

Organoides de cérebro como modelos de doenças de Alzheimer e Parkinson: uma revisão narrativa sobre as perspectivas para medicina regenerativa e personalizada

Raysa Taynara Vasconcelos de Souza¹ , Pedro Henrique Gomes Santana¹ , Ricardo Cambraia Parreira¹ , Lucas Felipe Oliveira² , Adrieli Oliveira Raminelli³ , Bruno Lemes Marques⁴ , Daniel Mendes Filho³ 

RESUMO

Há muitos anos a cultura celular bidimensional (2D) é utilizada como modelo de estudo de doenças, possuindo grande importância na medicina regenerativa, apesar de ainda conter limitações significativas. A fim de contornar essas limitações, a cultura celular tridimensional (3D) propõe uma organização mais complexa e sustentável que pode ser produzida a partir de células-tronco adultas (ASCs), células-tronco embrionárias (ESCs) ou células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs). A cultura 3D possibilitou o cultivo de células em um ambiente mais próximo do fisiológico, levando à formação de distintos tecidos órgãos-específicos. Em outras palavras, a cultura de células 3D possibilita a criação de estruturas orgânicas muito semelhantes aos órgãos de um ser humano, tanto estruturalmente, quanto funcionalmente. Desse modo, tem-se o que é chamado de organoides. O uso dos organoides tem crescido exponencialmente em ambientes *in vitro*, permitindo a análise e observação dos diversos fenômenos fisiológicos existentes. Como exemplo, pode-se citar os organoides cerebrais ("mini-brains") reproduzidos *in vitro* buscando delinear as peculiaridades e complexidades do cérebro humano, com o objetivo de compreender algumas disfunções neurológicas que acometem esse sistema, como as duas principais doenças neurodegenerativas: Doenças de Alzheimer e Parkinson. Portanto, os organoides cerebrais podem permitir notável avanço da medicina regenerativa aplicada a doenças neurodegenerativas, já que esses "mini-brains" podem ser produzidos a partir de células do próprio paciente. Isso permitirá intervenções personalizadas, como testagens farmacológicas, a fim de definir qual seria o melhor tratamento medicamentoso. Consequentemente, essa tecnologia pode permitir terapias mais eficientes e individualizadas - o que é fundamental para a Medicina Personalizada.

Palavras-chave: Organoides, Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson, Medicina regenerativa, Medicina personalizada.

1. INTRODUÇÃO

A cultura celular bidimensional (2D) é utilizada há anos como modelo de estudo de doenças, possuindo grande importância na medicina regenerativa. Porém, esse modelo contém limitações significativas. Tais limitações incluem a difícil tarefa de isolar e cultivar células coletadas dos pacientes de maneira rápida e eficaz, mantendo a originalidade genética^{1, 2}.

Por outro lado, tem-se as células que se multiplicam *in vitro*, em ambiente tridimensional (3D), com o objetivo de formar pequenos grupos de células que se diferenciam em distintos tipos celulares a partir de uma organização estrutural

e funcional semelhante à de um órgão *in vivo*. Há uma miríade de possibilidades para o cultivo de células que se aproximam fisiologicamente de um órgão, por esse motivo, essas células recebem o nome de miniórgãos ou organoides. Esses organoides podem ser construídos a partir de células-tronco embrionárias (ESCs), células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs), células-tronco neonatais ou adultas (ASCs), permitindo o cultivo de distintos tecidos órgãos-específicos³⁻⁵.

Para a construção de um organoide, é necessário depositar as células (sejam ASCs ou ESCs) em uma matriz com abundante quantidade de laminina e colágeno, a fim de mimetizar a matriz extracelular⁶. Desse modo,

1. Centro Universitário de Mineiros (UNIFIMES), Mineiros, (GO), Brasil.

2. Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, (MG), Brasil.

3. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina de Ribeirão, Ribeirão Preto, (SP), Brasil.

4. Universidade Federal de Goiás. Instituto de Ciências Biológicas, Goiânia, (GO), Brasil.



as células cultivadas em 3D tornam-se capazes de se organizar em estruturas mais complexas semelhantes a um órgão, tanto morfológicamente, quanto funcionalmente. Tais organoides consistem em estruturas de células heterogêneas com estabilidade genética e passíveis de serem cultivadas em biorreatores, criopreservadas em biobancos e submetidas a variados testes sem perder sua viabilidade^{2, 6, 7}.

O uso dos organoides tem crescido exponencialmente em ambientes *in vitro*, permitindo a análise e observação dos diversos fenômenos fisiológicos existentes⁶. O trabalho centrado em células 3D que possibilitou o cultivo de hepatócitos pela primeira vez⁸.

Como outro exemplo, pode-se citar os organoides cerebrais ("mini-brains"), que são reproduzidos *in vitro* buscando delinear as peculiaridades e complexidades do cérebro humano. Por conseguinte, os "mini-brains" possibilitam a compreensão de algumas disfunções neurológicas, incluindo doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer (DA) e a Doença de Parkinson^{9, 10}. Em modelos organoides da DA, doença neurodegenerativa mais prevalente no mundo, foi possível identificar a presença de placas β -amiloides e estruturas semelhantes a aglomerados neurofibrilares de proteína tau - sinais fisiopatológicos clássicos da DA^{11, 12}. Já com organoides cerebrais modelando a DP, foi possível verificar a degeneração de neurônios dopaminérgicos, disfunção mitocondrial e depósitos de proteína α -sinucleína¹³⁻¹⁵.

