



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Paulo Miguel Rua Rodrigues

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “An Overview of Exosomes in Cancer Therapy: A Small Solution to a Big Problem” referentes à Unidade Curricular “Estágio Curricular”, sob a orientação, da Dra. Florbela Santos, do Dr. Paulo Monteiro e da Professora Doutora Ana Rita Figueiras, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Outubro de 2020



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Paulo Miguel Rua Rodrigues

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “An Overview of Exosomes in Cancer Therapy: A Small Solution to a Big Problem” referentes à Unidade Curricular “Estágio Curricular”, sob a orientação, da Dra. Florbela Santos, do Dr. Paulo Monteiro e da Professora Doutora Ana Rita Figueiras, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

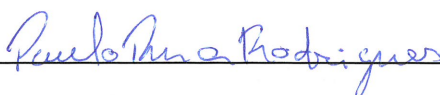
Outubro de 2020

Declaração de autoria:

Eu, Paulo Miguel Rua Rodrigues, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2015247265, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “An Overview of Exosomes in Cancer Therapy: A Small Solution to a Big Problem” 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, 14 de outubro de 2020.

A handwritten signature in blue ink, reading "Paulo Miguel Rua Rodrigues", is written over a horizontal line.

(Paulo Miguel Rua Rodrigues)

Agradecimentos

À Dra. Florbela Santos e a toda a equipa do Departamento de Quality Assurance da Bluepharma, Indústria Farmacêutica, S.A., pela simpatia e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Dr. Paulo Monteiro, por todo o profissionalismo demonstrado e pela dedicação exemplar, e a toda a equipa da Farmácia São José, por toda a aprendizagem e todos os momentos passados.

À Professora Doutora Ana Rita Figueiras, pela sua colaboração na orientação da minha monografia, pela sua disponibilidade e por todo o seu trabalho.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, por todos os conhecimentos transmitidos ao longo deste percurso.

À Phartuna – Tuna de Farmácia de Coimbra, pelas memórias, pelas experiências e por toda a diversão.

Aos meus amigos de Chaves, um enorme obrigado, porque apesar da distância, estiveram sempre presentes.

Aos meus amigos de Coimbra, por todos os momentos que tivemos, e por todos os momentos que ainda vamos ter.

À minha prima Inês, por toda a amizade e por me ter acompanhado desde o início.

Aos meus pais e ao meu irmão, por todo o apoio e por todas as oportunidades que me proporcionaram.

A todos vós, muito obrigado por tudo!

ÍNDICE

Capítulo I – Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Abreviaturas

1. Introdução.....	8
2. Análise SWOT	9
2.1. Pontos Fortes	9
2.1.1. Integração dos novos colaboradores.....	9
2.1.2. Plano de Formação Contínua	9
2.1.3. Trabalho Documental.....	10
2.2. Pontos Fracos	11
2.2.1. Restruturação Departamental.....	11
2.2.2. Acompanhamento de Processos.....	12
2.3. Oportunidades.....	12
2.3.1. Visita ao Controlo de Qualidade.....	12
2.3.2. Relevância no Setor Farmacêutico	13
2.4. Ameaças	13
2.4.1. Plano Curricular do MICE	13
2.4.2. Reconhecimento para obtenção do título de Farmacêutico	14
3. Conclusão	15
4. Referências Bibliográficas.....	16

Capítulo II – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Abreviaturas

1. Introdução.....	19
2. Análise SWOT	20
2.1. Pontos Fortes	20
2.1.1. Horário e Localização	20
2.1.2. Inventário da Farmácia	20
2.1.3. Equipamentos Tecnológicos.....	21
2.1.4. Tarefas de Gestão Farmacêutica.....	22
2.2. Pontos Fracos	22
2.2.1. Número de Estagiários.....	22
2.2.2. Obras na Sala de Atendimento	23
2.3. Oportunidades.....	23
2.3.1. Formações e Reuniões com Delegados de Informação Médica	23
2.3.2. Filosofia <i>Kaizen</i>	24
2.4. Ameaças	24
2.4.1. Pandemia de COVID-19	24
2.4.2. Parafarmácias e competitividade de preços.....	26
3. Conclusão	26
4. Referências Bibliográficas.....	28

Capítulo III – Monografía

Abbreviations

1. Introduction.....	34
2. Exosomes.....	35
2.1. Structure and Functions.....	35
2.2. Biogenesis.....	38
2.3. Exosome-like endogenous nanosystems.....	43
2.4. Immunotherapeutic Potential of Exosomes.....	45
3. Isolation Techniques.....	46
3.1. Traditional Methods.....	46
3.1.1. Differential Centrifugation/Ultracentrifugation.....	46
3.1.2. Density Gradient Centrifugation.....	47
3.1.3. Immunoaffinity isolation techniques.....	47
3.1.4. Size Exclusion Chromatography (SEC).....	48
3.1.5. Hydrophilic Polymer Precipitation.....	48
3.2. Novel Methods.....	49
3.2.1. Stirred Ultrafiltration.....	49
3.2.2. Nanoplasmon-Enhanced Scattering (nPES).....	49
4. Exosome Loading Strategies.....	50
4.1. Pre-Loading Methods.....	50
4.1.1. Incubation with Donor Cells.....	50
4.2. Post-Loading Methods.....	50
4.2.1. Incubation with Exosomes.....	50
4.2.2. Electroporation.....	51
4.2.3. Sonication.....	51
4.2.4. Freeze/Thaw Cycles.....	52
4.2.5. Saponin Assisted Incubation.....	52
5. Exosomes as Nanosystems of Nucleic Acids and Drugs.....	52
5.1. Paclitaxel.....	52
5.2. siRNA.....	54
5.3. Doxorubicin-loaded Nanoparticles.....	56
6. Conclusions and Future Perspectives.....	58
7. Bibliography.....	60

Capítulo I



Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Bluepharma, Indústria Farmacêutica, S.A.

Abreviaturas

BLPH – Bluepharma, Indústria Farmacêutica, S.A.

BPF – Boas Práticas de Fabrico

CAPA – *Corrective and Preventive Action*

CQ – Controlo de Qualidade

EC – Estágio Curricular

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

IF – Indústria Farmacêutica

IPC – *In-Process Control*

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Oos/OoT – *Out of Specification/Out of Trend*

PON – Procedimento Operacional Normalizado

PQR – *Product Quality Review*

QA – Departamento de *Quality Assurance*

QP&C – Departamento de Qualidade Produto & *Compliance*

RF – Registo de Fabrico

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

I. Introdução

Passados aproximadamente cinco anos de ensino no Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), os alunos deparam-se com a última unidade curricular do seu plano de estudos. O Estágio Curricular (EC) é abrangido pela realização do estágio em si, bem como a elaboração e apresentação de uma monografia e de um relatório de estágio (UC, 2020a).

Devido à abrangência dos conteúdos programáticos, o MICF oferece um vasto leque de saídas profissionais. A Indústria Farmacêutica (IF) engloba várias áreas relacionadas com as unidades curriculares lecionadas, das quais destaco as unidades de Tecnologia Farmacêutica, Assuntos Regulamentares do Medicamento e Gestão e Garantia de Qualidade. Devido a um grande interesse pelos conteúdos abordados nas unidades curriculares referidas, tomei a decisão de realizar um EC na área de IF, mais especificamente, na Bluepharma, Indústria Farmacêutica, S.A. (BLPH).

A BLPH é um grupo farmacêutico sediado em Coimbra, Portugal. Após a aquisição das instalações da indústria alemã Bayer, a BLPH introduziu-se no mundo da IF em fevereiro de 2001 (Bluepharma, 2020). Devido à sua localização e relevância, a sua existência não passa despercebida aos moradores de Coimbra, nomeadamente, aos estudantes da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC). Além do meu interesse pelo sector da IF, o *feedback* positivo de antigos estagiários e a facilidade de acesso às instalações foram fatores preponderantes na minha candidatura de estágio.

Aquando da realização da candidatura, os estagiários tiveram a possibilidade de referir os seus departamentos de interesse, dentro de um conjunto de doze departamentos: i) Investigação e Inovação; ii) Desenvolvimento Analítico e Galénico; iii) Controlo de Qualidade; iv) Planeamento e Gestão da Produção; v) Qualidade do Produto & *Compliance*; vi) Gestão da Qualidade; vii) Assuntos Regulamentares; viii) Desenvolvimento de Negócio; ix) Fabricação; x) Gestão de Projetos; xi) Bluepharma Genéricos e xii) Ensaio Clínicos. Após a realização de entrevista presencial, fui colocado no departamento de Qualidade do Produto & *Compliance* (QP&C), na área da Supervisão de Fabricação, sob o acompanhamento da minha coordenadora de estágio, Dra. Florbela Santos.

O estágio teve a duração aproximada de três meses, tendo decorrido desde o dia 6 de janeiro de 2020 até ao dia 31 de março de 2020. O presente relatório, realizado sob a forma de análise SWOT, servirá então de método de análise dos pontos fortes (S), fracos (W), oportunidades (O) e ameaças (T), relativos ao trabalho desenvolvido e conhecimentos assimilados durante o meu estágio na BLPH.

2. Análise SWOT

2.1. Pontos Fortes

2.1.1. Integração dos novos colaboradores

No início do estágio, eu e os restantes recém-colaboradores (tanto estagiários por parte da FFUC como colaboradores externos em situação de contrato) fomos recebidos por membros dos Recursos Humanos (RH). Foram transmitidas algumas informações gerais sobre o funcionamento das instalações e foi dado um momento para cada um falar acerca de si, do departamento que iria integrar e das suas expectativas quanto ao estágio. Com o acompanhamento dos RH, foi feita uma visita pelos escritórios da BLPH, durante a qual tivemos a oportunidade de nos apresentar individualmente a diferentes colegas, dos vários departamentos e escritórios. Foi um momento que permitiu criar, desde o início, uma certa relação interpessoal com outros colegas com que iríamos contactar nos três meses seguintes, alguns dos quais, por motivos de desenvolvimento de tarefas interdepartamentais.

Após este momento introdutório, cada estagiário ficou com o seu respetivo coordenador. A atribuição do coordenador é feita mediante o departamento em que o estagiário é colocado e consoante as tarefas que irá desempenhar. No meu caso, a Dra. Florbela Santos, responsável pela Supervisão de Fabricação, guiou-me durante o meu estágio e atribuiu-me as mais variadas tarefas, de modo a proporcionar-me uma experiência semelhante à que ela e os restantes colegas do QP&C vivenciam no sector da Fabricação.

2.1.2. Plano de Formação Contínua

Como membro do QP&C, foi-me atribuído um computador de trabalho para desempenhar funções de cariz documental e aceder à plataforma interna. Cada colaborador tem um plano de Formação Contínua, onde constam alguns documentos de leitura obrigatória inicial. Primeiramente, tive de me contextualizar com as Boas Práticas de Fabrico (BPF), mais especificamente com o Capítulo 4 do Volume 4 do EudraLex, referente a Documentação (Comissão Europeia, 2020). Tive também de interpretar Procedimentos Operacionais Normalizados (PONs), relativos a alguns conceitos com que iria lidar diariamente durante o meu estágio, como Desvios, Reclamações, *Out of Specification/Out of Trend* (OoS/OoT) e *Corrective and Preventive Action* (CAPA), os quais irei abordar em detalhe nos tópicos seguintes.

Durante o estágio, e à medida que ia desempenhando novas funções, recorria à leitura de novos PONs, os quais acrescentava ao meu plano de Formação Contínua. Uma das principais tarefas da Supervisão de Fabricação é o acompanhamento de processos de fabrico,

pelo que, era necessário assimilar conhecimentos relativos a Registos de Fabrico (RFs), *In-Process Control* (IPC) e aos equipamentos usados nos processos de fabrico (como granulação, compressão e/ou revestimento).

Além dos conhecimentos específicos inerentes às tarefas individuais, a BLPH desenvolve ações de formação em grupo, com temáticas gerais para todos os colaboradores. Assisti a formações sobre “BPF”, “Higiene, Saúde e Segurança no Trabalho”, “Assuntos Regulamentares”, “Farmacovigilância”, “Controlo de Qualidade (CQ)” e entre outras, sendo algumas sujeitas a questionários para obter a devida aprovação.

O plano de Formação Contínua foi um ponto forte no sentido em que me permitiu fazer uma melhor gestão dos conceitos que devia assimilar, bem como registar as tarefas que estava a desenvolver. As formações gerais também constavam no meu plano, tornando-se uma boa ferramenta de avaliação de desempenho e de evolução pessoal.

2.1.3. Trabalho Documental

No QP&C há uma enorme distribuição de tarefas, cada uma acompanhada com o seu tipo de documentação, mas, com o objetivo comum de garantir a qualidade dos produtos desenvolvidos. Uma tarefa atribuída a novos colaboradores e, transversal a membros do QP&C, é o desenvolvimento de *Product Quality Reviews* (PQRs). O PQR é um documento que avalia a qualidade de um produto, resumindo os parâmetros de qualidade de todos os lotes fabricados de um produto, em determinado espaço de tempo (geralmente, um ano). Alguns dos tópicos mencionados num PQR referem-se ao grau de pureza de cada matéria prima, aos resultados de IPC de cada lote, resultados de CQ e rendimentos de processos, sendo cada um acompanhado com uma análise gráfica e interpretação de resultados.

Como estagiário na Supervisão de Fabricação, efetuava regularmente revisão de RFs. Os RFs são documentos que detalham, passo a passo, todas as etapas do processo de fabrico de um produto, bem como os resultados de IPC e cálculos de rendimento. A maioria das etapas estão acompanhadas por um intervalo de referência, ao qual os valores declarados devem pertencer. Compete aos operadores e supervisores de fabricação efetuar o correto preenchimento do RF. O membro do QP&C responsável pela revisão do RF deve, então, verificar e analisar os dados reportados e, quando necessário, proceder à sua correção de modo a possibilitar a aprovação do RF. Qualquer informação registada discordante pode levar à abertura de um desvio. A abertura de um desvio implica uma investigação no processo de fabrico, para tentar perceber a causa do desvio e se terá implicações na qualidade do produto final.

Por parte da minha orientadora, foi-me pedido para realizar uma Análise Cruzada referente ao segundo semestre de 2019. Neste documento, realiza-se uma listagem de todos os produtos fabricados, com uma contagem dos respetivos desvios (já mencionados), reclamações, OoS/OoT e CAPAs. A nível de reclamações, deve constar qualquer tipo de reclamação recebida para determinado produto, infundada ou não. A reclamação pode ser gerada por um cliente direto (a empresa que contrata a BLPH para produção do medicamento), ou por um cliente indireto (como o caso de um utente que efetua uma reclamação, após aquisição do medicamento numa farmácia). Os Oos/OoT dizem respeito às análises efetuadas pelo CQ, ocorrem quando um resultado se encontra fora do intervalo de aceitação estabelecido (OoS) ou no caso de um resultado dependente do tempo, em que é expectada uma tendência e o resultado obtido não está de acordo (no caso de testes de estabilidade) (OoT). Os CAPAs, como o nome indica, consistem no conjunto de ações a ser tomadas para corrigir e prevenir o aparecimento de não-conformidades. Fazendo a listagem destes parâmetros e, através de um sistema de pontuações, realiza-se uma análise cruzada para determinar os produtos mais associados a problemas de fabrico. Compete à Supervisão de Fabricação do QP&C prestar especial atenção a estes produtos durante o seu fabrico, de modo a reduzir os indicadores mencionados.

Pude então contactar com diversos tipos de documentação, que exigiam a comunicação com colegas de diferentes departamentos. O trabalho desenvolvido, além de exigente, acarretava consigo elevada responsabilidade, que encarei como um desafio para melhorar determinadas qualidades minhas. Além disso, foi bastante frutífero a nível de aptidões, uma vez que pude contactar com vários *softwares* como JMP® (análise estatística), SAP (gestão) e Excel.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Restruturação Departamental

Durante grande parte do meu estágio, a BLPH encontrava-se num processo de reestruturação departamental. Além da promoção de novos Diretores Técnicos/ *Qualified Person* em cada departamento, houve também uma redistribuição de tarefas e funções a desempenhar em cada departamento. O departamento que integrava, QP&C, sofreu uma mudança de designação, passando a chamar-se de *Quality Assurance (QA)*. Colaboradores do departamento de Assuntos Regulamentares, em conjunto com alguns colaboradores do QP&C (agora, QA), passaram a exercer funções num novo departamento de *Compliance*. Houve

também um ajuste físico da localização dos escritórios e departamentos, dentro das próprias instalações.

Apesar destas mudanças visarem a inovação e melhoria da eficácia e qualidade do trabalho exercido na BLPH, em certos momentos, acabaram por se revelar um constrangimento ao meu estágio. Estando a exercer o estágio apenas há cerca de um mês e meio, ter de me readaptar a certas situações (como por exemplo, alteração de contactos e redistribuição de tarefas para novos colaboradores) levou a um atraso no desenvolvimento de algumas tarefas.

2.2.2. Acompanhamento de Processos

Uma das principais funções dos membros do QA responsáveis pela Supervisão de Fabricação é o acompanhamento dos processos no terreno. Quando integrei na equipa, apenas duas pessoas eram responsáveis pela tarefa, a Dra. Florbela Santos e a Dra. Mariana Nascimento. No início do estágio, pude acompanhá-las para receber um *briefing* sobre os processos desenvolvidos e a localização dos equipamentos na área de produção. Infelizmente, no decorrer do estágio, o acompanhamento de processos não pôde ser efetuado com a frequência planeada.

