



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Maria Gabriela Meneses Costa

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Organoides Cerebrais na Modelação de Doenças Degenerativas e Infeciosas” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Ana Filipa Guerra, Dra. Ana Campos Coroa e Professor Doutor Luís Pereira de Almeida, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2021



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Maria Gabriela Meneses Costa

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Organoides Cerebrais na Modelação de Doenças Degenerativas e Infeciosas” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Ana Filipa Guerra, Dra. Ana Campos Coroa e Professor Doutor Luís Pereira de Almeida, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2021

Eu, Maria Gabriela Meneses Costa, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2016227012, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Organoides Cerebrais na Modelação de Doenças Degenerativas e Infeciosas” 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, 10 de setembro de 2021.

Maria Gabriela Meneses Costa

(Maria Gabriela Meneses Costa)

AGRADECIMENTOS

À minha família, por tudo! São o meu suporte, obrigada pelo vosso amor incondicional, pelo vosso apoio e confiança em mim depositados. Sem vocês não teria conseguido.

Aos meus amigos, aos de toda a vida e aos novos que Coimbra me trouxe, um grande obrigada por me acompanharem neste percurso e o tornarem inesquecível.

À minha madrinha de curso, Ana Rita Palma. Sou eternamente grata por tudo o que fizeste por mim, por todo o apoio e partilha ao longo destes cinco anos. Admiro-te muito, terás sempre um lugar especial no meu coração.

À Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A., em particular, à Dra. Ana Filipa Guerra, à Dra. Ana Nunes Ribeiro e à Dra. Ana Marisa Simões. Sou grata pela forma como acompanharam o meu trabalho.

À Dra. Ana Campos Coroa, à Dra. Maria Inês Henriques e restante equipa da Farmácia Santiago. Obrigada pela forma como me acolheram, por tudo o que me ensinaram e fizeram crescer.

Aos meus Professores da Faculdade, foi um privilégio para mim poder tê-los conhecido e aprender convosco.

Ao Professor Doutor Luís Pereira de Almeida, em particular, por toda a atenção e ajuda prestada na escolha do tema e escrita da monografia.

*"Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes."
Isaac Newton*

ÍNDICE

RESUMO.....	7
ABSTRAT.....	8
PARTE I	
RELATÓRIO DE ESTÁGIO NA BLUEPHARMA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA, S.A.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A.....	11
1.2 Setor da Estabilidades.....	12
2. ANÁLISE SWOT.....	12
2.1. Pontos Fortes.....	13
2.1.1. Acolhimento e acompanhamento na Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A	13
2.1.2. Oportunidade de Formação Complementar.....	13
2.1.3. Disponibilização dos materiais de trabalho.....	14
2.2. Pontos Fracos.....	14
2.2.1. Teletrabalho.....	14
2.2.2. Reduzida diversidade de tarefas realizadas.....	14
2.3. Oportunidades.....	15
2.3.1. Implementação da Melhoria Contínua/Kaizen.....	15
2.4. Ameaças.....	16
2.4.1. Pandemia COVID-19.....	16
3. CONCLUSÃO.....	17
4. BIBLIOGRAFIA.....	18
PARTE II	
RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA.....	19
LISTA DE ABREVIATURAS.....	20
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. ANÁLISE SWOT.....	21
2.1. Pontos Fortes.....	22
2.1.1. Equipa técnica.....	22
2.1.2. Localização da farmácia / Heterogeneidade de utentes.....	22
2.1.3. Frequência e plano de estágio.....	23
2.1.4 Preparação Individualizada da Medicação (PIM).....	25
2.1.5 Preparação e encomenda de manipulados.....	25
2.2. Pontos Fracos.....	26

2.2.1. Novidade do Sifarma Módulo de Atendimento [®]	26
2.2.2. Aconselhamento de Medicamentos de Uso Veterinário (MUV).....	27
2.3. Oportunidades.....	28
2.3.1 Investimento em dermocosmética.....	28
2.3.2. Dispensa de Medicamentos Hospitalares.....	29
2.3.3. Realização de Testes Rápidos de Antígeno (TRAg).....	30
2.4. Ameaças.....	31
2.4.1. Medicamentos esgotados.....	31
3. CONCLUSÃO.....	31
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
PARTE III	
MONOGRAFIA.....	33
ÍNDICE DE FIGURAS.....	34
ÍNDICE DE TABELAS.....	34
LISTA DE ABREVIATURAS.....	35
1. INTRODUÇÃO.....	37
2. CÉREBRO.....	38
3. CÉLULAS ESTAMINAIS PLURIPOTENTES HUMANAS (HPSCS).....	38
3.1 Células Estaminais Embrionárias (ESCs).....	39
3.2 Células Estaminais Pluripotentes Induzidas (iPSC).....	40
4. ORGANOIDES.....	41
4.1 Organoides cerebrais.....	42
5. METODOLOGIAS DE OBTENÇÃO.....	43
5.1 Segregação - agregação.....	43
5.2 Rosetas neurais.....	44
5.3 Cultura de corpos embrioides livre de soro (SFEBq).....	44
5.4 Indução neural.....	45
5.5 Matrigel.....	45
5.6 Biorreator giratório.....	46
5.7 Modelos organoides existentes atualmente.....	47
6. VANTAGENS DOS MODELOS 3D.....	49
7. APLICAÇÕES.....	50
7.1 Modelação de doenças do cérebro.....	50
8. MODELAÇÃO DE DOENÇAS DEGENERATIVAS.....	51
8.1 Doença de Alzheimer.....	51
8.1.1 Modelos 3D de Doença de Alzheimer.....	52

8.1.2 Agentes terapêuticos em estudo.....	54
9. MODELAÇÃO DE DOENÇAS INFECIOSAS.....	56
9.1 Vírus Zika (ZIKV).....	56
9.1.2 Estudos com organoides cerebrais.....	56
9.1.3 Agentes terapêuticos em estudo.....	59
9.2 SARS-CoV-2.....	59
9.2.1 Manifestações neurológicas.....	60
9.2.2 Estudos em organoides cerebrais.....	61
9.2.3 Limitações/ Investigações futuras.....	64
10. LIMITAÇÕES DA TÉCNICA E PERSPETIVAS FUTURAS.....	65
11. CONCLUSÃO.....	67
11. BIBLIOGRAFIA.....	69
ANEXOS.....	73
Anexo 1 - Ilustração esquemática com informação complementar do processo de neurogênese e expansão cortical.....	73
Anexo 2 - Tabela síntese das limitações dos primeiros modelos de estudo do cérebro humano.....	74

RESUMO

O presente documento, redigido no âmbito da Unidade Curricular “Estágio Curricular” do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, inclui dois relatórios de estágio e uma monografia.

Os relatórios de estágio, que seguem uma estrutura de análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*), incidem sobre os estágios realizados na Indústria Farmacêutica Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A e em Farmácia Comunitária, na Farmácia Santiago, em Góis.

A monografia, intitulada “Organoides Cerebrais na Modelação de Doenças Degenerativas e Infeciosas”, sintetiza os principais avanços científicos e direções futuras dos mais recentes modelos de estudo da fisiologia cerebral, os organoides cerebrais, expondo o conhecimento atual, descoberta, metodologias de obtenção, aplicação e principais desafios inerentes à técnica. De modo particular, destaca a modelação de doenças neurológicas como a Doença de Alzheimer, para exemplo de uma doença degenerativa, e infeção pelo vírus Zika e pelo vírus SARS-CoV2. Os organoides cerebrais são culturas tridimensionais *in vitro* que representam uma ferramenta de última geração para diagnósticos preditivos, compreensão fisiopatológica e desenvolvimento de terapias individualizadas, principalmente quando otimizados com o conhecimento de outras áreas científicas.

Este documento conclui o ciclo de estudos com o trabalho realizado durante o último semestre do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Palavras-chave: Organoides, Cérebro, Modelação, Doenças, Doença de Alzheimer, vírus Zika, SARS-CoV-2.

ABSTRAT

This document, written within the "Curricular Internship" of the Integrated Master's Degree in Pharmaceutical Science of the Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, includes of two internship reports and a monograph.

The internship reports, which follow a SWOT analysis structure (Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats), focus on the internships carried out at the Pharmaceutical Industry Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A. and at Community Pharmacy, at the Farmácia Santiago, in Góis.

The monograph, entitled "Brain Organoids in the Modeling of Degenerative and Infectious Diseases", summarizes the main scientific advances and future directions of the most recent models for the study of brain physiology, the brain organoids, exposing current knowledge, discovery, methodologies for obtaining, application, and main challenges inherent to the technique. In particular, the monograph highlights the modeling of neurological diseases such as Alzheimer's Disease, as an example of a degenerative disease, and infection by the Zika virus and by the SARS-CoV2 virus. Brain organoids are three-dimensional in vitro cultures that represent a state-of-the-art tool for predictive diagnoses, pathophysiological understanding and development of individualized therapies, especially when optimized with knowledge from other scientific areas.

