se sabe como proceder.

Organização e estrutura do estágio curricular

A forma e o método de organização do estágio são importantes para que o estagiário tenha oportunidade de presenciar e intervir nas diferentes áreas de trabalho. Neste aspeto, em particular, acho que faltou alguma organização, visto que a tarefa principal do meu estágio foi o atendimento ao balcão. Apesar de ser uma tarefa essencial do farmacêutico comunitário e, com a qual adquiri conhecimentos e competências muito importantes, a verdade é que outras áreas como a receção de encomendas, dispensa semanal da medicação e produção de medicamentos manipulados ficaram mais negligenciadas.

Para um estagiário que se depara pela primeira com o funcionamento de uma farmácia, é importante começar por tarefas que o integrem no funcionamento e organização da farmácia, tais como a receção de encomendas. Nesta área, em particular, comecei por organizar os MSRM por princípio ativo após a sua receção, conferir encomendas e etiquetar e arrumar PCHC e MNSRM, sem nunca dar entrada da encomenda ou realizar uma encomenda no sistema informático autonomamente; apenas observei o procedimento. A falta de autonomia nestas atividades dificultou a realização de encomendas posteriormente e dificultou a minha perceção do modo de gestão de encomendas e dos níveis de *stock*.

Pela razão referida anteriormente e pela particularidade inerente à atividade em si, a preparação de medicamentos manipulados foi outra área que não teve uma aprendizagem tão frutífera. Apesar de não participar no fabrico, pode observar de perto todo o processo de receção, preparação, acondicionamento e dispensa destes para os utentes.

Sabendo que o atendimento ao público está sempre condicionado pela presença de utentes na farmácia e que a previsão antecipada de horários para a passagem por todas as áreas nem sempre é possível, são justificações para esta situação, um calendário pré-

estipulado ou uma estruturação mais geral do estágio poderia minimizar estas falhas, no sentido de tentar garantir que o estagiário, durante um período específico e predefinido do estágio, efetue determinada tarefa e também permitir à farmácia conseguir acompanhar melhor o estagiário.

Dermofarmácia e Cosmética

A crescente facilidade no acesso à informação origina utentes mais exigentes nos produtos que procuram para o seu bem-estar e saúde. Um atendimento mais personalizado e um conhecimento maior sobre todos os produtos de modo a proporcionar uma resposta rápida e eficaz às necessidades dos utentes é, cada vez mais, um requisito e um fator diferenciador das farmácias. Na área da Dermofarmácia e Cosmética as referências são imensas e, como tal, é necessário conhecer um nível considerado de produtos para abranger o máximo possível de linhas/ gamas de cosméticos. Esta área é bastante interessante e pode marcar a diferença no crescimento das farmácias comunitárias. Contudo é necessária uma formação especializada e contínua e um conhecimento real sobre os produtos das várias marcas disponíveis no mercado, bem como a capacidade de adequar a relação qualidade/preço ao utente, algo que provém da experiência de trabalho.

Uma das dificuldades que senti foi precisamente no aconselhamento deste tipo de produtos aos utentes. A falta de conhecimento técnico sobre os produtos e a diversidade de marcas e produtos semelhantes para um mesmo problema ou necessidade dificultaram a minha escolha e a minha decisão nos produtos a aconselhar ao utente. A este facto acrescenta-se que a FMP é uma farmácia que aporta uma elevada percentagem de cosméticos e produtos de saúde de marcas de referência como a *Filorga*[®], *ISDIN*[®] ou *SlinCeuticals*[®] e, de facto, verifica-se a necessidade de haver uma contínua formação para que se atinjam os objetivos propostos pelos próprios utentes, no que toca ao cumprimento das suas necessidades.

Medicação Oftalmológica e Auricular

De um ponto de vista muito pessoal, para além das dificuldades inerentes a um primeiro estágio curricular e das anteriormente referidas, o aconselhamento na medicação destinada ao uso oftálmico ou auricular foi uma dificuldade que senti fortemente ao longo do estágio. Apesar de a maioria da medicação dispensada neste âmbito o ser feito segundo uma prescrição médica, a verdade é que muitos utentes utilizam a farmácia para a resolução de

pequenos problemas que são passíveis de resolução sem recorrer ao médico. Foi precisamente neste campo que senti mais dificuldade e insegurança pois senti algumas falhas na minha formação académica neste campo. Os medicamentos e conceitos abordados neste sentido foram demasiado generalistas, não trazendo a segurança necessária para um aconselhamento dos mesmos sem dificuldades.

Oportunidades (*Opportunities*)

Medicamentos manipulados

A FMP é uma farmácia que produz medicamentos manipulados. Apesar de apenas existirem alguns protocolos que realizam, já é prática habitual e como tal, já é do conhecimento da população que podem ser obtidos a partir desta farmácia.

Esta necessidade surge quando a Indústria Farmacêutica não produz determinadas formulações, acabando por ser as próprias farmácias a ter de criar os produtos galénicos para as terapêuticas instituídas ou quando há necessidade de formulações adaptadas a determinadas situações clínicas. Assim, foi uma constatação ao longo do estágio, a contínua requisição e produção de manipulados para o exterior. É estipulado por lei, quais os manipulados a serem passíveis de produção e quais os requisitos mínimos que as farmácias devem respeitar para serem aplicados as Boas Práticas Laboratoriais aquando a sua produção. Acho que é de todo uma vantagem para a FMP produzir manipulados, pois torna-se uma farmácia imprescindível para a população ao fornecer produtos que em muitos locais não são possíveis de obter, chegando mesmo a contribuir para um aumento do lucro da farmácia e do número de utentes fidelizados.

Ações de prestação de serviços e campanhas ao público

Durante todo o estágio foi possível constatar o numero de serviços e de campanhas disponíveis para o publico, fornecidas pela FMP. A FMP aposta no bem-estar dos seus utentes e articula esse facto com a promoção de várias campanhas que visam esse objetivo e, concomitantemente, promovem novas e alternativas formas de terapêutica e cuidados. Um exemplo bastante ilustrativo disto mesmo foi o *Workshop* em Aromoterapia. Além disso fornecem um leque de serviços que podem usufruir de forma a completar o máximo possível os cuidados de saúde necessários. Por exemplo, é rotina haver consultas de Nutrição, onde uma nutricionista acompanha e aconselha neste campo a fim de garantir que

os utentes consigam atingir e manter os seus objetivos, seja na perda de peso como na sua manutenção. Igualmente é disponibilizado um serviço de Enfermagem onde os utentes podem recorrer para administrar as vacinas não incluídas no Plano Nacional de Vacinação e também para administrar outros produtos injetáveis, segundo a legislação em vigor, quando necessário, sendo que os farmacêuticos da FMP estão habilitados e creditados para executarem essa administração.

Para além destes serviços mais regulares, a FMP também organiza e proporciona campanhas e rastreios nas mais variadas áreas, como campanhas de aconselhamento cosmético da *SkinCeuticals*[®], *Filorga*[®], entre outras, com especialistas para o efeito e rastreios capilares e/ ou do sistema venoso, igualmente com especialistas, fornecendo os melhores conhecimentos para todos os interessados e acrescentando valor, no que toca ao cuidado e atenção na saúde destes.

Dentro destas ações e tendo em vista a perspetiva da valorização do papel do farmacêutico na sociedade como o principal promotor do uso racional da terapêutica e a proximidade do farmacêutico comunitário com a sociedade, existe nas farmácias comunitárias uma valiosa oportunidade de alertar e informar os utentes, nomeadamente para o Uso Racional do Antibiótico e para a Reciclagem dos Medicamentos. Muitos utentes não estão sensibilizados para os efeitos nefastos do uso de antibióticos em excesso, nem para as consequências de deitar estes e outros medicamentos no lixo comum, assim, surge aqui uma necessidade de formação cujo farmacêutico comunitário, como principal mediador entre o medicamento e o utente e o responsável pela maioria da dispensa de medicamentos, tem obrigação de fornecer de modo a que possa ser assegurada a segurança e eficácia da terapêutica.

Ameaças (Threats)

Concorrência das grandes superfícies comerciais

O crescimento de novos pontos de venda de MNSRM tem um grande impacto na sustentabilidade económica das farmácias comunitárias. Uma preocupação constante por parte das farmácias é tornar os seus preços mais competitivos e apelativos do que nestes locais, para que haja uma maior fidelização dos utentes e, conseqüentemente, um menor prejuízo possível.

No que toca a esta componente, a FMP não é exceção. Grandes superfícies comerciais detentoras destes pontos de venda são concorrentes bastantes intimidantes, ao

ponto que se torna um desafio a colocação de determinados PVP em produtos para que sejam competitivos e, ao mesmo tempo, lucrativos para a farmácia. Penso que esta ameaça é constantemente observável no dia-a-dia da FMP, pois tem de se arranjar formas de conseguir atingir os objetivos pretendidos a nível de vendas sempre com atenção às evoluções do mercado concorrente e com novas estratégias para satisfazer o utente da melhor forma e a combater a concorrência gerada. Com vista a conseguir estes objetivos muitas são as campanhas realizadas, com descontos e ofertas, embora muitas vezes as mesmas sejam também sejam realizadas pelos referidos pontos de venda.

Farmacêuticos versus Técnicos de Farmácia

A farmácia comunitária é um espaço de saúde na qual vários colaboradores integram a equipa de trabalho. Existem dois grupos principais de profissionais: os farmacêuticos e os técnicos de farmácia e ambos trabalham para o bem comum da farmácia: o utente.

No entanto, as suas funções são diferentes. Ambos são encarados como parceiros, mas também como concorrentes para o mesmo mercado que, cada vez mais, caminha para a igualdade de trabalho. Apesar de ter aspetos positivos, pois há mais reconhecimento do técnico de farmácia, há também ameaças no que toca à desvalorização do farmacêutico com a diminuição das condições salariais. Se por um lado é uma ameaça haver este nível de competitividade no que toca ao mercado de trabalho, também é interessante ver o trabalho em conjunto que é realizado no sentido de melhorar as práticas de saúde.

A FMP, tal como mencionado, é constituído para ambos os profissionais e, de facto, o trabalho desenvolvido encontra-se bem delineado, o que é uma vantagem e uma boa política de trabalho, pois assim, cada colaborador sentir-se-á útil e pode contribuir positivamente para o crescimento da farmácia. Assim, os técnicos de farmácia têm a responsabilidade principal de gerir as encomendas (gerar, rececionar e acondicionar as encomendas para FMR), assim como têm a responsabilidade do atendimento ao público (se bem que esta tarefa é partilhada, em parte, com os farmacêuticos), enquanto que os farmacêuticos têm as funções da Direção Técnica, de acordo com o estabelecido pela legislação, as funções do laboratório, na produção de medicamentos manipulados e as funções da preparação dos Sistemas de Dispensação Semanal da Medicação, no geral.

O papel do farmacêutico

Como tive a oportunidade de realizar dois estágios dentro da área clínica da profissão de farmacêutico pode constatar algumas diferenças que destaco como sendo uma forte ameaça. Quando comparado com o farmacêutico hospitalar, o farmacêutico comunitário vê a sua ação limitada no que toca à validação de medicação receitada pelo médico. Enquanto que num hospital o circuito do medicamento depreende a prescrição, pelo médico, seguida da validação, pelo farmacêutico, o mesmo não se verifica no circuito do medicamento fora dos hospitais. Sendo que a maioria das vendas é gerada com uma receita médica que vem diretamente de um consultório e não existindo nenhum meio de validação pelo farmacêutico da mesma, estes profissionais vêm a sua ação bastante limitada neste campo. Acresce a isto a dificuldade de comunicar com os médicos e outros profissionais de saúde para eventuais correções de dose ou sugestão de melhores alternativas terapêuticas, no sentido de contribuírem os dois para o objetivo terapêutico do doente. Numa opinião pessoal, destaco esta importante diferença de separa a credibilidade e as funções de duas áreas dentro da mesma profissão, algo que deveria mudar. O farmacêutico comunitário, como principal representante da profissão de farmacêutico, deve lutar para que esta diferença se torne mínima. É certo que, felizmente, o valor da profissão é cada vez mais reconhecido pela sociedade e pelo utente, contudo penso que ainda muita há a ser feito e melhorado. Acrescento ainda que este passo importante do circuito do medicamento que foi dissimulado ao longo do tempo na farmácia comunitária poderia contribuir, entre outros aspetos, para apaziguar a concorrência que tem vindo a aparecer entre técnicos de farmácia e farmacêuticos, dado que a validação é um ato exclusivamente farmacêutico.