Sendo um cargo exigente, o trabalho documental acabava por causar alguma sobrecarga e passava a ser prioridade. Tendo isto em conta, o plano principal do meu estágio sofreu uma certa alteração. Com as idas ao terreno menos frequentes, o meu estágio incidiu maioritariamente em auxiliar no trabalho documental inerente à Supervisão de Fabricação, nomeadamente, revisão de RFs.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Visita ao Controlo de Qualidade

Como mencionado anteriormente, a BLPH organiza formações que abrangem todos os colaboradores, independentemente do departamento e das funções em que se enquadram. Uma das formações envolve a visita às instalações, que é realizada em grupo e de uma forma agilizada (cerca de uma hora de duração), para evitar constrangimentos.

Durante a realização de PQRs, tive de contactar com documentação relativa ao CQ, com a qual não estava muito familiarizado. Por esse motivo, surgiu a ideia de realizar uma visita ao CQ, para ficar mais contextualizado com o trabalho que é desenvolvido, tanto a nível laboratorial como documental, e auxiliar na redação de PQRs. A visita teve a duração de um dia. Na parte da manhã pude presenciar procedimentos laboratoriais, dos quais destaco os

testes de dissolução e desagregação, titulação de *Karl Fischer* e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (ou HPLC). Durante a tarde pude contactar com diferentes membros do CQ, responsáveis pela parte documental, onde clarificaram algumas questões e descreveram o procedimento de análises do medicamento, desde matéria prima até produto acabado, inclusive, com uma demonstração das câmaras climáticas para estudos de estabilidade.

Embora algumas técnicas laboratoriais fossem já do meu conhecimento, devido à sua abordagem no decorrer do MICF (unidades curriculares de Métodos Instrumentais de Análise e Tecnologia Farmacêutica), considero uma mais-valia o testemunho da sua aplicação, num contexto prático da IF. Não fazendo parte do meu plano de estágio, considero esta situação como uma oportunidade no meu EC, que se demonstrou útil para o desempenho das minhas funções, mas também a nível extracurricular, para conhecimento próprio.

2.3.2. Relevância no Setor Farmacêutico

O grupo BLPH inaugurou, em fevereiro de 2002, a Bluepharma Genéricos, S.A. Entre Medicamentos Sujeitos a Receita Médica e Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica, a BLPH conta, desde então, com mais de uma centena de produtos vendidos em farmácias nacionais, bem como em Angola e Moçambique (Bluepharma Genéricos, 2020). Além da forte aposta em território nacional, o grupo BLPH, especializado no fabrico de formas farmacêuticas sólidas, expandiu-se extraordinariamente a nível internacional, exportando cerca de 90% dos produtos fabricados para diversos países, por todo o mundo.

De forma a facultar um vasto leque de opções de estágio aos seus estudantes, permitindo assim a obtenção de um ensino dinâmico e enriquecedor, a FFUC estabelece contacto com as mais diversas entidades do setor farmacêutico. Tive a oportunidade de ingressar numa empresa relevante a nível nacional, mas também de presença notória no mercado farmacêutico internacional. Devido à diversidade de clientes, foi possível observar as diferenças globais a nível documental e procedimental, relativamente à garantia de qualidade de um medicamento.

2.4. Ameaças

2.4.1. Plano Curricular do MICF

O programa curricular do MICF apresenta diversas unidades curriculares que abrangem várias áreas diferentes. O plano de estudos relativo a IF é fundamental para fornecer uma boa base de conhecimentos a qualquer estudante que queira ingressar nesta área. Atento que os conteúdos programáticos de Tecnologia Farmacêutica I se relacionam bastante com os

processos de fabrico que observei durante o meu estágio, uma vez que remetem ao fabrico de formas farmacêuticas sólidas. Apesar de realizar um estágio na Supervisão de Fabricação, continuava pertencente ao QA. Nesse sentido, notei que no meu ensino havia uma falta de interligação de conceitos lecionados entre Tecnologia Farmacêutica e Gestão e Garantia de Qualidade.

Estando num departamento responsável pela qualidade do produto, uma das maiores ameaças que senti relaciona-se com os conteúdos lecionados na unidade curricular de Gestão e Garantia de Qualidade. A nível teórico, o conteúdo programático da disciplina aborda de uma maneira geral as BPF, Boas Práticas Farmacêuticas e Boas Práticas de Distribuição de Medicamentos, bem como algumas Normas ISO (9001, 14001 e 19001). O programa teórico-prático envolve a elaboração de um resumo de anexos das BPF e a elaboração de um PON (UC, 2020b).

Quando efetuei a minha candidatura na BLPH, tinha preferência pela área da Produção ou de Assuntos Regulamentares. Inicialmente, a área de Garantia de Qualidade não fazia parte dos meus interesses. Até então, a unidade curricular de Gestão e Garantia de Qualidade era o meu único contacto com este campo, e não pensei que fosse uma área com que me identificasse. Após a realização do meu estágio no QA, um contacto direto com essa área, concluo que os conteúdos programáticos da unidade curricular ficam aquém daquela que é a realidade de um sistema de Gestão e Garantia de Qualidade no setor da Indústria Farmacêutica.

2.4.2. Reconhecimento para obtenção do título de Farmacêutico

De acordo com a alínea 2 do artigo 44º, secção 7, capítulo III da diretiva 2005/36/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, a obtenção do título de farmacêutico requer uma formação de, pelo menos, cinco anos, dos quais, um mínimo de quatro anos de ensino teórico e prático e seis meses de estágio na área de farmácia comunitária ou farmácia hospitalar (Eur-Lex, 2020).

A diretiva pressupõe também conhecimentos na área de tecnologia farmacêutica que, embora sejam adquiridos através do plano de estudos do MICEF, não considero suficientes para a nossa formação. A não-realização de um estágio em IF leva à formação de Farmacêuticos que, efetivamente, não possuem todos os conhecimentos teóricos e práticos em todos os domínios da sua área.

Para colmatar esta situação, e tal como já mencionei, a FFUC possibilita aos seus alunos a realização de um estágio na área da IF. Apesar de ser incluído no plano de EC e de ser alvo

de avaliação, a realização do mesmo é opcional, ficando ao critério dos estudantes se querem ou não adquirir conhecimentos práticos neste campo. Pelos motivos explanados e pela falta de reconhecimento a nível legislativo, considero esta situação como uma ameaça ao meu estágio.

3. Conclusão

Como futuros farmacêuticos, compete-nos elevar o nosso conhecimento e aptidões, com o objetivo de sermos melhores profissionais. Além do plano curricular a que temos acesso na Faculdade, devemos aproveitar as mais variadas oportunidades de formação curriculares que complementem o nosso ensino.

Findado o meu estágio na BLPH, resta-me apenas mostrar a minha satisfação pelo trabalho realizado no QA, que me proporcionou momentos desafiantes e testou as minhas capacidades como futuro profissional. Observei de perto o percurso de fabrico de medicamentos, desde a receção de matérias primas, até ao acondicionamento secundário e exportação.

Os conhecimentos adquiridos durante este estágio e a perceção da responsabilidade exigida nesta área serão, certamente, uma mais-valia a nível curricular e, futuramente, a nível profissional. Foi, de facto, gratificante poder fazer parte desta área do setor farmacêutico que, apesar de não ser obrigatória na nossa formação, não deixa de ser necessária.

Sendo o farmacêutico o profissional de saúde mais qualificado em relação a todo o circuito do medicamento, esse circuito passa, inevitavelmente, pela IF. É uma área profissional cada vez mais exigente, que engloba muita inovação científica na área das ciências farmacêuticas e, não menos importante quando comparada com outras atividades executadas por farmacêuticos.

4. Referências Bibliográficas

Bluepharma – **Quem Somos** [Acedido a 22/09/2020]. Disponível em <https://www.bluepharma.pt/about-us.php>

Bluepharma Genéricos – **Sobre Nós** [Acedido a 22/09/2020]. Disponível em <https://www.bluepharmagenericos.pt/Empresa>

Comissão Europeia – **EudraLex – Volume 4 – Good Manufacturing Practice guidelines** [Acedido a 22/09/2020]. Disponível em https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-4/chapter4_01-2011_en.pdf

Eur-Lex – **DIRECTIVA 2005/36/CE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO** [Acedido a 23/09/2020]. Disponível em <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005L0036&from=PTram&id=1172>

Universidade de Coimbra (2020a) – **Plano de Estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas** [Acedido a 22/09/2020]. Disponível em https://apps.uc.pt/courses/PT/unit/86966/20001/20192020?common_core=true&type=ram&id=1172

Universidade de Coimbra (2020b) – **Unidade Curricular/ Gestão e Garantia de Qualidade** [Acedido a 23/09/2020]. Disponível em https://apps.uc.pt/courses/PT/unit/86968/20001/2020-2021?common_core=true&type=

Capítulo II



Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia São José

Abreviaturas

AINE – Anti-inflamatório não esteroide

COVID-19 – *Coronavirus Disease 2019*

EPI – Equipamento de Proteção Individual

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

FSJ – Farmácia São José

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

PDCA – *Plan, Do, Check, Act*

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

I. Introdução

Durante o nosso percurso no Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), pudemos contactar com diversas áreas relacionadas com o mundo da Ciência e da Saúde. No entanto, é com a realização do Estágio Curricular em Farmácia Comunitária que temos a oportunidade de pôr em prática os conhecimentos adquiridos nas áreas de Farmacologia, Organização e Gestão Farmacêutica, Deontologia e Legislação Farmacêutica e Indicação Terapêutica, entre muitas outras.

A área da Farmácia Comunitária é aquela em que se pode observar um contacto direto entre o farmacêutico e a sociedade, sendo, por esse motivo, considerada a área representativa daquilo que é o ato farmacêutico. Sendo o farmacêutico um agente de saúde pública, a responsabilidade primária recai sempre no bem-estar do doente, competindo-lhe tomar as ações necessárias para educar a população no sentido de promover e garantir a saúde (Ordem dos Farmacêuticos, 2020).

Entre o dia 13 de maio de 2020 e 11 de setembro de 2020, realizei o meu estágio em Farmácia Comunitária na Farmácia São José (FSJ) em Coimbra, sob a orientação do proprietário e diretor técnico, Dr. Paulo Monteiro. A equipa técnica da FSJ é composta por diversos elementos, havendo uma divisão de tarefas distinta entre eles, sendo todas elas executadas com o maior rigor e profissionalismo. A liderar a equipa, o Dr. Paulo Monteiro é, sem dúvida, um profissional exemplar que dedica o seu coração ao trabalho que pratica, mostrando-se sempre disposto a ajudar quando necessário.

Apesar das dificuldades enfrentadas atualmente, devido à pandemia originada pelo SARS-CoV-2, agente etiológico da COVID-19 (*Coronavirus Disease*), durante o meu estágio executei diferentes tarefas e contactei com várias realidades ligadas com o mundo da Farmácia Comunitária. No seguinte relatório, escrito sob a forma de análise SWOT, destaco aqueles que foram os pontos fortes (S), pontos fracos (W), oportunidades (O) e ameaças (T) do meu estágio.

2. Análise SWOT

2.1. Pontos Fortes

2.1.1. Horário e Localização

A Farmácia São José fica situada na Avenida Calouste Gulbenkian, no Centro Comercial Primavera. Esta localiza-se na proximidade de vários serviços de saúde, ficando apenas a alguns metros do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (Hospital da Universidade e Maternidade Dr. Bissaya Barreto), do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E. (IPOCFG, E.P.E.) e da Liga Portuguesa Contra o Cancro – Núcleo Regional de Coimbra. Na zona de Celas é possível encontrar também vários estabelecimentos de restauração, ginásios, consultórios privados e laboratórios de análises clínicas, bem como a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) e a Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. É, portanto, uma localização privilegiada, que permite o atendimento a um grupo heterogéneo de utentes, num amplo espectro de faixas etárias e de necessidades de saúde, desde medicações crónicas a terapêuticas mais recentes.

Devido a uma grande afluência de pessoas, e de modo a tornar-se mais acessível, a FSJ tem um horário de funcionamento ininterrupto desde as 8h30 às 21h00, de segunda a sexta-feira, e desde as 9h00 até às 20h00 ao sábado.

Por estes motivos, durante o meu estágio tive a possibilidade de exercer um horário com rotatividade, tendo também tido a oportunidade de ajudar na abertura e fecho da farmácia, e num horário de serviço permanente. Contactei e auxiliei diversos utentes, tanto em situações de atendimento rápido, como num atendimento mais personalizado e com o devido aconselhamento farmacêutico.

2.1.2. Inventário da Farmácia

A FSJ dispõe de uma sala de atendimento bastante ampla, permitindo assim uma grande exposição de produtos. No dia-a-dia pude então contactar com vários produtos e medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM), indicados em diversas áreas terapêuticas. Nas horas de menor afluência, aproveitava para me familiarizar com a localização dos produtos expostos, bem como com as suas indicações terapêuticas, posologia e composição. Desta forma, evitava tempos de espera desnecessários durante os atendimentos, já que tinha maior facilidade em localizar os produtos pedidos. Embora no início sentisse algumas dificuldades, à medida que me ia familiarizando com os produtos, tornava-se mais fácil efetuar aconselhamentos corretos, com confiança e com um certo grau de autonomia.

Um dos maiores destaques da FSJ em termos de inventário, para além de todos os medicamentos e produtos de saúde e bem estar, é sem dúvida, a área da Dermocosmética. Muitos utentes têm a FSJ como ponto de referência na procura de produtos e aconselhamento nesta área. Além da enorme variedade de marcas e gamas disponíveis, existe um espaço dedicado na sala de atendimento para esta área, para o qual os utentes se podem dirigir assim que entrem na farmácia, caso queiram receber aconselhamento e adquirir um produto de Dermocosmética. Os membros da equipa técnica fazem o aconselhamento nesta área de forma cuidada, sendo a variedade de produtos e a preocupação demonstrada pela equipa técnica da FSJ, fulcrais para fidelização dos utentes. Depois do atendimento, é habitual os utentes deixarem o seu contacto, de modo a serem informados da presença de conselheiras e a manterem-se a par de promoções relativamente às suas marcas de preferência.

Posto isto, foi uma mais-valia poder testemunhar atendimentos na área da Dermofarmácia. Além de me permitir rever conceitos já adquiridos na unidade curricular de Dermofarmácia e Cosmética, foi uma oportunidade de complementar esses conhecimentos com uma realidade prática, tanto a observar como a efetuar aconselhamento em situações clínicas, que nem sempre são fáceis de tratar.

2.1.3. Equipamentos Tecnológicos

A FSJ conta com dois equipamentos tecnológicos, o *robot* e o *cashguard*, que visam a melhoria do funcionamento da equipa técnica e da imagem exterior da farmácia. Após a receção de encomendas, grande parte dos medicamentos da farmácia são armazenados no *robot*. Este equipamento permite um armazenamento rápido e eficaz das embalagens, garantindo uma boa gestão do espaço da farmácia e dos armazéns. No momento de entrada de produtos no *robot*, ocorre também o registo dos prazos de validade dos medicamentos. Assim, durante a aquisição de um produto armazenado no *robot*, este será dispensado seguindo a política de “*first in, first out*”. Este equipamento é uma mais-valia para grande parte dos atendimentos, já que o farmacêutico não tem de sair do balcão para ir buscar o medicamento, permitindo que se foque mais no utente e nas suas necessidades, contribuindo para uma melhor gestão do tempo do atendimento.

Para efetuar pagamentos em numerário, a FSJ tem ao seu dispor um *cashguard*. Este equipamento permite o armazenamento do dinheiro proveniente de uma venda e disponibiliza automaticamente o troco, reduzindo a ocorrência de erros. É possível aceder ao histórico de entradas/saídas de dinheiro associadas a cada operador e à respetiva venda.

Ambas as ferramentas se demonstraram bastante úteis durante o meu estágio, devido ao auxílio que me prestaram durante os atendimentos. Na FSJ, cada membro da equipa técnica é responsável pelo fecho da sua própria caixa e, apesar do surgimento ocasional de erros, o *cashguard* foi bastante útil na resolução dos mesmos. Além dos motivos referidos, foi a primeira vez, na minha atividade curricular e extracurricular, em que contactei com este tipo de equipamentos.

2.1.4. Tarefas de Gestão Farmacêutica

O atendimento ao balcão é uma das principais responsabilidades atribuídas a farmacêuticos na área de Farmácia Comunitária. No entanto, um dos pontos fortes do meu estágio recai também nas várias atividades desenvolvidas no *backoffice*. Pude colaborar em tarefas relativas a documentação (notas de encomenda e notas de crédito), conferência de receituário, organização de produtos, gestão de encomendas e de *stocks*. Ao definir um limite de *stocks* adequado à procura dos utentes, conseguimos manter um inventário capaz de satisfazer as necessidades dos utentes e promover um acesso à terapêutica sem constrangimentos e sem haver quebras de *stock*.