This document summarizes the end of this these studies with the work carried out during the last semester of the Integrated Master in Pharmaceutical Sciences.

Keywords: Organoids, Brain, Modeling, Disease, Alzheimer's disease, Zika virus, SARS-CoV-2.

PARTE I

RELATÓRIO DE ESTÁGIO NA BLUEPHARMA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA, S.A.

Setor de Estabilidades, Departamento de Desenvolvimento Analítico e
Galénico

LISTA DE ABREVIATURAS

AIM	Autorização de Introdução no Mercado
COVID-19	Doença Provocada pelo Novo Coronavírus SARS-CoV-2
DAG	Desenvolvimento Analítico e Galénico
FFUC	Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
HPLC	Cromatografia líquida de elevada eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICH	Conferência Internacional de Harmonização, do inglês <i>International Conference of Harmonization</i>
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
OoE	Fora de expectativa, do inglês <i>Out of Expectation</i>
OoS	Fora de especificação, do inglês <i>Out of Specification</i>
OoT	Fora de tendência, do inglês <i>Out of Trend</i>
SOP	<i>Standard Operating Procedure</i>
SWOT	Forças, Fraquezas, Oportunidades, Ameaças, do inglês <i>Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats</i>

I. INTRODUÇÃO

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) é um curso muito rico. O plano curricular, extenso e abrangente, viabiliza a preparação de especialistas do medicamento passíveis de exercer a profissão em diversas áreas como farmácia hospitalar, farmácia comunitária, análises clínicas, indústria farmacêutica, investigação, assuntos regulamentares do medicamento e produtos de saúde, entre outros (*Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas - Faculdade de Farmácia - Cursos - Universidade de Coimbra, [s.d.]*).

Deste modo, a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) celebra acordos com diferentes instituições, garantindo aos alunos, por um lado, a oportunidade de experienciar diferentes opções de saída profissional, por outro, completar a formação teórica com conhecimentos práticos da profissão farmacêutica.

Perante o interesse despertado pelas Unidades Curriculares de Tecnologia Farmacêutica e o conhecimento da vertente empreendedora e inovadora do Grupo Bluepharma, com sede na cidade onde estudo, a escolha da empresa Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A. revelou-se óbvia no momento de decidir um local de estágio complementar ao estágio em farmácia comunitária.

O presente relatório diz, assim, respeito ao estágio curricular realizado nesta empresa, com uma duração de 3 meses, no período de 11 de janeiro de 2021 a 02 de abril de 2021. Durante o estágio, exerci funções no Setor de Estabilidades.

I.1 Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A.

A Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A é uma indústria farmacêutica, sediada em Coimbra. Faz parte do grupo Bluepharma que detém 20 empresas, emprega mais de 700 colaboradores e completou este ano, 2021, 20 anos de atividade (*Bluepharma, [s.d.]*).

A empresa atua na cadeia do medicamento nas áreas de investigação, desenvolvimento, fabrico e comercialização, com a produção de medicamentos próprios e para terceiros. Tem como missão o desenvolvimento de medicamentos de elevado valor acrescentado e uma aposta contínua na qualidade e inovação. A sua estratégia tem como palavras-chave para o sucesso: Investimento, Inovação, Internacionalização, Parcerias e Qualidade (*Bluepharma, [s.d.]*).

I.2 Setor da Estabilidades

O meu estágio foi realizado no Setor de Estabilidades do Departamento de Desenvolvimento Analítico e Galénico (DAG), mais especificamente na equipa de Revisão da documentação.

O Setor de Estabilidades detém a responsabilidade sobre os testes de estabilidades. De entre as suas funções deve preparar os lotes para colocar nas câmaras climáticas, elaborar e controlar o inventário de amostras, retirar as amostras nos tempos definidos, realizar os ensaios de estabilidade e elaborar os protocolos e relatórios de acordo com os objetivos de cada ensaio (Niazi, 2020).

Os estudos de estabilidade são uma parte indispensável no desenvolvimento, produção e comercialização de medicamentos. Na fase de desenvolvimento do produto fundamentam a submissão de novos pedidos de Autorização de Introdução no Mercado (AIM) e em produtos já aprovados, monitorizam a qualidade. Estes distinguem-se em dois tipos: Estudos Formais e Estudos *On-going*. Os primeiros, dão suporte à fase de desenvolvimento de medicamentos, permitindo conhecer o comportamento dos mesmos ao longo do tempo sob a influência da luminosidade, temperatura, humidade e definir condições de armazenamento, prazo de validade e materiais de acondicionamento. Os segundos visam supervisionar a qualidade, eficácia e segurança dos medicamentos durante o período de validade estabelecido e aferir o impacto de qualquer alteração potencialmente significativa do fabrico ou acondicionamento (Niazi, 2020).

A equipa responsável pela documentação tem os revisores dos diários dos analistas, para os ensaios ICH (*International Conference of Harmonization*), tem um colaborador responsável pela deteção e investigação de desvios e outro pelo acompanhamento dos lotes no mercado, em estudos *On-going*, com a elaboração de Análises de Tendências. A minha função foi cooperar com a Dra. Ana Filipa Guerra, a responsável pela Análises de tendências.

2. ANÁLISE SWOT

O relatório encontra-se estruturado sob a forma de análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*). Nesta metodologia, as Forças (*Strengths*) e as Fraquezas (*Weaknesses*) são referentes a fatores internos, enquanto as Oportunidades (*Opportunities*) e as Ameaças (*Threats*) se relacionam com fatores externos (Pereira e Rito, 2013).

2.1. Pontos Fortes

2.1.1. Acolhimento e acompanhamento na Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A

No primeiro dia de estágio foi realizada uma sessão de acolhimento por parte do Departamento dos Recursos Humanos. Esta teve como propósito elucidar a estrutura da equipa dirigente, o funcionamento e a política da instituição. Foram esclarecidas as condições de estágio e quais os meus direitos e deveres. Nessa mesma sessão, conheci a minha tutora, responsável por me mostrar as instalações, apresentar os colaboradores do departamento em que fui inserida, me fornecer o material necessário para trabalhar e indicar quem seria a minha orientadora de estágio. A tutora Dra. Ana Marisa Simões, bem como a orientadora Dra. Ana Filipa Guerra, e a diretora do Setor de Estabilidades Dra. Ana Nunes Ribeiro, foram o elo mais próximo de ligação à empresa, e sempre me apoiaram prontamente.

Considero que esta sessão de acolhimento inicial, bem como a atribuição de um tutor para cada estagiário, e todo o acompanhamento ao longo do estágio, foram pontos fortes, pois permitiram-me conhecer a instituição de uma forma integrada e sentir-me bem recebida na grande equipa da Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A.

2.1.2. Oportunidade de Formação Complementar

A Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A propõe, para cada novo colaborador ou estagiário que inicie funções, um Plano de Integração que é adequado às responsabilidades de cada Departamento e tem a duração de 3 meses. O plano de formação inicial é muito pertinente para transmitir, aos novos membros da empresa, as ferramentas necessárias para a segurança, bom funcionamento e correta execução das tarefas exigidas. Este inclui a leitura e compreensão de documentos e procedimentos internos - SOP (*Standard Operating Procedure*) e participação em formações, com realização de testes para validação de conhecimentos.

Realizei formações de integração na organização, com temas como: Boas Práticas de Fabrico, Saúde e Segurança no trabalho, Ambiente e Sistemas informático e Documental. Numa segunda fase, as formações tinham como objetivo a integração no setor de trabalho. Participei em formações sobre: Estudos de Estabilidade, Documentação Analítica, Validação de Métodos Analíticos, Ensaios de Dissolução, HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) e Tratamento e Investigação de resultados fora de especificação (OoS), fora de tendência (OoT) e fora de expectativa (OoE).

Esta formação complementar oferecida pela empresa constituiu, assim, outro ponto forte do estágio. Permitiu-me consolidar os conhecimentos teóricos já adquiridos, ganhar novas capacidades técnicas e realizar o trabalho proposto de acordo com as normas e objetivos da entidade patronal.

2.1.3. Disponibilização dos materiais de trabalho

A Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A disponibiliza a cada novo colaborador ou estagiário todo material necessário à execução das suas funções, desde o equipamento de proteção individual, essencial nos setores de fabrico, embalagem e laboratórios, aos meios tecnológicos, para os departamentos de trabalho documental. Para a realização do meu estágio, foi-me emprestado um computador da empresa com todos os programas necessários instalados e acesso a assistência técnica informática permanente, para que tivesse todas as condições de trabalho.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Teletrabalho

A equipa de revisão de documentação do Setor de Estabilidades encontrava-se em regime de teletrabalho, motivado pela situação pandémica provocada pela COVID-19, no momento do meu estágio. Como parte da equipa, este foi também concretizado remotamente. Deste modo, perdi a oportunidade, por um lado, de partilhar a sala com a restante equipa e criar proximidade aos técnicos superiores, por outro, de conhecer e me relacionar presencialmente com a minha orientadora, dados que permitem uma interação mais presente, célere e constante esclarecimento de dúvidas e perceção em tempo real do *feedback* do trabalho executado.