Portanto, o desenvolvimento de organoides cerebrais possibilita um notável avanço da medicina regenerativa para o levantamento de respostas ainda não existentes quanto à algumas doenças neurodegenerativas. Além disso, esses organoides podem ser produzidos a partir de células do próprio paciente, como as iPSCs¹⁶⁻¹⁸, permitindo intervenções específicas, como testagens farmacológicas, terapia celular regenerativa a partir de fontes de células para repor os neurônios degenerados. Isso permitirá o desenvolvimento de melhores tratamentos para tais doenças¹⁹⁻²³. Assim, esse novo meio de estudo pode permitir terapias mais eficientes e individualizadas, o que é chamado de Medicina Personalizada^{24, 25}. Logo, o objetivo deste trabalho é rastrear informações sobre o modelo de organoides em fontes de publicação científica, bases de indexação de dados, periódicos científicos, buscando indicadores significativos para a elaboração do trabalho.

2. METODOLOGIA

O presente trabalho foi produzido seguindo o modelo de revisão narrativa, e tem como princípio metodológico a busca, análise e interpretação de estudos científicos originais relacionados aos organoides e suas perspectivas clínicas para doenças neurodegenerativas. O período das buscas limitou-se a 10 anos: de 2011 a 2021. Como critério de inclusão, estabeleceu-se que os estudos deveriam estar nos idiomas português e inglês.

Para isso, foram selecionados estudos publicados e indexados nas bases de dados PubMed, LILACS, SciELO e Google Acadêmico. Para melhor definição dos termos de busca, foram utilizadas as seguintes palavras-chave indexadas nas bases de dados: Organoids; Stem Cells; Neurodegenerative Diseases; Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Regenerative Medicine, Precision Medicine; Personalized Medicine. Estudos duplicados, anteriores ao ano de 2011 e que não se relacionam com a temática foram excluídos da pesquisa.

3. ORGANOIDES

3.1. História

O termo "organoide" já é utilizado há mais de um século. Em 1910, houve o primeiro experimento com órgãos *in vitro* a partir da dissociação e reagregação de células de uma esponja marinha (Porifera). Para isto, as células da esponja marinha foram separadas mecanicamente e, posteriormente, as células dissociadas foram reagregadas através de um processo químico. As células que foram capazes de reagregar e se auto-organizar, formaram tecidos semelhantes aos agregados multicelulares das esponjas marinhas. Portanto, a partir deste experimento, diversos estudos passaram a ser desenvolvidos e provou-se que a reagregação celular poder gerar estruturas orgânicas biologicamente semelhantes às originais⁹.

Em 1946 o termo "organoide" foi utilizado para definir uma massa isolada proveniente de um tumor humano e, em seguida, desenvolveram-se estudos sobre aspectos desse tecido^{9, 31}. A palavra "organoide" passou a receber ainda mais significado quando descobriram que as células-tronco embrionárias e pluripotentes induzidas apresentavam uma ampla capacidade de autorrenovação celular e diferenciação

em diversos tipos de células. Essa capacidade alavancou os estudos direcionados aos organoides, formando estruturas de alta complexidade, com organização celular de órgãos específicos, exibindo estruturas semelhantes ao tecido original, inclusive com funções fisiológicas similares. Em consequência, surgiram modelos de patologias que acometiam tais órgãos, facilitando a compreensão⁹.

3.2. Gênese

Os organoides foram construídos ao longo de muitas décadas de pesquisas na biomedicina. Tais tecidos podem ser cultivados a partir de um conjunto de células-tronco colocadas em recipientes específicos (placas de Petri) ricos em nutrientes, onde essas células se multiplicam (devido à sua capacidade pluripotente) e se transformam nas estruturas tridimensionais (3D) denominadas organoides. Essas estruturas são capazes de reproduzir as informações orgânicas do corpo em relação à organização, atividade e função celular de um determinado órgão²⁶.

Diversos modelos organoides foram desenvolvidos nos últimos anos, análogos aos tecidos do intestino, rim, olho, fígado, pulmão, ouvido interno, cérebro e outros. Esses organoides (por serem derivados de células-tronco pluripotentes humanas) podem auxiliar na modelagem de doenças, estudo de novas intervenções farmacológicas e testes da aplicação dessas drogas, além de facilitar o emprego de terapias regenerativas²⁶. Além disso, os organoides possibilitam de maneira mais eficaz as interações célula-célula e célula-matriz. Consequentemente, essas peculiaridades da cultura 3D, simulam de maneira mais fidedigna as vias de sinalização e as reais funções celulares nos tecidos. Logo, em muitos aspectos os miniórgãos são capazes de mimetizar doenças melhor do que modelos animais e/ou de cultura celular tradicional²⁷.

Como dito anteriormente, as iPSCs possuem alta capacidade de auto-organização e essa habilidade é o que viabiliza a cultura dos organoides. Quando as iPSCs são dispostas em sistemas de cultivo 3D (utilizando microcarregadores e hidrogéis que simulam a matriz fisiológica extracelular *in vitro*) associados a fatores bioquímicos apropriados, as iPSCs podem se desenvolver e gerar organoides específicos ao tecido cultivado. Geralmente, o organoide desenvolvido é compatível com as células-tronco empregadas no sistema de cultivo (contendo apenas uma única linhagem). Porém, há ainda a possibilidade de

autorrenovação das células progenitoras que se diferenciam em células heterogêneas, dando origem à diferentes linhagens celulares²⁷⁻²⁹.

Os organoides cerebrais são tecidos gerados *in vitro*, derivados de células-tronco do sistema nervoso central e simulam o neurodesenvolvimento fetal humano. Esse tecido tridimensional – rico em células progenitoras neurais, neurônios e, em menor quantidade, células da glia (as quais modulam o microambiente celular) – possibilita a realização de testes e experimentos sobre o desenvolvimento cerebral e o estudo de processos fisiopatológicos, como, por exemplo, as doenças neurodegenerativas³⁰. Apesar de saber que mesmo as culturas tridimensionais mais aprimoradas não permitem o pleno entendimento das disfunções que acometem os órgãos humanos, os organoides têm inúmeros benefícios em potencial para a terapia personalizada^{9, 31}.