A realização deste tipo de tarefas foi, sem dúvida, uma mais-valia no meu estágio. Além de um contacto mais próximo com a equipa, permitiu-me adquirir conhecimentos relativos à melhoria contínua do funcionamento e da organização da farmácia. Uma excelente gestão interna da farmácia acaba por se refletir positivamente a vários níveis externos, possibilitando um atendimento de excelência para os utentes e apresentando um espaço organizado, dinâmico e onde se sintam bem vindos.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Número de Estagiários

Tendo em conta as suas dimensões e o seu reconhecimento pelos estudantes da FFUC, a FSJ disponibiliza várias vagas para realização de estágio curricular. Devido aos constrangimentos causados pela pandemia de COVID-19 (que irei abordar nos tópicos seguintes), grande parte do meu trabalho na FSJ foi realizado numa equipa de oito estagiários. Apesar de algumas medidas internas (como trabalho por turnos), senti que em determinadas ocasiões, a presença simultânea de vários estagiários limitava a distribuição de tarefas, traduzindo-se em menores oportunidades de treino e de aprendizagem, em diversas funções.

2.2.2. Obras na Sala de Atendimento

Na fase final do meu estágio, sensivelmente durante um mês, iniciou-se um processo de reestruturação de algumas infraestruturas da farmácia. As zonas afetadas maioritariamente foram os acessos ao *backoffice* e a sala de atendimento, que viu a sua área de funcionamento reduzida temporariamente para metade. Inicialmente, tivemos de auxiliar na reorganização dos produtos da farmácia, obrigando à arrumação e organização dos armazéns para economizar espaço.

Após o começo das obras, e aliando às medidas de contingência aplicadas para garantir o distanciamento social, apenas três utentes podiam ser atendidos em simultâneo. Devido a todos estes constrangimentos, o atendimento ao público ficou bastante limitado. Considero isto um ponto fraco uma vez que, estando na fase final do meu estágio, senti uma regressão nas tarefas que podia desempenhar, a nível de exigência e responsabilidade.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Formações e Reuniões com Delegados de Informação Médica

Durante o meu estágio tive a oportunidade de participar em várias formações por parte de delegados de informação médica, relativamente a novos produtos ou a alguns produtos já presentes no nosso inventário, tais como Artelac[®], Durex[®] e NiQuitin[®]. Assisti também a uma formação da Rede de Informação de Saúde Oral (RISO), um projeto das Farmácias Portuguesas, ministrada por uma especialista em higiene oral, com o objetivo de nos educar e despertar o interesse para a área da higiene oral (RISO, 2020). Dadas as circunstâncias atuais, devido à pandemia de COVID-19, apercebi-me de que o número de formações foi bastante limitado, no entanto, foram feitos os possíveis para termos acesso a estas temáticas, garantindo a nossa segurança. Também pude presenciar várias reuniões entre o Dr. Paulo Monteiro e delegados comerciais de diversos laboratórios farmacêuticos, para proceder à encomenda direta de vários produtos, tendo em conta as necessidades dos utentes da farmácia.

Considero este ponto como uma oportunidade no meu estágio, já que me permitiu tirar dúvidas relativamente a alguns produtos e técnicas de atendimento, o que foi certamente uma mais-valia na minha evolução, contribuindo para me tornar um melhor profissional. Quanto maior o conhecimento científico relativamente a um produto, melhor o aconselhamento.

2.3.2. Filosofia Kaizen

A FSJ adotou a filosofia *Kaizen*, uma ferramenta de melhoria contínua, orientada para os utentes, mas tendo como foco a melhoria dos processos internos da farmácia (Kaizen Institute™, 2020). Enquanto estagiário, participei ativamente nas reuniões de equipa, fazendo sugestões que contribuíssem para a qualidade do funcionamento da farmácia. Além disso, pude auxiliar em diversas tarefas advenientes das reuniões, como por exemplo, na recolha de indicadores (vendas suspensas e vendas a crédito), organização de zonas de trabalho e manutenção de lineares.

A farmácia tinha também um espaço dedicado para todos os assuntos relativos à melhoria da mesma. Intitulado de “Quadro de *Kaizen*”, podíamos facilmente consultar observações que outros colegas quisessem transmitir, os indicadores recolhidos, objetivos a nível de vendas, bem como a implementação de melhorias, através de um sistema de *Plan, Do, Check, Act* (PDCA). Os membros da equipa responsáveis identificavam-se e descreviam o processo que estavam a desenvolver, mantendo os restantes colegas informados acerca da evolução das etapas.

Por ter trabalhado num ambiente respeitante a esta filosofia, com uma equipa envolvida no bom funcionamento da mesma, senti a importância da implementação de métodos que contribuam para o crescimento da farmácia. A oportunidade de participar nas tarefas relacionadas com filosofia *Kaizen*, foi, sem dúvida, uma boa maneira de melhorar alguns dos meus pontos fortes, nomeadamente, no que concerne ao desenvolvimento de tarefas de gestão. Assim, obtive as ferramentas necessárias para realizar um trabalho mais dinâmico e proativo, através da implementação de pequenas alterações que melhorassem o meu espaço de trabalho e dos meus colegas.

2.4. Ameaças

2.4.1. Pandemia de COVID-19

Tal como fui mencionando ao longo do relatório, o meu estágio curricular decorreu durante a pandemia de COVID-19. Apesar de ter iniciado o estágio após o Estado de Emergência decretado a 18 de março de 2020 (Diário da República, 2020a), estavam ainda presentes várias medidas que afetaram o funcionamento normal da farmácia e, conseqüentemente, o meu estágio. Toda a equipa da FSJ tinha plena noção das medidas de contingência em vigor, relativamente ao uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) (DGS, 2020a). Tínhamos também conhecimento das normas relativas ao funcionamento de Farmácias Comunitárias, tendo adotado as medidas anunciadas no que concerne a utentes,

membros da equipa da própria farmácia e ao espaço da farmácia em si, zelando sempre pelo cumprimento dos procedimentos (DGS, 2020b). A nível de atendimentos, tínhamos várias limitações relativamente ao número de balcões abertos, dando prioridade aos membros efetivos da farmácia. Limitou-se também o número de utentes na sala de atendimento para cinco pessoas, tendo de se pedir frequentemente a utentes acompanhados para entrarem sozinhos na farmácia. Após cada atendimento, procedíamos à correta desinfecção do balcão e de equipamentos de multibanco, antes de iniciarmos o atendimento seguinte, o que acabava por aumentar o tempo de espera dos utentes. O sistema de senhas foi desativado de forma a evitar a contaminação cruzada do equipamento e dos utentes que retirassem a senha. Neste sentido, delineou-se um perímetro específico para as pessoas fazerem fila, mantendo uma distância de segurança mínima. De forma a agilizar os atendimentos, foi muitas vezes pedido a estagiários e a outros membros da equipa técnica que abordassem as pessoas em fila de espera, evitando assim a permanência prolongada das mesmas na sala de atendimento.

Muitos dos utentes fidelizados da FSJ têm preferência em ser atendidos por um membro específico da equipa. Em momentos de elevada afluência, alguns destes utentes recusavam-se a ser atendidos por alguém que não fosse o farmacêutico que queriam. Esta falta de cooperação e compreensão causava sempre mais constrangimentos a nível de atendimento, tanto a nós estagiários e farmacêuticos, como aos restantes utentes em fila de espera.

Como referido, sendo muitas vezes impossível efetuar atendimento ao balcão, o meu trabalho era mais direcionado ao auxílio do mesmo, ou então focado no *backoffice*. Uma das tarefas que desempenhei, como já referi, e em que pude sentir o efeito da pandemia, foi relativamente à gestão dos *stocks*. A definição de um limite mínimo e máximo no *stock* de um produto, envolve a análise cuidada das suas compras e vendas em meses passados. No caso de alguns medicamentos, esta análise tornou-se difícil devido à alteração de padrões de compra por parte dos utentes. Foi possível observar um pico de compras de alguns medicamentos, nomeadamente, de ben-u-ron® 500mg. No mês de março, este produto teve um pico de vendas, relacionando-se com a declaração do Estado de Emergência e com o abastecimento desnecessário por parte dos utentes. Com isto em mente, o INFARMED, I.P., publicou uma Circular Normativa a apelar ao uso responsável dos medicamentos, e a restringir a venda abusiva dos mesmos (INFARMED, 2020). Em contrapartida, na mesma altura, as vendas de alguns anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) (como o Brufen®), tiveram uma diminuição acentuada. Em conversa com os colegas da farmácia, a causa deste decréscimo podia ter a ver com as declarações do Ministro da Saúde de França, Olivier Verán, que desaconselhou a toma deste grupo terapêutico, por agravamento do risco de infeção. O mediatismo e a divulgação

de falsas informações associadas à pandemia de COVID-19 tiveram, deste modo, uma influência na venda de medicamentos.

Sem dúvida que esta pandemia afetou toda a população, tanto a nível pessoal como profissional. Tendo limitado o desempenho das minhas funções enquanto estagiário, em contexto de contacto com o público, e afetado algumas tarefas de gestão da farmácia, considero a pandemia de COVID-19 como uma ameaça ao meu estágio.

2.4.2. Parafarmácias e competitividade de preços

Em 2005, o Governo autorizou a venda de MNSRM fora de farmácias, e sem a supervisão de farmacêuticos ou técnicos de farmácia (2020b). Esta medida teve um impacto nas vendas das farmácias, devido à facilidade de acesso a este tipo de produtos e, nomeadamente, devido à diferença de preços praticados. Durante o meu estágio, ao realizar atendimentos, presenciei várias situações em que os utentes apenas se dirigiam à farmácia para perguntar o preço de dado produto, fazendo, por norma, um comentário negativo. Esta situação era recorrente na venda de produtos de Dermofarmácia, em que achavam alguns preços demasiado elevados e faziam uma comparação com os preços praticados em parafarmácias ou em lojas *online*. No caso de utentes que demonstravam alguma pressa, era um bocado complicado tentar apelar à importância de privilegiar a aquisição deste produtos numa farmácia, uma vez que a preocupação principal deles recaía no preço, e não no aconselhamento e conhecimento dos farmacêuticos e técnicos de farmácia.

3. Conclusão

Quando iniciei o meu estágio, senti algumas dificuldades em desempenhar determinadas tarefas, nomeadamente, no atendimento ao balcão, para o qual não me sentia de todo preparado nem confiante. Diria que o meu maior medo sempre foi o de cometer erros, mas tal como me disseram, “*Na Farmácia São José não se cometem erros, perguntamos sempre quando não estamos confiantes para fazer*”. Foi de facto uma lição que me reconfortou e transmitiu confiança, motivando-me para melhorar as minhas aptidões.

Finalizado este estágio, tenho a certeza de que o papel do farmacêutico vai muito além do que a simples dispensa de medicamentos. O seu trabalho a nível da farmácia comunitária acompanha todas as etapas do circuito do medicamento. Desde que um medicamento ou outro produto de saúde entra na farmácia, até ao momento da sua dispensa, a responsabilidade recai sobre o farmacêutico. Sinto que adquiri experiência e conhecimentos suficientes para

ingressar no mundo profissional, efetuar tarefas de gestão farmacêutica autonomamente e fazer um atendimento de excelência, que faça com que o utente se sinta satisfeito e bem-vindo na farmácia. Enquanto estagiário, senti-me completamente realizado por trabalhar com uma equipa tão competente e dinâmica como a da FSJ, tendo sido uma excelente oportunidade para aprender e crescer enquanto pessoa e futuro profissional.

O Estágio Curricular é, para muitos, o primeiro contacto com a área de Farmácia Comunitária. O nosso papel nesta área é de extrema relevância, sendo o farmacêutico capaz de estabelecer o elo entre os utentes e o acesso à terapêutica. Devemos estar preparados para qualquer situação que nos seja apresentada, e saber proceder de forma rigorosa, responsável e pondo em prática os nossos conhecimentos na área. Por esta razão, é importante adotar medidas que nos permitam expandir o nosso conhecimento e melhorar continuamente enquanto profissionais.

4. Referências Bibliográficas

Diário da República (2020a) – **Decreto do Presidente da República n.º 14-A/2020** [Acedido a 28/09/2020]. Disponível em <https://dre.pt/pesquisa/-/search/130399862/details/maximized>

Diário da República (2020b) – **Lei n.º 38/2005** [Acedido a 28/09/2020]. Disponível em <https://dre.pt/pesquisa/-/search/226233/details/maximized>

Direção-Geral de Saúde (2020a) – **Norma n.º 007/2020** [Acedido a 28/09/2020]. Disponível em <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0072020-de-29032020-pdf.aspx>

Direção-Geral de Saúde (2020b) – **Norma n.º 003/2020** [Acedido a 28/09/2020]. Disponível em <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0032020-de-19032020-pdf.aspx>

INFARMED, I.P. – **Circular Normativa n.º 002/CD/100.20.200** [Acedido a 28/09/2020]. Disponível em <https://www.infarmed.pt/documents/15786/3464134/Orienta%C3%A7%C3%B5es+para+a+gest%C3%A3o+respons%C3%A1vel+de+Medicamentos+no+atual+contexto+de+Pandemia+COVID-19/22b8e8aa-0606-a32e-f2f6-a0684b1edcb3>

Kaizen Institute™ – **About us** [Acedido a 27/09/2020]. Disponível em <https://www.kaizen.com/>

Ordem dos Farmacêuticos – **Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos** [Acedido a 27/09/2020]. Disponível em https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/codigo_deontologico_da_of_4436676175988472c14020.pdf

Plataforma RISO – **RISO** [Acedido a 27/09/2020]. Disponível em <https://www.plataformariso.pt/pt/riso>

Capítulo III

Monografia

“An Overview of Exosomes in Cancer Therapy: A Small
Solution to a Big Problem”

Orientado pela Professora Doutora Ana Rita Figueiras

Abstract

Exosomes are defined as a type of extracellular vesicles, released when multivesicular bodies of the endocytic pathway fuse with the plasma membrane. They are characterized by their role in extracellular communication, partly due to their composition. When cells secrete exosomes, they carry several molecules with them, both present at the parent cell membrane or in the intracellular medium. These nanovesicles can target other cells by recognizing peptides expressed at the surface of the membranes. Besides this, exosomes have the ability to recognize and interact with cells from the immune system, enabling them to elicit an immune response. Their targeting capability and nanosized dimensions make them great candidates for cancer therapy. Many types of oncologic therapeutics, namely chemotherapy, are related with cytotoxicity and multiple drug resistance. In this sense, the use of the exosomes targeting capabilities, able to deliver anticancer drugs specifically to cancer cells, is a great approach to overcome these disadvantages. Many studies focus on the *in vivo* administration of exosome-based formulations in mice. The objective is to assess treatment efficiency in reducing tumour cells, as well as overall safety and response by cancer carriers. So far, results show exosomes as a promising therapeutic strategy in the fight against cancer. This review summarizes the characteristics and composition of exosomes, as well as explaining in detail the involved parties in the origin of exosomes. Then, some considerations about the application of exosomes in immunotherapy are addressed. The main isolation and loading methods are approached to give insight into how exosomes can be obtained and manipulated. Finally, some therapeutic applications of exosomes in cancer therapy are described.

Keywords: exosomes, ESCRT pathway, nanovesicles, cancer therapy, *in vivo* studies, immunotherapy.

Resumo

Os exossomas definem-se como um tipo de vesícula extracelular, libertados quando os corpos multivesiculares da via endocítica se fundem com a membrana plasmática. São caracterizados pelo seu papel na comunicação extracelular, em parte, devido à sua composição. Quando as células secretam exossomas, estes transportam várias moléculas, presentes quer na membrana plasmática, quer no meio intracelular das células-mães. Estas nanovesículas conseguem reconhecer peptídeos expressos à superfície de outras células. Além disto, os exossomas têm a capacidade de reconhecer e interagir com células do sistema imunitário, o que lhes permite desencadear uma resposta imunitária. As suas capacidades de reconhecimento e nanodimensões tornam-nos excelentes candidatos para a terapia do cancro. Vários tipos de terapia oncológica, nomeadamente quimioterapia, relacionam-se com a ocorrência de citotoxicidade e resistência farmacológica. Neste sentido, uma ótima estratégia para superar estas desvantagens, é através do recurso às capacidades de reconhecimento dos exossomas, permitindo o transporte de fármacos anticancerígenos diretamente para as células cancerígenas. Alguns estudos focam-se na administração *in vivo* de formulações à base de exossomas em murganhos. O objetivo é avaliar a eficácia do tratamento na redução de células tumorais, bem como a segurança em geral e a resposta dos transportadores anticancerígenos. Até à atualidade, os resultados demonstram os exossomas como uma estratégia promissora no combate ao cancro. Este trabalho sumariza as principais características e composição dos exossomas, bem como referencia os mecanismos envolvidos na origem dos exossomas. Além disso, são abordadas algumas aplicações dos exossomas em imunoterapia. As principais técnicas de isolamento e carga dos exossomas para evidenciar os métodos usados para obtenção e manipulação dos mesmos são também descritas. Por fim, são abordadas algumas aplicações terapêuticas de exossomas na terapia do cancro.

Palavras-chave: exossomas, via ESCRT, nanovesículas, terapia do cancro, estudos *in vivo*, imunoterapia.