Medicamentos esgotados ou rateados

A constante mudança de preços dos medicamentos, a exportação paralela e os atrasos nos pagamentos às Indústrias Farmacêuticas são algumas razões para que muitas vezes haja falhas nos medicamentos no mercado. Estes produtos podem estar completamente esgotados, por motivos de impedimentos de produção por parte da indústria durante um período de tempo, ocorrendo faltas sentidas pelos utentes, ou então porque os medicamentos estão rateados, ou seja, cujo stock está limitado e as quantidades encomendadas não são respeitadas, havendo um corte abrupto na entrega desses mesmos.

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

É algo que muitas vezes se torna insustentável, mas que tem sido contrariado de forma a que estas dificuldades não comprometam a terapêutica dos próprios doentes, contudo a verdade é que isto nem sempre se verifica. Apesar disso, tentar passar a mensagem ao utente não é fácil e muitas vezes há recusa em alterar para outro laboratório o medicamento que já tem vindo a tomar há bastantes anos com o receio de poder interferir com a sua medicação ou apenas esquecer, pois trata-se de um medicamento, que apesar de similar, apresenta-se com cor ou forma diferente, sendo suficiente para criar confusão ao utente, muitas vezes idoso. Penso que seja necessário criar estratégias de prevenção do esgotamento de medicamentos com a dispensa mais restrita destes à população e, quando necessário, haver um aconselhamento atencioso na alteração para outro laboratório com a premissa de que os medicamentos são similares.

CONCLUSÃO

Numa perspetiva de futura farmacêutica que poderá enveredar pela carreira de farmacêutica comunitária considero este estágio uma mais valia. Este estágio permitiu-me ampliar os meus conhecimentos e pô-los em prática da forma mais eficaz possível. É uma área que me interessa muito, tanto pela dinâmica que exige, como pela contínua procura dos melhores serviços possíveis a prestar à comunidade. A área clínica sempre foi aquela que mais interesse me despertou pela aplicabilidade prática dos conhecimentos que adquirimos durante o curso e pela possibilidade de oferecer saúde a quem mais precisa, o utente.

Em farmácia comunitária o contacto direto com o utente e a confiança crescente que é depositada no farmacêutico é, sem dúvida, um aspeto que considero muito importante. Contudo sinto que ainda muito há a fazer no sentido de enaltecer a importância do papel do farmacêutico como prestador de serviços e/nos cuidados primários de saúde e que muitas vezes é desvalorizado. O farmacêutico comunitário deve encarar este facto não como uma ameaça, mas como uma oportunidade de lutar pelo seu papel intrínseco no circuito do medicamento e no objetivo final que é a saúde do doente. Sendo uma referência no medicamento, aspeto essencial da saúde, o farmacêutico deve reeducar a comunidade para que este perceba o seu real papel como prestador de cuidados de saúde e não, apenas, como dispensador da medicação. Penso que tal mentalidade está a mudar, mas ainda muito há a fazer para tal deixar de ser uma realidade.

Esta análise *SWOT* permitiu-me adotar uma perspetiva mais crítica, o que considero um aspeto bastante positivo, uma vez que passarei a profissional de saúde que está pronta para exercer numa das diversas áreas que o curso permite e cada vez mais vejo potencialidade na farmácia comunitária como uma das carreiras profissionais a seguir.

Finalizo manifestando o meu apreço pela oportunidade de estagiar na FMP, uma farmácia, no meu caso, já bastante familiar, mas que nunca deixou de me ensinar como ser melhor profissional e lutar por um objetivo maior que é o utente, ao mesmo tempo que me tratou como um membro da equipa.

PARTE II

Relatório de Estágio em Farmácia Hospitalar Centro Hospitalar de Santo André



C E N T R O
H O S P I T A L A R
L E I R I A

Orientado por: Dra. Joaquina Sanganha

LISTA DE ABREVIATURAS

CHL – Centro Hospitalar de Leiria

CIM – Centro de Informação de Medicamentos

HSA – Hospital de Santo André

JCI – *Joint Commission International*

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

SF – Serviços Farmacêuticos

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

TSDT – Técnico Superior de Diagnóstico e Terapêutica

INTRODUÇÃO

A farmácia hospitalar é por definição “o conjunto de atividades farmacêuticas exercidas em organismos hospitalares ou serviços a eles ligados para colaborar nas funções de assistência que pertencem a esses organismos e serviços e promover a ação de investigação científica e de ensino que lhes couber”. Os serviços farmacêuticos são um serviço com “autonomia técnica, sem prejuízo de estarem sujeitos à orientação geral dos órgãos da administração, perante os quais respondem pelos resultados do seu exercício.”

O Centro Hospitalar de Leiria (CHL) é composto por três unidades de cuidados de saúde, o Hospital Distrital de Pombal e o Hospital Bernardino Lopes de Oliveira, situado em Alcobaça e o Hospital de Santo André (HSA), onde se situam os Serviços Farmacêuticos (SF). Este agrupamento em Centro Hospitalar surgiu com o intuito de reorganizar o parque hospitalar, promovendo a complementarização dos serviços e uma melhor integração dos recursos. O CHL tem uma área de influência que abrange uma população de cerca de 400.000 habitantes e, no sentido de corresponder à sua missão de prestadores de cuidados de saúde, articula-se com os centros de saúde existentes nas diversas localidades e com os demais hospitais do Sistema Nacional de Saúde do distrito e de Coimbra.

No que se refere ao meu estágio hospitalar, sob supervisão da orientadora, Dra. Joaquina Sanganha, foi distribuído, dentro do espaço de tempo disponível, pelos setores de atuação farmacêutica que o CHL integra e que decorreu nos meses de maio e junho de 2019. Assim sendo, os setores por onde tive oportunidade de observar e experienciar foram:

- Gestão e Organização do SF;
- Distribuição de medicamentos:
 - Distribuição Individual em Dose Unitária;
 - Distribuição por requisição Individualizada;
 - Sistema de Reposição de Stocks Nivelados.
- Distribuição de medicamentos em regime de internamento – Circuitos especiais:
 - Gases Medicinais;
 - Hemoderivados;
 - Psicotrópicos e Estupefacientes.
- Produção e controlo de Medicamentos Estéreis:
 - Unidade de Produção de Citotóxicos.

Relatório de Estágio em Farmácia Hospitalar

- Produção de medicamentos manipulados / não estéreis:
 - Unidade de Produção de não estéreis.
- Ensaio Clínicos.

De acordo com o preconizado pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, é norma a criação deste relatório em formato de análise SWOT, o que corresponde a uma reflexão crítica dos pontos fortes (*Strengths*), pontos fracos (*Weaknesses*), oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*) que pude evidenciar durante a minha fase de estágio hospitalar e que, direta ou indiretamente, afetaram, positiva ou negativamente, a minha aprendizagem.

ANÁLISE SWOT

Pontos Fortes (Strengths)

Plano de estudos MICF

Os conhecimentos adquiridos ao longo da nossa formação acadêmica são fulcrais para serem aplicados no ambiente profissional como o de farmácia hospitalar. Assim sendo, o saber retido ao longo dos anos na instituição de ensino, permitiu-me que houvesse conforto em meio hospitalar de forma que a minha integração no Hospital fosse mais bem-sucedida. Contudo, não seria demais que um maior detalhe e maior aproximação à realidade fosse conseguido para que determinados obstáculos não sejam colocados em ambiente de estágio/ trabalho. No entanto, o plano de estudos há determinadas áreas, como a farmacologia, farmácia hospitalar, farmacovigilância, galénica, farmacoterapia e farmácia clínica, que permitem uma maior facilidade em integrar o circuito do medicamento, tornando-nos uma mais valia no mercado de trabalho.

Apresentação oral

Neste estágio tive a oportunidade de apresentar um trabalho relativo ao Centro de Informação de Medicamentos (CIM), entre outros pequenos trabalhos de utilidade que tive oportunidade de realizar. Sendo o farmacêutico o principal responsável pelo bom uso do medicamento, é de todo essencial que conheça e disponha das mais variadas fontes de informação e que estas sejam fidedignas, de modo a que seja prestada toda a informação necessária para o uso correto do medicamento.

O crescente avanço na tecnologia permite que o acesso à informação seja facilitado, contudo também permite que as fontes sejam oriundas das mais variadas origens e que a sua veracidade seja posta em causa. Esta apresentação permitiu por em evidência que fontes de informação a dar prioridade em detrimento de outras, bem como destacar o papel crucial do farmacêutico como informador principal do medicamento.

Para tal este necessita de um espaço próprio para o efeito e de estar munido das ferramentas essenciais visto que é aos serviços farmacêuticos a quem todos os serviços hospitalares recorrem quando surge alguma dúvida sobre medicamentos. Mais ainda, foi

possível perceber como se organiza um espaço de informação de apoio aos serviços farmacêuticos hospitalares dado que nos foi incumbida a tarefa de reorganizar a biblioteca de apoio de acordo com o proposto para uma biblioteca de apoio de um CIM.

Este tipo de trabalhos não só contribui para enriquecer o estágio curricular e a formação adquirida, como permite que exista destaque no meio hospitalar perante os profissionais de saúde uma vez que possibilita que uma melhoria na nossa postura, comunicação e interligação e gera uma alternativa para mostrar os nossos conhecimentos perante terceiros de forma que possamos mostrar o nosso valor e rigor.

Auditoria pela JCI

O CHL é um centro hospitalar acreditado pela Joint Commission International (JCI), uma empresa de acreditação cuja missão é aumentar a segurança e a qualidade dos cuidados de saúde na comunidade internacional através de serviços de educação, consultadoria, publicação e avaliação. Durante o período de tempo do meu estágio foi possível assistir a parte do processo que precede uma auditoria desta empresa.

Em primeiro lugar todos os serviços são avaliados pela Comissão de Qualidade e Segurança do Doente, através de auditoria internas. Neste caso particular esta teve o propósito de avaliar a resolução das não conformidades apontadas pela auditoria de re-acreditação da JCI.

Em segundo lugar pudemos observar a auditoria focal feita pela própria JCI, a qual é realizada por um auditor de prestígio da empresa e que avalia todas as não conformidades ou conformidades parciais apontadas.

Este processo foi um aspeto bastante interessante porque permitiu uma visão real dos processos implementados no sentido de existir uma melhoria contínua e uma procura da qualidade, uma característica essencial para quem trabalha na área da saúde.

Plano de estágio

Neste ponto enuncio algumas particularidades do meu plano de estágio. Em primeiro lugar, realçar que, apesar do curto tempo de estágio hospitalar fornecido, foi possível passar e observar por todos os setores onde os SF atuam, permitindo-me um conhecimento geral sobre o circuito do medicamento no hospital e a forma como o farmacêutico atua nestes diferentes setores o que, como estagiário, permite inferir sobre a própria carreira do farmacêutico hospitalar.

Iniciando pelo módulo de organização e gestão do SF, foi possível perceber quais os métodos aplicados na aquisição e os critérios de seleção, bem como é feita a receção e verificação das encomendas. O armazenamento de medicamentos enquanto produtos de saúde foi também uma das áreas pela qual passei, o que me permitiu perceber as particularidades e os cuidados a ter com os mais diversos medicamentos e produtos de saúde.

De seguida, passei á parte da distribuição de medicamentos. Neste setor verifiquei os vários processos de distribuição de medicamentos: distribuição em dose unitária individual, distribuição clássica, reposição de *stock* por níveis definidos, requisições urgentes, distribuição personalizada, distribuição em ambulatório e distribuição de medicamentos sujeitos a controlo especial. Esta parte foi particularmente interessante pelas diferenças que existem relativamente á distribuição em farmácia comunitária, relativamente a quantidades, validação pelo farmacêutico e controlo dos medicamentos especiais, bem como das políticas internas do hospital relativamente ao uso de antibióticos e antissépticos.

No setor de preparação e controlo existe uma relação contígua entre produção e garantia da qualidade. Todos os procedimentos visam garantir a eficácia, segurança e qualidade dos produtos medicamentosos de modo a que o doente receba a terapêutica mais adequada às suas necessidades. Foi possível observar a preparação de produtos farmacêuticos não estéreis e estéreis, bem como observar toda a embalagem dos medicamentos. No setor de preparação de citotóxicos, houve, ainda, a possibilidade de observar e testemunhar todos os protocolos de preparação em câmara de fluxo laminar vertical, procedimentos de higiene e segurança, bem como a validação e adequação da dose ao doente.