3.3. Organoides cerebrais

No cérebro existe uma gama de redes neuronais que faz parte do processamento final da linguagem, do agir, do pensar, da memória, do movimento, dentre outras inúmeras funções. Portanto, compreender esse órgão não é uma tarefa fácil. A maneira mais utilizada até então para compreensão da função cerebral está baseada nos estudos em modelos animais (camundongos, por exemplo). Porém, essas informações obtidas a partir de modelos animais possuem valor limitado, considerando que as doenças que os acometem são distintas das doenças que acometem o ser humano. Além dos estudos em animais, estão disponíveis também culturas bidimensionais e os estudos *post-mortem*. Porém, sua aplicabilidade é diretamente comprometida por possíveis alterações irreversíveis que o cérebro possa ter sofrido durante o processo de óbito. Deste modo, considerando toda a complexidade desse órgão e as diferentes morfologias existentes nas distintas patologias, é necessário um modelo que represente o cérebro da maneira mais fisiológica possível para enriquecer o conhecimento e compreensão de determinadas doenças neurodegenerativas^{9, 27, 37}.

Diversos protocolos foram desenvolvidos para a geração de organoides cerebrais a partir de cultivos tridimensionais. Mas, para reproduzir os aspectos do cérebro humano, inicialmente utilizava-se modelos *in vitro* de cultura bidimensional (2D) de células-tronco. No entanto, o desenvolvimento neuronal era

limitado e tornava-se difícil a criação de modelos biológicos precisamente semelhantes ao cérebro. Dentre essas limitações existia a falta de interação entre as células e o déficit na capacidade de auto-organização neuronal⁹.

Surgiu então o cultivo tridimensional que trouxe maior capacidade de interação celular e alta habilidade de auto-organização. O resultado foi o desenvolvimento de cérebros em versões miniaturas, os chamados “mini-brains”, produzidos a partir de células-tronco. Uma proposta para a medicina personalizada é a produção de organoides que derivem do paciente com disfunções específicas, por exemplo, daquele paciente que apresente mutações genéticas e curse com disfunções neurodegenerativas. Isso permitiria uma maior abordagem da doença neurodegenerativa, conhecendo melhor sua fisiopatologia, evolução e, conseqüentemente, possibilitando novas perspectivas na elaboração de terapias, aplicabilidade de drogas e prognóstico^{9, 27}.

Para que as células-tronco consigam se multiplicar e se auto-organizar são necessários alguns procedimentos *in vitro* que facilitarão essa resposta sem induzir de maneira artificial esse processo. O protocolo de cultura 3D de organoides para o crescimento de tecido neural tem o objetivo de oferecer um ambiente apropriado para o desenvolvimento dos fatores intrínsecos celulares. Inicialmente há a geração de neuroectoderma a partir de corpos embrioides – o neuroectoderma representa a camada de células de onde deriva o sistema nervoso e os corpos embrioides seriam resultado do crescimento uniforme das células-tronco embrionárias – em seguida há a incorporação de tecidos neuroectodérmicos em cultura 3D imersos em gotículas de Matrigel³⁷. Esse gel que fornecerá o suporte necessário para a auto-organização das iPSCs e conseqüente crescimento do tecido nervoso. Com o objetivo de melhorar e aumentar a troca de oxigênio e nutrientes entre as células, as gotas de Matrigel são transferidas para dentro de um biorreator giratório. Dentro de oito a dez dias após a transferência do Matrigel para o biorreator giratório, as células já apresentam conformidade neuronal. Em aproximadamente vinte a trinta dias, esse tecido neuronal já é capaz de formar regiões cerebrais bem delineadas, como o córtex cerebral, a retina, meninges, plexo coroide, hipocampo e prosencéfalo ventral. Essas regiões podem alcançar até 4mm de estrutura e podem permanecer vivas até dez meses enquanto estão retidas no biorreator giratório^{9, 27, 28}.

3.4. Doenças neurodegenerativas

Doenças neurológicas como a DP e DA têm um importante impacto na vida humana e causam um pesado fardo financeiro em suas famílias e na sociedade. O mecanismo e a patogênese dessas doenças são complexos e os sintomas são diversos, o que dificulta o diagnóstico precoce e tratamentos eficazes. A compreensão atual das doenças neurológicas é em suma baseada nos modelos animais e no exame *post-mortem*. Mas, nem sempre os modelos animais produzem esses fatores, já que a etiologia de algumas doenças neurológicas está vinculada a mutações multigênicas. Além disso, destaca-se que as doenças neurológicas acometem mais de uma região cerebral e estão mais relacionadas a lesões de múltiplos tipos celulares. Portanto, é improvável que a tecnologia tradicional de cultura de células possa modelar doenças neurológicas^{9, 27, 29}.

Uma maneira eficiente para estudar as doenças neurológicas são os organoides cerebrais, considerando seus diversos tipos celulares, múltiplas regiões cerebrais e a capacidade de recapitular as distintas características essenciais no desenvolvimento cortical humano^{9, 27, 29}.

O uso de organoides cerebrais é um avanço para a ciência, mas ainda há um longo caminho a percorrer para que sejam competentes instrumentos na modelagem e estudo de doenças neurológicas. As técnicas que permitem edição genética em associação à tecnologia organoide cerebral 3D são fundamentais nos estudos futuros sobre distúrbios cerebrais mais complexos. Destaca-se ainda que os organoides cerebrais podem ser cultivados a partir das células somáticas provenientes do paciente, possibilitando o auxílio na descoberta de novos fármacos e ainda seu uso na avaliação da resposta individualizada do paciente às diferentes possibilidades de medicamentos no tratamento de doenças neurodegenerativas^{9, 27, 29}.