Abbreviations

ABC – ATP-binding cassette

APC – Antigen-presenting cell

ATP – Adenosine triphosphate

CAR-T – Chimeric Antigen Receptor T

CRS – Cytokine release syndrome

CSC – Cancer stem cell

DC – Dendritic cell

DNA – Deoxyribonucleic Acid

Doa4 – Degradation of alpha-4 enzyme

DOX – Doxorubicin

EMT – Epithelial-mesenchymal transition

EphA2 – Ephrin type-A receptor 2

ESCRT – Endosomal sorting complex required for transport

GM-CSF – Granulocyte-macrophage colony stimulating factor

H22 – Hepatoma 22

HEK – Human Embryonic Kidney cell line

HeLa – Human cervical carcinoma cell line

Hep2 – Human epithelial type 2 cell line

HNC – Head and neck cancer

HPLC – High performance liquid chromatography

Hsp – Heat shock protein

ILV – Intraluminal vesicles

Lamp2b – Lysosome-associated membrane protein 2

MAGE – Melanoma antigen gene

MDR – Multiple drug resistance

MHC – Major Histocompatibility Complex

miRNA – Micro RNA

MNT-1 – Human melanoma cells

mRNA – Messenger RNA

MVB – Multivesicular body

NK – Natural killer cell

NP – Nanoparticle

nPES – Nanoplasmon-enhanced scattering

PBS – Phosphate buffered saline

PCR – Polymerase chain reaction

PEG – Polyethylene glycol

Pgp – P-glycoprotein

PI – Phosphatidylinositol

PI(3)P – Phosphatidylinositol-3-phosphate

PI3K – Phosphatidylinositol-3-kinase

PLP – Proteolipid Protein

PM – Plasma membrane

Pmel17 – Melanocyte protein

PTX – Paclitaxel

RNA – Ribonucleic Acid

RVG – Rabies viral glycoprotein

SEC – Size exclusion chromatography

siRNA – Small interfering RNA

SNARE – Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein receptor

TEX – Tumour-derived exosome

TRPP2 – Transient receptor potential polycystic 2

VAMP7 – Vesicle-associated membrane protein 7

I. Introduction

Cancer remains one of the leading causes of death worldwide despite significant therapeutic advancements and improved detection methods. The main characteristic of this disease is the uncontrolled cell proliferation. There are several types of cancer, related to different types of cell, with different behaviours and responses to treatment (Sarkar *et al.*, 2013). Several factors contribute to the development of this disease (diet, lifestyle, inherited genes, infectious microorganisms, exposure to radiation and carcinogenic substances) (Anand *et al.*, 2008). Usual cancer treatments involve chemotherapy, radiation therapy and/or surgery. Chemotherapy is considered the most effective therapy, however, treatment fails in several situations where cancer cells show resistance to chemotherapeutic drugs. In fact, two of the biggest threats to chemotherapy are related with multiple drug resistance and with treatment toxicity (Mansoori *et al.*, 2017). In this regard, therapies based in nanoparticles (NPs) are being investigated, focused on efficient drug delivery methods, as a way to reduce adverse effects and improve the chances of a successful treatment (Zhang *et al.*, 2019).

In 1983, while observing the maturation of reticulocytes into erythrocytes, Johnstone *et al.* reported that fusion of multivesicular bodies (MVBs) with the plasma membrane (PM) led to the release of nanosized vesicles. Later, in 1987, these vesicles were named exosomes (Johnstone *et al.*, 1987; Pan and Johnstone, 1983). At first, it was believed that exosomes acted as a cellular disposal system, helping in the removal of unnecessary proteins (Vlassov *et al.*, 2012). However, nowadays it is known that exosomes play an important role in extracellular communication, capable of carrying proteins, nucleic acids and lipids (Kowal, Tkach and Théry, 2014). Taking advantage of their innate characteristics and functions, exosomes are being investigated as potential therapeutic agents. As will be discussed, exosomes are capable of triggering an immune response, opening ways for the development of vaccines in immunotherapy. With the capability of targeting and recognizing proteins on a cell membrane, they can also act as nanocarriers of drugs and nucleic acids for several pathologies, namely cancer.

This review aims to describe the composition of exosomes, as well as give insight into the underlying mechanism responsible for the origin of these vesicles. What could be simply described as a form of exocytosis, is in fact a much deeper process. With the help of several proteins working together as one complex, there are several steps involved in the development of exosomes. Although there is still much to learn about this mechanism, there

is already proof of other pathways that lead to the biogenesis of exosomes (Kosaka *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2018; Stuffers *et al.*, 2009).

Nowadays, there are many techniques used to obtain and purify exosomes. Some techniques are more popular than others due to their accessibility and simpler methodology (for example, centrifugation-based methods). Others, which present higher yields, are associated with elevated costs. Depending on the goal of each study, one technique may be preferable to another. For these reasons, several techniques were described, each with their own advantages and disadvantages.

Due to the capability of exosomes to carry molecules, several advances have been made in order to load exosomes with a desired drug or nucleic acid. It was therefore relevant to summarize some of the most commonly performed loading strategies. The different techniques were divided in pre- and post-loading methods, varying whether the exosome loading occurs directly or indirectly. Like isolation techniques, loading techniques also have advantages and disadvantages. These are mostly related to the drug loading capacity of the method, and to the stress induced on the vesicles.

Knowledge of these techniques provides some background into the posteriorly referred clinical applications. Several *in vivo* experiments were performed, using different isolation and loading methodologies. Results of different investigations will be discussed, evaluating the efficacy of exosome-based treatments using paclitaxel (PTX), small interfering RNA (siRNA) and doxorubicin (DOX) (Kim *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019; Yong *et al.*, 2019).

2. Exosomes

2.1. Structure and Functions

Cells from the most diverse organisms are known to release extracellular vesicles, which can be found in several biological fluids like blood, saliva, urine, lymph and breast milk (Colombo, Raposo and Théry, 2014; Tamkovich, Tutanov and Laktionov, 2016). One of these vesicles is the exosome, a particle of endocytic origin with a size ranging from 30-100nm (Colombo, Raposo and Théry, 2014; Frydrychowicz *et al.*, 2015; Théry, Zitvogel and Amigorena, 2002). The morphology of these particles has been described as being “saucer-like” (Théry, Zitvogel and Amigorena, 2002) or “cup-shaped” (Xiao *et al.*, 2019), resembling a flattened sphere (depending on the cells that originated them) (Ha, Yang and Nadithe, 2016; Théry, Zitvogel and Amigorena, 2002; Xiao *et al.*, 2019). Exosomes are lined with a lipid bilayer that encloses cytosol from the secreting cells, and are composed by several lipids, proteins

and nucleic acids. Like their morphology, the composition of exosomes is also influenced by the parent cell that originated them (Colombo, Raposo and Théry, 2014; Frydrychowicz *et al.*, 2015; Ha, Yang and Nadithe, 2016).

Over the years, the protein composition of exosomes has been the subject of several studies. According to ExoCarta, an online database regarding exosomes, 9769 proteins have been identified in these systems (ExoCarta, 2020), such as adhesion molecules, major histocompatibility complex (MHC) class I and II proteins, cytosolic chaperone proteins (for example, heat shock proteins (Hsp)) and metabolic enzymes (Conde-Vancells *et al.*, 2008; Février and Raposo, 2004). One of the most commonly found protein family in exosomes are the tetraspanins (namely CD9, CD63, CD81 and CD82) (Andreu and Yáñez-Mó, 2014; Théry, Zitvogel and Amigorena, 2002). The tetraspanins are a superfamily of proteins with four transmembrane domains and two extracellular segments (Charrin *et al.*, 2009; Hemler, 2005). These compartments are responsible for several processes that result in membrane fusion, organization of large molecular complexes and even protein trafficking and signalling (Andreu and Yáñez-Mó, 2014; Théry, Zitvogel and Amigorena, 2002). Since the membrane of exosomes is enriched with tetraspanins, they are considered excellent biomarkers (Andreu and Yáñez-Mó, 2014).

Another set of proteins present in the composition of exosomes are the Hsp. These systems act as molecular chaperones in response to stress. Helping and maintaining an appropriate folding of proteins, Hsp prevent the formation of protein aggregates. These misfolded proteins could lead to the most diverse pathologies, such as neurodegenerative disorders like Parkinson or Alzheimer's disease (Clayton *et al.*, 2005). The correct manipulation of their biological activity could be the answer to develop new therapies for the mentioned diseases or for several types of cancer (Ponomarenko, Stepanenko and Kolchanov, 2013). The expression of Hsp can be constitutive or induced due to stressful events (like exposing a cell to higher temperatures) (Reddy *et al.*, 2018). In an attempt to induce the production of Hsp to be sorted into B-cell exosomes, Clayton *et al.* (2005), exposed the cell line to high temperatures (42°C over 3 hours). In this study, it was concluded that there was an increase both in B-cell exosomes secretion, as well as in the amount of produced Hsp. Further analysis showed that the Hsp are encapsulated in the lumen of the exosomes. This renders them unavailable to interact with Hsp receptors present at the surface of target cells (Clayton *et al.*, 2005), suggesting that other mechanisms could be involved in order to allow the exosomal Hsp to interact with biological targets.

Exosomes from antigen-presenting cells (APC) carry MHC class II molecules (Théry, Zitvogel and Amigorena, 2002), which could enable them to play a role in antigen presentation. Raposo *et al.* (1996) documented that peptide-MHC class II complexes present at the surface of exosomes were able to stimulate T cells. It has also been shown that dendritic cells (DC) produce exosomes with MHC class I molecules and CD86, giving them the potential to induce a response from CD8⁺ T-Cells (Bobrie *et al.*, 2011; Théry, Zitvogel and Amigorena, 2002).

Regarding their lipid composition, exosomes have resemblances with lipid rafts (Colombo, Raposo and Théry, 2014; Skotland *et al.*, 2019) – microdomains expressed at the PM with elevated content of sphingolipids, cholesterol and phospholipids (Hemler, 2003). According to studies, in comparison with their parent cells, exosomes are usually enriched 2-3 times more in sphingomyelin, cholesterol, phosphatidylserine and glycosphingolipids, with values varying with each type of originating cell (Skotland *et al.*, 2019; Subra *et al.*, 2007). Besides their structural function in the PM and role in the formation of exosomes, lipids could also have an influence on the function of these particles in the body, making them important targets for future studies, as to better understand how exosomes work and how to easily manipulate them as therapeutic agents (Skotland *et al.*, 2019; Subra *et al.*, 2007).

Besides their protein and lipid composition, exosomes also act as carriers of nucleic acids, namely messenger RNA (mRNA) and microRNA (miRNA) (Qin and Xu, 2014). miRNAs are small, non-coding RNA molecules, that can regulate the expression of genes and complementary mRNAs, playing a role in cellular development, proliferation and apoptosis (Ambros, 2004; Gusachenko, Zenkova and Vlassov, 2013; Qin and Xu, 2014). The transfer of nucleic acids by exosomes from one cell to another can influence cells on an epigenetic level and lead to an exchange of features between cells, since receiving cells are getting RNA of proteins that wouldn't be normally expressed in them (Gusachenko, Zenkova and Vlassov, 2013; Qin and Xu, 2014). Like other cell types, cancer cells can also release exosomes, and with them, their own nucleic acids. Melo *et al.*, studied the effects of miRNAs transported by breast cancer cells-derived exosomes. In this study, it was suggested that these molecules have the capacity to induce the formation of tumours on cells that would otherwise be considered healthy (Melo *et al.*, 2014). As alarming as it may be, these conclusions shed a light on cancer diagnostic and treatment methods, with the possibility of using miRNAs transported by exosomes as biomarkers in melanoma, breast cancer or lung cancer (Frydrychowicz *et al.*, 2015; Gusachenko, Zenkova and Vlassov, 2013). Such mechanisms could be adapted in our advantage, using exosomes as vectors in genetic therapy, loading specific sets of nucleic acids to use them as carriers between cells (Valadi *et al.*, 2007).

Due to their composition (see Figure I), exosomes act as nanocarriers in the transfer of macromolecules around the organism. They have a fundamental role as mediators in cell to cell communication, whether cells are close or far distant between each other (Li *et al.*, 2018; Qin and Xu, 2014). These nanosystems are capable of eliciting biological responses like expression/suppression of proteins, induce immune responses or modulate cancer progression (Andreu and Yáñez-Mó, 2014; Kalluri and LeBleu, 2020).

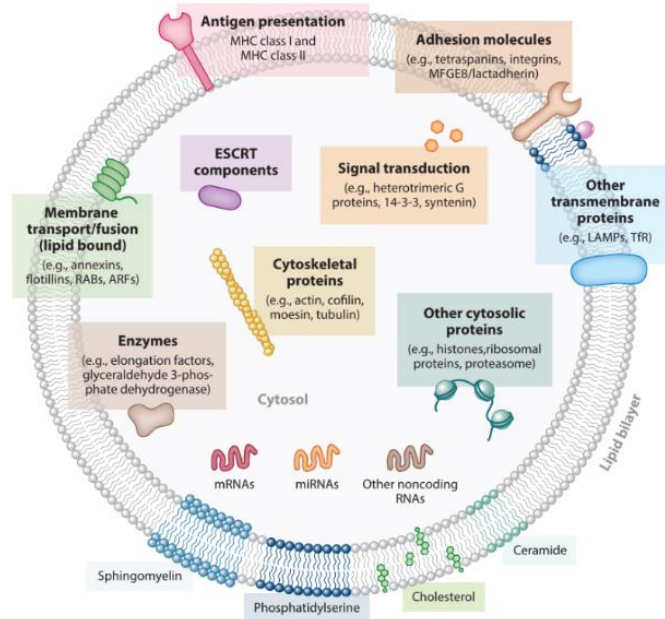


Figure I – Structure and Overall Composition of an Exosome. (Adapted from Colombo *et al.*, 2014)

2.2. Biogenesis

As previously mentioned, exosomes are considered extracellular vesicles with an endocytic origin (Colombo, Raposo and Théry, 2014). When a cell membrane site is invaginated, due to the ubiquitination of surface receptors, it leads to the formation of early endosomes (Tamkovich, Tutanov and Laktionov, 2016). As they mature, there is a gradual increase in size and change in their content, mostly due to the accumulation of intraluminal vesicles (ILV). They eventually become late endosomes, also referred to as MVBs (Frydrychowicz *et al.*, 2015; Stoorvogel *et al.*, 2002). After their maturation, MVBs usually fuse with lysosomes, leading their contents to lysosomal degradation. However, in a process that still is not quite understood, the membrane of MVBs can fuse with the PM of the cell, leading to the release of the ILVs they accumulated, which are now called exosomes (Andreu and Yáñez-Mó, 2014; Frydrychowicz *et al.*, 2015; Hanson and Cashikar, 2012; Stoorvogel *et al.*, 2002).

One of the most studied mechanisms for the formation and cargo sorting of ILVs into the MVBs involves the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) (Frydrychowicz *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2018). The ESCRT family is composed by almost twenty proteins, distributed by four multiprotein complexes (ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II AND ESCRT-III), plus accessory protein Vps4. All of them are involved in the biogenesis of exosomes, transporting ubiquitinated proteins on the membrane of endosomes, clustering them, so they can later be included in a newly formed vesicle, inside the endosome (Andreu and Yáñez-Mó, 2014). The discovery of the ESCRT machinery began after the identification of several genes in *Saccharomyces cerevisiae* yeast, classified as “Vps” genes, whose proteins had the capacity to form complexes and mediate protein trafficking through endosomes (Henne, Buchkovich and Emr, 2011). Since then, the human analogues of these proteins have been discovered and categorized according to the ESCRT complex (see Table I).

Table I – The ESCRT proteins in *Saccharomyces cerevisiae* yeast and corresponding human analogue. (Adapted from Hanson & Cashikar, 2012; Henne *et al.*, 2011)

Complexes	Yeast	Human
ESCRT-0	Vps27	Hrs
	Hse1	STAM1,2
ESCRT-I	Vps23	Tsg101
	Vps28	Vps28
	Vps37	Vps37 A, B, C, D
	Mvb12	Mvb12 A, B
ESCRT-II	Vps36	EAP45
	Vps22	EAP30
	Vps25	EAP20
ESCRT-III	Vps20	CHMP6
	Snf7	CHMP4 A, B, C
	Vps24	CHMP3
	Vps2	CHMP2 A, B
Vps4 Complex	Vps4	Vps4 A, B

Sites of the cell membrane start forming early endosomes when proteins at their surface are ubiquitinated. Due to the action of Vps34, or class III Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), the lipid phosphatidylinositol (PI), present at the surface of the cell and the endosome,

is phosphorylated into phosphatidylinositol-3-phosphate (PI(3)P) (Hurley, 2010). The presence of PI(3)P acts as a recognition signal with specificity for the Hrs protein, recruiting the ESCRT-0 complex which binds to the ubiquitinated proteins at the surface of the endosome, initiating cargo sorting into the MVBs (Henne, Buchkovich and Emr, 2011; Stoorvogel *et al.*, 2002).