Também me foi permitido observar a gestão e execução dos ensaios clínicos onde, igualmente, os SF mantêm um papel ativo. Aqui foi possível observar o circuito do medicamento experimental e concluir sobre a importância extrema do controlo constante a que este está sujeito. Esta experiência nos ensaios clínicos forneceu uma oportunidade de verificar uma área, exclusivamente farmacêutica, que pode ser explorada ainda mais, dado ao número crescente de ensaios clínicos que se têm desenvolvido. Foi-me dada a possibilidade de presenciar uma reunião de visita de uma empresa sobre um ensaio clínico a ser implementado no HSA, assim como, acompanhar alguns ensaios clínicos que se encontravam no ativo, observando a receção da medicação experimental, dispensa ao doente, registo e avaliação de toda a documentação associada que evidenciava a importância de que tudo é

necessário registar de forma a ser mantida toda a segurança, qualidade e critérios do estudo em causa.

Manipulados estéreis e não estéreis/ galénica

A oportunidade de poder observar o método de trabalho nas unidades de preparação é de facto muito importante, uma vez que permite ao estagiário inteirar-se de todas as particularidades de um processo bastante exigente que visa garantir a saúde do doente com a qualidade do produto.

Por um lado, temos a preparação de citotóxicos onde se prepara toda a quimioterapia a ser administrada no Hospital de Dia. Aqui pude preparar os tabuleiros necessários à preparação desta medicação e ver, em primeira mão, como são preparadas, em câmara de fluxo laminar vertical, as bolsas e/ou seringas com os citotóxicos necessários nas prescrições realizadas para o efeito. Um facto a ressaltar no método de trabalho é a sua organização para que seja sempre mantida a esterilidade das preparações e não existam trocas, visto que a dose é adaptada a cada doente. Para tal, existiam vários pontos de verificação, desde o médico até ao enfermeiro, de modo a que, caso existissem erros, estes não chegassem ao doente.

Por outro lado, também tive oportunidade de experienciar a preparação de não estéreis no que toca a manipulados e formulações pediátricas, bem como medicamentos de diagnóstico para ginecologia/obstetrícia, que são entregues para administração no domicílio ou para o internamento, de acordo com a necessidade.

A importância de uma unidade de preparação constata-se pela necessidade de uma formulação adaptada para os doentes, contribuindo para um maior sucesso clínico. Esta unidade destaca, portanto, a adaptação dos SF e o seu nível de competência.

Em ambas as áreas de manipulação tenho de realçar a importância do farmacêutico na libertação de lotes, pois tudo o que é preparado tem de ser verificado de forma a minimizar erros e este profissional tem um papel importante no circuito desde a prescrição até à cedência da medicação.

Colaboração com toda a equipa dos SF

É com grande aprazimento que posso constatar como são desenvolvidos os diferentes métodos de trabalho dos profissionais de saúde no local de estágio de forma a poder inferir como podemos melhorar a nossa postura, metodologia e juízo crítico e aplicá-los da melhor forma. Assim, destaco a possibilidade de poder aprender com todos os

farmacêuticos e restantes profissionais de saúde dos diferentes setores do SF como um grande ponto forte. A ligação profissional de saúde- estagiário forte que se estabeleceu conseguiu melhorar a capacidade de convivência com colegas de trabalho, permitindo a integração em equipas de trabalho de uma forma mais eficiente e produtiva.

Para tal, tenho de agradecer a todos os farmacêuticos e restantes profissionais de saúde que disponibilizaram o seu tempo de trabalho para poderem explicar, como todo o processo do trabalho é desempenhado, como podemos ser mais interventivos e críticos no nosso meio de atuação e dedicarem-se a nós, estagiários.

As boas relações de equipa, estabelecidas entre estagiários durante o meu estágio, foram, também, sem dúvida, um ponto forte. Contribuíram para um estágio cooperativo e saudável, de forma a que houvesse sempre camaradagem entre os estudantes estagiários. Isto levou à criação de laços entre colegas, à valorização de todos os intervenientes na realidade profissional com vista a que o ambiente profissional instituído seja sempre o melhor e, por conseguinte, os frutos do trabalho sejam sempre o reflexo disso.

Contacto com medicamentos de exclusivo uso hospitalar

É do nosso conhecimento, enquanto estudantes, que existe medicação que é utilizada apenas em âmbito hospitalar não sendo, por isso, encontrada em farmácia comunitária, o que torna a farmácia hospitalar ainda mais peculiar.

Um dos setores onde mais este facto se verificou foi no ambulatório, onde se pode observar a dispensa de medicação para doenças crónicas, como a Hepatite B, Hepatite C, Esclerose Múltipla, Esclerose Lateral Amiotrófica e Artrite Reumatóide, contudo o circuito de medicamento de uso exclusivo hospitalar também se verifica nos medicamentos Oncológicos e Hemoderivados.

Enquanto que os medicamentos Oncológicos ou Hemoderivados são, na sua maioria, administrados ao doente por profissionais de saúde em ambiente hospitalar, os medicamentos em regime de ambulatório são distribuídos ao doente. Neste setor pude verificar todo o processo de dispensa direta ao doente e que informações este deve reter para fazer cumprir, com maior rigor possível, todas as medidas de conservação, utilização e segurança dos medicamentos.

Pontos Fracos (Weaknesses)

Estágio com caráter observacional

Não posso deixar de pronunciar que este estágio foi, na sua maioria, observacional. É uma enorme falha não ser dada a oportunidade em ser mais ativo no meio hospitalar de modo a poder ter um parecer mais sólido e coerente sobre esta saída profissional do que apenas observar como todos os processos ocorrem.

Não obstante estar ciente das dificuldades que muitos hospitais enfrentam devido à falta de recursos humanos e acumulação de tarefas e que estes fatores não permitem dispor do tempo necessário para guiar um estagiário, a verdade é que um estágio com caráter observacional não dita muito ao estagiário sobre as suas capacidades enquanto futuro profissional. Este facto, por vezes, leva a algum desagrado, pois não podemos provar o nosso valor ou por em prática os conhecimentos adquiridos.

Na minha opinião, com supervisão, deveria ser possível reduzir este fator negativo, tornando o estágio mais apelativo e desafiante e mostrar ao estudante, de forma mais prática, quais os desafios que o farmacêutico hospitalar enfrenta e como podemos arranjar soluções para otimizar esses desafios.

Compreendo que dado ao elevado grau de responsabilidade, nem todos os setores são passíveis de tal ser aplicado, mas certamente que noutros setores poderia ser concretizável, nem que, para tal, um plano de realização de trabalhos escritos com aplicabilidade prática fosse criada e fosse dada a oportunidade ao estagiário de se envolver mais profundamente naquilo que é a realidade quotidiana de um farmacêutico hospitalar.

Cronograma e distribuição do estágio

Considero como um ponto fraco o facto de o estágio em ambiente hospitalar ser muito curto, mais propriamente, apenas dois meses. Este curto espaço de tempo leva a que existam uma rotação muito rápida entre os vários setores do SF, ficando o estágio em si prejudicado.

O curto tempo que dispomos em cada setor serve apenas para introdução e observação, não existindo tempo nem espaço para “colocar em prática”.

Assim, apenas se possibilita que os setores sejam inteirados de forma muito generalista, não havendo capacidade de avaliar, aprofundar e experienciar determinadas tarefas de forma mais prática e útil.

Posto isto, apesar de haver a possibilidade de o estagiário passar por todos os setores do serviço, a estrutura do estágio deveria ser abordada de forma diferente, de modo a que os setores mais observacionais fossem mais curtos e os setores mais práticos fossem mais longos, tornando toda a experiência mais prática e menos observacional. Claro que este estágio deveria ser prolongado de forma a que tal fosse possível, mas haveria mais tempo para integrar e aplicar conceitos de forma concisa e eficiente.

Plano de estudos MICE

No que toca à comparação entre o plano de estudos do MICE e a realidade do ambiente hospitalar as diferenças são notórias. O plano de estudos do curso contém falhas no que toca à preparação do aluno para a farmácia hospitalar e farmácia clínica, acabando por alguns conceitos saírem muito diluídos e demasiado generalistas. Este facto torna ainda mais difícil um estágio proveitoso, pois vamos sendo deparados com situações nas quais a realidade de uma sala de aula é bem diferente da realidade profissional. Algumas matérias com particular importância nos SF são abordadas com demasiada ligeireza para quem pretende ingressar neste tipo de carreira, e, pessoalmente, no momento de estágio.

Acho que MICE deveria ser mais clínico e menos investigacional, de forma a poder munir o estudante para o universo que lhe é imposto, tanto a nível de farmácia comunitária como hospitalar.

Conhecimentos em Excel®

Acho que, neste estágio em particular, senti que foi um ponto fraco não estar completamente ciente das tecnologias que são utilizadas no ambiente hospitalar. A utilização do programa Excel® é uma constante e a incapacidade de poder analisar a forma como a informação é processada, é de facto um ponto negativo para mim, como estagiária. Da mesma forma que programas informáticos aplicados no setor farmacêutico são importantes para o conhecimento do estudante, sendo esta também uma falha do plano de estudos do MICE, ferramentas como o Excel® são cruciais para podermos, pelo menos, ter a capacidade de processar informação de forma sistemática e organizada e com mais sucesso.

Esta foi uma preciosa lição sobre a importância de alargar os conhecimentos para além do que nos é transmitido em ambiente de faculdade, de modo a poder exercer da melhor forma a profissão de farmacêutico.

Farmácia clínica

O HSA é o centro em que diversas situações clínicas ocorrem. Como tal é um excelente espaço para o ensino de futuros profissionais de saúde nas mais diversas áreas de saúde, mas também um espaço ideal de aprofundamento de serviços de modo a que seja sempre o objetivo a prestação dos melhores cuidados de saúde.

Apesar das dificuldades por falta de recursos humanos, é objetivo do SF o início da monitorização da terapêutica, com controlo da dose individualizada em cada utente, bem como a descentralização do farmacêutico, passando este a acompanhar os serviços clínicos pelos quais esta responsável *in locu*. Tais objetivos são de enaltecer, uma vez que contribuem para o bem-estar do doente e permite o uso racional dos recursos e da terapêutica, diminuindo os efeitos secundários e os erros, trazendo mais saúde ao doente. Aponto-os como ponto negativo pela impossibilidade de os presenciar durante o meu estágio.

Oportunidades (*Opportunities*)

Perspetiva hospitalar central

O HSA é o hospital central distrital do distrito de Leiria e o hospital maior do Centro Hospitalar de Leiria. Como tal, enquanto estagiária, foi uma oportunidade incrível poder observar como os SF conseguem responder à dimensão do centro hospitalar, seja a nível de gestão de stocks como a nível de preparação e dispensa de medicação. É neste tipo de hospital que conseguimos averiguar todos os setores onde o farmacêutico hospitalar atua acabando por a sua prática clínica ser mais vasta em relação a hospitais mais pequenos que não têm a possibilidade de albergar tantas valências. Como estagiária, esta ótica é bastante interessante, pois permite recolher o máximo de informação sobre a própria saída profissional que em muitos hospitais não é possível obter, acabando este estágio ser mais profícuo.

Ensaio Clínicos

A existência de ensaios clínicos em meio hospitalar é crucial para o desenvolvimento de novas formas de terapêutica e para avanços em saúde. Neste sentido destaco o trabalho realizado pelos profissionais dos SF que monitorizam vários ensaios clínicos e que perspetivam o aumento do número de ensaios a realizar na instituição.

Todo o processo inerente à implementação de um ensaio clínico foi algo que tive a oportunidade de acompanhar e, pela complexidade do processo, considero uma mais-valia.

Mais ainda, é importante perceber a contínua inovação que surge no mundo farmacêutico e como os hospitais funcionam no sentido de contribuir para tal.

Farmacêutico versus Técnico de Farmácia

Os avanços na saúde têm sido muito grandes e, com essa evolução, a disposição de carreiras profissionais têm igualmente aumentado. No que se refere à área farmacêutica, ao longo dos anos, tem surgido uma carreira quase paralela de forma a auxiliar toda a carga de funções que a Farmácia tem tido. Refiro-me aos Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica (TSDT). Estes carregam uma importante missão de auxiliar o farmacêutico no circuito do medicamento. Contudo, é importante que exista uma distribuição de competências para que estas carreiras não se tornem competitivas, mas sim que se complementem e colaborem numa perspetiva de melhoria contínua dos cuidados de saúde.

Hoje em dia, esta colaboração está a aumentar, o que acaba por ser uma vantagem não só para os próprios profissionais, mas também para os próprios doentes, que são o objetivo principal destas carreiras.

Ameaças (Threats)

Elevado trabalho administrativo do farmacêutico hospitalar

Enquanto farmacêutico uma das principais missões é garantir o uso correto e racional do medicamento. Para tal, são necessários registos de todos os procedimentos inerentes ao circuito do medicamento. Mais ainda, quanto mais aumenta o trabalho desenvolvido, mais aumenta todo o processo burocrático, acabando o farmacêutico por ficar saturado com imenso trabalho administrativo. Este acresce a todas as funções distribuídas pelos diversos farmacêuticos que compõem o setor, aumentando assim a quantidade de trabalho por profissional.