Para compreender o desenvolvimento das doenças neurodegenerativas faz-se necessário explicar as funções da micróglia. Micróglia são células do sistema imunológico que atuam ao nível de sistema nervoso central cuja função está relacionada à realização de sinapses, à plasticidade neuronal e à maturação do circuito neuronal. Essas células são ativadas quando há um processo degenerativo ao nível neuronal e liberam substâncias neurotóxicas para que possam atuar gerando resposta inflamatória. Portanto, é possível inferir que a micróglia está relacionada à gênese e progressão das doenças neurodegenerativas^{9, 29}.

A capacidade de recrutamento de micróglia dentro de organoides seria uma possibilidade de compreender o desenvolvimento e progressão dessas doenças. Em um estudo baseado no desenvolvimento simultâneo de micróglia e neurônios em cultura 3D, observou-se que a micróglia que surgiu dentro dos organoides cerebrais era muito semelhante à micróglia presente no organismo adulto e que estas eram capazes de produzir resposta inflamatória quando estimuladas por lipopolissacarídeos (um pirógeno exógeno que atua sobre os macrófagos, estimulando-os a produzirem citocinas pró-inflamatórias), comprovando a importância da micróglia na modelagem da resposta inflamatória. Dessa maneira, surgiram importantes informações quanto às interações entre neurônio e micróglia e o desenvolvimento de doenças a nível cerebral^{9, 29}.

3.4.1. Doença de Alzheimer

Uma das principais doenças neurodegenerativas é a DA que afeta mais de 46,8 milhões de pessoas mundialmente e representa uma das principais causas de morte em todo o mundo. Os principais fatores de risco para o desenvolvimento dessa doença incluem idade avançada, exposição ao alumínio (que pode se acumular no tecido cerebral) e traumatismo craniano³⁸. A Doença de Alzheimer pode se manifestar em duas formas distintas: a esporádica, forma de início tardio que consiste em um quadro demencial; e a forma precoce ou familiar, que costuma surgir antes dos 65 anos e se caracteriza por uma evolução rápida do prejuízo cognitivo^{10,39}. Essa doença é caracterizada pela deposição exacerbada de peptídeo β -amiloide no cérebro, levando ao surgimento de emaranhados neurofibrilares intracelulares, compostos principalmente por proteína Tau hiperfosforilada^{10, 32}. O acúmulo de agregados β -amiloide de proteína Tau hiperfosforilada pode desencadear uma resposta imune inflamatória, mediada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) e produção de espécies reativas de oxigênio. Além disso, foi detectado o aumento da atividade de lactato desidrogenase. Todos esses fatores culminam para um maior processo de citotoxicidade e perda neuronal, contribuindo para a progressão da DA. Tal processo patológico leva a um declínio na capacidade cognitiva e comprometimento grave da memória. Alguns fatores de risco são atribuídos a esta doença, como idade avançada, histórico familiar e fatores ambientais. Mutações

genéticas também são descritas como fator de risco, especificamente sobre algumas proteínas precursoras (β -amiloide, presenilina 1 e presenilina 2)^{10, 32}.

Existem inúmeras pesquisas voltadas à compreensão do mecanismo patogênico da DA, cujo objetivo é buscar meios de prevenir ou curar a DA, porém, ainda não foi descoberto nenhum meio capaz de concretizar este propósito. Em 2014 a DA foi estudada pela primeira vez em um modelo organoide em 3D³². Ao serem incorporados em matrigel, os organoides apresentaram marcadores neuro-inflamatórios, remodelação da matriz extracelular, alteração no funcionamento sináptico, agregação aumentada de peptídeo β -amiloide e proteína Tau hiperfosforilada, além disso, também superexpressaram a proteína β -amiloide e presenilina 1 com mutações semelhantes às encontradas na DA^{10, 32}.

A clivagem da proteína precursora amiloide (APP) através da enzima β -secretase é o que dá origem ao peptídeo β -amiloide, portanto, entender o processamento da APP é importante para levantar novas terapêuticas que sejam capazes de reduzir os níveis de β -amiloide. Em condições normais, as enzimas α e γ -secretase efetuam a clivagem da APP e dá origem a fragmentos solúveis da APP (sAPP β). Mas, em pacientes com DA essa clivagem de APP ocorre via β e γ -secretase, resultando nos fragmentos sAPP β e peptídeos β -amiloides, o principal componente das placas amiloides presentes da DA^{10, 32}.

Um importante achado durante o estudo dessas alterações foi o resultado eficaz durante o uso de inibidores das secretases, que foram capazes de bloquear a ação das enzimas proteolíticas envolvidas na formação da β -amiloide, além de reduzir a fosforilação da proteína Tau. Acreditava-se que a inibição das enzimas β e γ -secretase seria o alvo terapêutico para reduzir a produção dos peptídeos β -amiloides^{9, 10, 32}.

Entretanto, apesar de tais estudos terem demonstrado uma redução dos níveis plasmáticos de β -amiloides no líquido cefalorraquidiano, houve aumento na incidência de câncer de pele e comprometimento dos escores cognitivos dos pacientes que participaram dos ensaios clínicos^{32, 33}. A falha desses estudos pode estar relacionada aos diversos substratos e funções importantes que essas enzimas possuem fora do cérebro, como, por exemplo, a formação do fuso muscular. Uma possível solução para essas falhas poderia ser o uso de terapias direcionadas à inibição das β e γ -secretases específicas do cérebro, reduzindo consequentemente os efeitos adversos extra cerebrais^{9, 10}.

Portanto, percebe-se que os modelos organoides cerebrais são excelentes meios para validar essas tentativas. Apesar de não ter sido segura a intervenção a partir do uso de inibidores das secretases, tal fato comprovou a hipótese de que a patologia da DA pode ser recapitulada a partir de organoides 3D e que estes conseguem expressar mutações (processos patogênicos) associadas à DA, conseqüentemente torna mais fácil o levantamento de estudos para a descobertas e desenvolvimentos de novas intervenções para a DA, sejam elas farmacológicas ou não. Mais estudos com organoides cerebrais são necessários para avaliar as funções enzimáticas, mudanças neuronais e atividade sináptica que ocorrem na DA^{9, 10, 32}.