After binding with proteins, the ESCRT-0 begins to cluster and sequester them and, due to the Hrs subunit, binds itself with a Tsg101 unit from ESCRT-I, who proceeds to recruit the ESCRT-II complex via Vps28/Vps36 binding (Henne, Buchkovich and Emr, 2011). ESCRT-I and ESCRT-II work together to create buds and stabilize vesicle necks, opening way for ESCRT-III to promote the budding process and cleaving inward budding vesicles. These vesicles are released into the lumen of the endosome, originating ILVs (Wollert and Hurley, 2010; Zhang *et al.*, 2019). Unlike the other three complexes, ESCRT-III exists in the cytosol as inactive monomers instead of an active complex, and depends on ESCRT-II to be activated (in yeasts, ESCRT-II protein Vps25 binds to Vps20, and afterwards Snf7, Vps24 and Vps2 bind to each other, sequentially) (Hanson and Cashikar, 2012; Hurley, 2010). The exact cleaving mechanism is not fully understood, however, it is known that Snf7/CHMP4 is responsible for recruiting the degradation of alpha-4 (Doa4) enzyme. This enzyme is responsible for the removal of ubiquitin from the cargo of MVBs, allowing them to be sorted and incorporated in vesicles (Babst, 2005; Katzmann, Odorizzi and Emr, 2002). Before the process is completed, the ESCRT-III complex is disassembled and recycled back to the cytosol after binding with the Vps4 ATPase enzyme, in a process that requires adenosine triphosphate (ATP) (See Figure 2) (Frydrychowicz *et al.*, 2015; Hanson and Cashikar, 2012; Hurley, 2010).

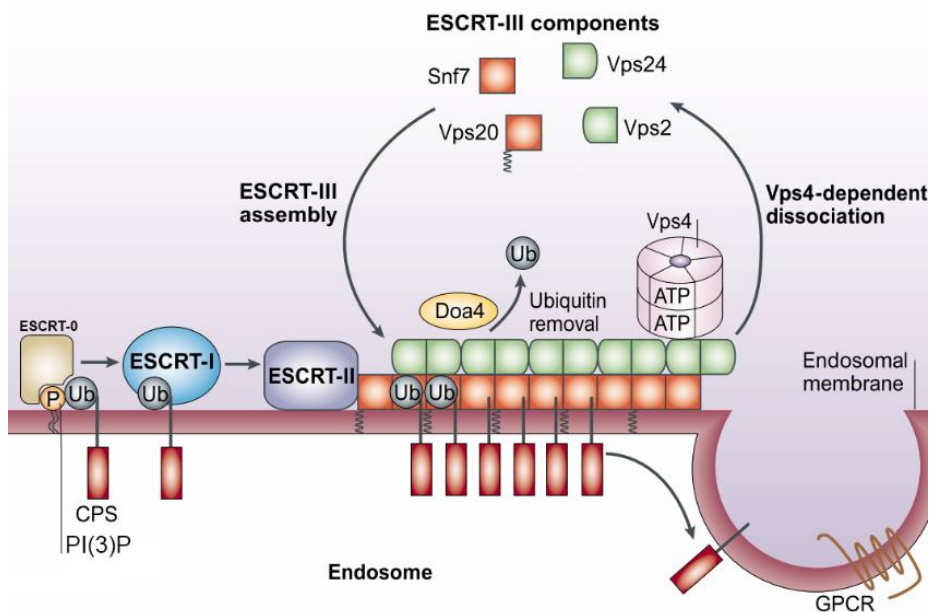


Figure 2 – Overall mechanism of the ESCRT during MVB sorting. (Adapted from Katzmann, Odorizzi and Emr, 2002)

Even though the ESCRT pathway is considered a key mechanism in the biogenesis of MVBs, there is evidence of ESCRT-independent mechanisms. Stuffers *et al.* (2009) depleted cells of Hrs, Tsg101, Vps22 and Vps24, subunits of each ESCRT complex, in order to evaluate the production of MVBs and secretion of exosomes in the absence of ESCRT proteins. After transfecting siRNA against the mentioned proteins, using Hep-2 and HeLa cells, the integrity of the ESCRT complex was lost, however, MBVs were still being formed, suggesting the existence of ESCRT-independent mechanisms (Stuffers *et al.*, 2009).

One of the supposed mechanisms involved in MVBs formation revolves around tetraspanins, namely, CD63 (Charrin *et al.*, 2009), who, unlike other proteins of the tetraspanins family, is abundantly found intracellularly in ILVs of late endosomes (Pols and Klumperman, 2009). The melanosomal protein Pmel17 (essential in the maturation of melanosomes) is transported into ILVs without the need for ubiquitination and, therefore, does not need to be sorted by the ESCRT complex (Theos *et al.*, 2006). After depleting CD63 in MNT-1 cells with CD63-specific siRNA, there was a reduction of ILVs on endosomes, with consequent impairment of melanosome maturation (Niel, van *et al.*, 2011), suggesting an important role for CD63 in ESCRT-independent mechanisms.

Besides proteins, lipids also seem to play a role when it comes to generate ILVs without the ESCRT machinery (see Figure 3). Ceramide has been the subject of several studies, as to better understand the way it works. Studying the endosomal trafficking of the proteolipid protein (PLP), it was observed that the ESCRT complex was not involved in PLP sorting after using siRNA to knock down Hrs, Tsg101 or Vps4 coding genes. In the absence of ESCRT, ILVs containing PLP were still being formed, with a high concentration of sphingolipids in the vesicles (Trajkovic, 2008). Sphingomyelinases remove the phosphocholine group of sphingomyelin leading to the formation of ceramide. In order to analyse the role of ceramide in PLP vesicle sorting and exosome biogenesis, Oli-neu cells (mouse oligodendroglial cells) were treated with sphingomyelinase inhibitor GW4869. Other inhibitors were used, spiroepoxide and glutathione. The same effect could be observed in the three tests, with a marked decrease of exosome secretion from the cells, concluding that ceramide is also involved in ESCRT-independent ILV formation (Trajkovic, 2008). A similar study was performed in Human Embryonic Kidney (HEK) 293 cells to prove that miRNA secretion depends on ceramide. First, it was evaluated if extracellular miRNA is contained in exosomes by adding RNases to the medium. After the cells were incubated with the RNases, miRNA could still be detected. Exosomes play an important role in protecting carried molecules from external threats. Afterwards, two tests were performed, one with GW4869 and another with

siRNA to knock down the expression of sphingomyelinase. It was concluded that depletion of ceramide lead to a decrease of both exosomes and miRNA in the extracellular medium. The exact mechanism of how miRNAs are sorted into exosomes is still unknown, however, an ESCRT-independent mechanism involving ceramide could be responsible for this phenomena (Kosaka *et al.*, 2010).

Several studies are trying to discover more about how MVBs fuse with the PM and release exosomes to the extracellular microenvironment. Two groups of proteins seem to be a part of this mechanism, small GTPases of the RAB family and sets of soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein receptors (SNAREs) (Colombo, Raposo and Théry, 2014). The use of small-hairpin RNA (shRNA) to knock down Rab proteins (Rab2b, Rab9a, Rab5a, Rab27a and Rab27b) led to an inhibition of exosome secretion in HeLa cells (Ostrowski *et al.*, 2010). A focused analysis on proteins Rab27a and Rab27b led to the discovery that these two proteins are involved in MVBs distribution to the cell periphery, after using total internal reflection fluorescence microscopy to observe MVBs. Silencing of the Rab27 proteins caused a reduction of fusion events between the MVBs and the PM, but also led to an increase in MVBs size, suggesting that in the absence of these proteins, MVBs could fuse with each other or form complexes with other vesicles, preventing them from docking with the PM (Ostrowski *et al.*, 2010).

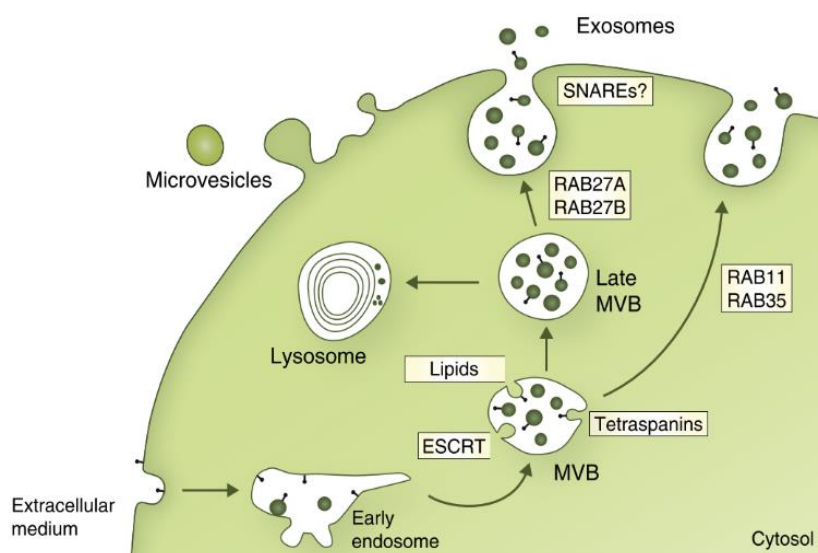


Figure 3 – Several machineries involved in the biogenesis of exosomes. (Adapted from Kowal, Tkach and Théry, 2014)

Over the years, several studies have proven the involvement of SNAREs in vesicle fusion with the PM, for example, in lysosomal exocytosis (Rao *et al.*, 2004). However, the SNARE complexes that intervene in that process could be different from the SNAREs involved in fusion of the MVB with the PM (Bobrie *et al.*, 2011). Fader *et al.* (2009) observed that the

vesicle-associated membrane protein 7 (VAMP7), a member of the SNARE family, was necessary for the fusion of MVBs with the PM, leading to exosome secretion. Inhibition of these protein in K562 cells (myeloid leukaemia cell line) led to a decrease in exosome secretion (Fader *et al.*, 2009). In another study, Proux-Gillardeaux *et al.* (2007) concluded that inhibition of VAMP7 on Madin-Darby canine kidney cells impaired lysosome secretion but had no influence on exosome release (Proux-Gillardeaux *et al.*, 2007). Although contradictory, these results do not discard the role of SNAREs in the biogenesis of exosomes, but instead suggest that different cell types could require other proteins from the SNARE family. Further studies should be conducted to better understand how these molecules work (Colombo, Raposo and Théry, 2014; Kowal, Tkach and Théry, 2014).

2.3. Exosome-like endogenous nanosystems

Prolonged cancer therapies cause systemic toxicity and healthy cell damage, limiting the efficacy of cytostatic drugs (Jang *et al.*, 2013; Schiff *et al.*, 2009). New drug delivery systems based in NPs could be a way to reduce side effects and improve the treatment of patients. These nanosystems can target tumours while protecting the drug from degradation and enhancing endocytosis and drug uptake in the cells (Jang *et al.*, 2013; Peer *et al.*, 2007). Due to flawed angiogenesis and poor lymphatic drainage in tumour cells, nanocarriers accumulate around the blood vessels of the tumours due to the enhanced permeability and retention effect (Peer *et al.*, 2007). Also, some nanosystems (such as exosomes) can actively target cells by recognition of surface proteins or other biomolecules. Unfortunately, synthetic nanosystems have the disadvantage of being recognized and eliminated by the reticuloendothelial system (Batrakova and Kim, 2015). On the other hand, NPs like exosomes have an endogenous nature making them perfect candidates for drug delivery due to their stability, low immunogenicity and biocompatible properties (Yong *et al.*, 2019).

The composition of exosomes gives them an innate ability to target other cells, and their structure allows the encapsulation of molecules that can be delivered to such cells. However, cells release exosomes in relatively low amounts and current purification methods can be inefficient, obtaining low yields (Jang *et al.*, 2013). This issue led to several studies with the objective of directing exosomal targeting and to formulate nanocarriers with the same characteristics of exosomes, enhancing their therapeutic effect.

As previously referred, exosomes can target cells based on their molecular composition. Such targeting ligands can, however, be artificially modified (Luan *et al.*, 2017). One method commonly used to engineer desired targeting ligands on exosomes revolves

around plasmid transfection. Alvarez-Erviti *et al.* (2011) transfected plasmids encoding Lamp2b constructs into DCs. One of these constructs was comprised by the rabies viral glycoprotein (RVG) peptide, that binds to acetylcholine receptors. After purification of the exosomes, quantitative PCR assay confirmed the expression of RVG-Lamp2b complexes on the surface of the dendritic cell-derived exosomes. Using fluorescence microscopy, it could be observed that the exosomes targeted neuronal cells (microglia, oligodendrocytes and neurons). The method used for exosomal targeting was, therefore, successful (Alvarez-Erviti *et al.*, 2011).

Since the amount of exosomes released by cells is low, Jang *et al.* (2013) studied a technique to obtain high amounts of exosome-like nanovesicles. Monocytes and macrophages were loaded with DOX, a chemotherapeutic drug. In an extrusion process, the cells were passed through filters with different pore sizes (from 10µm to 1µm). The obtained products were nanovesicles with the same protein composition of the PM of the cells they derived, similar to the composition of exosomes released by the same cells. The protein content (analysed by western blotting) of exosomes and the obtained nanovesicles revealed the presence of CD63, Tsg101, Moesin and Beta-actin in both particles (see Figure 4) (Jang *et al.*, 2013).

In the same study, mice were transplanted with CT26 cells (a colorectal carcinoma cell line that causes tumours when introduced in mice). After tumour growth was observed, the mice were administered with the exosome-like nanovesicles loaded with DOX. Tumour reduction could be observed and there was no reported decrease of body weight and white cells count. In addition to these promising results in terms of therapeutic efficacy, the yield of the exosome-like particles was about 100-fold higher than the quantity of naturally released exosomes (Jang *et al.*, 2013). Hence, the method used for obtention of exosome mimics is a great alternative to study the effects of these particles as drug delivery systems.

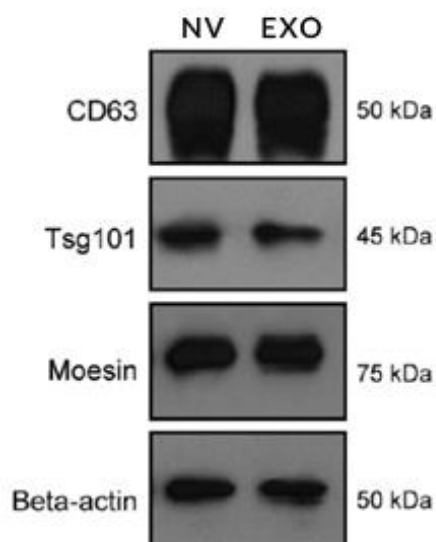


Figure 4 – Western blot results comparison between the nanovesicles (NV) and exosomes (EXO). (Adapted from Jang *et al.*, 2013)

2.4. Immunotherapeutic Potential of Exosomes

As approached before, due to their composition, exosomes could elicit some sort of immune response. Tumour-derived exosomes (TEXs) carry a various array of proteins – such as MCH class I and II, CD9, CD63 – including tumour specific antigens (Naseri *et al.*, 2020). Due to their composition, TEXs can initiate a tumour-targeted immune response. DCs recognize and process antigens from TEXs, presenting them to helper T lymphocytes, and causing their activation. Besides this, TEXs can stimulate Natural Killer (NK) cells. Incubation of Hsp70-expressing TEXs and CD94+ NK cells, stimulates activation of NKs and release of granzyme B (Naseri *et al.*, 2020).

In contrast, TEXs can also have an immunosuppressant effect. For example, the presence of TGF- β I and galectin-I produce a suppressive effect in CD4+ and CD8+ T lymphocytes (Naseri *et al.*, 2020). In addition, TEXs are known to be involved in tumour progression, aiding the process of angiogenesis and metastasis, and inhibiting cancer cells apoptosis (Torre Gomez *et al.*, 2018).

When it started being employed, Chimeric Antigen Receptor T (CAR-T) cell immunotherapy became a promising oncologic therapeutic. Using a viral vector, T cells can be recombined with a specific antigen receptor. Through this method, T lymphocytes are targeted more precisely to a certain tumour-associated antigen, obtaining a more effective cytotoxic response (Tang *et al.*, 2015). Unfortunately, there are still many limitations associated with this method. Since CAR-T cells are active, they can expand uncontrollably. Usually, ten days after CAR-T cell infusion, two thirds of the patients experience an adverse effect called cytokine release syndrome (CRS). CRS is caused by an uncontrollable release of cytokines by the modified T cells (Tang *et al.*, 2015). A way to surpass this effect would be with CAR-T cell derived exosomes. These exosomes, which are released by CAR-T cells, retain the therapeutic capacity of their parent cells. Administrating CAR-T cell derived exosomes would enable control of the *in vivo* expansion that CAR-T cells go through. In this sense, CRS could be avoided (Dutta, 2020).

So far, CAR-T cell therapy has only proved itself efficient in haematological conditions (such as lymphomas). Owing to their nanometric size, CAR-T cell derived exosomes can easily cross the blood-brain barrier or tumour cell membranes. This particularity could abroad CAR-T therapeutic applications to other pathologies (Dutta, 2020; Tang *et al.*, 2015).

3. Isolation Techniques

3.1. Traditional Methods

Due to their composition and functions, exosomes have gained attention as potential tools in diagnosis and treatment of oncologic diseases. Although there is no standardization when it comes to exosome isolation, several methods have been developed to facilitate their extraction (Lobb *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2018).

The following topics give insight into some techniques applied for exosomal extraction, as well as the advantages and disadvantages behind each method. In order to obtain exosomes of higher purity, some of these techniques are performed sequentially (Kamerkar *et al.*, 2017). To confirm the obtained particles after each procedure, it is common to perform western blot and/or flow cytometry analysis (Li *et al.*, 2017; Szatanek *et al.*, 2015).