Não obstante, esta dificuldade foi atenuada pela disponibilização de plataformas de comunicação digital e todas as minhas dúvidas foram respondidas à distância de um clique ou uma chamada. Para além disso, possibilitou-me fortalecer outras capacidades também importantes a qualquer profissional. Desenvolvi maior autonomia na resolução de problemas e gestão do trabalho e tempo, pelo que retiro algo de construtivo desta experiência.

2.2.2. Reduzida diversidade de tarefas realizadas

A análise de resultados OoT utiliza, para cada produto comercializado, um lote representativo anual, por dosagem, zona climática e material de embalagem (Niazi, 2020; Quality e Working, 2011). Os dados dos testes laboratoriais para esses lotes seguidos em

estabilidade são transcritos para uma folha de cálculo que permite estudar a evolução de parâmetros críticos, específicos de cada medicamento, por análise estatística e tendo em conta o histórico do produto. A interpretação dessas folhas, com elaboração periódica de relatórios, permite seguir a tendência do produto e detetar precocemente e alertar o cliente de eventuais problemas no produto, por exemplo ao nível da produção ou qualidade.

No momento do meu estágio, o Setor de Estabilidades encontrava-se num processo de reformulação e melhoria do banco de dados de Análises de Tendência, com renovação das folhas de cálculo de todos os lotes de estabilidade. As novas folhas permitem uma análise mais robusta e deteção assertiva de resultados OoT e a minha função consistiu exatamente na construção dessas folhas de cálculo.

O meu trabalho possibilitou-me criar agilidade e aprofundar, com a prática diária, os meus poucos conhecimentos em Excel e permitiu-me sentir útil e contribuir para a melhoria deste processo de análise de produtos comercializados. Penso, e tendo em conta a duração de frequência do estágio, que a multiplicidade e dificuldade das tarefas exigidas podia ainda ter sido mais ampla e exigente. No entanto, tal facto foi compensado pela dedicação da orientadora que me foi e explicando e fornecendo material teórico, de como se processam outras tarefas, como a elaboração de relatórios e contacto com os clientes, mesmo eu não chegando a executa-las.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Implementação da Melhoria Contínua/*Kaizen*

A Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A adota uma filosofia de gestão baseada na Melhoria Contínua/ *Kaizen*. A Bluelean é o grupo de colaboradores responsável pela implementação deste método de trabalho organizacional que visa a diminuição de desperdícios, estabelecendo o foco nas equipas e nas suas dificuldades em executar um trabalho mais eficiente, alinha a visão e objetivos desde a gestão de topo até aos colaboradores e centra-se no valor para o cliente.

A empresa tem 48 equipas de reuniões diárias *Kaizen*, que permitem pequenas implementações de ajuste, a par de outros projetos e reuniões que envolvem os vários setores da indústria, administração, colaboradores e consultores externos que atuam desde a definição e balanço estratégico de iniciativas até à monitorização de ações práticas de melhoria. O *Kaizen* diário é um incentivo à participação e envolvimento dos colaboradores e permite disciplinar as equipas sobre um método que transforma problemas em oportunidades de melhoria,

através da análise e estabelecimento de objetivos sobre um ou vários indicadores de performance.

Este fator foi particularmente impactante na minha experiência de estágio na medida em que fui integrada numa das equipas de *Kaizen* diário, a equipa de documentação do Setor de Estabilidades, com foco na revisão, dentro de prazos estabelecidos, dos diários dos analistas. Isso possibilitou-me ter um contacto assíduo com o grupo de trabalho e observar a dinâmica, os desafios e as tarefas de um profissional neste setor, atenuando o isolamento que se acentua com o teletrabalho.

2.4. Ameaças

2.4.1. Pandemia COVID-19

A situação de saúde pública vivida a nível mundial impactou negativamente, de alguma forma, todos os setores, e a indústria farmacêutica não é exceção. Apesar de não ter cessado funções, a empresa reduziu o número de colaboradores em regime presencial e todos os departamentos passíveis de teletrabalho, estão em funções a partir de casa.

Esse facto marcou negativamente o meu estágio. Para além de se realizar, como suprarreferido, em teletrabalho, foi uma experiência privada de todas as atividades presenciais de inclusão e *lazer*, que permitem observar a dinâmica interna, a conexão com os colaboradores e o estabelecimento de relações interpessoais e de ajuda, também importantes para a eficiência e motivação no trabalho.

Acresce que a empresa recebe sempre vários alunos do MICF. A possibilidade de comunicação e interação entre os vários colegas, em diferentes departamentos, também contribui para a integração e engrandecimento do estágio, e este ano, essa foi particularmente reduzida.

Não sendo um fator determinante para a execução das tarefas de estágio, esta proximidade é uma outra vertente de aprendizagem, a partilha contante de experiências, tanto nos momentos de trabalho como nas pausas e atividades, também contribui para o crescimento pessoal e profissional.

Sabendo dessa importância, e tive oportunidade de o experimentar na celebração de aniversário, dia 1 de março, por exemplo, a empresa adaptou muitos eventos para meios digitais, numa atitude resiliente face a esta situação e não deixou de selar por se manterem os momentos importantes e as relações entre toda a empresa.

3. CONCLUSÃO

Em suma, e superando os constrangimentos do quadro pandémico atual, o sucesso do estágio deveu-se a três fatores distintos, a integração no grupo de revisão de documentação, permitindo-me um contacto contínuo com a rotina e desafios diários da equipa, a formação teórica e prática ministrada e o acompanhamento orientadora.

O balanço geral do meu estágio é muito positivo, foi um desafio enriquecedor que colocou à prova minha capacidade de trabalho autónomo e adaptação. Foi o meu primeiro contacto com a profissão e com o dia-a-dia dentro de uma empresa, e no departamento em que estagiei desenvolvi novas competências e ferramentas de trabalho que levo para o meu futuro profissional. O estágio permitiu-me também observar as inúmeras oportunidades do farmacêutico na indústria, e sinto-me grata pela oportunidade que tive.

4. BIBLIOGRAFIA

1. **Bluepharma** - [Consult. 6 set. 2021]. Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/>
2. **Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas - Faculdade de Farmácia - Cursos - Universidade de Coimbra** - [Consult. 6 set. 2021]. Disponível em: <https://apps.uc.pt/courses/PT/course/1172>
3. NIAZI, Sarfaraz K. - Stability Testing of New Drug Substances and Products. **Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations**. August (2020) 31–40.
4. PEREIRA, Rui; RITO, Maria - A análise SWOT como estratégia de (auto) avaliação: uma partilha de experiências em contextos de prática clínica supervisionada. **Congresso Internacional De Ssupervisão Clínica: Livro De Comunicações & Conferências**. 2013) 273–278.
5. QUALITY, Analytical; WORKING, Control - Laboratory Data Management; Out of expectation (OOE), Out of Trend (OOT) and Out of Specification (OOS) Results. 2011) 1–16.

PARTE II

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA

Farmácia Santiago – Góis

LISTA DE ABREVIATURAS

COVID-19	Doença Provocada pelo Novo Coronavírus SARS-CoV-2
DGS	Direção Geral de Saúde
FPS 50+	Fator de Proteção Solar 50 ⁺
INFARMED, I.P.	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.
LAF	Linha de Apoio Farmacêutico
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
MNSRM	Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica
MSRM	Medicamentos Sujeitos a Receita Médica
MUV	Medicamentos de Uso Veterinário
PIM	Preparação Individualizada de Medicação
SARS-CoV-2	Vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus - 2
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica
SWOT	Forças, Fraquezas, Oportunidades, Ameaças, do inglês <i>Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats</i>
TRAg	Testes Rápidos de Antígeno
UV	Ultravioleta

I. INTRODUÇÃO

“O exercício da atividade farmacêutica tem como objetivo essencial a pessoa do doente”, Artigo 1º do Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos (Ordem dos Farmacêuticos, 1998). De facto, a profissão farmacêutica tem como uma das suas áreas centrais a farmácia comunitária, tanto pelo número de profissionais que emprega como pela importância junto da população. A farmácia tem o contacto mais próximo com o utente, é por isso uma estrutura essencial para a saúde pública. O farmacêutico, em coordenação com a equipa técnica da farmácia, tem como função prestar cuidados de proximidade, através da dispensa de Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM), aconselhamento de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM), acompanhamento farmacoterapêutico, administração de vacinas e medicamentos injetáveis, e promoção de literacia em saúde.