3.4.2. Doença de Parkinson

A DP é uma doença neurodegenerativa de caráter crônico com prevalência de 2 a cada 1.000 indivíduos. É classicamente considerada um transtorno associado à idade e caracteriza-se por degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos na substância negra do mesencéfalo e acúmulo de α -sinucleína (proteína que compõe os neurônios) principalmente nos terminais pré-sinápticos, com inclusões citoplasmáticas (corpos de Lewy). O comprometimento da depuração autofágica de α -sinucleína (α -syn) é uma das principais causas do acúmulo de α -syn na DP. A α -syn desempenha função no processo de formação e fusão de vesículas pré-sinápticas e, conseqüentemente, regulam a liberação de neurotransmissores. Além disso, têm ainda a capacidade de alterar a composição e a viscosidade de ácidos graxos de membranas lipídicas, contribuindo para a plasticidade neuronal^{9, 34, 35}.

A degeneração gradativa dos neurônios dopaminérgicos e acúmulo de α -sinucleína causa tremores, hipertonia e oligocinesia caracterizada pela redução da atividade motora espontânea, instabilidade postural, bradicinesia, rigidez muscular e tremor em repouso^{9, 35}.

Alguns fatores de risco já foram descritos como a exposição a pesticidas ou lesão cerebral em idades pré/perinatal, condições que levariam à disfunção do sistema de neurônios dopaminérgicos na vida adulta^{9, 35}. Há muitas variantes genéticas envolvidas na α -sinucleína que contribuem para a suscetibilidade à DP, dentre elas há o gene PARK1 (que codifica para a proteína α -sinucleína), PARK2 (codifica para parkina), PARK6 para PINK1 (PTEN-induzida quinase 1), PARK 7 e PARK8 (que codifica para a proteína LRRK2). Dentre esses genes, o fator

genético mais comum para DP precoce e tardia é a mutação do LRRK2 (locus do gene da quinase 2 de repetição rica em leucina). Mas, ainda é um desafio compreender o papel da LRRK2 na DP e buscou-se por muito tempo modelos que fossem capazes de transmitir com precisão a doença associada a mutações na LRRK2. Inicialmente, os modelos mais utilizados eram baseados em culturas 2D, porém, estes não recapitulavam com exatidão as funções e ações proteicas e celulares da DP. Mas, a tecnologia organoide 3D demonstrou maior potencial para modelar a patogênese da α -sinucleína e maturação celular^{9, 35}.

Em 2019, um estudo gerou organoides do mesencéfalo derivados de células-tronco humanas pluripotentes induzidas com mutações do gene LRRK2. Após 60 dias esses organoides do mesencéfalo já tinham acúmulo de neuromelanina e aglomeração de genes caracteristicamente expressos no mesencéfalo de um humano mais velho³⁵. Além disso, esses organoides mutantes de LRRK2 apresentaram patologia semelhante à DP, incluindo localização anormal de α -sinucleína fosforilada, alterações observadas em pacientes com DP associada a mutações do gene LRRK2, corroborando resultados de outros estudos com organoides cerebrais que, além destes mesmos achados, encontraram defeitos mitocondriais e estresse oxidativo em células neuronais dopaminérgicas^{9, 15, 35}.

Um importante avanço durante esses estudos foi a descoberta do tratamento com um inibidor de quinase específico para LRRK2, que reduziu consideravelmente a morte de células neuronais dos organoides e diminuiu também o acúmulo de α -sinucleína³⁵, sugerindo que o modelo organoide 3D do mesencéfalo é capaz de recapitular com mais precisão a DP, podendo ser útil para triagem de possíveis drogas a serem utilizadas nesta doença, com grande potencial não somente na compreensão dos fatores moleculares da patogênese, mas também na busca de novas terapias^{9, 15}.

3.5. Organoides na Medicina Regenerativa e Personalizada

Em comparação com os métodos tradicionais existentes até então, é perceptível que a tecnologia a partir de organoides cerebrais supere os modelos baseados em animais ou outras estratégias em humanos, facilitando a compreensão da lacuna

existente no entendimento dos processos orgânicos e celulares, trazendo grandes vantagens na aplicação da pesquisa biológica²⁷.

A aplicação dos organoides cerebrais derivados de iPSCs pode ser eficiente no estudo do desenvolvimento do cérebro, das possibilidades terapêuticas farmacológicas para a melhora da doença ou até mesmo para o transplante no local da lesão cerebral objetivando o reparo de tecidos danificados como terapia de medicina regenerativa²⁷.

Como já mencionado, os organoides são derivados de células-tronco ou progenitoras, o que facilita o desenvolvimento de órgãos. Dessa forma, outro avanço que os organoides proporcionam é o fornecimento de uma fonte de células e tecidos que podem ser viáveis para transplantes. Apesar de não haver relatos sobre organoides cerebrais utilizados para terapia de reposição, sabe-se que estes organoides possuem células progenitoras neurais e diversos outros tipos de neurônios que são uma grande esperança para as terapias de reposição celular nas doenças neurodegenerativas²⁷.

Os organoides cerebrais normais e organoides que mimetizam uma doença específica possuem alto potencial na aplicação da medicina personalizada por meio de testes personalizados de resposta a medicamentos. A introdução, por exemplo, de um biorreator giratório miniaturizado pode contribuir para a descoberta de terapia farmacológica por meio de triagem de alto rendimento para testar a eficácia e toxicidade de drogas e compostos²⁷.