Relatório de Estágio em Farmácia Hospitalar

É um problema quando esta saturação interfere na prática clínica do farmacêutico, uma vez que se torna obrigatório desenvolver este processo administrativo, acabando por retirar tempo para as grandes decisões na prática diária e podendo mesmo atrasar todo o processo delineado para o dia de trabalho. Sendo que, apesar de cumulativa, toda a carga burocrática é necessária, logo o aumento em recursos humanos como resposta a esta situação, de forma a que o farmacêutico nunca perca a sua componente clínica, é algo a ter em conta.

Carreira do Farmacêutico Hospitalar

Enquanto estudantes em fase de término de curso estamos cientes da dificuldade de acesso dos recém-licenciados à área hospitalar devido a uma série de fatores que impedem a fluidez nas contratações, acabando por limitar o acesso à criação de carreira de farmacêutico hospitalar. Esta dificuldade reflete-se num futuro incerto por quem quer enveredar por esta área. Posto isto, a crescente necessidade de haver mais contratações e incentivos aos jovens farmacêuticos para investir nesta carreira deve ser apoiada de forma a que os problemas associados à falta de recursos humanos não ocorram e também para que haja resposta à concorrência dos dias de hoje entre farmacêuticos e técnicos de farmácia.

CONCLUSÃO

Numa perspetiva de futura farmacêutica que poderá enveredar pela carreira de farmacêutica hospitalar considero este estágio uma mais-valia. A possibilidade de poder observar todos os procedimentos e tarefas ao encargo do farmacêutico no circuito do medicamento dentro de um hospital foi essencial para concretizar conceitos e processos que tendem a ser algo vagos e gerais numa sala de aula. É certo que o saber adquirido ao longo do curso é essencial para fornecer as bases teóricas necessárias à profissão, contudo a realidade prática torna possível uma visão totalmente nova deste importante ramo da saúde.

O interesse crescente em inserir-me na área clínica, implica inferir o máximo sobre a farmácia hospitalar e comunitária, onde esta é mais evidente. Senti ainda este facto de forma mais marcada porque ingressei neste estágio após o estágio em farmácia comunitária, onde o papel do farmacêutico ainda carece de relevância e a possibilidade da indicação ou do aconselhamento farmacêutico muitas vezes depende da boa vontade do utente e a conversa com o médico ou outros profissionais de saúde nem sempre é a mais fácil. O antagonismo neste aspeto é bastante claro na farmácia hospitalar, onde os farmacêuticos são cada vez mais procurados e a sua opinião profissional é cada vez mais tida em conta na escolha da terapêutica e uso do medicamento.

É um facto que a componente administrativa por parte do farmacêutico no meio hospitalar está muito presente, mas é importante existir o registo e documentação de todo o processo ocorrido como salvaguarda para os profissionais de saúde e doentes.

Após esta reflexão em análise SWOT, posso dizer que, de modo geral, uma carreira hospitalar é algo a considerar, uma vez que é possível marcar a diferença e que, como profissionais, somos uma peça essencial para o tratamento do doente, podendo muito ainda ser feito de forma a melhorar a nossa intervenção.

Finalizo manifestando o meu apreço pela oportunidade de estagiar em âmbito hospitalar e que, apesar de maioritariamente observacional, capacitou-me com ferramentas para lidar com uma das saídas profissionais que corrobora a minha vontade de dar o meu contributo da forma mais eficaz para o contínuo melhoramento do objetivo principal que a profissão exige, que é o doente. Sinto-me agora mais segura e ciente no que toca a uma escolha profissional futura.

PARTE III
**“Caracterização de vesículas extracelulares em *Giardia*
Lambli”**



Orientada por: Professora Doutora Maria do Céu Sousa

LISTA DE ABREVIATURAS

ADI – <i>Arginine Deiminase</i>	HCNCp – <i>High Cysteine Non-variant Cyst protein</i>
AMEs – <i>Arginine Metabolict Enzymes</i>	IgG – <i>Imunoglobulina G</i>
CPs – <i>Cysteine Proteases</i>	IL-8 – <i>Interleucina 8</i>
COPII – <i>Coat Protein II</i>	ILVs – <i>Intralumial Vesicules</i>
CWPs – <i>Cyst Wall Proteins</i>	LBPA – <i>Lysobisphosphatidic Acid</i>
DCs – <i>Dendritic Cells</i>	LRRs – <i>L eucine-rich Repeat</i>
DCSG – <i>Dense Core Secretory Granules</i>	MiRNA – <i>micro RNA</i>
DEGs – <i>Diferencialy Expressed Genes</i>	mRNA – <i>RNA mensageiro</i>
DNA – <i>Deoxyribonucleic Acid</i>	MPs – <i>Micropartículas</i>
EF-1 α – <i>Elongation factor I alpha</i>	MVBs – <i>Multivesicular Bodies</i>
EGF – <i>Epidermal Growth Factor</i>	MVs – <i>Micro vesículas</i>
EGFCp – <i>Epidermal Growth Factor like Cyst Protein</i>	OMS – <i>Organização Mundial de Saúde</i>
ER- <i>Endoplasmatic Reticulum</i>	OTC – <i>Ornitina Transcarbamilase</i>
EVs – <i>Extracelular Vesicules</i>	RNA – <i>Ribonucleic Acid</i>
ESPs – <i>Excretory-Secretory Products</i>	PVs – <i>Peripheral Vesicles</i>
GalNac – <i>N - acetilgalactosamina</i>	TTP – <i>Tristetrapolina</i>
	VSPs – <i>Variant Sufarce Proteins</i>

Resumo

O parasita *Giardia* é um protozoário ubíquo em todo o Mundo, contudo a giardíase continua a ser uma doença parasitária negligenciada. A falta de conhecimento sobre os mecanismos inerentes à doença continua a ser uma dificuldade no desenvolvimento de novos fármacos e de novas formas de terapêutica. Assim, as vesículas extracelulares, particularmente os exossomas, pelo papel que desempenham na interação parasita-hospedeiro, no processo de enquistamento e na modulação da resposta imunitária, podem ser uma ferramenta para o avanço no conhecimento da doença e para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos.

Palavras-chave: *Giardia*, Giardíase, Vesículas extracelulares, Exossomas, Resposta Imunitária.

Abstract

Giardia is a parasite with worldwide distribution, yet giardiasis remains a poorly understood parasitic disease. Lacking in knowledge about the disease mechanisms is still an obstacle in the development of new drugs. Extracellular vesicles have an important role in host-pathogen interaction and in the encysting process and may be an important tool to understand the disease and in the discovering of new therapeutic targets.

Keywords: *Giardia*, Giardiasis, Extracellular vesicles , Exossomes, Imunitary Response.

INTRODUÇÃO

Mais de mil milhões de pessoas em todo o Mundo estão infetadas com doenças parasitárias, incluindo a malária e outras doenças tropicais negligenciadas.^{1,2} Os países em desenvolvimento são os mais afetados, como a África Oriental e Subsariana e a América. A perspetiva da resistência a fármacos é alarmante, bem como o aumento da incidência em animais de estimação e domésticos, o que aumenta a transmissão de zoonoses e tem fortes implicações sociais e económicas. A necessidade crescente de terapêuticas mais eficazes implica um melhor conhecimento de como os parasitas se adaptam e manipulam o organismo do hospedeiro.^{1,2}

A maior parte dos parasitas, durante o seu ciclo de vida, têm a capacidade de comunicar uns com os outros e com as células do hospedeiro, contudo os mecanismos adjacentes a esta comunicação ainda não são claros.²

Neste contexto, as vesículas extracelulares (EVs, do inglês *Extracellular Vesicles*) surgem como mecanismos de transporte que levam informação entre células e entre organismos. Além do seu papel na fisiologia normal, também transportam moléculas dos patogéneos para o hospedeiro, e vice-versa, como por exemplo antigénios e agentes infecciosos.¹⁻⁴ Nos mamíferos, os sistemas de EVs representam um mecanismo de comunicação célula-a-célula, através da estimulação direta dos recetores ou pela transferência de material genético, proteínas e lípidos.¹⁻⁴

Nos últimos cinco anos, as EVs revelaram estar presentes em diversos contextos biológicos e de doença. Em termos históricos, foram primeiramente identificadas em reticulócitos como um mecanismo de libertação de transferrina.² Mas o seu potencial revelou-se quando se descobriu que podiam apresentar antigénios.^{2,4}

Além das várias aplicações na área da oncologia, as EVs revelam um potencial enorme em várias doenças infecciosas, como as doenças parasitárias, dado que têm uma importante função na comunicação entre parasita-hospedeiro.^{2,4}

O parasita *G. lamblia* (sinónimo de *Giardia duodenalis*, *G. intestinalis*) é o agente etiológico da giardíase, uma doença gastrointestinal veiculada pela água, com prevalência considerável nos países em desenvolvimento e nos países desenvolvidos e considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) uma doença tropical negligenciada, responsável por 280 milhões de infeções sintomáticas por ano.⁵

Giardia spp. foi descoberta pela primeira vez por Antony van Leeuwenhoek. Este protozoário flagelado e binucleado pertence ao Filo Mastigophora e à Ordem Diplomonadida. É um dos parasitas mais comuns e mais conhecidos dos seres humanos e animais domésticos.⁶⁻⁸ Este organismo eucariota unicelular sofreu uma evolução reductiva que resultou na redução ou até mesmo perda da maioria dos sistemas celulares, como a mitocôndria, peroxissomas, aparelho de Golgi e o sistema lisossomal. Contudo, em *Giardia*, são distinguíveis o retículo endoplasmático (ER, do inglês Endoplasmatic Reticulum) que se estende bilateralmente através do corpo celular, vesículas periféricas (PVs, do inglês *Peripheral Vesicles*) e uma mitocôndria vestigial (mitosoma), localizada no centro da célula e também dispersa no citoplasma.⁹

Giardia tem um ciclo de vida simples, variando entre duas formas distintas: o trofozoíto e o quisto (Fig. 1).^{7,9} O trofozoíto (forma vegetativa) multiplica-se por divisão binária e coloniza o intestino delgado do hospedeiro, na fase infecciosa. Apesar de não invadirem a mucosa, os parasitas aderem a esta, mais precisamente ao epitélio intestinal, através do disco ventral, e os flagelos contribuem para o posicionamento correto, durante o processo de adesão.^{7,9-11} A formação do quisto, forma infetante libertada nas fezes, ocorre quando existem mudanças ambientais, como a alteração da concentração de bÍlis, pH ou a biodisponibilidade de lípidos.⁹ Os trofozoítos sofrem o processo de enquistamento e transformam-se em quistos resistentes às condições ambientais externas, uma etapa essencial no ciclo de vida do parasita.¹² Os quistos são ingeridos por via oral e os sintomas surgem após um período de incubação de uma a duas semanas, contudo, a maioria das infecções por este parasita são assintomáticas.^{7,9,11,13}

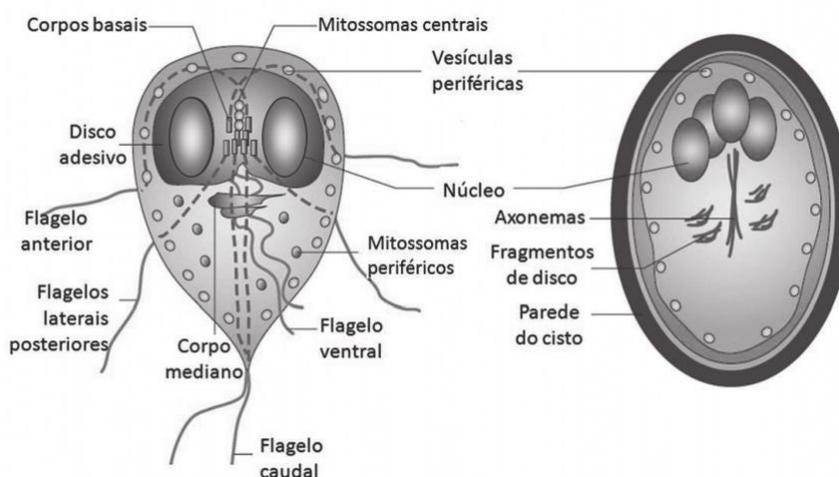


Figura 1- Esquema do trofozoíto (esquerda) e quisto (direita) de *G. lamblia*. O trofozoíto possui dois núcleos, um disco ventral, oito corpos basais e os seus flagelos correspondentes e as vesículas periféricas (PVs), corpo mediano e mitossomas. O quisto contém quatro núcleos, a parede, axonemas e os corpos basais. (Adaptado de Zamponi, 2017)³.