Desta forma, o estágio curricular em farmácia comunitária é importantíssimo para colocar em prática e completar, com o saber e experiência de outros farmacêuticos, os conhecimentos adquiridos ao longo do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) e, em paralelo, preparar os estudantes para a prática profissional e para os novos desafios que ela representa.

Este relatório diz, assim, respeito ao estágio curricular realizado na Farmácia Santiago, em Góis, sob orientação da Dra. Ana Campos Coroa, com uma duração de quatro meses, num total de 670 horas, de 5 de abril de 2021 a 30 de julho de 2021.

2. ANÁLISE SWOT

O relatório encontra-se organizado sob a forma de análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*), sendo as Forças (*Strengths*) e as Fraquezas (*Weaknesses*) referentes a fatores internos, e as Oportunidades (*Opportunities*) e as Ameaças (*Threats*) a fatores externos (Pereira e Rito, 2013).

Integrados na descrição dos pontos, para ilustração das minhas considerações, vou descrevendo casos práticos concretos, que demonstram como o estágio potenciou o conhecimento teórico do MICF com os desafios reais de trabalho.

2.1. Pontos Fortes

2.1.1. Equipa técnica

A equipa técnica da Farmácia Santiago é constituída por duas farmacêuticas, Dra. Ana Campos Coroa, diretora técnica e proprietária, e Dra. Maria Inês Henriques, farmacêutica substituta; por uma técnica de farmácia, Ana Rute Paixão; e por uma técnica auxiliar de farmácia, Patrícia Rodrigues. Sinto-me muito grata pela forma como a equipa me acolheu e me ensinou tantas coisas, me fez crescer profissionalmente a cada dia com a sua experiência. Sou grata por terem partilhado o seu espaço e por todo o empenho e paciência em responder às minhas questões. Toda a equipa, e de forma mais próxima ambas as farmacêuticas, acompanhou o meu trabalho, sempre disponível para me auxiliar e partilhar os seus conhecimentos.

Considero muito importante, e uma componente que só se aprende completamente na prática profissional, a gestão de recursos humanos, otimizando as valências de cada membro de uma equipa e promovendo o bem-estar no trabalho, em prol do crescimento da empresa, neste caso, da farmácia.

A simpatia e cuidado que desde início demonstraram comigo, em paralelo com a confiança, para que desenvolvesse a capacidade de autonomia foram imprescindíveis para o meu crescimento enquanto farmacêutica e consolidação dos conhecimentos teóricos aprendidos.

2.1.2. Localização da farmácia / Heterogeneidade de utentes

Góis é uma pequena vila com cerca de dois mil habitantes, cuja população varia de forma quase sazonal. Grande parte do ano, Góis tem maioritariamente uma população envelhecida, com muitos doentes crónicos, polimedicados e com reduzida escolaridade. Acresce que se situa num local de difícil acesso a outros centros, por isso a população mais jovem recorre igualmente à farmácia para compra dos mais diversos produtos. No verão, a vila recebe muitos turistas, portugueses e estrangeiros, e os familiares dos residentes habituais.

Como o meu estágio decorreu durante a primavera e parte do verão, pude contactar com os diferentes tipos de utentes e considero que essa heterogeneidade foi um ponto forte do mesmo.

Para os idosos da vila, o farmacêutico e a farmácia desempenham um papel importante, pois representam credibilidade e segurança não apenas em relação à sua saúde, mas também à vida pessoal e familiar. Mais do que dispensar os medicamentos da receita ou medir algum parâmetro fisiológico, o farmacêutico tem aqui um papel de ouvinte e muitas vezes é

exatamente prestando atenção e escutando a pessoa que se detetam dificuldades ou problemas de saúde em que pode atuar com prontidão, fazendo um aconselhamento farmacêutico ou referenciando ao médico, caso a situação o exija. Particularmente, esta vertente humana da profissão foi marcante para mim. O facto de me sentir útil e prestável na vida de alguém contribuiu para a motivação diária e para a vontade de progredir na formação contínua.

Paralelamente, entre os utentes habituais da farmácia também está a população mais jovem da vila, maioritariamente para compra de produtos de saúde, dermocosmética e produtos de puericultura. De igual modo, os turistas de passagem pela vila recorrem muitas vezes à farmácia para situações de aconselhamento de produtos de dermocosmética ou MNSRM para situações agudas. A faixa etária mais nova, bastante mais informada, talvez pelo maior acesso à *internet* e outras fontes de informação mais ou menos fiáveis, apresenta maior retração ao aconselhamento do farmacêutico o que me obrigou a pensar em diversas estratégias de comunicação e salientou a importância do farmacêutico investir num aconselhamento diferenciador e personalizado, que contribua para a fidelização do utente e valorização do setor farmácia.

Os diferentes poderes de compra e a disparidade referentes à literacia em saúde permitiram-me, enquanto profissional de saúde, aconselhar diferentes tipos de produtos e adaptar a linguagem utilizada, tornando cada dia e cada atendimento um desafio.

2.1.3. Frequência e plano de estágio

Um dos pontos fortes do meu estágio curricular em farmácia comunitária foi o plano de estágio implementado. Segundo as Normas Orientadoras da Faculdade, e de forma sintética, consistiu no aprovisionamento e armazenamento de existências da farmácia, dispensa de medicamentos e indicação farmacêutica de medicamentos e produtos de saúde, informação sobre organização e gestão da farmácia e sobre a consulta de documentação científica de utilização em farmácia.

Tendo em conta as características da farmácia onde estagiei, foi-me também permitido completar o plano de estágio com tarefas associadas a medicamentos manipulados, medição de parâmetros bioquímicos, processamento de receitas manuais, conferência do receituário e faturação de lotes e serviços farmacêuticos, nomeadamente Preparação Individualizada da Medicação.

A duração de 670 horas de estágio foi um tempo ótimo para aprender os conhecimentos de logística e gestão farmacêutica, bem como fortalecer os conhecimentos de Unidades Curriculares tão diversas como, Indicação Farmacêutica, Farmacologia, Fitoterapia,

Deontologia e Legislação Farmacêutica, entre outras, e ganhar confiança na comunicação assertiva junto dos utentes.

Para demonstrar o suprarreferido, apresento um exemplo prático de um aconselhamento farmacêutico que fiz e me permitiu exercitar tanto a capacidade comunicativa como aplicar conhecimentos de diversas áreas. Uma utente do sexo feminino, com cerca de 60 anos, dirige-se à farmácia e solicita a venda de Fosfomicina, uma vez que pensa que está a desenvolver uma infeção urinária. Para compreender a situação, e numa atitude de escuta ativa, questiono a utente sobre os sintomas que apresenta. A mesma refere que sente principalmente muita dor na micção, acompanhada de vontade de urinar frequente e oligúria. Acrescenta também que é uma situação recorrente e que, quando recorre ao médico, é o antibiótico que lhe é prescrito.

De facto, perante as respostas recebidas, o quadro clínico sugere tratar-se de uma infeção urinária. Identificada a situação, explico à utente que o medicamento por ela pedido é um MSRM e que, por isso, não o posso dispensar sem a devida prescrição. Fosfomicina 3000 mg, comercializado na forma de granulado para solução oral, é um antibiótico bactericida que atua impedindo a síntese da parede celular bacteriana por inibição da síntese de peptidoglicano (Em, 2020). Deve ser o médico a avaliar a situação clínica da utente e a prescrever a terapêutica adequada.

No entanto, indico à utente algumas medidas, farmacológicas e não farmacológicas, que podem ajudar no tratamento e na prevenção. Primeiramente, destaco a importância da ingestão de água (1 a 2 L diários). De seguida, explico também que existem no mercado suplementos fitoterápicos com ação diurética e/ou antisséptica, indicados no alívio dos sintomas associados às infeções do trato urinário não complicadas e na prevenção de recidivas. Estes suplementos incluem ingredientes diuréticos como: talo de Cavalinha (*Equisetum arvense*), estiletes de milho (*Zea mays L.*), e folhas de *Camellia sinensis*. Com propriedades antissépticas destacam-se o fruto de Arando vermelho (*Vaccinium subg. Oxycoccus*) e folha de Uva-ursina (*Arctostaphylos uva-ursi*), que atuam por inibição da aderência bacteriana, impedindo a formação de biofilme no trato urinário. Para além disso ainda pode ser benéfica a suplementação para reforço do sistema imunitário, por exemplo, raiz de *Echinacea purpurea* (Gupta, Grigoryan e Trautner, 2017; Sihra *et al.*, 2018). A utente, que desconhecia a existência destes suplementos, valorizou a informação cedida e demonstrou interesse em ver os suplementos com esta composição existentes na farmácia e experimentar.