A medicina regenerativa é um importante campo da medicina moderna e visa a substituição ou regeneração de células, tecidos ou órgãos, com a finalidade de restaurar ou estabelecer normalidade de uma função previamente comprometida. As células-tronco têm a capacidade de autorrenovação e diferenciação em diversas linhagens celulares, e as estratégias baseadas em células-tronco são promissoras na cura de lesões causadas por doenças neurodegenerativas²⁷.

Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de identificar alvos terapêuticos e drogas neuroprotetoras que sejam capazes de atuar nas doenças que comprometem a função cerebral e é esse progresso nos estudos de células-tronco que potencializam o desenvolvimento da medicina regenerativa²⁷.

Um grande avanço foi feito recentemente: o cultivo de organoides do mesencéfalo contendo neurônios dopaminérgicos. Quando comparado com

um cultivo de células normais, percebeu-se que os organoides do mesencéfalo foram capazes de gerar em um período mais curto uma quantidade bem maior de neurônios dopaminérgicos, além de produzir células precursoras neuronais com níveis maiores de sobrevivência e maior longevidade no crescimento e progressão de fibras nervosas. Por isso, os tecidos provenientes de organoides cerebrais não apenas fornecem uma plataforma para testar novas drogas e sua toxicidade, mas poderão também ser parte de estudos que objetivam o levantamento de estratégias terapêuticas para a promoção e a regeneração tecidual e neuronal, além de fornecer um meio de estudo para novas terapias de reposição na DP e DA, contribuindo essencialmente para a medicina regenerativa²⁷.

3.6. Limitações no uso de organoides cerebrais

Diante de todo aparato teórico abordado anteriormente sobre os organoides cerebrais é notório que estes fazem parte de um avanço na tecnologia, com distintas vantagens em relação aos métodos tradicionais. Mas, é importante destacar que apesar de serem bons instrumentos para a medicina regenerativa, estes ainda possuem muitas desvantagens. Grande parte dos organoides tem componentes parciais de órgãos, o que não permite o controle totalmente efetivo de seu desenvolvimento quanto aos tipos de células e estruturas em crescimento⁹. Portanto, os organoides cerebrais nem sempre serão capazes de simular situações de neurodesenvolvimento, principalmente quando envolverem condições mais complexas, como, por exemplo, na esquizofrenia²⁷.

As principais desvantagens dos organoides cerebrais incluem o alto custo, a falta de envelhecimento, a heterogeneidade das células, a variabilidade das regiões cerebrais dentro de cada organoide. O que causa a heterogeneidade celular é a falta de auto-organização espontânea das células-tronco, o que dificulta a realização de experimentos controlados com correlações viáveis⁹. A formação de um organoide depende do processo de auto-organização que é dependente das células-tronco. Uma estratégia para controlar o crescimento e a diferenciação das células-tronco *in vitro* é tratar os organoides com moléculas sinalizadoras em diferentes estágios de crescimento. Tal estratégia provavelmente levaria a uma menor heterogeneidade e semelhança no tamanho dos organoides²⁷.

O protocolo para crescimento de organoides cerebrais ainda é uma tarefa difícil, já que existem regiões cerebrais muito específicas que participam das doenças neurodegenerativas. Um organoide cerebral pode chegar até a 4mm de diâmetro, podendo ter uma vida longa, sobrevivendo por muito tempo se mantido em biorreator giratório. Desse modo, acredita-se que o uso de biorreatores giratórios melhora a reprodutibilidade dos organoides além de aumentar o rendimento, vida útil e maturação, melhorando as condições de crescimento dos organoides e, consequentemente, otimizando os protocolos^{9, 27}.

Outra desvantagem dos organoides cerebrais está relacionada à vascularização ausente. Por exemplo, as células que compõem o núcleo dos organoides sofrem apoptose após 100 dias da cultura inicial e não são capazes de se diferenciar em nenhum outro tipo de célula. Isso ocorre devido à ausência de vasos sanguíneos que transportem os nutrientes e realizem as trocas gasosas necessárias para o novo crescimento celular²⁷. Como resultado, tem-se um grande comprometimento no crescimento e maturação dos organoides. Uma estratégia para redução dessa falha é a integração de redes vasculares funcionais e conectáveis, que permitiria uma morfogênese muito mais eficiente e considerável crescimento desses organoides^{9, 31}.

Outro fator que afeta o uso de organoides cerebrais é a falta de estudos completos sobre a evolução química e física cerebral. Apesar de haver a representação de muitas características presentes no cérebro do ser humano, ainda há estruturas e células que não são bem desenvolvidas. Em outras palavras, pode-se dizer que os organoides cerebrais são capazes de representar o desenvolvimento do cérebro de um feto de até 3 meses, sendo ainda incompleto e não contempla todas as estruturas formadas após o nascimento^{9, 27}.

Quanto às questões práticas, é preciso salientar que o uso do cérebro humano é alvo de restrições na pesquisa científica por questões éticas e legais. Portanto, compartilhar e manter um tecido cerebral *in vitro* envolve muitas restrições, estando os processos sujeitos a diversas diretrizes e regulamentos⁹.

Atualmente o que mais se utiliza para estudo do cérebro são modelos animais e exames *post mortem*, permitindo uma compreensão próxima do desenvolvimento cerebral de vertebrados e mamíferos. Mas, em função das diferenças estruturais, nem sempre os estudos com modelos animais são realizados com sucesso. Um exemplo dessas diferenças estruturais

está relacionado a camada interna de fibras e a zona subventricular externa, que possuem papéis fundamentais no desenvolvimento cerebral humano, mas que estão ausentes no cérebro de ratos^{9, 27, 31}.