Os fatores de risco associados à infecção são sobretudo más condições de higiene, viagens a zonas endémicas ou consumo de água não tratada.⁸

Apesar da infecção ocorrer com pouca ou nenhuma inflamação⁷, alguns indivíduos desenvolvem sintomas, como cólicas e distensão abdominal, diarreia (esteatorreia) e perda de peso.^{5,11} Posteriormente, e por razões desconhecidas, a infecção pode evoluir para formas crónicas que podem manifestar-se de várias formas, incluindo Síndrome do Cólon Irritável pós-infecção, fadiga crónica, má absorção, comprometimento cognitivo e, ainda, manifestações extraintestinais como alergia, urticária, artrite reativa e manifestações oculares inflamatórias.^{5,11}

Observações experimentais e clínicas demonstraram que a diarreia e a má absorção resultam de mecanismos diretos e indiretos, como a competição no lúmen por nutrientes, indução da apoptose celular por *Giardia*, impedimento da proliferação celular e alterações nas *tight-junctions*, danos celulares causados pela resposta celular mediada pelas células T, perda de microvilosidades, deficiência em dissacaridasas e translocação do microbiota através da mucosa.⁵ Aparentemente determinadas infecções por *Giardia* são capazes de modular a resposta imune do hospedeiro.¹³

Existe um aumento na produção de EVs pela *Giardia* quando exposta a diferentes condições ambientais, sugerindo que estas vesículas poderão representar um mecanismo de adaptação às mudanças ambientais no hospedeiro no curso da infecção.^{2,5,8,10,14} Foi, também, demonstrado um processo seletivo de transporte proteico da membrana plasmática para as PVs, bem como a sua ligação seletiva ao ER e a sua função no *uptake* de nutrientes para o parasita, contudo a sua morfogénese ainda é desconhecida.^{3,9,10,15}

É possível que as EVs desempenhem um papel importante na giardíase, daí que o seu estudo possa abrir novos caminhos no conhecimento dos mecanismos da doença.¹⁴

O que são vesículas extracelulares?

O prémio Nobel de Medicina reconheceu, em 2013, o projeto pioneiro sobre a pesquisa de proteínas secretadas e o seu transporte em vesículas específicas para compartimentos celulares. Estudos mais recentes revelaram o papel crucial destas na comunicação intercelular.¹⁶

As EVs são definidas, de um modo simplificado, como vesículas derivadas da membrana com capacidade de se ligar a outras células. Apesar de poderem ter várias

origens, transportam no seu interior uma variedade de moléculas bioativas como proteínas, lípidos, DNA, RNA mensageiro (mRNA) e micro RNAs (miRNA), que conseguem regular a célula-alvo.^{4,14,16}

São divididas em três categorias principais: exossomas, corpos apoptóticos e microvesículas (MVs), consoante a sua biogênese, composição e tamanho. Todas estas são derivadas de células e são formados por uma bicamada lipídica, mas variam em tamanho e composição (Fig. 2).^{1,2,12,14,16}

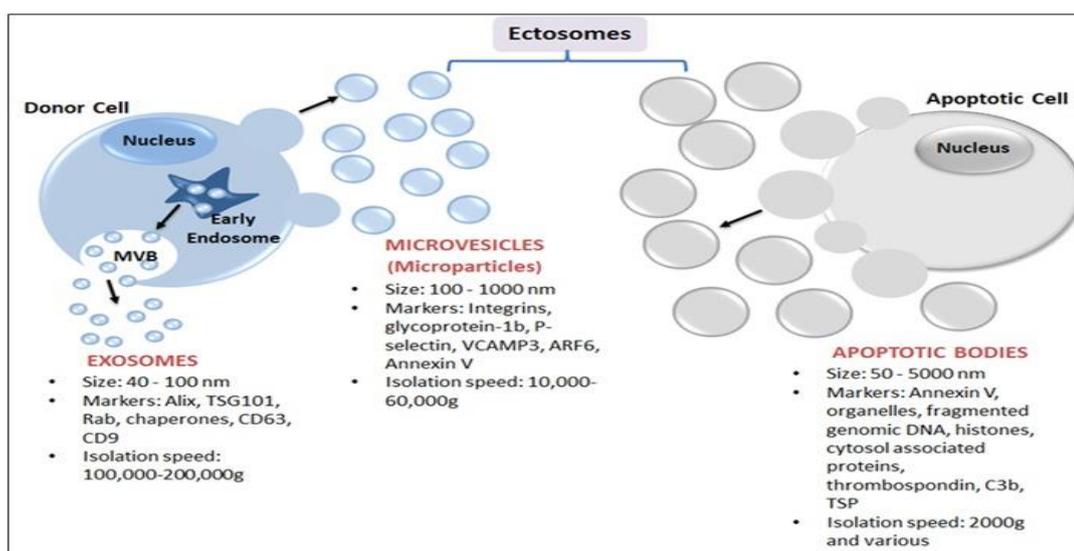


Figura 2- Representação esquemática das categorias principais de vesículas extracelulares (EVs). Os exossomas são as EVs de menor tamanho, e formam-se após a fusão de MVBs e a sua exocitose. As microvesículas são libertadas de células ativas, enquanto que os corpos apoptóticos são libertados de células em processo de apoptose. (Adaptado de Jaiswal, 2019)¹⁷

As MVs tiveram vários nomes na literatura, como ectomas, vesículas derivadas da membrana plasmática e micropartículas (MPs). As MVs podem ser difíceis de distinguir dos exossomas, contudo o tamanho varia entre 100 nm-1000nm e apresentam formas mais heterogêneas.¹⁷ Provenientes da membrana plasmática, num processo dependente da concentração de cálcio, incorporam determinados lípidos e proteínas da superfície, bem como outras moléculas antes da sua fissão da célula-mãe. A formação de MVs é um processo inato à maioria das células.⁴ Um estímulo ou algum tipo de dano celular aumenta a concentração intracelular de cálcio no citoplasma, que é seguido de uma clivagem da actina do citoesqueleto dependente de calpaína.⁴ Dá-se, então, um transporte de fosfolípidos da membrana plasmática, que resulta na formação de uma vesícula (MV) com a exposição de fosfatidilserina.^{2,14,16}

Os exossomas são partículas da via endocítica com aproximadamente 30-100 nm de tamanho e são libertados após a fusão de corpos multivesiculares (MVBs, do inglês

Multivesicular Bodies) com a membrana celular e consequente libertação de vesículas intraluminais (ILVs, do inglês *Intraluminal Vesicles*) como exossomas (Fig. 3).¹ Foram pela primeira identificados numa cultura de reticulócitos e, durante as duas últimas décadas, o seu estudo foi alargado para os vários tipos de células e para os vários tipos de organismos, incluindo eucariotas unicelulares, sugerindo que este possa ser um mecanismo de comunicação celular que foi conservado com a evolução.^{2,4,16}

Os exossomas são libertados da maioria das células e estão envoltos por uma camada lipídica sendo, biologicamente e fisicamente equivalentes ao citoplasma rodeado pela membrana plasmática com os domínios externos das proteínas transmembranares, expostas ao ambiente extracelular.¹ Expressam marcadores das células que lhe dão origem, mas são ricos em moléculas específicas associadas com a sua biogénese ou que são seletivamente transportadas neles.^{1,2,14} A sua composição complexa é uma vantagem na comunicação célula-a-célula pois permite um maior controlo em todo o processo. A presença de lípidos sinalizadores, proteínas, hidratos de carbono e várias espécies de RNA numa única estrutura origina mudanças rápidas e radicais na célula-alvo.^{2,4,14} Podem ser induzidas por condições fisiológicas ou patológicas e podem atuar localmente ou circular através dos vários fluidos corporais, incluindo o sangue e a linfa, dando origem a uma resposta sistemática.²

Apesar da complexidade dos exossomas ter benefícios claros para o organismo que os produz, torna o seu estudo mais difícil pois o efeito de um exossoma ou de um *pool* de exossomas é o resultado de todos os componentes que dele fazem parte.^{1,12}

Normalmente os exossomas são ricos em proteínas da via endossomal e proteínas envolvidas na formação de vesículas. As proteínas oriundas do núcleo ou do ER não são, normalmente encontradas no conteúdo dos exossomas.^{2,14} A composição dos exossomas varia de acordo com o tipo de células que lhes dá origem e pode, até, dar informação sobre a existência de patologias.¹ Os exossomas contêm proteínas comuns como a Tsg101, Hsc70, várias tetrapaninas e proteínas que participam na formação e tráfego de vesículas, como a proteína ligadora do ácido lisobifosfatídico (LBPA, do inglês *Lysobisphosphatidic Acid*).¹ Quanto ao perfil lipídico pode variar consoante a célula que lhe deu origem, contudo, geralmente estes são mais ricos em esfingomiéline, fosfatidilserina, gangliosídeos, colesterol e ceramidas quando comparados com a membrana plasmática e outras membranas intracelulares.¹

Os estudos mais recentes focam-se na caracterização da sequência de RNA presente nos exossomas. Um estudo pioneiro revelou que os exossomas são ricos em miRNA e mRNA e quantidades limitadas de DNA e RNA ribossomal.²

Apesar da clara distinção entre exossomas e MVs em termos de composição, ainda é difícil diferenciá-los porque existe uma semelhança de componentes e de funções fisiológicas. Além disso, a confusão na literatura em termos de nomenclatura e de origem das EVs, bem como as diferenças nos métodos de isolamento e caracterização torna ainda mais complicado a distinção total dos vários tipos de EVs.¹⁴

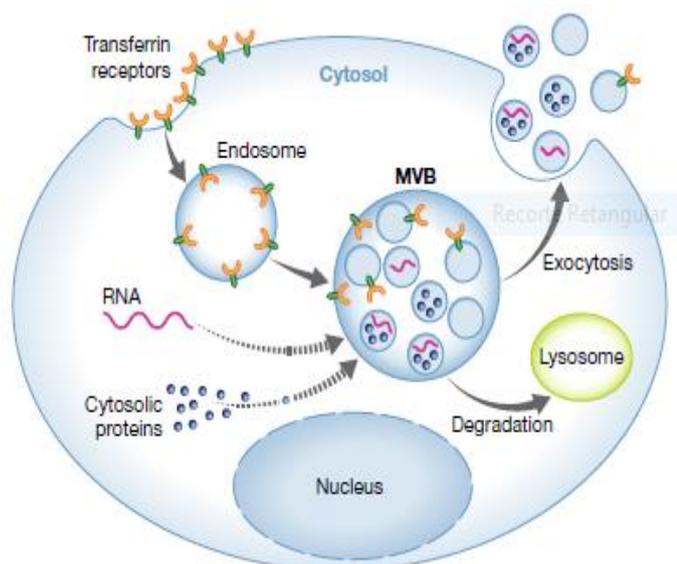


Figura 3- Biogênese de exossomas. Os lipídios, proteínas e ácidos nucleicos são transportados para as MVBs ou para as vesículas intraluminais. As MVBs fundem-se com a membrana plasmática e são libertadas como exossomas. Originalmente foram identificadas como recetores para a libertação de transferrina de reticulócitos. RNA e proteínas citoplasmáticas também são transportadas em MVBs, embora este transporte seja menos conhecido. (Adaptado de Schorey, 2015)¹

As EVs são componentes chave na comunicação intercelular, sem ocorrer o contacto entre células. O seu papel como mediadores na transmissão de sinais biológicos e respostas imunológicas veio alterar a perceção que existia relativamente às EVs.^{4,14,16}

Os exossomas bem como outras EVs têm sido isoladas e caracterizadas em todos os grupos de patógenos como vírus, bactérias, fungos e parasitas.¹ Podem ter origem no hospedeiro ou no patógeno e atuam como transportadores de moléculas entre as células do parasita e do hospedeiro, de uma forma semelhante aos sistemas secretórios das bactérias, podendo ser candidatos atrativos para a transferência de genes.¹⁶ Quando a célula-alvo entra em contacto com a EV esta pode ficar associada à membrana plasmática, dissociar-se, fundir-se com a célula ou ser internalizada.¹⁶ Como seria expectável, a atividade e composição das EVs varia significativamente entre os diferentes taxos e entres patógenos do mesmo género.¹

A infecção parasitária nos seres humanos tem evidências históricas. De facto, pensa-se que cerca de 400 espécies podem afetar os seres humanos e que cerca de 90 espécies são responsáveis por elevadas taxas de morbidade e mortalidade.¹² As infeções parasitárias são muitas vezes crónicas, ocorrendo uma modulação significativa da resposta imune do hospedeiro pelo parasita, o que pode ou não beneficiar tanto o parasita como o hospedeiro. A modulação da resposta imune é uma adaptação que resulta de milhares de anos de co-evolução.¹²