3.1.1. Differential Centrifugation/Ultracentrifugation

In centrifugation, particles in a sample are subjected to a centrifugal force. This causes the sequential sedimentation of particles, according to their size and density, with heavier/bigger particles depositing first (Li *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2018). In differential centrifugation, three successive centrifugations are performed with increasing centrifugal forces and durations, aiming to remove cells, cellular debris and macromolecules from the rest of the sample (Yu *et al.*, 2018). The three centrifugal forces and durations are 300 x g for 10 minutes, 2.000 x g for 10 minutes and 10.000 x g for 30 minutes, respectively (Szatanek *et al.*, 2015). Between each sequence, the supernatant is aspirated (Li *et al.*, 2017). After the differential centrifugation is performed, there comes a step of ultracentrifugation, applying forces of 100.000 x g for 70 minutes, causing the exosomes to pellet. This step can be repeated, by carefully removing the supernatant and re-suspending the exosome pellet in phosphate buffered saline (PBS), subjecting it to another centrifugation (Li *et al.*, 2017; Szatanek *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2018).

The method of differential centrifugation/ultracentrifugation is the most widely used when it comes to exosome isolation (Yu *et al.*, 2018). It is considered as being easy to perform and not requiring much technical expertise nor sample pre-treatment. In terms of disadvantages, the extreme forces applied in ultracentrifugation could damage the exosomes, making them unviable for further testing. Some nanovesicles tend to be trapped by bigger particles during centrifugation and lost during supernatant aspiration, resulting in low yields (Lobb *et al.*, 2015).

3.1.2. Density Gradient Centrifugation

A variation of ultracentrifugation is the method of density gradient centrifugation. In this technique, the obtained supernatant from a differential centrifugation is placed in a density gradient medium (Li *et al.*, 2017). A sucrose gradient medium is commonly used, being built into an ultracentrifuge tube. Instead of sucrose, an iodixanol gradient can also be used, with reported improvements when it comes to separate nanovesicles from viral particles (Cantin *et al.*, 2008). The density of the medium increases linearly from top to bottom, and after applying a centrifugal force, the particles in the sample separate themselves based on their densities (Li *et al.*, 2017). The sample is placed on the top of the density gradient and ultracentrifuged at 100.000 – 200.000 × g for long periods of time ranging from one to five hours, and with some studies even going as far as 16 hours (Kamerkar *et al.*, 2017; Szatanek *et al.*, 2015). As mentioned, the particles in the sample sediment themselves along the medium until they reach a density equal to their own, the isopycnic position (Li *et al.*, 2017). For exosomes, that density is between 1.10 g/mL to 1.19 g/mL (Szatanek *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2018). The particles of interest can then be extracted by simply collecting the fractions of the suspension.

Unlike the traditional method for ultracentrifugation, this approach prevents the mixture of exosomes with residual proteins or previously separated particles. Having higher separation efficiency, this technique leads to the obtention of exosomes with higher purity (Li *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2018). Regardless of the efficiency of the method, it is more complex in terms of technique, requiring the preparation of the density gradient medium, and having more costs associated. Additionally, the process itself requires more time to be performed than traditional ultracentrifugation (Yu *et al.*, 2018).

3.1.3. Immunoaffinity isolation techniques

The surface of exosomes is covered by proteins and other macromolecules. These molecules can be targeted by corresponding ligands, similar to antigen-antibody interactions (Li *et al.*, 2017). A method for isolation of exosomes has emerged based on the immunoaffinity between their proteins. Immunoaffinity isolation of exosomes uses magnetic beads coated with monoclonal antibodies. These antibodies specifically target proteins present at the membrane of exosomes, such as CD9, CD63 and CD81 (Tauro *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2018). The magnetic beads are added to a sample and attach themselves to the exosomes. After applying a magnetic force, the magnetic beads are retained and the rest of the sample is discarded, remaining the exosomes attached to the beads (Yu *et al.*, 2018). This method allows targeting of exosomes derived from specific cells with unique markers. Mathivanan *et al.*, (2010) used this technique

to isolate exosomes derived from LIM1215 cells, a colorectal carcinoma cell line. In order to capture the exosomes, they used beads coated with A33 antibodies. A33 is a protein commonly expressed in colon epithelial cells. It was safe to assume that exosomes released from LIM1215 cells would express the A33 protein and be targeted by the A33-antibody coated beads (Mathivanan *et al.*, 2010).

After binding to the exosomes, it is difficult to remove the magnetic beads, limiting the use of the exosomes for further studies (Yu *et al.*, 2018). Also, the reagents necessary for this technique are associated with high costs, limiting the accessibility of the method. To avoid interference, cells and cell debris have to be absent from the sample. This implies the need to previously perform other isolation techniques (Li *et al.*, 2017; Mathivanan *et al.*, 2010).

3.1.4. Size Exclusion Chromatography (SEC)

The basis of SEC is sorting particles of a sample according to their size. The particles move across a column that contains the stationary phase, a porous gel (Szatanek *et al.*, 2015). Based on their sizes, the particles will move across the column at different rates. Since larger particles cannot penetrate through the pores of the stationary phase, they are eluted first by the mobile phase (Li *et al.*, 2017). Smaller particles are retained, meaning that they are eluted more slowly. Afterwards, the eluted fraction containing exosomes is collected (Szatanek *et al.*, 2015). Prior to the SEC, it is common to perform a low speed centrifugation to remove larger components from the sample, like cells, cell debris and macromolecules. The sample is also filtered in order to concentrate extracellular vesicles (Szatanek *et al.*, 2015).

Exosomes obtained by SEC show size uniformity and high purity. Unfortunately, this method requires extensive equipment with high costs, rendering it unsuitable to many laboratories. In addition, SEC is associated with long running times (Szatanek *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2018).

3.1.5. Hydrophilic Polymer Precipitation

Polyethylene glycol (PEG) is a polymer commonly used to precipitate macromolecules, proteins, nucleic acids, viruses and other particles (Konoshenko *et al.*, 2018). Due to their hydrophilic nature, PEGs complex with water molecules forcing less soluble components to precipitate (Li *et al.*, 2017). The common procedure starts with incubating the sample with a precipitating solution at 4°C, followed by low speed centrifugation (1500 x g) (Konoshenko *et al.*, 2018). The pelleted exosomes can then be re-suspended in PBS (Konoshenko *et al.*, 2018).

This technique is simple, fast, easy to execute, and does not deform the exosomes. Several precipitating kits specialized for exosome precipitation are commercially available, however, are associated with high costs (Yu *et al.*, 2018). Cells and cell debris have to be removed from the sample to avoid interference. Like the exosomes, proteins, nucleic acids and other particles present in the sample can precipitate after incubation with PEG (Konoshenko *et al.*, 2018). Therefore, it could be necessary to perform additional techniques to minimize the presence of impurities (Konoshenko *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2017).

3.2. Novel Methods

Although widely used, traditional methods still present many limitations: long running times, methods associated with high costs and damages to the integrity of the nanovesicles. In recent years, new techniques have been developed to isolate and identify exosomes, attempting to surpass some disadvantages of traditional methods (Yu *et al.*, 2018).

3.2.1. Stirred Ultrafiltration

The principle of stirred ultrafiltration is similar to traditional membrane filtration. Particles in a sample are separated depending on their size. Based on the pore size of the ultrafiltration membrane, exosomes and small molecules pass through the filter along with the solvent (Yu *et al.*, 2018). The sample is subjected to constant stirring, to prevent the membrane from becoming clogged by bigger particles that were retained. It is also required an external source of pressure, usually nitrogen, to push the sample through the filtration membrane. Afterwards, the ultrafiltration membrane is usually rinsed with PBS (Lobb *et al.*, 2015).

This method allows the purification of large volumes of sample, obtaining large amounts of exosomes in little time. In comparison to the forces applied in ultracentrifugation, there is a lowered risk of damaging the integrity of exosomes when using this technique (Yu *et al.*, 2018). However, the membrane only discriminates particles based on their size. Small molecules and other particles can pass through the filter, diminishing the purity of the isolate (Li *et al.*, 2017).

3.2.2. Nanoplasmon-Enhanced Scattering (nPES)

The purpose of nPES is not directed to exosome isolation in the same way as the previously mentioned methods. The main goal of this technique is to detect and quantify exosomes present in a sample in a rapid, sensitive and specific way (Yu *et al.*, 2018). The methodology resembles an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A sensor chip is coated with antibodies against typical exosomal markers (for example, CD81) (Liang *et al.*,

2017). When a sample is added to a well, exosomes that express the marker are retained and accumulated in the wells. Afterwards, gold NPs, also coated with exosomal markers (antibodies for CD9 or CD63), are added to the medium. According to their size and shape, the gold NPs scatter light at different wavelengths. The sensor chip is then placed under a dark field microscope to analyse the light scattering (Liang *et al.*, 2017). Based on the scatter area, the amount of exosomes can be quantified (Yu *et al.*, 2018).

Liang *et al.*, (2017) observed that exosomes secreted by pancreatic cancer cells express the ephrin type-A receptor 2 (EphA2). In this study, they used antibodies for EphA2 and used nPES to identify exosomes bearing this protein. This method successfully detected EphA2-expressing exosomes. In addition to this, it was also possible to quantify exosomes of patients with pancreatic cancer, and compare results with post-treatment samples (Liang *et al.*, 2017). Besides diagnosis, the nPES technique could give insight into the success rate of oncologic treatments by monitoring exosomes expressing oncologic markers (Liang *et al.*, 2017).

4. Exosome Loading Strategies

Some exosomes naturally function as cargo deliverers from one cell to another. Taking advantage of this ability, these particles can be artificially loaded with drugs and nucleic acids. The several existing techniques can be divided in pre-loading and post-loading methods. In pre-loading methods, the exosomes are indirectly loaded with the drug, unlike post-loading methods.

4.1. Pre-Loading Methods

4.1.1. Incubation with Donor Cells

In this technique, parent cells are incubated with a drug at room temperature. When the cells release extracellular vesicles, like exosomes, these are loaded with the drug (Luan *et al.*, 2017). Although relatively simple to execute, this method does not allow to evaluate the loading efficiency of the drug (Antimisiaris, Mourtas and Marazioti, 2018).

4.2. Post-Loading Methods

4.2.1. Incubation with Exosomes

Extracted and purified exosomes are incubated with a drug, similarly to the previous method. Due to the concentration gradient, the drug molecules diffuse into the exosomes (Luan *et al.*, 2017).

Both incubation techniques, considered passive methods to load drugs into nanosystems, are simple to execute (Luan *et al.*, 2017). However, due to the hydrophobic interactions between certain drugs and the lipid bilayer of the nanovesicles, the loading efficiency is relatively low (Luan *et al.*, 2017).

4.2.2. Electroporation

In electroporation, exosomes are placed in a conductive solution and subjected to an electrical field (Luan *et al.*, 2017). The applied current causes the phospholipid bilayer of the exosomes to rearrange, forming small pores in their membrane (Luan *et al.*, 2017). The presence of these pores leads to the diffusion of drugs and/or nucleotides to the interior of the exosomes. After the loading process is completed, the integrity of the PM is restored (Antimisiaris, Mourtas and Marazioti, 2018).

Electroporation is the selected method to encapsulate nucleotides. siRNA is negatively charged and cannot diffuse through the hydrophilic shell of the PM (Wahlgren *et al.*, 2012). Nevertheless, if an optimized buffer is not used, electroporation could cause RNA aggregation and disrupt the stability of the exosomes, reducing the loading efficiency (Antimisiaris, Mourtas and Marazioti, 2018). Johnsen *et al.* (2016) suggested the use of a trehalose containing buffer to maintain the integrity of the exosomes.

4.2.3. Sonication

This technique uses ultrasonic frequencies to agitate particles in a suspension. The exosomes are mixed with the drug and a probe sonicator induces deformation of the PM of the nanovesicles (Antimisiaris, Mourtas and Marazioti, 2018). While the membrane is deformed, drugs diffuse inside the exosomes. The integrity of the membrane is reported to be restored about an hour after the sonication process (Kim *et al.*, 2016)

Kim *et al.* (2016) loaded exosomes with PTX using different methods: incubation with free exosomes, electroporation and sonication. The obtained exosome-PTX nanosystems were purified using SEC and analysed by high performance liquid chromatography (HPLC) to evaluate the loading efficiency of each method (Kim *et al.*, 2016). They concluded that sonication loaded higher amounts of PTX into the exosomes, followed by electroporation and drug incubation with free exosomes (Kim *et al.*, 2016).

4.2.4. Freeze/Thaw Cycles

In this method, exosomes are incubated with the drug. Afterwards, they are rapidly frozen at -80°C and thawed at room temperature (Antimisiaris, Mourtas and Marazioti, 2018). In each cycle, the PM is disrupted, allowing drug molecules to diffuse inside the exosomes (Costa, Xu and Burgess, 2014). The cycles are repeated several times to achieve equal drug concentrations inside and outside the nanovesicles (Costa, Xu and Burgess, 2014).

Considering loading capacity, this method is lower than other techniques, such as electroporation or sonication (Luan *et al.*, 2017).

4.2.5. Saponin Assisted Incubation

In this methodology, exosomes are incubated with the drug and saponins. Saponins are surfactant molecules that form complexes with cholesterol, present in the PM of exosomes, generating pores (Luan *et al.*, 2017). This increase in permeability allows for easier loading of hydrophilic molecules, when compared to simple incubation (Fuhrmann *et al.*, 2015).

The exact mechanism how saponins interact with cholesterol is not yet to be understood. However, they interact the same way with cholesterol on the PM of red blood cells (Podolak, Galanty and Sobolewska, 2010). This fact could be quite harmful when used in *in vivo* studies, due to the haemolytic activity of saponins. When using this technique, saponin concentrations should be minimal, and exosomes have to be thoroughly washed after being incubated with saponins (Podolak, Galanty and Sobolewska, 2010).

5. Exosomes as Nanosystems of Nucleic Acids and Drugs

5.1. Paclitaxel

PTX is one of the mostly used anticancer drug. It is naturally found in the bark of *Taxus brevifolia*, although, new extraction methods have been developed to obtain this drug (Zhu and Chen, 2019). PTX promotes the assembly of tubulin into microtubules, stabilizing the microtubules and inhibiting their dissociation. Since the microtubules do not dissociate, cell cycle progression is blocked, inhibiting the growth of cancer cells (See Figure 5) (Weaver, 2014).

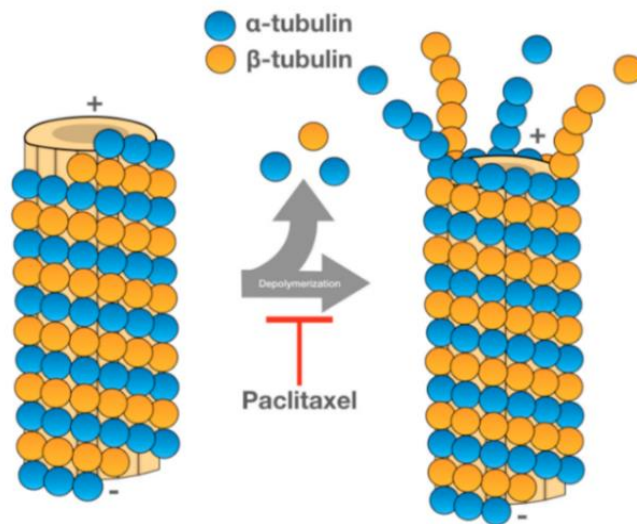


Figure 5 – Representation of how PTX promotes microtubule stabilization. (Adapted from Fong, Durkin and Lee, 2019)

PTX has been used in the treatment of several types of cancer, namely colorectal, ovarian, breast or lung cancer (Weaver, 2014; Zhu and Chen, 2019). The efficiency of PTX and other chemotherapeutic drugs is being limited by the emergence of multiple drug resistance (MDR) (Liu *et al.*, 2018). The overexpression of ATP-binding cassette (ABC) transporters, namely, the drug efflux P-glycoprotein (Pgp) transporter, is one of the mechanisms mediating MDR in cancer cells (Kim *et al.*, 2016). To overcome MDR, Kim *et al.* (2016) evaluated oncological treatment efficiency of PTX-loaded exosomes.

The exosomes used in this study were extracted from a murine macrophage cell line, using a precipitating polymer (ExoQuick-TC™ kit) (Kim *et al.*, 2016). As previously mentioned, three loading methods were tested in order to evaluate the loading capacity of each technique. The exosomes loaded with PTX were purified using SEC and analysed by HPLC. The exosome-PTX complex obtained by sonication was used for further studies since it showed better values of loaded PTX (Kim *et al.*, 2016).

To evaluate the antineoplastic effect of exosome-PTX complex, a Lewis Lung Carcinoma mouse model was used. Using a Lentiviral vector, 3LL-M27 cells (a carcinoma cell line with overexpression of Pgp) were transfected in order to encode fluorescent proteins. As such, tumoral growth can be accompanied via fluorescence imaging techniques (Kim *et al.*, 2016).