Apesar dos desafios existentes na tecnologia de organoides 3D, um método útil para identificar os diferentes tipos de células e trajetórias de linhagem durante a diferenciação celular é o sequenciamento de RNA de célula única. Tal método fornece expressão gênica a nível de uma única célula e dados em relação à idade da linhagem celular, o que facilita a expressão de organoides em todo o genoma. Portanto, seria um meio útil na identificação dos diferentes tipos de células e as distintas trajetórias de linhagem que ocorrem durante a diferenciação celular³¹. Outra possibilidade é o emprego de assemblóides cerebrais, os quais são sistemas celulares tridimensionais auto-organizáveis formados a partir da combinação de neuroesferas e capazes de recapitular, por exemplo, as interações entre neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos³⁶.

De qualquer modo, são necessárias novas tecnologias que facilitem a produção automatizada dos organoides cerebrais. O alto rendimento na produção e no desenvolvimento de organoides através de sistemas mais aprimorados é essencial para a geração e a aplicação rotineira de modelos de organoides para doenças humanas, abrindo caminho para estudos em larga escala quanto às possíveis aplicações farmacêuticas e terapias individualizadas³¹.

4. CONCLUSÃO

Os organoides cerebrais gerados em cultivo *in vitro* através do método 3D têm representado o modelo mais promissor para compreender os complexos processos de neurodesenvolvimento do cérebro humano, progressão de doenças e patogênese, facilitando o levantamento de estratégias de intervenções até então impossíveis de serem estudadas em humanos. Os organoides conseguem desenvolver muitas das características do cérebro humano as quais dificilmente seriam desenvolvidas através de outros métodos tradicionais em células ou animais.

Até então, o uso dos organoides cerebrais direcionou-se a estudos do desenvolvimento fisiológico, patogênico (doenças neurodegenerativas) e testagem de fármacos que possam ser utilizados como intervenção para doenças específicas. Mas, devido às limitações que os organoides ainda possuem, eles ainda não

representam um modelo padrão para expressar o desenvolvimento cerebral em sua totalidade, bem como suas disfunções neurodegenerativas. Desse modo, muitos estudos ainda são necessários para que haja um avanço na reprodutibilidade e maturidade dos organoides cerebrais.

Mesmo que ainda sejam necessários progressos para que os organoides cerebrais alcancem seu potencial máximo nas aplicabilidades clínicas, eles têm potencial considerável para auxiliar no prognóstico e em opções terapêuticas mais eficientes para doenças neurodegenerativas como DA e DP.

5. REFERÊNCIAS

1. Neal, J. T., & Kuo, C. J. (2016). Organoids as models for neoplastic transformation. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 11, 199-220.
2. Rozich, N. S., Blair, A. B., & Burkhart, R. A. (2020). Organoids: a model for precision medicine. In *Precision Medicine for Investigators, Practitioners and Providers*, (Elsevier), pp. 123-129.
3. Clevers, H. (2016). Modeling development and disease with organoids. *Cell*, 165(7), 1586-1597.
4. Fang, Y., & Eglén, R. M. (2017). Three-dimensional cell cultures in drug discovery and development. *Slas discovery: Advancing Life Sciences R&D*, 22(5), 456-472.
5. Huch, M., Gehart, H., Van Boxtel, R., Hamer, K., Blokzijl, F., Verstegen, M. M. *et al.* (2015). Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. *Cell*, 160(1-2), 299-312.
6. Schutgens, F., & Clevers, H. (2020). Human organoids: tools for understanding biology and treating diseases. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 15, 211-234.
7. Sato, T., Stange, D. E., Ferrante, M., Vries, R. G., Van Es, J. H., Van Den Brink, S. *et al.* (2011). Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*, 141(5), 1762-1772.
8. Hu, H., Gehart, H., Artegiani, B., López-Iglesias, C., Dekkers, F., Basak, O. *et al.* (2018). Long-term expansion of functional mouse and human hepatocytes as 3D organoids. *Cell*, 175(6), 1591-1606.
9. Chang, Y., Kim, J., Park, H., Choi, H., & Kim, J. (2020). Modelling neurodegenerative diseases with 3D brain organoids. *Biological Reviews*, 95(5), 1497-1509.
10. Venkataraman, L., Fair, S. R., McElroy, C. A., Hester, M. E., & Fu, H. (2020). Modeling neurodegenerative diseases with cerebral organoids and other three-dimensional culture systems: Focus on Alzheimer's disease. *Stem Cell Reviews and Reports*, 1-22.
11. Fyfe, I. (2021). Brain organoids shed light on APOE genotype and Alzheimer disease pathology. *Nature Reviews Neurology*, 17(1), 1-2.
12. Papaspyropoulos, A., Tsolaki, M., Foroglou, N., & Pantazaki, A. A. (2020). Modeling and targeting Alzheimer's disease with organoids. *Frontiers in pharmacology*, 11, 396.
13. Galet, B., Cheval, H., & Ravassard, P. (2020). Patient-derived midbrain organoids to explore the molecular basis of Parkinson's disease. *Frontiers in Neurology*, 1005.
14. Smits, L. M., Reinhardt, L., Reinhardt, P., Glatza, M., Monzel, A. S., Stanslowsky, N. *et al.* (2019). Modeling Parkinson's disease in midbrain-like organoids. *NPJ Parkinson's disease*, 5(1), 1-8.
15. Wulansari, N., Darsono, W. H. W., Woo, H. J., Chang, M. Y., Kim, J., Bae, E. J., ... & Lee, S. H. (2021). Neurodevelopmental defects and neurodegenerative phenotypes in human brain organoids carrying Parkinson's disease-linked DNAJC6 mutations. *Science Advances*, 7(8), 1540.
16. Azar, J., Bahmad, H. F., Daher, D. *et al.* (2021). The use of stem cell-derived organoids in disease modeling: an update. *Int J Mol Sci* 22, doi: <https://doi.org/10.3390/ijms22147667>
17. Fatehullah, A., Tan, S. H., & Barker, N. (2016). Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nature cell biology*, 18(3), 246-254.
18. Krokker, L., Szabó, B., Németh, K., Tóhádi, R., Sarkadi, B., Mészáros, K. *et al.* (2021). Three Dimensional Cell Culturing for Modeling Adrenal and Pituitary Tumors. *Pathology and Oncology Research*, 27.
19. Liu, L., Yu, L., Li, Z., Li, W., & Huang, W. (2021). Patient-derived organoid (PDO) platforms to facilitate clinical decision making. *Journal of Translational Medicine*, 19(1), 1-9.
20. Nanki, Y., Chiyoda, T., Hirasawa, A., Ookubo, A., Itoh, M., Ueno, M. *et al.* (2020). Patient-derived ovarian cancer organoids capture the genomic profiles of primary tumours applicable for drug sensitivity and resistance testing. *Scientific Reports*, 10(1), 1-11.
21. Pernik, M. N., Bird, C. E., Traylor, J. I., Shi, D. D., Richardson, T. E., McBrayer, S. K., & Abdullah, K. G. (2021). Patient-derived cancer organoids for precision oncology treatment. *Journal of Personalized Medicine*, 11(5), 423.
22. Takahashi, T. (2019). Organoids for drug discovery and personalized medicine. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 59, 447-462.
23. Verjans, E. T., Doijjen, J., Luyten, W., Landuyt, B., & Schoofs, L. (2018). Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: Worth the effort?. *Journal of cellular physiology*, 233(4), 2993-3003.
24. Cosset, E., Locatelli, M., Marteyn, A., Lescuyer, P., Antonia, F. D., Mor, F. M. *et al.* (2019). Human neural organoids for studying brain cancer and neurodegenerative diseases. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (148).