2.1.4 Preparação Individualizada da Medicação (PIM)

A Farmácia Santiago disponibiliza aos seus utentes diversos serviços. Para além da habitual medição da glicémia capilar, pressão arterial, colesterol total, perfil lipídico, e determinação de IMC, está disponível a Preparação Individualizada de Medicação (PIM). De facto, segundo a Portaria n.º 97/2018 de 9 de abril e perante a evolução do setor das farmácias comunitárias enquanto espaço de saúde reconhecido pelos utentes, as farmácias podem disponibilizar diversos serviços farmacêuticos de promoção de saúde e bem-estar, em que se inclui o serviço PIM (Portaria n.º 97/2018 de 9 de abril - Diário da República n.º 69/2018, Série I de 2018-04-09).

O serviço de PIM prende-se com a preparação semanal da medicação de um utente, nomeadamente as formas farmacêuticas sólidas orais, organizada em caixas dispensadoras por horas do dia, de acordo com a posologia prescrita. Este reacondicionamento da medicação contribui para assegurar a sua correta, segura e efetiva utilização, prevenindo situações de esquecimento de tomas e/ou duplicação de terapêutica. Permite facilitar a rotina de utentes, diminuindo a não adesão não intencional. Indicados para o serviço estão utentes que reportem dificuldades físicas ou cognitivas no processo de uso de medicamentos ou com regimes terapêuticos complexos, principalmente idosos que moram sozinhos.

Este serviço permitiu-me ganhar um contacto mais próximo com os medicamentos e com as posologias aplicadas aos mesmos, facilitando muito a comunicação com os utentes; aplicar os conhecimentos de Farmacologia na observação de esquemas terapêuticos e compreender a importância do farmacêutico no acompanhamento de doentes crónicos e polimedicados e no auxílio da comunidade.

2.1.5 Preparação e encomenda de manipulados

Um medicamento manipulado define-se como “qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico”, de acordo com o Decreto-Lei n.º 95/2004, de 22 de abril (Decreto-Lei n.º 95/2004 de 22 de abril Diário da República - I SÉRIE-A 2439, 2004). Estes, apesar de cada vez menos frequentes, permitem colmatar falhas da indústria em formulações adequadas ao perfil fisiopatológico de um doente em particular e, em farmácia comunitária, têm como áreas de maior solicitação Dermatologia e/ ou Pediatria.

Durante os meses do meu estágio surgiram duas situações distintas, ambas relacionadas com a patologia designada Escabiose, associada à infeção pelo ácaro *Sarcoptes scabiei var. hominis*. A Escabiose é altamente contagiosa, a transmissão ocorre habitualmente por contacto cutâneo

direto pessoa-a-pessoa, e o principal sintoma é prurido intenso generalizado. Há algumas opções terapêuticas cuja escolha depende de vários fatores como a idade do doente, gravidade da doença, experiência local, presença de eczema/escoriação, toxicidade do fármaco, e o seu custo e disponibilidade (Santiago e Januário, 2017).

No primeiro caso, a opção de tratamento escolhida foi Enxofre de aplicação tópica. É um tratamento antigo muito seguro e eficaz. Em Portugal, não existe comercializado, estando apenas disponível na forma de manipulado: precipitado de 5-10% em vaselina, a aplicar uma vez ao dia, durante três dias. Participei nas operações de preparação, acondicionamento e rotulagem do manipulado no laboratório da farmácia, respeitando as boas práticas de manipulação, e na elaboração da ficha de preparação do medicamento.

No segundo caso, a prescrição foi de cápsulas de Ivermectina 200 µg/kg oral, toma única, repetir em 14 dias. Como a farmácia não tem o equipamento necessário para a preparação desta forma farmacêutica, observei o procedimento de encomenda de manipulados a outras farmácias.

Em ambos os casos participei também na dispensa, com informação de como proceder ao tratamento, inclusivamente, tratamento simultâneo de todos os coabitantes, sintomáticos ou não, e lavagem a alta temperatura das roupas pessoais em contacto com a pele e de cama.

Tendo em conta que poder participar na preparação de manipulados é cada vez mais raro, considero que foi um ponto positivo do meu estágio.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Novidade do Sifarma Módulo de Atendimento[®]

A Farmácia Santiago utiliza o *software* Sifarma 2000[®], da Glintt, que otimiza o atendimento ao utente e os aspetos burocráticos, técnico-científicos e de gestão na farmácia. A Unidade Curricular de Organização e Gestão Farmacêutica forneceu o primeiro contacto teórico-prático com este *software*, porém só a utilização diária permite consolidar os conhecimentos e ganhar agilidade.

Em março de 2021 foi implementado na farmácia o novo módulo do *software* - Sifarma Módulo de Atendimento[®] - com uma distinta configuração das funções relativas ao atendimento. Este novo módulo apresenta vários benefícios. Para além de visualmente mais intuitivo, permite recuar no atendimento, mesmo que já se encontre no ecrã de pagamento; enquadrar diferentes utentes no mesmo atendimento, sendo possível emitir diferentes faturas; e garante fácil acesso e gestão do cartão SAÚDA, entre outras funções. No entanto, este

módulo está ainda incompleto, por exemplo, no importe de dados do utente do Sifarma 2000® ou organização de utentes por perfil comercial.

Assim, considero que este ponto foi menos positivo no meu estágio por dois motivos. Por um lado, a novidade do programa instalado fez com que toda a equipa ainda estivesse em fase de adaptação e compreensão do módulo. Por outro, por ser ainda um módulo parcial em termos de funcionalidades, tive que aprender a usar igualmente ambos os programas em simultâneo na parte do atendimento, isto é, muitas vezes para terminar um atendimento completo, tinha ambos os programas abertos para completar as necessidades exigidas no atendimento ao utente. Sendo os dois *softwares* bastante diferentes exigiu um maior esforço da minha parte para aprender a trabalhar com os dois, e tornou os atendimentos, numa fase inicial, mais morosos.

Não obstante, este facto não deixou de ser estimulante e me permitir, a cada novo atendimento, descobrir ícones e funcionalidades novas e, enquanto equipa, houve entretajuda para que todos pudéssemos tirar partido do novo módulo de atendimento e sinto que pude contribuir ativamente para isso.

2.2.2. Aconselhamento de Medicamentos de Uso Veterinário (MUV)

Estando a farmácia localizada numa vila rural rodeada de pequenas aldeias, é bastante comum a dispensa de Medicamentos de Uso Veterinário (MUV) tanto para animais de companhia como para pecuária. Durante o meu estágio tive oportunidade de fazer a dispensa de desparasitantes externos e internos, contraceptivos orais, champôs, entre outros produtos, bem como contactar com várias receitas veterinárias para as mais diversas situações.

Senti alguma dificuldade, principalmente numa fase inicial, a prestar aconselhamento sobre estes produtos, pois desconhecia muitos deles, bem como as suas indicações, em parte pela lacuna de uma abordagem mais prática na Unidade Curricular de Preparações de Uso Veterinário.

Não obstante, este facto permitiu aumentar a minha curiosidade sobre estes produtos e MUV e desenvolver algum trabalho autónomo, numa atitude resiliente também importante, para melhorar o meu atendimento, a par de toda a ajuda e formação prática que a equipa me foi dando ao longo do estágio.

2.3. Oportunidades

2.3.1 Investimento em dermocosmética

O facto de Góis ser relativamente isolado de grandes centros com maior oferta em produtos de saúde, nomeadamente, hipermercados ou parafarmácias, torna importante algum investimento em produtos diversificados de dermocosmética. A contribuir para esse investimento está o interesse e gosto de ambas as farmacêuticas nesta área e a observação de que é um setor do *stock* que permite diferenciar a farmácia e fidelizar os utentes.

Durante o meu estágio tive oportunidade de contactar com diversos produtos e formas galénicas, observar os rótulos, associar os compostos ativos à função do produto e partilhar opiniões sobre os mesmos com as farmacêuticas. Aprendi muito com o seu conhecimento, formação e experiência profissional. Tive também, e sou muito grata por isso, a oportunidade de participar de diversas formações e apresentações sobre dermocosméticos, nomeadamente relacionados com o envelhecimento e hiperpigmentação, e do processo de encomenda aos fornecedores, tendo em conta a procura pelos utentes. Prestei aconselhamento sobre produtos de higiene íntima, cuidados de rosto antienvhecimento e para pele acneica, fotoproteção e gamas pediátricas.

A título de exemplo, descrevo um aconselhamento que prestei sobre fotoproteção durante o meu estágio. Uma utente, com cerca de 35 anos, entra na farmácia com um carrinho de bebé pedindo um protetor solar que desse para toda a família, a mãe, o bebé, e o irmão mais velho e pai que aguardam do lado de fora da farmácia. A primeira pergunta que faço é a idade das crianças, à qual a utente responde tratar-se de dois meninos de um ano e meio e seis anos de idade. Observo também que a pele da utente é clara, podendo corresponder a um fototipo I, II ou III.