The mice were administered intravenously with the modified 3LL-M27 cells. The carcinoma cells were allowed to establish for 48 hours. To begin the treatment, the mice were split through different groups, being administered with saline, free PTX and with the exosome-

PTX system, respectively (Kim *et al.*, 2016). Tumour progression was accompanied by monitoring and quantifying the chemiluminescent signal emitted by the modified carcinoma cells. *In vivo* images show the progression of the metastasis in the different treatment groups (Figure 6). 22 days after the administration of the 3LL-M27 cells, the mice were sacrificed. Lung sections were observed via confocal microscopy (Figure 7). Mice administered with saline present the biggest tumour growth. Both free PTX and exosome-PTX complex inhibit tumour progression. When comparing PTX based treatments, the exosome-PTX complex proved to be more effective at stopping metastasis progression than free PTX (Kim *et al.*, 2016).

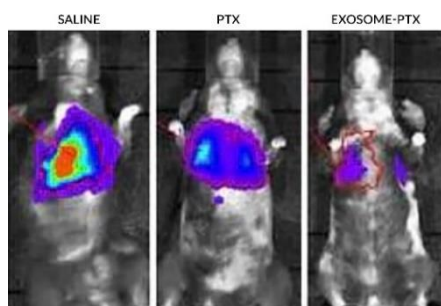


Figure 6 – *In vivo* imaging of chemiluminescent signal monitoring in each treatment group. (Adapted from Kim *et al.*, 2016)

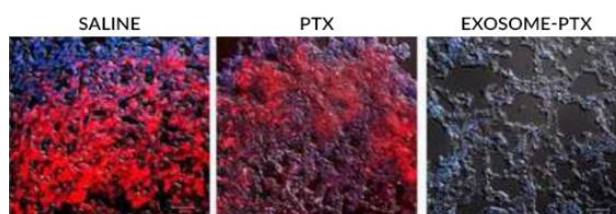


Figure 7 – Confocal microscopy of lung sections of the sacrificed mice. It is possible to observe no detection of fluorescence in the Exosome-PTX treated cells, when compared to the non-treated control group (saline). (Adapted from Kim *et al.*, 2016)

5.2. siRNA

siRNA belongs to a class of small, double stranded, non-coding RNAs, composed of 20 to 30 nucleotides. In a mechanism of RNA interference, these molecules can target complementary mRNA. This way, it causes mRNA degradation and subsequent gene silencing (Dana *et al.*, 2017).

Due to their mechanism and the possibility of exosome loading, exosome-siRNA complexes are emerging as a therapeutic agent in oncologic conditions. Owing to an uncontrolled tumour growth and metastasis, head and neck cancer (HNC) still has a poor prognosis (Wang *et al.*, 2019). One of the reasons that make HNC so malignant is the epithelial-mesenchymal transition (EMT). EMT is a transforming process that some epithelial cells go through, leading to the formation of mesenchymal cells (Dave *et al.*, 2011). EMT is usually associated with tumour growth and cancer progression. Cancer cells become more invasive and form metastases easier (Dave *et al.*, 2011). The transient receptor potential polycystic 2 (TRPP2), an ion channel, is one of the regulating mechanisms of EMT in HCN.

Targeting TRPP2 could be a way to inhibit tumour progression in HNC, which was the goal of a developed study by Wang *et al.* (2019).

Wang *et al.* (2019) investigated if TRPP2 siRNA would have any effect in TRPP2 gene knockdown and further influence in HNC growth and metastasis. To achieve this, a TRPP2 siRNA-exosome complex was prepared and used. Exosomes were obtained from HEK 293 cells using PEG as precipitating agent (a centrifugation was previously performed to remove cells and cell debris). Exosomes were incubated with the TRPP2 siRNA, with the latter being loaded and encapsulated. siRNA is susceptible to the action of many enzymes, such as nucleases, being fundamental that exosomes provide some sort of protection to the cargo they are carrying. To assess this, an agarose gel electrophoresis was performed to evaluate the stability of free TRPP2 siRNA and the TRPP2 siRNA-exosome complex against RNA nucleases (see Figure 8). Free TRPP2 siRNA was degraded after 5 minutes, whereas exosome-encapsulated TRPP2 siRNA maintained stability, proving that exosomes shield siRNA from enzyme degradation (Wang *et al.*, 2019).

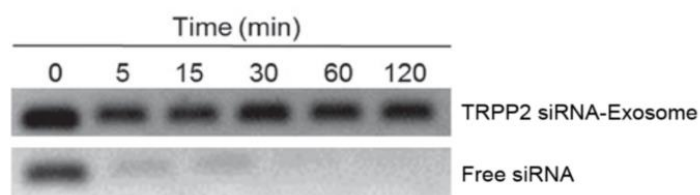


Figure 8 – Results of agarose gel electrophoresis. Each sample was incubated with RNA nucleases, free siRNA was mostly degraded after 5 minutes. (Adapted from Wang *et al.*, 2019)

FaDu cells, a human squamous carcinoma cell line, were used to evaluate TRPP2 siRNA-exosome complex efficiency. The FaDu cells were incubated with free TRPP2 siRNA (control) and with the exosomes. Western blot analysis was performed to confirm if TRPP2 suppression occurred. The results indicated that there was a significant reduction of TRPP2 expression in FaDu cells treated with the TRPP2 siRNA-exosomes (see Figure 9) (Wang *et al.*, 2019). Since TRPP2 is associated with EMT, the authors of the study also confirmed the influence that the treatment had in this process. Common biomarkers of EMT are E-cadherin (low levels), vimentin and N-cadherin (both with increased levels). For these biomarkers, western blot analysis was also performed, all of them with promising results (Figure 9). There was an increase in the expression of E-cadherin and a reduction of both vimentin and N-cadherin, evidencing the potential of TRPP2 siRNA-exosomes as a treatment of HNC (Wang *et al.*, 2019).

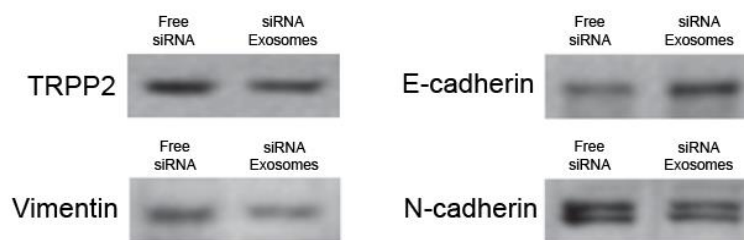


Figure 9 – Results of western blot analysis for TRPP2 expression and EMT biomarkers. Free siRNA was used as control. (Adapted from Wang *et al.*, 2019)

5.3. Doxorubicin-loaded Nanoparticles

DOX belongs to a class of drugs routinely used in chemotherapy, the anthracyclines. It is recommended in the treatment of several cancers (ovarian, breast, lung, Hodgkin's lymphoma) (Thorn *et al.*, 2011). The way DOX fights cancer cells has been described by two mechanisms. One occurs in the nucleus of the cell, where DOX intercalates itself with DNA, impairing the activity of topoisomerase-II and blocking nucleic acid transcription. The other way involves oxidation of DOX into semiquinone with posterior transformation in DOX again. This process generates reactive oxygen species that cause oxidative stress and cell membrane damage, eventually causing cell death (Thorn *et al.*, 2011). Besides MDR caused by ABC transporters (like the previously mentioned Pgp), the use of DOX is limited due to the cardiotoxic effect it causes.

As previously mentioned, the use of nano-based technologies in drug delivery seems like an almost perfect solution. However, exogenous particles have the disadvantage of being recognized and eliminated by the immune system (Luan *et al.*, 2017). To overcome this, Yong *et al.* (2019) developed biomimetic NPs, converging the efficiency of NPs with the endogenous benefits of exosomes.

Porous silicon NPs were loaded with DOX. The choice of these NPs was based on their biocompatibility and drug loading capacity. Afterwards, the DOX-loaded NPs were incubated with H22 cells, a mouse hepatocellular carcinoma cell line. Exosomes were obtained by centrifugation followed by differential centrifugation. Cells were able to incorporate DOX-NPs and release DOX-NP-Exosomes (Yong *et al.*, 2019). The same procedure was applied to other cell lines, obtaining DOX-NP-Exosomes from different origins.

Another cause of MDR is the existence of cancer stem cells (CSC). This population of cells has high expressions of ABC transporters and an elevated self-renewal rate. These properties render most treatments ineffective (Yong *et al.*, 2019). H22 CSCs were treated

with DOX-NP-Exosomes to evaluate the cytotoxic effectiveness of the nano-complex. The procedure was done with different groups, containing free DOX, DOX-NPs and DOX-NP-Exosomes, respectively. The results are represented in Figure 10. Comparing with the other methods, there is an accentuated reduction of H22 CSCs in cells treated with the DOX-NP-Exosome complex (Yong *et al.*, 2019).

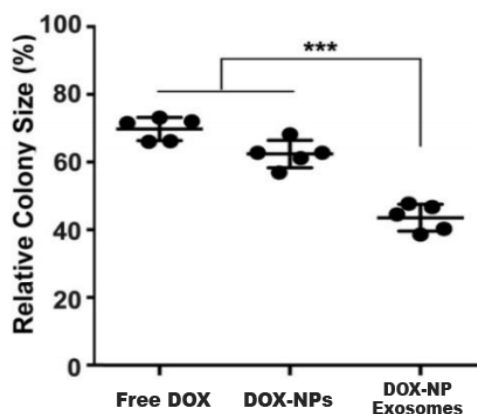


Figure 10 – H22 CSCs colony size after DOX administration, delivered as free drug, in NPs and NPs contained in exosomes. (Adapted from Yong *et al.*, 2019)

To assess *in vivo* results, a model was used with H22 tumour-bearing mice. The mice were administered with different DOX formulations (free DOX, DOX-NPs and DOX-NP-Exosomes), with a drug concentration of 0.5 mg/kg. A fourth group was administered with free DOX at a higher concentration, of 4 mg/kg. Free DOX and DOX-NPs (at a dosage of 0.5 mg/kg) showed weak tumour growth inhibiting capabilities. The most effective treatment was with DOX-NP-Exosomes, which proved to be even more effective than high dose of free DOX (4 mg/kg). This formulation showed the biggest tumour mass reduction (see Figure 11) and also increased mice survival time. Yong *et al.* (2019) developed an exosomal formulation, containing NPs loaded with a therapeutic agent. The presented drug delivery system proved itself to be biocompatible, not triggering an immune response. In terms of MDR, this system exhibits higher tumour accumulation in comparison to other formulations (like free DOX), who suffer efflux by the action of ABC transporters (Yong *et al.*, 2019).

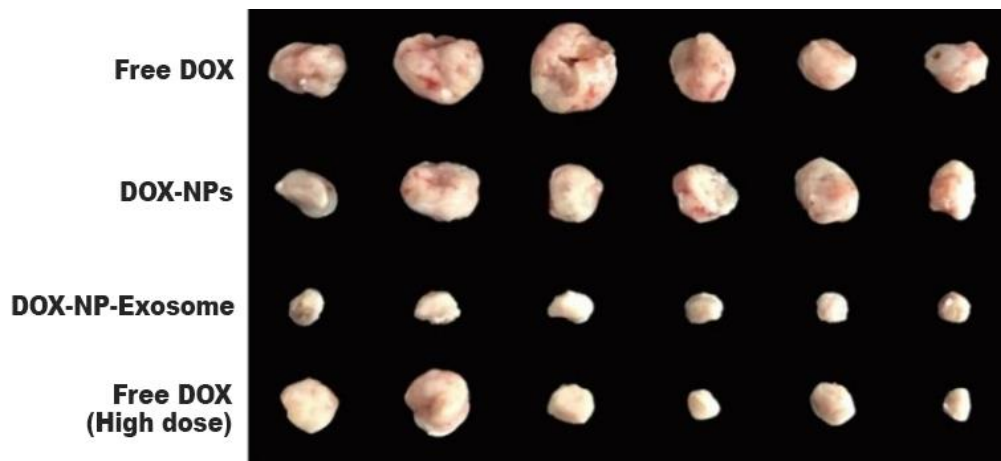


Figure 11 – Tumour masses of mice after intravenous administration of different formulations of DOX. (Adapted from Yong *et al.*, 2019)

6. Conclusions and Future Perspectives

MDR by cancer cells is one of the greatest threats to a positive outcome in oncological treatment. Although many resistance mechanisms have been acknowledged, most of them still remain without a successful solution. Exosome-based treatments shed a light on this area. As seen in the mentioned *in vivo* studies, exosome-containing formulations were more efficient in diminishing tumour cells when compared to conventional treatments (administration of free drug). In many studies, adverse reactions common to anticancer agents were much less frequent in mice groups treated with exosomes. However, these studies were only performed in animals, and the results obtained could not be applicable in humans.

In previous years, clinical trials have been performed to evaluate the effectiveness of vaccines containing exosomes in immunotherapy. In 2005, a Phase I Clinical Trial was performed using autologous exosomes derived from DCs, loaded with melanoma antigen gene (MAGE) proteins. This study aimed to test the safety and effectiveness of these exosomes on 13 patients with non-small cell lung cancer. It was possible to observe an increase of activity by NK cells, as well as an immune response against MAGE (determined by delayed type hypersensitivity test). Overall, there was a prolonged stabilization of the disease and only mild adverse reactions were reported (mostly, topical reactions related with the injection) (Morse *et al.*, 2005). Two years later, in 2007, a Phase I Clinical Trial was conducted covering 40 patients suffering from colorectal cancer. The exosomes used in this study were obtained from ascitic fluid. One group was administered with the exosomes alone, another group was administered with a combination of exosomes and granulocyte-macrophage colony-stimulating

factor (GM-CSF). Results showed that groups inoculated with the GM-CSF adjuvant had a more efficient induction of a tumour-antigen specific response by Cytotoxic T Lymphocytes. Similarly to the previously mentioned Clinical Trial, the reported adverse effects were related with injection site reactions, and some patients claimed to feel fatigued (Dai *et al.*, 2008). Besides the two mentioned trials, other studies took place to assess exosome safety and efficiency in cancer therapies. In recent years, more clinic trials have been registered and are still recruiting candidates (Table II). Also, besides the treatment of oncologic illnesses, there are trials related with the treatment of other illnesses, like chronic diseases (for example, chronic kidney disease or type I diabetes) (Chen *et al.*, 2020).

Table II – On-going clinical trials with exosome-based therapies for oncological treatment. (Adapted from ClinicalTrials.gov, 2020)

Year	Disease	Phase	Exosome Source	Formulation	Status
2013	Malignant Ascites	Phase II	Tumour-cell derived	Exosomes loaded with Chemotherapeutic drugs	Unknown
2016	Malignant Pleural Effusion	Phase II	Tumour-cell derived	Exosomes loaded with cisplatin	Recruiting
2020	Stage IV Pancreatic Cancer	Phase I	Mesenchymal Stromal Cells	Exosomes loaded with KRAS G12D siRNA	Not yet recruiting

There is still much to be learned about the biogenesis of exosomes. It is known that the ESCRT is involved, as well as several ESCRT-independent methods. However, there are many in-between steps that are still unexplained and require further studies. Fully understanding the processes behind the formation of these nanovesicles would be a great advantage. Most laboratorial techniques for exosome isolation suffer from low yields. A better knowledge on the nature of exosomes could help develop new techniques, aiming to improve exosome production and collection.

Until now, there are no approved products containing exosomes. Hopefully, that paradigm will change in the following years. Many studies concerning exosomes have proved their role in stimulating the immune system and their ability to load therapeutic molecules. Recent reports have tried to develop new formulations, based on the characteristics of exosomes. With several positive results in several investigations, it is undeniable that exosomes represent a promising multiparametric nano-approach for cancer therapy.

7. Bibliography

ALVAREZ-ERVITI, Lydia *et al.* - **Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes.** *Nature Biotechnology*. ISSN 10870156. 29:4 (2011) 341–345. doi: 10.1038/nbt.1807.

AMBROS, Victor - **The functions of animal microRNAs.** *Nature*. ISSN 00280836. 431:7006 (2004) 350–355. doi: 10.1038/nature02871.

ANAND, Preetha *et al.* - **Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes.** *Pharmaceutical Research*. ISSN 1573904X. 25:9 (2008) 2097–2116. doi: 10.1007/s11095-008-9661-9.

ANDREU, Zoraida; YÁÑEZ-MÓ, María - **Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function.** *Frontiers in Immunology*. ISSN 16643224. 5:SEP (2014) 1–12. doi: 10.3389/fimmu.2014.00442.

ANTIMISIARIS, Sophia G. *et al.* - **Exosomes and exosome-inspired vesicles for targeted drug delivery.** *Pharmaceutics*. ISSN 19994923. 10:4 (2018). doi: 10.3390/pharmaceutics10040218.

BABST, Markus - **A Protein's Final ESCRT.** *Traffic*. 6 (2005) 2–9. doi: 10.1111/j.1600-0854.2005.00246.x.

BATRAKOVA, Elena V.; KIM, Myung Soo - **Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery.** *Journal of Controlled Release*. ISSN 18734995. 219: (2015) 396–405. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.07.030.

BOBRIE, Angélique *et al.* - **Exosome Secretion: Molecular Mechanisms and Roles in Immune Responses.** *Traffic*. ISSN 13989219. 12:12 (2011) 1659–1668. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01225.x.

CANTIN, Réjean *et al.* - **Discrimination between exosomes and HIV-1: Purification of both vesicles from cell-free supernatants.** *Journal of Immunological Methods*. ISSN 00221759. 338:1–2 (2008) 21–30. doi: 10.1016/j.jim.2008.07.007.