Estudos epidemiológicos realizados em zonas endémicas de algumas doenças imunológicas, por exemplo atopia, sugerem que a presença de uma infecção parasitária pode ter um efeito protetor.¹² Em contraste, nos países desenvolvidos, onde as condições de vida são melhores e a vacinação é uma realidade, a falta de exposição do nosso sistema imunitário a determinadas infeções poderá levar a um aumento da hipersensibilidade e de doenças autoimunes.¹²

Muitas das proteínas imunomoduladoras não apresentam os peptídeos típicos de sinalização do ambiente extracelular, o que sugere que novas vias secretórias devem ser ativadas, durante a interação parasita-hospedeiro, que poderão estar relacionadas com a modulação da resposta imune. O papel imunomodulador dos exossomas foi primeiramente descrito em *Leishmania spp.* em 2010.^{12,16} Nestes estudos também se demonstrou que determinados fatores associados com a infecção eram capazes de regular positivamente a libertação de exossomas, bem como a sua composição.^{12,16}

Os helmintas são um bom exemplo no estudo da modulação da resposta imune, uma vez que a resposta imune do hospedeiro também se desenvolveu no sentido de limitar a patologia e minimizar os sintomas.¹² A resposta imune aos helmintas combina a resposta imune inata e a resposta Th2, que debilita e expulsa estes parasitas. As características da infecção por helmintas são uma resposta Th2 que domina a resposta imunitária e um bloqueio Th1/Th17 que permite a sobrevivência do parasita neste ambiente.¹²

A regulação da resposta imune gerada pelos helmintas pode oferecer novas formas para o tratamento de disfunções imunitárias, como alergias, autoimunidade e doenças inflamatórias. Neste sentido, vários ensaios clínicos estão em curso.¹² Além disso, foi demonstrada a tolerância à infecção por helmintas em várias espécies animais, sugerindo que a infecção em si ou os produtos resultantes desta podem ser usados em protocolos de transplante. Por essa razão, muitos estudos focam-se nos produtos secretados e excretados por helmintas e como estes podem interferir na imunidade do hospedeiro.¹²

O número de publicações que relatam que as EVs dos protozoários e, mais recentemente, dos helmintas, transportam fatores de virulência, moléculas imunomoduladoras e ácidos nucleicos têm vindo a aumentar. As EVs fornecem uma proteção de longa duração, através da modulação do sistema imunitário e, por isso, levantam a interessante possibilidade de existir uma aplicação terapêutica para estas vesículas de origem parasitária.¹²

Um exemplo, na infeção por *Toxoplasma gondii*, a primeira a ser estudada no contexto dos exossomas, as células dendríticas (DCs, do inglês Dendritic Cells) quando contactavam com as proteínas do parasita e os exossomas, estimulavam a resposta imune no sentido de proteger o hospedeiro contra a infeção aguda e crónica.^{1,12} Esta resposta foi específica contra o antigénio e envolveu a imunidade celular e humoral. Quando os exossomas foram usados como vacinas, observou-se um menor desenvolvimento de quistos cerebrais em ratos infetados com *T. gondii* e, ainda, preveniram a toxoplasmose congénita, quando administrados antes da gravidez. Foram, também, detetados exossomas libertados de linhas celulares de monócitos THP-1 humanos não infetados, que, após infeção por *T. gondii*, eram estimulados a produzir TNF- α e outros mediadores pro-inflamatórios.^{1,12}

O protozoário *Leishmania* spp também foi estudado quanto à produção de exossomas, verificando-se que serviam de veículo no transporte de proteínas para macrófagos. Verificou-se, também, que os exossomas inibiam a resposta imune. A proteína HSP100, responsável pelo empacotamento das proteínas em exossomas, também foi estudada, verificando-se que a sua ausência originava exossomas com cargas diferentes e efeitos pró-inflamatórios diferentes em células imunes.^{1,12}

O estudo de infeções por *Plasmodium* focou-se nas vesículas derivadas do patógeno versus as vesículas libertadas pelas células do hospedeiro e sugeriu que os exossomas libertados pelo hospedeiro podem modular a resposta imune e a sobrevivência do parasita.¹ O trabalho de Martin-Jaular e colegas (2011) verificou que os exossomas isolados do sangue de ratos infetados com *P. yoelli* continham proteínas parasitárias que, ao serem usadas em ratos *naïve*, estimulavam a produção de anticorpos imunoglobulina G (IgG) que reconheciam glóbulos vermelhos infetados, diminuía a parasitemia e aumentavam a sobrevivência de animais infetados.^{1,12}

A capacidade do sistema imunológico controlar a infeção depende da sua capacidade de reconhecer e responder aos organismos patogénicos. Neste sentido, a imunidade fornecida através das citocinas bem como de outros mediadores inflamatórios produzidos por células residentes ou infetadas é crucial para o recrutamento de leucócitos e para a

eliminação do invasor. Os produtos provenientes do patógeno são ativadores essenciais quer da resposta imune inata, quer da adquirida.¹ As EVs demonstraram ter um papel ativo na resposta imune, através da sinalização célula- célula. Podem entregar moléculas específicas de RNA através da fusão, o que tem um grande impacto na expressão proteica da célula-alvo. Além do RNA, algumas EVs albergam DNA, proteínas e vírus camuflados ou componentes virais. O seu conteúdo depende, obviamente, da célula que lhe deu origem.^{12,16}

A ativação ou supressão de exossomas depende de vários fatores, inclusivamente da sua origem, isto é, do tipo de célula que os produz e do tipo de fluido corporal do qual são isolados. Por exemplo, os exossomas libertados de células dendríticas demonstraram ser eficazes como vacinas pela estimulação do sistema imunológico.¹ Contrariamente, os exossomas de macrófagos infetados suprimem a resposta imune, promovendo a sobrevivência do parasita. Estas respostas antagónicas resultam das diferentes composições dos exossomas, incluindo a sua carga interna (proteínas e RNA) e dos diferentes marcadores de superfície. Diferentes conteúdos levam a respostas celulares diferentes. Compreender os benefícios e os prejuízos dos efeitos dos exossomas no contexto de uma infeção *in vivo* é o objetivo maior, mas requer um conhecimento adicional na biogénese dos exossomas.¹

EVs e ESPs em infeção por *Giardia*

A comunicação entre células, através de EVs, ocorre através de biomoléculas que incluem péptidos, proteínas, lípidos e ácidos nucleicos. As EVs são capazes de se ligar a recetores de células diferentes das células de origem, desencadeando mecanismos de sinalização intracelulares que modificam o estado fisiológico da célula-alvo. Na interação parasita-hospedeiro foram descritas EVs de diferentes tamanhos contendo microRNAs, proteínas e citocinas pró-inflamatórias que atuam nas células do hospedeiro.⁷

O contacto de *Giardia* com as células epiteliais causa danos celulares na superfície apical destas, compromete a função das enzimas e afeta a permeabilidade da barreira intestinal. Vários produtos secretados e excretados (ESPs, do inglês *Excretory- Secretory Products*) pelo parasita demonstraram capacidade de exercer estes efeitos, como as enzimas que metabolizam a arginina (AMEs, do inglês *Arginine Metabolic Enzymes*): deiminase de arginina (ADI, do inglês *Arginine Deiminase*) ou a ornitina (OTC, do inglês *Ornitina Transcarbamilase*).¹⁸ Estas enzimas são consideradas fatores de virulência do parasita, pois competem com as células hospedeiras pelo *uptake* de arginina, inibem a proliferação celular,

diminuem a produção de óxido nítrico, um composto tóxico para o parasita, e inibem a produção de citocinas pelas células dendríticas.¹⁸ O fator de alongação I-alpha (EF-I α , do inglês *Elongation Factor I α*) e a enzima glicolítica enolase também foram encontrados no meio de crescimento do parasita, embora a sua função na virulência do parasita seja ainda desconhecida.¹⁸ Sabe-se que EF-I α é uma enzima chave no processo de síntese proteica em células eucariotas. O EF-I α de *Giardia*, mostrou ser uma proteína imunorreativa, sendo reconhecida por anticorpos de pacientes infetados previamente.^{10,19,20}

Estes fatores fazem, assim, parte do proteossoma do parasita e podem alterar a expressão genética nas células epiteliais intestinais, a sinalização celular e a produção de citocinas pró-inflamatórias.¹⁰

Os ESPs de *Giardia* induzem a transcrição dos genes de citocinas, após a adesão do parasita.¹⁸ Quando produzidas, as citocinas recrutam células imunitárias (células B e T, células dendríticas e macrófagos) que se dirigem para o local de infecção. As ESPs induzem a transcrição de interleucina 8 (IL-8), importante para o recrutamento de neutrófilos, produzida numa fase inicial da infecção.¹⁸ Por outro lado, a proteína tristetrapolina (TTP), cujo gene está entre os genes diferencialmente expressos (DEGs), é capaz de se ligar à porção 3'UTR dos genes transcritos das citocinas, induzindo a sua destruição.¹⁸ Mais ainda, o parasita produz proteases de cisteína (CPs, do inglês *Cysteine Proteases*) que conseguem degradar o IL-8 e as citocinas CXCL1, CXCL2, CXCL3, CCL1 e CCL20, provocar a rutura da barreira epitelial e a modulação da resposta imune.¹⁸ Os estudos sugerem que a libertação ESPs ocorre quando o parasita recebe um estímulo inflamatório. As ESPs vão atenuar as vias de sinalização inflamatórias, promovendo um diminuição dos fatores de transcrição de citocinas e/ou a degradação de citocinas.¹⁰ Outro fator libertado pelo parasita que danifica o duodeno é a catepsina B, uma protease, que à semelhança da TTP, degrada a IL-8, reduzindo a inflamação. Além disso, degrada a mucina das células epiteliais, facilitando a adesão do parasita.¹⁹

O processo de transporte das vesículas é ainda pouco conhecido pois o trofozoíto não apresenta muitos organelos com capacidade de síntese, como o complexo de Golgi ou, pelo menos, algum organelo morfológicamente semelhante.⁹ É, contudo, conhecido que existe um processo de síntese constitutivo em *Giardia*, comprovado pela libertação contínua de proteínas variáveis de superfície (VSPs, do inglês *Variant Surface Proteins*)²¹, proteínas que cobrem a membrana do trofozoíto, protegendo-o da ação das proteases e de outras enzimas digestivas, devido à sua composição rica em cisteína²² e, possivelmente, protegendo o parasita de ser reconhecido pelo sistema imunológico do hospedeiro, devido ao constante

switching antigénico.²³ Estas proteínas são exportadas diretamente do ER para os organelos alvo, como a PVs ou para a membrana plasmática, num processo *lysosome-like*.²¹

O parasita produz e liberta ESPs, proteínas de superfície e EVs. Os ESPs afetam a expressão génica, secreção, a adesão do parasita às células epiteliais e a resposta imune. Porém, existe também uma resposta por parte das células parasitadas que requer maior investigação. A compreensão desta interação pode ser a chave para compreender a fisiopatologia da giardíase.¹⁰

EVs no processo de enquistamento

Após a colonização do intestino do hospedeiro, a formação do quisto representa uma fase essencial do ciclo de vida de *Giardia*, assegurando a sobrevivência do parasita no meio ambiental.²⁴ O processo de enquistamento envolve processos celulares e moleculares, que são induzidos pela diminuição de colesterol, e que dão origem a alterações metabólicas e morfológicas (Fig. 4).²⁵ Após a receção do estímulo que desencadeia o processo de enquistamento, inicia-se a síntese de proteínas que vão ser secretadas e concentradas em vesículas para formar a parede do quisto. Estudos recentes caracterizaram o proteoma destas vesículas durante o processo de enquistamento de *G. lamblia*, verificando-se que este processo parece ser mediado por estas vesículas e que resulta na formação de uma matriz extracelular.^{7,18,19,25,26}

A secreção regulada é apenas conhecida no enquistamento, ou seja, com a passagem de trofozoíto a quisto.^{3,26} Análises comparativas de *microarrays* revelaram 18 genes regulados positivamente e 10 genes regulados negativamente durante as primeiras sete horas do processo de enquistamento, sugerindo que este processo ocorre apenas com mudanças no transcriptoma.¹⁹