Perante a situação, o primeiro aconselhamento que dou à utente é o de levar um protetor mineral para o seu bebé. Indico que, pela maior sensibilidade e permeabilidade da pele das crianças, mais suscetível a alergia de contacto com os filtros orgânicos, até aos três anos estão recomendados os filtros inorgânicos, não absorvidos pela pele. Informo que este tipo de filtros físicos são substâncias de origem mineral, à base de Dióxido titânio e Óxido Zinco, que atuam por dispersão das radiações ultravioleta (UV), recomendados para crianças e indivíduos adultos alérgicos. A utente pode optar por levar esta opção para toda a família, no entanto, advirto também para a menor cosmeticidade do produto, que deixa a pele esbranquiçada (Cravo *et al.*, 2008).

A utente revela interesse em levar o produto mais adequado para o bebé, mas tendo em conta as características do produto prefere levar outro mais fácil de aplicar para a

restante família. Assim, proponho optar por uma formulação pediátrica de filtros orgânicos, em leite ou *spray*, com Fator de Proteção Solar 50⁺ (FPS 50⁺). Os filtros orgânicos ou químicos são compostos que absorvem a radiação UV (UVB e/ou UVA) e o FPS 50⁺ é o fator de proteção mais elevado, ideal para as crianças e adultos de fototipo de pele clara, para garantir máxima proteção. Depois da escolha dos produtos, explico à utente que deve fazer a aplicação do protetor solar de filtros químicos meia hora antes da exposição solar, para que o produto seja absorvido, e que a proteção solar tópica deve ser reaplicada em quantidade suficiente de duas em duas horas para garantir eficácia. Em simultâneo, relembro as recomendações sobre fotoproteção, principalmente nas crianças, que se deve evitar a exposição solar entre as 11h e 17h e usar chapéu e vestuário, com fotoproteção tópica apenas nas áreas expostas ao sol.

Este investimento em dermocosmética é uma ótima oportunidade para qualquer farmacêutico aprofundar os conceitos teóricos aprendidos em Dermofarmácia e Cosmética, no MICF. Para mim, foi particularmente impactante pois tinha e tenho cada vez mais interesse pela área.

2.3.2. Dispensa de Medicamentos Hospitalares

A necessidade de alocação de todos os meios dispensáveis para o combate à pandemia de COVID-19 a nível hospitalar conduziu à cedência em ambulatório de medicação de dispensa exclusiva hospitalar, em farmácia comunitária, medida aprovada pela Direção Geral de Saúde (DGS) e pela Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. (INFARMED, I.P.) na Norma Conjunta DGS/INFARMED n.º 03/2020, a 19 de março (Direção-Geral de Saúde, 2020).

O procedimento inicia-se com o contacto do utente com o hospital onde é acompanhado, informando que pretende utilizar este serviço. O hospital contacta a Linha de Apoio Farmacêutico (LAF) que irá notificar, por *e-mail*, a farmácia escolhida pelo utente, disponibilizando as informações necessárias para a dispensa do medicamento. Após a entrega da medicação por um distribuidor grossista, esta é verificada, num local reservado, por um farmacêutico, e o utente é informado de que o seu medicamento se encontra disponível para dispensa. Para proteger a confidencialidade do utente, o medicamento é dispensado dentro de um saco opaco e quaisquer questões são esclarecidas pelo telefone. Por último, o farmacêutico regista a dispensa no *Sifarma Clínico* ficando a informação disponível para os profissionais de saúde com acesso ao mesmo, utilizando o *software* da farmácia e confirma, por *e-mail*, à LAF que esta foi realizada (Ordem dos Farmacêuticos, 2020).

Durante o meu estágio, tive a oportunidade de acompanhar a dispensa de alguns medicamentos hospitalares, tendo participado na verificação da medicação e registo no *software*. Durante o meu estágio, tive a oportunidade de acompanhar a dispensa de alguns medicamentos hospitalares, tendo participado na verificação da medicação e registo no *software*. Este procedimento, para além de libertar equipas hospitalares para os desafios da emergência de saúde pública, valoriza a intervenção e a competência do farmacêutico comunitário na cadeia de medicamento e beneficia o utente. Este evita a deslocação ao hospital com único intuito de dispensa de medicação, e custos associados, garantindo a continuidade do tratamento.

2.3.3. Realização de Testes Rápidos de Antígeno (TRAg)

A Circular Normativa Conjunta do DGS/INFARMED/INSA n.º 006/CD/100.20.200 de 16/12/2020 inclui, de forma clara, os farmacêuticos entre os profissionais habilitados para a prestação do serviço de realização de testes rápidos de antígeno (TRAg) para o SARS-Cov-2. Para tal, é necessário um farmacêutico com experiência ou formação e competência para a colheita da amostra biológica, realização do teste e interpretação dos resultados; é necessário o cumprimento de requisitos específicos relativamente a instalações e biossegurança e a comunicação dos resultados no Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica (SINAVE) e ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (Circular Informativa Conjunta, 2020).

Acresce que, desde o dia 1 de julho, é possível realizar TRAg para o SARS-Cov-2 com um regime excecional e temporário de comparticipação, sob orientação e cumprimento dos requisitos da Portaria n.º 138-B/2021 de 30 de junho (Portaria n.º 138-B/2021 de 30 de junho - Diário da República n.º 125/2021, 2º Suplemento, Série I de 2021-06-30).

Neste contexto, a Farmácia Santiago preparou-se e deu início à realização dos TRAg para o SARS-Cov-2 durante o mês de julho, contribuindo para reforçar o controlo da pandemia de COVID-19 pela intensificação da testagem junto da população.

Durante o meu estágio participei da formação para a colheita da amostra biológica - exsudato nasofaríngeo - e da comunicação de resultados e referenciação. Este ponto foi uma oportunidade para mim a nível técnico e científico, mas não só, permitiu-me dar o meu pequeno contributo nesta batalha comum e comprovar na prática o quanto as farmácias estão sempre prontas a adaptar-se à situação atual e na linha da frente a colaborar na saúde pública.

2.4. Ameaças

2.4.1. Medicamentos esgotados

A existência de medicamentos esgotados é uma ameaça na área da farmácia comunitária, principalmente quando ainda não estão disponíveis outras opções terapêuticas. Por exemplo, durante o meu estágio esteve esgotado, para os doentes da farmácia, o medicamento Eliquis® 5mg, com o princípio ativo apixabano, pertencente ao grupo farmacoterapêutico dos anticoagulantes e antitrombóticos, inibidores diretos do fator Xa, para o qual ainda não estão disponíveis medicamentos genéricos (Zhou *et al.*, 2015). Estas situações deixam o utente preocupado com a possibilidade de não tomar a medicação necessária e levam o utente a procurar a sua medicação noutras farmácias que ainda o tenham em stock, prejudicando a fidelização dos utentes a uma farmácia.

Nas situações que o permitiam, tentei colmatar este problema pela dispensa de medicamentos do mesmo grupo homogéneo. Quando tal não era possível, a própria farmácia contactava vários colegas a fim de tentar encontrar o medicamento pretendido ou, se de todo não se consegue, o utente é aconselhado a contactar o médico para que seja feita a substituição da medicação.

Apesar de ser uma situação desagradável, há vários mecanismos para a tentar minimizar. Entre eles, destaco as Encomendas Via Verde e a limitação de duas embalagens do mesmo medicamento, por receita, por mês e por utente, possibilitando uma maior equidade no acesso aos medicamentos e desencorajando o açambarcamento dos mesmos.

3. CONCLUSÃO

Em suma, mesmo escolhendo uma área profissional muito diferente de Farmácia Comunitária, qualquer farmacêutico deve conhecer a realidade dos utentes e comunidades, que são o fim último e o foco do farmacêutico enquanto profissional de saúde e agente de saúde pública, por definição. Considero este estágio curricular essencial para o *términus* do percurso académico do MICE, para consolidação do conhecimento adquirido ao longo do plano curricular e para a aquisição de ferramentas práticas imprescindíveis ao percurso profissional.