CHARRIN, Stéphanie *et al.* - **Lateral organization of membrane proteins: Tetraspanins spin their web.** *Biochemical Journal*. ISSN 14708728. 420:2 (2009) 133–154. doi: 10.1042/BJ20082422.

CHEN, Yu Shuan *et al.* - **Exosomes in clinical trial and their production in compliance with good manufacturing practice.** Tzu Chi Medical Journal. ISSN 10163190. 32:2 (2020) 113–120. doi: 10.4103/tcmj.tcmj_182_19.

CLAYTON, Aled *et al.* - **Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes.** Journal of Cell Science. ISSN 00219533. 118:16 (2005) 3631–3638. doi: 10.1242/jcs.02494.

ClinicalTrials.gov - **Find Studies** [Accessed on 03/10/2020]. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

COLOMBO, Marina *et al.* - **Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles.** Annual Review of Cell and Developmental Biology. ISSN 1081-0706. 30:1 (2014) 255–289. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.

CONDE-VANCELLS, Javier *et al.* - **Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes.** Journal of Proteome Research. ISSN 15353893. 7:12 (2008) 5157–5166. doi: 10.1021/pr8004887.

D.L.CHUNG, Deborah - **Cement-Matrix Composites.** Carbon Composites. Second Edition, Elsevier Inc. (2017). doi: 10.1016/B978-0-12-804459-9.00006-3

DAI, Shengming *et al.* - **Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer.** Molecular Therapy. ISSN 15250024. 16:4 (2008) 782–790. doi: 10.1038/mt.2008.1.

DANA, Hassan *et al.* - **Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA.** International journal of biomedical science: IJBS. ISSN 1550-9702. 13:2 (2017) 48–57.

DAVE, Bhuvanesh *et al.* - **Epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cells and treatment resistance.** Breast Cancer Research. ISSN 1465542X. 14:1 (2011) 1–5. doi: 10.1186/bcr2938.

DUTTA, Abhishek - **Exosomes-based cell-free cancer therapy: a novel strategy for targeted therapy.** Immunological Medicine. ISSN 25785826. 0:0 (2020) 1–8. doi: 10.1080/25785826.2020.1818482.

ExoCarta - **EXOSOME PROTEIN, RNA AND LIPID DATABASE** [Accessed on 28/04/2020]. Available online at: <http://www.exocarta.org/>

FADER, Claudio Marcelo *et al.* - **TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways.** Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research. ISSN 01674889. 1793:12

(2009) 1901–1916. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.09.011.

FÉVRIER, Benoit; RAPOSO, Graça - **Exosomes: Endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages**. *Current Opinion in Cell Biology*. ISSN 09550674. 16:4 (2004) 415–421. doi: 10.1016/j.ceb.2004.06.003.

FONG, Alexis *et al.* - **The potential of combining tubulin-targeting anticancer therapeutics and immune therapy**. *International Journal of Molecular Sciences*. ISSN 14220067. 20:3 (2019). doi: 10.3390/ijms20030586.

FRYDRYCHOWICZ, M. *et al.* - **Exosomes-structure, biogenesis and biological role in non-small-cell lung cancer**. *Scandinavian Journal of Immunology*. ISSN 13653083. 81:1 (2015) 2–10. doi: 10.1111/sji.12247.

FUHRMANN, Gregor *et al.* - **Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins**. *Journal of Controlled Release*. ISSN 18734995. 205: (2015) 35–44. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.11.029.

GUSACHENKO, O. N. *et al.* - **Nucleic acids in exosomes: Disease markers and intercellular communication molecules**. *Biochemistry (Moscow)*. ISSN 00062979. 78:1 (2013) 1–7. doi: 10.1134/S000629791301001X.

HA, Dinh *et al.* - **Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges**. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. ISSN 22113835. 6:4 (2016) 287–296. doi: 10.1016/j.apsb.2016.02.001.

HANSON, Phyllis I.; CASHIKAR, Anil - **Multivesicular Body Morphogenesis**. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. ISSN 1081-0706. 28:1 (2012) 337–362. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154152.

HEMLER, Martin E. - **Tetraspanin Proteins Mediate Cellular Penetration, Invasion, and Fusion Events and Define a Novel Type of Membrane Microdomain**. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. ISSN 1081-0706. 19:1 (2003) 397–422. doi: 10.1146/annurev.cellbio.19.111301.153609.

HEMLER, Martin E. - **Tetraspanin functions and associated microdomains**. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. ISSN 14710072. 6:10 (2005) 801–811. doi: 10.1038/nrm1736.

HENNE, William M. *et al.* - **The ESCRT Pathway**. *Developmental Cell*. ISSN 15345807. 21:1 (2011) 77–91. doi: 10.1016/j.devcel.2011.05.015.

- HURLEY, James H. - **The ESCRT complexes**. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. ISSN 10409238. 45:6 (2010) 463–487. doi: 10.3109/10409238.2010.502516.
- JANG, Su Chul *et al.* - **Bioinspired exosome-mimetic nanovesicles for targeted delivery of chemotherapeutics to malignant tumors**. *ACS Nano*. ISSN 1936086X. 7:9 (2013) 7698–7710. doi: 10.1021/nn402232g.
- JOHNSEN, Kasper Bendix *et al.* - **Evaluation of electroporation-induced adverse effects on adipose-derived stem cell exosomes**. *Cytotechnology*. ISSN 15730778. 68:5 (2016) 2125–2138. doi: 10.1007/s10616-016-9952-7.
- JOHNSTONE, R. M. *et al.* - **Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)**. *Journal of Biological Chemistry*. ISSN 00219258. 262:19 (1987) 9412–9420.
- KALLURI, Raghu; LEBLEU, Valerie S. - **The biology, function, and biomedical applications of exosomes**. *Science*. ISSN 10959203. 367:6478 (2020). doi: 10.1126/science.aau6977.
- KAMERKAR, Sushrut *et al.* - **Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer**. *Nature*. ISSN 14764687. 546:7659 (2017) 498–503. doi: 10.1038/nature22341.
- KATZMANN, David J. *et al.* - **Receptor downregulation and multivesicular-body sorting**. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. ISSN 14710072. 3:12 (2002) 893–905. doi: 10.1038/nrm973.
- KIM, Myung Soo *et al.* - **Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells**. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. ISSN 15499642. 12:3 (2016) 655–664. doi: 10.1016/j.nano.2015.10.012.
- KONOSHENKO, Maria Yu *et al.* - **Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends**. *BioMed Research International*. ISSN 23146141. (2018). doi: 10.1155/2018/8545347.
- KOSAKA, Nobuyoshi *et al.* - **Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells**. *Journal of Biological Chemistry*. ISSN 00219258. 285:23 (2010) 17442–17452. doi: 10.1074/jbc.M110.107821.
- KOWAL, Joanna *et al.* - **Biogenesis and secretion of exosomes**. *Current Opinion in Cell Biology*. ISSN 18790410. 29:1 (2014) 116–125. doi: 10.1016/j.ceb.2014.05.004.

LI, Pin *et al.* - **Progress in exosome isolation techniques.** *Theranostics*. ISSN 18387640. 7:3 (2017) 789–804. doi: 10.7150/thno.18133.

LI, Song Pei *et al.* - **Exosomal cargo-loading and synthetic exosome-mimics as potential therapeutic tools.** *Acta Pharmacologica Sinica*. ISSN 17457254. 39:4 (2018) 542–551. doi: 10.1038/aps.2017.178.

LIANG, Kai *et al.* - **Nanoplasmonic quantification of tumour-derived extracellular vesicles in plasma microsamples for diagnosis and treatment monitoring.** *Nature Biomedical Engineering*. ISSN 2157846X. 1:4 (2017) 1–11. doi: 10.1038/s41551-016-0021.

LIU, Jianbing *et al.* - **A Tailored DNA Nanoplatfrom for Synergistic RNAi-/Chemotherapy of Multidrug-Resistant Tumors.** *Angewandte Chemie - International Edition*. ISSN 15213773. 57:47 (2018) 15486–15490. doi: 10.1002/anie.201809452.

LOBB, Richard J. *et al.* - **Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma.** *Journal of Extracellular Vesicles*. ISSN 20013078. 4:1 (2015). doi: 10.3402/jev.v4.27031.

LUAN, Xin *et al.* - **Engineering exosomes as refined biological nanoplatfroms for drug delivery.** *Acta Pharmacologica Sinica*. ISSN 17457254. 38:6 (2017) 754–763. doi: 10.1038/aps.2017.12.

MANSOORI, Behzad *et al.* - **The different mechanisms of cancer drug resistance: A brief review.** *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. ISSN 22517308. 7:3 (2017) 339–348. doi: 10.15171/apb.2017.041.

MATHIVANAN, Suresh *et al.* - **Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature.** *Molecular and Cellular Proteomics*. ISSN 15359476. 9:2 (2010) 197–208. doi: 10.1074/mcp.M900152-MCP200.

MELO, Sonia A. *et al.* - **Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis.** *Cancer Cell*. ISSN 18783686. 26:5 (2014) 707–721. doi: 10.1016/j.ccell.2014.09.005.

MORSE, Michael A. *et al.* - **A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer.** *Journal of Translational Medicine*. ISSN 14795876. 3: (2005) 1–8. doi: 10.1186/1479-5876-3-9.

NASERI, Marzieh *et al.* - **Tumor-derived exosomes: the next generation of promising**

cell-free vaccines in cancer immunotherapy. *Oncolmmunology*. ISSN 2162402X. 9:1 (2020). doi: 10.1080/2162402X.2020.1779991.

NIEL, Guillaume VAN *et al.* - **The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent and -Dependent Endosomal Sorting during Melanogenesis.** *Developmental Cell*. ISSN 15345807. 21:4 (2011) 708–721. doi: 10.1016/j.devcel.2011.08.019.

OSTROWSKI, Matias *et al.* - **Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway.** *Nature Cell Biology*. ISSN 14657392. 12:1 (2010) 19–30. doi: 10.1038/ncb2000.

PAN, Bin Tao; JOHNSTONE, Rose M. - **Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor.** *Cell*. ISSN 00928674. 33:3 (1983) 967–978. doi: 10.1016/0092-8674(83)90040-5.

PEER, Dan *et al.* - **Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy.** *Nature Nanotechnology*. ISSN 1748-3387. 2: (2007) 751–760. doi: 10.1038/nnano.2007.387.

PODOLAK, Irma *et al.* - **Saponins as cytotoxic agents: A review.** *Phytochemistry Reviews*. ISSN 15687767. 9:3 (2010) 425–474. doi: 10.1007/s11101-010-9183-z.

POLS, Maaïke S.; KLUMPERMAN, Judith - **Trafficking and function of the tetraspanin CD63.** *Experimental Cell Research*. ISSN 10902422. 315:9 (2009) 1584–1592. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.09.020.

PONOMARENKO, M. *et al.* - **Heat Shock Proteins [S.I.]** : Elsevier Inc., 2013 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00685-9>>. ISBN 9780080961569.

PROUX-GILLARDEAUX, Véronique *et al.* - **Expression of the Longin domain of TI-VAMP impairs lysosomal secretion and epithelial cell migration.** *Biology of the Cell*. ISSN 0248-4900. 99:5 (2007) 261–271. doi: 10.1042/bc20060097.

QIN, Jun; XU, Qing - **Functions and applications of exosomes.** *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. ISSN 00016837. 71:4 (2014) 537–543.

RAO, Swathi K. *et al.* - **Identification of SNAREs Involved in Synaptotagmin VII-regulated Lysosomal Exocytosis.** *Journal of Biological Chemistry*. ISSN 00219258. 279:19 (2004) 20471–20479. doi: 10.1074/jbc.M400798200.

RAPOSO, Graça *et al.* - **B Lymphocytes Secrete Antigen-presenting Vesicles.** 183:March (1996).

- REDDY, V. Sudhakar *et al.* - **Extracellular small heat shock proteins: exosomal biogenesis and function.** Cell Stress and Chaperones. ISSN 14661268. 23:3 (2018) 441–454. doi: 10.1007/s12192-017-0856-z.
- SARKAR, Sibaji *et al.* - **Cancer development, progression, and therapy: An epigenetic overview.** International Journal of Molecular Sciences. ISSN 16616596. 14:10 (2013) 21087–21113. doi: 10.3390/ijms141021087.
- SKOTLAND, Tore *et al.* - **Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology.** Journal of Lipid Research. ISSN 15397262. 60:1 (2019) 9–18. doi: 10.1194/jlr.R084343.
- STOORVOGEL, Willem *et al.* - **The biogenesis and functions of exosomes.** Traffic. ISSN 13989219. 3:5 (2002) 321–330. doi: 10.1034/j.1600-0854.2002.30502.x.
- STUFFERS, Susanne *et al.* - **Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs.** Traffic. ISSN 13989219. 10:7 (2009) 925–937. doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00920.x.
- SUBRA, Caroline *et al.* - **Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies.** Biochimie. ISSN 03009084. 89:2 (2007) 205–212. doi: 10.1016/j.biochi.2006.10.014.
- SZATANEK, Rafal *et al.* - **Isolation of extracellular vesicles: Determining the correct approach (review).** International Journal of Molecular Medicine. ISSN 1791244X. 36:1 (2015) 11–17. doi: 10.3892/ijmm.2015.2194.
- TAMKOVICH, S. N. *et al.* - **Exosomes: Generation, structure, transport, biological activity, and diagnostic application.** Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. ISSN 19907494. 10:3 (2016) 163–173. doi: 10.1134/S1990747816020112.
- TANG, Xiang Jun *et al.* - **Therapeutic potential of CAR-T cell-derived exosomes: A cell-free modality for targeted cancer therapy.** Oncotarget. ISSN 19492553. 6:42 (2015) 44179–44190. doi: 10.18632/oncotarget.6175.
- TAURO, Bow J. *et al.* - **Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes.** Methods. ISSN 10462023. 56:2 (2012) 293–304. doi: 10.1016/j.ymeth.2012.01.002.

- THEOS, Alexander C. *et al.* - **A luminal domain-dependent pathway for sorting to intraluminal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis.** *Developmental Cell.* ISSN 15345807. 10:3 (2006) 343–354. doi: 10.1016/j.devcel.2006.01.012.
- THÉRY, Clotilde *et al.* - **Exosomes: Composition, biogenesis and function.** *Nature Reviews Immunology.* ISSN 14741733. 2:8 (2002) 569–579. doi: 10.1038/nri855.
- THORN, Caroline F. *et al.* - **Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects.** *Pharmacogenetics and Genomics.* ISSN 1744-6872. 21:7 (2011) 440–446. doi: 10.1097/fpc.0b013e32833ffb56.
- TORRE GOMEZ, Carolina *et al.* - **‘Exosomics’-A review of biophysics, biology and biochemistry of exosomes with a focus on human breast milk.** *Frontiers in Genetics.* ISSN 16648021. 9:MAR (2018) 1–11. doi: 10.3389/fgene.2018.00092.
- TRAJKOVIC, K. - **Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes (Science (1244)).** *Science.* ISSN 00368075. 320:5873 (2008) 179. doi: 10.1126/science.320.5873.179.
- VALADI, Hadi *et al.* - **Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells.** *Nature Cell Biology.* ISSN 14657392. 9:6 (2007) 654–659. doi: 10.1038/ncb1596.
- VLASSOV, Alexander V *et al.* - **Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials.** *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects.* ISSN 03044165. 1820:7 (2012) 940–948. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.03.017.
- WAHLGREN, Jessica *et al.* - **Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes.** *Nucleic Acids Research.* ISSN 03051048. 40:17 (2012). doi: 10.1093/nar/gks463.
- WANG, Chunhui *et al.* - **Exosome-delivered TRPP2 siRNA inhibits the epithelial-mesenchymal transition of FaDu cells.** *Oncology Letters.* ISSN 17921082. 17:2 (2019) 1953–1961. doi: 10.3892/ol.2018.9752.
- WEAVER, Beth A. - **How Taxol/paclitaxel kills cancer cells.** *Molecular Biology of the Cell.* ISSN 19394586. 25:18 (2014) 2677–2681. doi: 10.1091/mbc.E14-04-0916.

WOLLERT, Thomas; HURLEY, James H. - **Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes.** Nature. ISSN 00280836. 464:7290 (2010) 864–869. doi: 10.1038/nature08849.

XIAO, Cheng *et al.* - **Exosomes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.** Frontiers in Oncology. ISSN 2234943X. 9:September (2019) 1–13. doi: 10.3389/fonc.2019.00894.

YONG, Tuying *et al.* - **Tumor exosome-based nanoparticles are efficient drug carriers for chemotherapy.** Nature Communications. ISSN 20411723. 10:1 (2019). doi: 10.1038/s41467-019-11718-4.

YU, Li Li *et al.* - **A Comparison of Traditional and Novel Methods for the Separation of Exosomes from Human Samples.** BioMed Research International. ISSN 23146141. (2018). doi: 10.1155/2018/3634563.

ZHANG, Yuan *et al.* - **Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential.** Cell and Bioscience. ISSN 20453701. 9:1 (2019) 1–18. doi: 10.1186/s13578-019-0282-2.

ZHU, Linyan; CHEN, Liqun - **Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy.** Cellular and Molecular Biology Letters. ISSN 16891392. 24:1 (2019) 1–11. doi: 10.1186/s11658-019-0164-y.