25. Wray, S. (2021). Modelling neurodegenerative disease using brain organoids. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 111, pp. 60-66). Academic Press.
26. Nie, J., & Hashino, E. (2017). Organoid technologies meet genome engineering. *EMBO reports*, 18(3), 367-376.
27. Wang, Z., Wang, S. N., Xu, T. Y., Miao, Z. W., Su, D. F., & Miao, C. Y. (2017). Organoid technology for brain and therapeutics research. *CNS neuroscience & therapeutics*, 23(10), 771-778.
28. De Oliveira, M., De Sibio, M. T., Costa, F. A., & Sakalem, M. E. (2021). Airway and Alveoli Organoids as Valuable Research Tools in COVID-19. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7(8), 3487-3502.
29. Song, L., Yuan, X., Jones, Z., Griffin, K., Zhou, Y., Ma, T., & Li, Y. (2019). Assembly of human stem cell-derived cortical spheroids and vascular spheroids to model 3-D brain-like tissues. *Scientific reports*, 9(1), 1-16.
30. Janssens, S., Schotsaert, M., Manganaro, L., Dejoze, M., Simon, V., García-Sastre, A., & Zwaka, T. P. (2019). FACS-Mediated Isolation of Neuronal Cell Populations From Virus-Infected Human Embryonic Stem Cell-Derived Cerebral Organoid Cultures. *Current protocols in stem cell biology*, 48(1), e65.
31. Magno, V., Meinhardt, A., & Werner, C. (2020). Polymer hydrogels to guide organotypic and organoid cultures. *Advanced Functional Materials*, 30(48), 2000097.
32. Choi, S. H., Kim, Y. H., Hebisch, M., Sliwinski, C., Lee, S., D'Avanzo, C. *et al.* (2014). A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease. *Nature*, 515(7526), 274-278.
33. Cohen, R. M., Rezai-Zadeh, K., Weitz, T. M., Rentsendorj, A., Gate, D., Spivak, I. *et al.* (2013). A transgenic Alzheimer rat with plaques, tau pathology, behavioral impairment, oligomeric $\text{a}\beta$, and frank neuronal loss. *Journal of Neuroscience*, 33(15), 6245-6256.
34. Beiske, A. G., Loge, J. H., Rønningen, A., & Svensson, E. (2009). Pain in Parkinson's disease: prevalence and characteristics. *Pain*, 141(1-2), 173-177. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.12.004>
35. Kim, H., Park, H. J., Choi, H., Chang, Y., Park, H., Shin, J. *et al.* (2019). Modeling G2019S-LRRK2 sporadic Parkinson's disease in 3D midbrain organoids. *Stem Cell Reports*, 12(3), 518-531.
36. Sloan, S.A., Andersen, J., Paşca, A.M. *et al.* (2018). Generation and assembly of human brain region-specific three-dimensional cultures. *Nat Protoc* 13, 2062-2085. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0032-7>
37. Lancaster, M., Knoblich, J. (2014). Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 9, 2329-2340. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.158>
38. Armstrong R. (2019) Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol.*;57(2):87-105. doi: 10.5114/fn.2019.85929. PMID: 31556570.
39. Mendez MF. (2019) Early-onset Alzheimer Disease and Its Variants. *Continuum (Minneapolis)*. Feb;25(1):34-51. doi: 10.1212/CON.0000000000000687.

Contribuições dos autores:

RTVS: Definiu a temática, realizou o levantamento bibliográfico e a escrita.

PHGS: Realizou o levantamento bibliográfico e a escrita.

RCP: Definiu a temática, realizou o levantamento bibliográfico e a escrita.

LFO: Realizou a revisão e escrita do trabalho.

AOR: Realizou a revisão e a formatação do trabalho.

BLM: Realizou a revisão e escrita do trabalho.

DMF: Definiu a temática, realizou o levantamento bibliográfico e a escrita.

O presente trabalho não recebeu apoio financeiro.

Autor Correspondente:

Daniel Mendes Filho

mendesfilhod@alumni.usp.br

Editor:

Prof. Dr. Felipe Villela Gomes

Recebido: 24/10/2022

Aprovado: 11/01/2023