O estágio em farmácia comunitária superou muito as minhas expectativas, foi uma experiência positivamente marcante, durante a qual me senti a crescer pessoal e profissionalmente todos os dias. Para além de tudo o que aprendi, guardo a amizade que a equipa teve comigo e que os próprios utentes foram criando, como um fator essencial para o sucesso deste estágio.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CD, Novidades N. - Circular Informativa Conjunta. (2020) 1–10.
2. CRAVO, Mariana et al. - Fotoproteção na Criança. (2008).
3. Decreto-Lei n.º 95/2004 de 22 de abril Diário da República - I SÉRIE-A 2439 - 2004.
4. DIREÇÃO-GERAL DE SAÚDE - Norma n.º 0003/2020. **Normas e Circulares Normativas**. (2020) 1–14.
5. EM, Aprovado - Aprovado em 03-08-2020 infarmed. (2020).
6. GUPTA, Kalpana; GRIGORYAN, Larissa; TRAUTNER, Barbara - In the clinic® urinary tract infection. **Annals of Internal Medicine**. ISSN 15393704. 167:7 (2017) ITC49–ITC64. doi: 10.7326/AITC201710030.
7. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos. (1998) 1–9.
8. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - Operação Luz Verde - Dispensa de medicamentos hospitalares em farmácias comunitárias e ao domicílio. (2020) 19.
9. PEREIRA, Rui; RITO, Maria - A análise SWOT como estratégia de (auto) avaliação: uma partilha de experiências em contextos de prática clínica supervisionada. **Congresso Internacional De Ssupervisão Clínica: Livro De Comunicações & Conferências**. (2013) 273–278.
10. Portaria n.º 138-B/2021 de 30 de junho - Diário da República n.º 125/2021, 2º Suplemento, Série I de 2021-06-30.
11. Portaria n.º 97/2018 de 9 de abril - Diário da República n.º 69/2018, Série I de 2018-04-09.
12. SANTIAGO, Felicidade; JANUÁRIO, Gustavo - Artigo de Revisão Escabiose : Revisão e Foco na Realidade Portuguesa Scabies : Review and Focus on the Portuguese Reality Artigo de Revisão. 75: february (2017) 129–137.
13. SIHRA, Néha et al. - Nonantibiotic prevention and management of recurrent urinary tract infection. **Nature Reviews Urology**. ISSN 17594820. 15:12 (2018) 750–776.
14. ZHOU, Xinyi et al. - Anexo I - Resumo das Características do Medicamento I. **Andrologia**. . ISSN 1008-682X. 29:2 (2015) 1–29.

PARTE III

“ORGANOIDES CEREBRAIS NA MODELAÇÃO DE DOENÇAS DEGENERATIVAS E INFECIOSAS”

Monografia

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração dois princípios da auto-organização celular. (Retirado de (Lancaster e Knoblich, 2014))	42
Figura 2 - Esquema de um biorreator rotativo SpinΩ e síntese do protocolo de organoide nele desenvolvido. (Retirado de (Qian et al., 2016)).....	47
Figura 3 - Esquema representativo dos estudos da Doença de Alzheimer em organoides cerebrais. (Adaptado de (Amin e Paşca, 2018)).....	48
Figura 4 - Ilustração comparativa do desenvolvimento cerebral <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . (Adaptado de (Benito-Kwiecinski e Lancaster, 2020))	54
Figura A - Esquema ilustrativo do processo de neurogênese e expansão cortical no córtex cerebral humano (Human) e do murganho (Mouse). (Retiradoad de (Kelava e Lancaster, 2016)).....	74

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I - Limitações e atuais abordagens da técnica de organoides cerebrais. (Adaptado de (MODEL 19))	67
Tabela A - Tabela síntese das limitações dos primeiros modelos de estudo do cérebro humano: Modelos <i>pos-mortem</i> , Modelos animais e Modelos Celulares monocamada	74

LISTA DE ABREVIATURAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
A β	β -Amilóide, do inglês <i>Amyloid-beta</i>
ACE2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
APOE	Gene da Apolipoproteína E
APP	Proteína Precursora Amilóide, do inglês <i>Amyloid Precursor Protein</i>
BACE1	β -Secretase I
bFGF	Fator de Crescimento Básico de Fibroblastos, do inglês <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
BHE	Barreira Hematoencefálica
Bmps	Proteínas morfogenéticas ósseas
CD31	<i>Cluster of differentiation 31</i>
COVID-19	Doença Provocada pelo Novo Coronavírus SARS-CoV-2
CP	Placa Cortical
CRISPR / Cas9	Repetições Palindrómicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas com uma nucleasse 9 associada, do inglês <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated protein 9</i>
DA	Doença de Alzheimer
DAE	Doença de Alzheimer Esporádica
DAF	Doença de Alzheimer Familiar
DOE	<i>Design of Experiment</i>
EB	Corpos Embríoides
ESCs	Células Estaminais Embrionárias
ETV2	<i>ETS Variant Transcription Factor 2</i>
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GR	Glia Radial
GSK-3	Glicogénio Sintase Quinase 3
HDAC6	Desacetilase das Histonas 6
HH	Bromidrato de Hipeastrina
hPSCs	Células Estaminais Pluripotentes Humanas
ICM	Massa Celular Interna

IFN- γ	Interferão gama
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-8	Interleucina 8
iPSCs	Células Estaminais Pluripotentes Induzidas
KLF4	<i>Kruppel Like Factor 4</i>
LCR	Líquido Céfalo-raquídeo
NFTS	Tranças Neurofibrilares
NPCs	Células Progenitoras Neurais
OCT4	<i>Octamer-binding Transcription Factor 4</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PEG	Polietilenoglicol
PLA	Policaprolactona
PSEN1	Presenilina 1
PSEN2	Presenilina 2
PVA	Álcool polivinílico
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
RT - PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SARS-CoV-2	Vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus - 2
SFEBq	Cultura flutuante livre de soro de corpos embrioides com reagregação rápida, do inglês <i>serum-free floating culture of embryoid bodylike aggregates with quick reaggregation</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SOX2	<i>SRY (Sex Determining Region Y) - Box 2</i>
SVZ	Zona Subventricular
TGF β	Fator de Crescimento Transformador beta
TLR3	<i>Receptor 3 toll-like</i>
TNF- α	Factor de necrose tumoral alfa, do inglês <i>tumor necrosis factor -α</i>
vGLUT1	<i>Vesicular glutamate transporter 1</i>
VZ	Zona Ventricular
ZIKV	Vírus Zika

I. INTRODUÇÃO

O cérebro é um órgão único, estrutural e funcionalmente complexo, inacessível à manipulação experimental. Esta singularidade torna o seu estudo, por um lado, fascinante, por outro, desafiante. De facto, compreender o seu desenvolvimento e disfunção é um dos principais objetivos das neurociências (Lullo, Di e Kriegstein, 2017).

Por o cérebro humano apresentar características tão distintas dos outros mamíferos, como maior e mais densa encefalização, os modelos animais são redutores na compreensão dos seus mecanismos de organogénese e patogénese (Kelava e Lancaster, 2016; Koo *et al.*, 2019). Importantes, mas igualmente limitados, são os modelos celulares *in vitro* em monocamada, derivados de células estaminais pluripotentes humanas (hPSCs).

Com origem na observação das propriedades de auto-organização espacial das culturas de hPSCs surgiram os organoides. Os organoides são culturas heterogéneas tridimensionais que reproduzem o microambiente do órgão e características do desenvolvimento fetal humano. Os organoides cerebrais, em particular, são uma tecnologia inovadora com potencial para mudar significativamente a compreensão do cérebro humano e das doenças neurológicas, tais como as doenças neurodegenerativas e de neurodesenvolvimento.

As doenças neurodegenerativas, caracterizadas pela morte progressiva de neurónios e perda da função cerebral, incluem a doença de Alzheimer (DA), com maior prevalência, a doença de Parkinson, a esclerose lateral amiotrófica, entre outras (Chang *et al.*, 2020). Estas doenças têm uma relevância crescente pois afetam preferencialmente a população envelhecida, cujo número se encontra em crescimento, e são uma preocupação de saúde pública pelas consequências na qualidade de vida dos doentes e dificuldade de identificação de terapias (Logan *et al.*, 2019).

As doenças infecciosas, como podemos observar pelo estado pandémico atual, caracterizam-se pela imprevisibilidade, mas podem gerar um grande impacto na saúde do Sistema Nervoso Central (SNC), de forma mais ou menos direta. Efetivamente, o surto de casos de microcefalia em recém-nascidos resultante de infeções pelo vírus Zika (ZIKV) durante a gestação, em 2016, foi um dos grandes motores do progresso na investigação sobre os organoides cerebrais e da sua aplicabilidade na investigação do neurodesenvolvimento. De igual modo, os organoides do cérebro estão a ser usados para compreender os efeitos neurológicos do coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2).

Esta técnica de cultura tridimensional está ainda em aperfeiçoamento, apresenta algumas limitações que estão a ser avaliadas e resolvidas, para que todo o potencial seja aproveitado num futuro próximo.

Assim, esta revisão bibliográfica tem como propósito fornecer uma visão geral sobre os organoides cerebrais e aplicação na modelação de doenças degenerativas e infecciosas. A área é importante no domínio das ciências da vida e da saúde e em particular na área farmacêutica na medida em que se espera que venha a permitir investigar e identificar fármacos eficazes no tratamento de doenças do cérebro.

2. CÉREBRO

A expansão cortical do cérebro humano é um dos processos evolutivos mais notáveis do desenvolvimento cerebral e relaciona-se com as competências humanas mais complexas como tomada de decisão e interações emocionais, cognitivas e sociais (Gabriel *et al.*, 2020). O córtex cerebral maduro é uma estrutura de seis camadas composta por duas classes principais de neurónios: neurónios excitatórios glutamatérgicos e interneurónios inibitórios ácido γ -aminobutírico (GABA)-érgicos com diferentes subtipos de neurónios dispostos em diferentes camadas corticais (Ardhanareeswaran *et al.*, 2017; Gabriel *et al.*, 2020).