O quisto não conseguiria sobreviver no ambiente, após excreção pelo hospedeiro, sem uma parede resistente. A parede do quisto de *Giardia* é composta por proteínas e polissacáridos, tornando-o resistente quer à lise hipotónica na água, quer ao ácido gástrico durante o início da infeção no hospedeiro. A ligação entre polissacáridos e proteínas, através da N-acetilgalactosamina (GalNac) forma uma parede quística altamente resistente e insolúvel.^{22,24} A síntese da parede começa quatro a seis horas após a indução do enquistamento e termina com a formação do quisto, após vinte e quatro horas. Durante o processo de enquistamento, o trofozoíto vai sofrendo um arredondamento progressivo, no qual os componentes do citoesqueleto como os flagelos, o disco ventral e os corpos

medianos são desagrupados. Os outros organelos celulares e o ER sofrem uma reorganização profunda.^{7,19}

As proteínas da parede do quisto (CWP, do inglês *Cyst Wall Proteins*) são expressas e concentradas em ESVs num processo regulado, que se inicia no retículo endoplasmático.^{7,19,21,24,26} De facto, toda a informação disponível sobre a expressão génica durante o enquistamento sugere que apenas os genes das CWP são especificamente regulados, isto é, não se encontram ativos no trofozoíto.⁹

As CWPs 1, 2 e 3 são proteínas ácidas de 26, 39 e 27 kDa, respetivamente, que contêm peptídeos de sinalização na região N-terminal, quatro ou cinco repetições de leucina (LRRs, do inglês *Leucine-rich Repeat*) e mais de 14 cisteínas posicionadas numa região conservada, que formam um complexo oligomérico ou heteroligomérico estável devido às ligações disulfeto.^{15,24,26} A proteína CWP2 é distinguida pelos 121 resíduos da região C terminal e está presente nas ESVs, contudo, a proteína em si não se encontra na parede do quisto. A CWP2 funciona como um fator regulador da formação de ESVs, regulando a agregação das CWPI e CWP3, através da sua região mais conservada. A exocitose das ESVs requer uma protease de cisteína para clivar a região C terminal da CWP2.²¹

As ESVs são organelos com propriedades semelhantes ao aparelho de Golgi e são geradas *de novo* especificamente para o transporte regulado do biopolímero da parede quística.^{9,27} A formação das ESVs é induzida pelas CWPs exportadas do ER num processo dependente da *Proteína II de revestimento* (COPII, do inglês *Coat Protein II*).⁹ As ESVs estão intimamente ligadas ao ER, contudo diferenciam-se após a sua neogénese, apesar de existir uma continuidade de membranas entre as duas estruturas.⁹ De facto, a troca das CWPs para as ESVs maduras dá-se através de uma rede tubular de ligações membranosas.⁹ Estudos de microscopia eletrónica e de imunofluorescência demonstraram que existe um recrutamento de ribossomas, não apenas para o ER mas também para as membranas das ESVs durante o processo de diferenciação.⁹

As etapas de enquistamento em *Giardia* revelam que à parte da síntese das CWPs, apenas pequenas alterações na expressão de alguns genes, como por exemplo enzimas de síntese do glicano da parede, são necessários para a produção de ESVs. Deste modo, a morfogénese de ESVs poderá ser devida à acumulação de carga em vez de estar associada a um organelo específico, num processo análogo à formação de grânulos secretórios densos (DCSG, do inglês *Dense Core Secretory Genes*) em células endócrinas ou neuroendócrinas.⁹ Nos estudos de microscopia eletrónica, a formação de ESVs foi descrita como uma acumulação de material eletrodense nos compartimentos do ER, seguida de um aumento de

tamanho pela adição direta de CWP3 sintetizadas recentemente. Contudo, modelos mais recentes sugerem que a formação das ESVs resulta das propriedades auto organizativas da CWP3 que levam à formação de grânulos densos.⁹

A presença de uma via de síntese simples e básica de formação de ESVs é suportada pela observação de que a expressão de CWPI e CWP2 em linhas celulares humanas embrionárias de rim, células não produtoras de grânulos, é suficiente para induzir a secreção de proteínas e a sua aglomeração nos compartimentos membranares, em grânulos que elas próprias geram por acumulação.^{9,15}

Embora a formação de ESVs possa derivar de uma acumulação progressiva de CWPs num mecanismo de “*sorting by retention*”, as proteínas residentes do ER, como a Hsp70/BiP, são removidas por vesículas de baixa densidade ou pela rede tubular entre o ER e as ESVs à medida que os organelos amadurecem. Assim, numa visão global, os estudos do proteoma suportam fortemente que a formação e maturação de ESVs se baseia nas propriedades de *cargo* das proteínas e, provavelmente, em componentes ainda desconhecidos.^{9,15}

Outras proteínas que sofrem alterações durante o processo de enquistamento da *Giardia* são as VSPs. Estas são transportadas da membrana para o plasmanema através do ER. A *High Cysteine Non-variant Cyst protein* (HCNCp) foi identificada como uma VSP de tamanho grande e é uma proteína ácida e sem LRRs, tal como as restantes VSPs. A sua expressão é aumentada durante o enquistamento e está localizada em ESVs nos trofozoítos durante o processo de enquistamento. No quisto foi localizada na parede e no interior da célula, diferindo da localização das CWPs, que estão somente na parede do quisto. Algumas destas proteínas HCNCp foram reconhecidas como *VSP-like*, *EGF-like* e *cinases transmembranares-like*.^{10,20,22}

As proteínas *Epidermal Growth Factor-like Cyst Protein* (EGFCPs) são classificadas como *Epidermal Growth Factor-like-like* (EGF-like). Repetições *EGF-like* estão envolvidas em diferentes funções fisiológicas como remodelação da matriz extracelular, coagulação, fibrinólise, adesão e mobilidade celular, proliferação e diferenciação celular. As EGFCPs no genoma de *G. lamblia* são semelhantes às tenascinas, glicoproteínas da matriz extracelular humana que são expressas em abundância durante o desenvolvimento embrionário da célula e reaparecem aquando dos processos de cicatrização de feridas, reparação de nervos e na génese de tumores. Foi demonstrado que a repetição *EGF-like* na tenascina-C é capaz de modular a adesão celular e atuar como ligando direto do recetor EGF e induzir a mitose celular. O domínio *EGF-like* presente permite um envolvimento na interação proteína-proteína, sinalização celular e adesão. Como as tenascinas têm a capacidade de se ligar à lectina, foi

sugerido que estas podem ter um papel na imunidade inata do hospedeiro, pela sua capacidade de aglutinar hemácias.^{10,19,20,22}

Os níveis de proteicos de EGFCPI, CWPs e HCNCp aumentam durante o enquistamento indicando que aparecem no ciclo de vida do parasita na mesma altura, sugerindo uma relação sinérgica na formação da parede do quisto. De facto, um aumento da expressão de EGFCPI induz a formação do quisto, enquanto que a deleção do peptídeo sinalizador, impede a formação das ESVs e reduz os níveis proteicos e a formação do quisto. A localização semelhante das HCNCps e da EGFCPI nas ESVs, parede do quisto e corpo celular do trofozoíto sugere uma via de sinalização semelhante, uma similaridade de funções durante e após o enquistamento e a indução da transdução de sinais.^{10,19,22}

Uma outra proteína de 54 kDa foi localizada exclusivamente nas ESVs do trofozoíto e não na parede do quisto. A proteína é induzida durante o enquistamento, de forma semelhante às CWPs, é depois processada durante a maturação dos grânulos, sofrendo proteólise e é capaz de se ligar ao cálcio *in vitro*, de forma semelhante às proteínas sequestradoras de cálcio em eucariotas mais complexos. A proteína é codificada pelo gene *gGSP* e não tem homologia com nenhuma outra proteína referida das bases de dados atuais. De facto, a inibição da expressão deste gene impede a formação do quisto, mas não impede a expressão das CWPs, sugerindo que existe uma desgranulação cálcio-dependente das ESVs durante a formação da parede do quisto.²⁶

O conteúdo das EVs pode modificar o fenótipo celular, evitando a resposta imune e produzindo infeção. A identificação de alvos celulares e inibidores das EVs representa uma potencial estratégia de controlar a doença.⁷ O processo de enquistamento e a síntese da parede do quisto revelaram uma complexidade inesperada, oferecendo um modelo de estudo de secreção e acumulação de EVs e uma nova perspetiva de um passo crucial da vida do parasita, o que pode ajudar a esclarecer alguns aspetos desta doença.²²

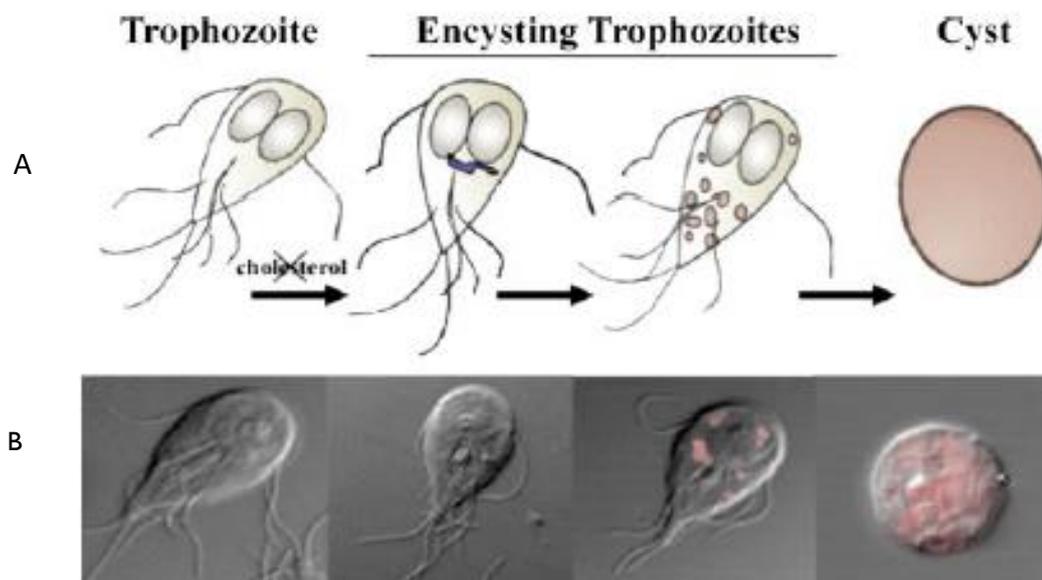


Figura 4- Diferenciação do trofozoite de *Giardia* no quisto. Representação esquemática (A) e imagens microscópicas (B). O processo de diferenciação inicia-se quando as células em cultura estão num ambiente sem a presença de bilis e de colesterol, iniciando a fase de pré-enquistamento. As primeiras alterações morfológicas observadas nos trofozoitos são o aparecimento de grânulos secretórios, ESVs, que transportam o material para a parede do quisto. (Adaptado de Quiroga, 2006)²¹

Tratamento e controlo da giardíase

No que respeita ao tratamento da giardíase, ainda não existe uma vacina humana disponível. Existe uma vacina veterinária, *GiardiaVax*TM e várias vacinas experimentais que se baseiam nas VSPs, mas a elevada variabilidade antigénica e a quantidade de componentes dificulta a sua produção. A IgA consegue ligar-se a estes antígenos, no lúmen do intestino, o que impedirá a adesão do parasita e, neste sentido foram identificados 23 novos antígenos de superfície como possíveis candidatos a vacinas. Entre eles, a *proteína-1 uridina fosforilase-like*, proteína 21.1, α 1-giardia e a α 11-giardina foram produzidas numa forma recombinante e demonstraram ser imunogénicas em ratos e humanos infetados, e ainda proteção, através da imunização intranasal, em modelos de ratos infetados.²⁸⁻³⁰

Um outro estudo no qual o *Streptococcus gordonii* foi manipulado de modo a exprimir a proteína CWP2 e contendo um epíteto da célula B na superfície, foi demonstrada uma redução em 70% do *output* de quistos em ratos imunizados oralmente e um aumento dos níveis de anticorpos.³¹ As informações recolhidas deste e de outros estudos sugerem que o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra a *Giardia* será possível porque é desenvolvida

uma resposta imune forte em ratos que são re-infetados após vacinação. Mostrou-se ainda que uma resposta com anticorpos não é essencial para uma proteção contra este parasita.³²

Outros alvos para o tratamento da giardíase poderão passar pelo bloqueio de proteínas dominantes no proteoma do parasita e que têm funções essenciais no metabolismo, como a OCT ou a ADI, ou bloquear o acesso a moléculas imprescindíveis como a cisteína, as pirimidinas e as purinas. O bloqueio do processo de enquistamento, através de, por exemplo, a inibição das CPs ou da inibição da síntese do GalNac poderá ser um bom método de interrupção do ciclo de vida do parasita.³⁰

Conclusão

Uma óbvia função das EVs em patógenos extracelulares é a sua capacidade de proteger e transportar material até às células do hospedeiro.^{2,16} Contudo, os mecanismos, incluindo se existe especificidade para determinados tipos de células, se a carga parasitária é reconhecida pelo sistema imunitário do hospedeiro e como ocorre a comunicação entre duas espécies filogeneticamente distantes, ainda são pouco conhecidos.^{2,16}

As vesículas podem funcionar transmitindo sinais entre parasitas, do parasita para o hospedeiro ou do hospedeiro para o ambiente, participando na apresentação de antígenos e outros aspetos de defesa do hospedeiro.² Podem até auxiliar os patógenos a garantir um nicho competitivo, funcionando como sinais prévios que modulam a imunidade do hospedeiro ou preparando as células para a receção do parasita, auxiliando na colonização ou na internalização dos parasitas intracelulares.¹⁶ A manipulação imune parece ser uma função predominante dos exossomas derivados dos parasitas, originando numerosas interações célula-a-célula no corpo humano. Contudo, também é expectável que as EVs desempenhem um papel proeminente na comunicação parasita-parasita, o que tem sido menos estudado e requer mais investigação.²

As EVs parecem ter um papel importante na comunicação intercelular, com uma influência direta no ciclo celular do parasita a vários níveis: na adaptação do parasita às mudanças ambientais, quer seja pela pressão exercida pelos fármacos ou pelas mudanças do pH; na imunomodulação, dado que as EVs podem atuar como mensageiros para a invasão parasitária; ou pela regulação direta do transcriptoma do hospedeiro pela internalização das EVs do parasita.¹⁴

Apesar de muito recente, já se demonstrou que estas vesículas podem contribuir para infeções crónicas e para a fisiopatologia da doença.^{14,16}

Compreender os benefícios ou os prejuízos dos efeitos dos exossomas no contexto de uma infeção *in vivo* é o objetivo maior, mas requer um conhecimento adicional da biogénese dos exossomas e novas ferramentas para se poder conhecer quais as células que dão origem a que exossomas.^{1,4}

As EVs fazem agora parte de iniciativas clínicas para testar as suas propriedades como transportadoras de fármacos, o seu uso como biomarcadores de diagnóstico e o seu potencial terapêutico e como vacinas *cell-free*.¹⁴

O conceito do uso de exossomas como vacinas teve origem na área oncológica. As vantagens relacionam-se com a maior estabilidade conformacional das proteínas, aumento da distribuição, devido à facilidade com que os exossomas circulam nos vários fluidos corporais, uma associação mais eficiente das células imunitárias com o antígeno, devido à presença de marcadores celulares específicos para estas células, e ao facto de os exossomas serem um dos métodos naturais do organismo de transporte de proteínas e antígenos. Contudo, há ainda alguns aspetos a ultrapassar, como obter os exossomas com a mistura correta de antígenos que confere proteção, que sejam reprodutíveis e atenuar o risco de introduzir moléculas “non-self” no organismo.^{1,4}

O papel das EVs como moduladores da resposta imunitária foi descrito pela primeira vez num estudo pioneiro que usou exossomas de uma linha de células B. Surpreendentemente, os resultados dos ensaios clínicos com o uso de exossomas como vacinas “cell-free” em doentes com cancro em fase avançada tem revelado resultados muito favoráveis. Apesar de ainda não existirem ensaios clínicos no âmbito das infeções parasitárias, existem um enorme potencial que novas vacinas sejam desenvolvidas para *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major* e *Plasmodium yoelli*, uma vez que exossomas com carga antigénica de DCs ou de outras células infetadas, protegeram modelos animais de infeção.¹⁴

Contudo, uma vacina contra um determinado parasita terá provavelmente origem numa linha celular humana, o que significa que determinadas proteínas e outras moléculas serão provenientes dessas células. O efeito destes antígenos “estranhos” na resposta imune é desconhecido e mais estudos são necessários.^{1,4}

Outra aplicação das EVs, considerando que estas circulam por todos os fluidos biológicos e que a sua composição molecular se altera consoante a sua origem e a patologia em causa, é como biomarcadores de diagnóstico. Foram demonstradas diferenças quantitativas e qualitativas na composição de exossomas entre indivíduos saudáveis e doentes. Estas diferenças combinadas com a facilidade de acesso através dos fluidos corporais, fazem das EVs excelentes candidatos a marcadores de diagnóstico. As maiores dificuldades desta pesquisa são sobretudo com a falta de consenso nos protocolos de isolamento e caracterização das EVs dos diferentes tipos de células e tecidos. Quando ultrapassadas estas dificuldades, novas perspetivas sobre a base molecular da fisiopatologia e o seu uso como ferramentas de diagnóstico, bem como novos alvos terapêuticos contra infeções parasitárias.^{1,4,14,16}

Bibliografia

1. SCHOREY, J. S., CHENG, Y., SINGH, P. P. and SMITH, V. L. Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO Rep.* **16**, (2015) 24–43.
2. COAKLEY, G., MAIZELS, R. M. and BUCK, A. H. Exosomes and Other Extracellular Vesicles: The New Communicators in Parasite Infections. *Trends in Parasitology* **31**, (2015) 477–489.
3. ZAMPONI, N., ZAMPONI, E., MAYOL, G. F., LANFREDI-RANGEL, A., SVÄRD, S. G. and TOUZ, M. C. Endoplasmic reticulum is the sorting core facility in the Golgi-lacking protozoan *Giardia lamblia*. *Traffic* **18**, (2017) 604–621.
4. DEOLINDO, P., EVANS-OSES, I. and RAMIREZ, M. I. Microvesicles and exosomes as vehicles between protozoan and host cell communication. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, (2013) 252–257.
5. BARTELT, L. A. and SARTOR, R. B. Advances in understanding *Giardia* : determinants and mechanisms of chronic sequelae. *F1000Prime Rep.* **7**, (2015).
6. THOMPSON, R. C. A. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int. J. Parasitol.* **30**, (2000) 1259–1267.
7. EVANS-OSES, I., MOJOLI, A., MONGUIÓ-TORTAJADA, M., MARCILLA, A., ARAN, V., AMORIM, M., INAL, J., BORRÀS, F. E. and RAMIREZ, M. I. Microvesicles released from *Giardia intestinalis* disturb host-pathogen response in vitro. *Eur. J. Cell Biol.* **96**, (2017) 131–142.
8. PRUCCA, G., RIVERO, F. D. and LUJ, H. D. Regulation of Antigenic Variation in *Giardia lamblia*. *Annu. rev. microbiol* **65**, (2011) 611–630.
9. WAMPFLER, P. B., TOSEVSKI, V., NANNI, P., SPYCHER, C. and HEHL, A. B. Proteomics of Secretory and Endocytic Organelles in *Giardia lamblia*. *PLoS One* **9**, (2014).
10. MA`AYEH, S., LIU, J. ET AL. Characterization of the *Giardia intestinalis* secretome during interaction with human intestinal epithelial cells : The impact on host cells. *plos negl trop dis* **11**, (2017).
11. HALLIEZ, M., BURET, A. Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World J. Gastroenterol.* **19**, (2013) 8974–8985.
12. MONTANER, S., GALIANO, A., TRELIS, M., MARTIN-JAULAR, L., DEL PORTILLO, H. A., BERNAL, D. and MARCILLA, A. The role of extracellular vesicles in modulating the host

- immune response during parasitic infections. *Front. Immunol.* **5**, (2014) 1–8.
13. COTTON, J. A., AMAT, C. B. and BURET, A. G. Disruptions of Host Immunity and Inflammation by *Giardia Duodenalis*: Potential Consequences for Co-Infections in the Gastro-Intestinal Tract. *Pathogens* **4**, (2015) 764–792.
 14. MARCILLA, A., MARTIN-JAULAR, L., TRELIS, M., DE MENEZES-NETO, A., OSUNA, A., BERNAL, D., FERNANDEZ-BECERRA, C., ALMEIDA, I. C. and DEL PORTILLO, H. A. Extracellular vesicles in parasitic diseases. *J. Extracell. Vesicles* **3**, (2014).
 15. KONRAD, C., SPYCHER, C. and HEHL, A. B. Selective Condensation Drives Partitioning and Sequential Secretion of Cyst Wall Proteins in Differentiating *Giardia lamblia*. *PLoS Pathog.* **6**, (2010).
 16. TWU, O. and JOHNSON, P. J. Parasite Extracellular Vesicles: Mediators of Intercellular Communication. *PLoS Pathog.* **10**, (2014) e1004289.
 17. JAISWAL, R. and SEDGER, L. M. Intercellular Vesicular Transfer by Exosomes , Microparticles and Oncosomes - Implications for Cancer Biology and Treatments. *Front. oncol* **9**, (2019).
 18. LIUA, J., MA'AYEHA, S., PEIRASMAKIA, D., LUNDSTRÖM-STADELMANNB, B., HELLMANA, L. and SVÄRDA, S. G. Secreted giardia intestinalis cysteine proteases disrupt intestinal epithelial cell junctional complexes and degrade chemokines. *Virulence* **9**, (2018) 879–894.
 19. FASO, C., BISCHOF, S. and HEHL, A. B. The proteome landscape of *Giardia lamblia* encystation. *PLoS One* **8**, (2013).
 20. DUBOURG, A., XIA, D., WINPENNY, J. P., AL NAIMI, S., BOUZID, M., SEXTON, D. W., WASTLING, J. M., HUNTER, P. R. and TYLER, K. M. *Giardia* secretome highlights secreted tenascins as a key component of pathogenesis. *Gigascience* **7**, (2018) 1–13.
 21. QUIROGA, R., NORES, J., SOLARI, A. J., TOUZ, C. and LUJA, H. D. Active and Passive Mechanisms Drive Secretory Granule Biogenesis during Differentiation of the Intestinal Parasite *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* **281**, (2006) 18156–18166.
 22. CHIU, P., HUANG, Y., PAN, Y., WANG, C. and SUN, C. A Novel Family of Cyst Proteins with Epidermal Growth Factor Repeats in *Giardia lamblia*. *plos negl trop dis* **4**, (2010).
 23. RIVERO, F. D., SAURA, A., PRUCCA, C. G., CARRANZA, P. G., TORRI, A. and LUJAN, H. D. Disruption of antigenic variation is crucial for effective parasite vaccine. *Nat. Med.* **16**, (2010) 551–557.
 24. REINER, D. S., MCCAFFERY, J. M. and GILLIN, F. D. Reversible interruption of *Giardia lamblia* cyst wall protein transport in a novel regulated secretory pathway. *Cell*.

- Microbiol.* **3**, (2001) 459–472.
25. LUJÁN, H. D., MOWATT, M. R., BYRD, L. G. and NASH, T. E. Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, (1996) 7628–33.
 26. MARIA TOUZ, NATALIA GOTTIG. Identification and Characterization of a Novel Secretory Granule Calcium-binding Protein from the Early Branching Eukaryote. *J. Biol. Chem.* **277**, (2002) 50557–50563.
 27. STEFANIC, S., PALM, D., SVA, S. G. and HEHL, A. B. Organelle Proteomics Reveals Cargo Maturation Mechanisms Associated with Golgi-like Encystation Vesicles in the Early-diverged Protozoan *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* **281**, (2006) 7595–7604.
 28. DAVIDS, B. J., LIU, C. M., HANSON, E. M., LE, C., ANG, J., HANEVIK, K., FISCHER, M., RADUNOVIC, M., LANGELAND, N., FERELLA, M., SVÄRD, S. G., GHASSEMIAN, M., MIYAMOTO, Y. and ECKMANN, L. Identification of conserved candidate vaccine antigens in the surface proteome of *Giardia lamblia*. *Infect. Immun.* (2019) doi:10.1128/iai.00219-19.
 29. JENIKOVA, GABRIELA; HRUZ, PETR; ANDERSSON, K. α I-giardin based live heterologous vaccine protects against *Giardia lamblia* infection in a murine model Gabriela. *Vaccine* **29**, (2011) 9529–9537.
 30. TIAN, H., CHEN, B. and WEN, J. Giardiasis , Drug Resistance , and New Target Discovery. *Infect. Disord.* **10**, (2010) 295–302.
 31. LEE, P. and FAUBERT, M. Oral immunization of BALB / c mice by intragastric delivery of *Streptococcus gordonii* -expressing *Giardia* cyst wall protein 2 decreases cyst shedding in challenged mice. *FEMS Microbiol. Lett.* **265**, (2006) 225–236.
 32. LI, E., LIU, M. and SINGER, S. M. Resistance to reinfection in mice as a vaccine model for giardiasis. *Hum. Vaccin. Immunother.* **10**, (2014) 1536–1543.