É necessário um processo altamente orquestrado de interação, proliferação, migração de células estaminais neurais para que a expansão cortical ocorra de forma precisa, estrutural e funcionalmente normal (Gabriel *et al.*, 2020). Esse processo, descrito em pormenor na Figura A do Anexos I, é a base para o desenvolvimento de organoides cerebrais que pretendem mimetizá-lo de forma precisa.

3. CÉLULAS ESTAMINAIS PLURIPOTENTES HUMANAS (HPSCS)

As células estaminais pluripotentes humanas (hPSCs) incluem as células estaminais embrionárias (ESCs) e as células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs) (Koo *et al.*, 2019). Definem-se pela capacidade de divisão indefinida (propriedade de autorenovação ilimitada) e de diferenciação em todos os destinos celulares do organismo humano (característica de pluripotência) (Hartley e Brennand, 2017; Bordoni *et al.*, 2018). Estas células, diferenciadas em cultura, exibem uma capacidade de se auto-organizarem em estruturas que refletem aspetos cruciais dos tecidos aos quais estão destinadas (Clevers, 2016; Chang *et al.*, 2020).

Note-se que ambas, iPSCs e ESCs, são consideradas semelhantes relativamente à morfologia celular, capacidade de proliferação e diferenciação, tendo as iPSCs a vantagem de

não envolver as mesmas barreiras éticas que as células de tecidos embrionários (Logan *et al.*, 2019). As características destas células permitem que culturas celulares exibam funções fisiologicamente relevantes, possibilitando uma oportunidade sem precedentes para estudar o desenvolvimento do cérebro humano e a fisiopatologia de doenças humanas (Koo *et al.*, 2019; Rigamonti *et al.*, 2016; Chang *et al.*, 2020).

3.1 Células Estaminais Embrionárias (ESCs)

A fertilização é seguida pela formação do blastocisto, que contém as células pluripotentes presentes na massa celular interna (ICM). Após a implantação, a ICM dá origem ao epiblasto, que mantém a capacidade de pluripotência (Benito-Kwiecinski e Lancaster, 2020; Eiraku e Sasai, 2012). É desta ICM que todo o embrião se forma por diferenciação e especialização progressiva em todos os tipos de células do organismo (Benito-Kwiecinski e Lancaster, 2020).

As ESCs são, assim, células pluripotentes derivadas da ICM de um blastocisto. As linhas de ESCs tornaram-se adequadas para investigação de processos celulares e moleculares, depois de muitos estudos mostrarem que a diferenciação neural espontânea ocorre nestas culturas na ausência de inibidores da diferenciação neural (Eiraku e Sasai, 2012).

Quando cultivadas em suspensão, as ESCs agregam para formar estruturas semelhantes aos corpos embrioides que simulam os eventos iniciais da embriogênese, nomeadamente a diferenciação nas três camadas germinativas (Benito-Kwiecinski e Lancaster, 2020). Seguidamente, a diferenciação neural ocorre espontaneamente num meio contendo sinais extrínsecos mínimos, como o fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF do inglês *Basic Fibroblast Growth Factor*) (Eiraku e Sasai, 2012).

As linhas de ESCs humanas foram isoladas pela primeira vez em 1998 por Thomson *et al.* (Costamagna *et al.*, 2019; Kelava e Lancaster, 2016). Além de estudar células específicas isoladas do tecido em desenvolvimento, *in vitro*, estas linhas celulares fornecem uma ferramenta para recapitular as características do próprio desenvolvimento embrionário, diferenciação e auto-organização em diferentes identidades (Benito-Kwiecinski e Lancaster, 2020). Estas linhas celulares foram também projetadas para modelação de doenças, assim como desenvolver terapias celulares para essas doenças (Costamagna *et al.*, 2019).

Não obstante, note-se que estas culturas apresentam limitações relevantes, entre elas, as questões éticas associadas à utilização de células estaminais de tecidos embrionários (Ardhanareeswaran *et al.*, 2017).

3.2 Células Estaminais Pluripotentes Induzidas (iPSC)

O desenvolvimento das células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs) foi uma tecnologia revolucionária desenvolvida por Takahashi e Yamanaka, que conduziu à atribuição a Yamanaka do Prémio Nobel de Medicina em 2012. Os cientistas demonstraram que as células somáticas adultas podem ser reconduzidas de volta a um estado pluripotente, num processo de reprogramação celular. As iPSCs expressam marcadores exclusivos de células estaminais embrionárias, reproduzem a sua morfologia e crescimento e podem ser diferenciadas, *in vitro*, em qualquer tipo de célula, na presença de sinais moleculares idênticos aos presentes durante o desenvolvimento embrionário (Robbins e Price, 2017; Lullo, Di e Kriegstein, 2017; Pasca *et al.*, 2015).

A introdução da reprogramação celular permitiu superar as limitações subjacentes às ESCs e proporcionou um crescimento do desenvolvimento e utilização dos modelos celulares humanos, otimizando o estudo do desenvolvimento de embriões, órgãos humanos e doenças (Lullo, Di e Kriegstein, 2017; Pasca *et al.*, 2015). Ao contrário das ESCs, as iPSCs dependem de técnicas minimamente invasivas, como biópsias de pele ou, mais recentemente, colheitas de sangue ou de urina, pois são reprogramadas a partir de células somáticas de pacientes, como fibroblastos, células mononucleares de sangue periférico ou células epiteliais presentes na urina (Costamagna *et al.*, 2019; Bordoni *et al.*, 2018).

Além disso, as iPSCs podem ser geradas a partir de doentes com fenótipos clínicos definidos, importante ao nível da associação genótipo-fenótipo de certas doenças em que os doentes se dividem em várias categorias fenotípicas, por exemplo, doenças neurodegenerativas, assim como no desenvolvimento de terapias personalizadas e ajustadas (Ardhanareeswaran *et al.*, 2017; Qian e Julia, 2021; Bordoni *et al.*, 2018). Recentemente, o advento das ferramentas de edição de genoma, como o sistema CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated protein 9*), permite que os cientistas modifiquem de forma precisa o genoma das iPSCs (Koo *et al.*, 2019).

O método de formação de iPSCs começa com a colheita de uma célula somática e diferenciação reversa ou reprogramação de volta ao seu estado embrionário, semelhante a uma célula estaminal (Ardhanareeswaran *et al.*, 2017). Este processo envolve a reativação de genes-chave na célula somática, que são importantes nas células estaminais embrionárias para manter a pluripotência, pela introdução de um conjunto de fatores de transcrição como: SOX2 (*SRY (Sex Determining Region Y)-Box 2*), OCT4 (*Octamer-binding Transcription Factor 4*), KLF4 (*Kruppel Like Factor 4*) e c-Myc (Ardhanareeswaran *et al.*, 2017; Logan *et al.*, 2019; Agirman, Broix e Nguyen, 2017).

O potencial de divisão mitótica *in vitro* das iPSCs e de diferenciação em qualquer tipo de célula, deriva do seu estado epigenético único caracterizado principalmente pela estrutura de cromatina aberta, idêntico ao das células estaminais embrionárias, com acesso mais fácil dos fatores de transcrição, resultando na transcrição ativa de múltiplos genes (Ardhanareeswaran *et al.*, 2017). Estas células pluripotentes, as iPSCs, permitem gerar células somáticas de interesse para o estudo de patologias e processos biológicos humanos, após um processo de diferenciação. Para o estudo de patologias neurológicas, aplica-se o processo de diferenciação neuronal que consiste na indução neural inicial de iPSCs pela adição de concentrações e gradientes apropriados de fatores morfogenéticos espontaneamente expressos no cérebro humano em desenvolvimento (Ardhanareeswaran *et al.*, 2017).

Em síntese, foram desenvolvidos diversos protocolos de diferenciação em células estaminais pluripotentes humanas, protocolos estes em contínuo aperfeiçoamento (Ardhanareeswaran *et al.*, 2017). Os principais avanços no estabelecimento destes protocolos culminaram na geração de "tecnologias organoides" (Lullo, Di e Kriegstein, 2017). Atualmente os dois principais modelos de diferenciação neuronal de hPSCs são culturas bidimensionais (2D) e culturas organoides tridimensionais (3D), sendo estas últimas o ramo em maior expansão (Ardhanareeswaran *et al.*, 2017).

4. ORGANOIDES

Organóide é o termo aplicado para denominar culturas tridimensionais *in vitro*, em que as células se auto organizam em complexos estruturais e replicam não só a complexidade dos tipos de células presentes e os processos de auto-organização do tecido, como a arquitetura do órgão (Ho, Pek e Soh, 2018; Kelava e Lancaster, 2016; Quadrato, Brown e Arlotta, 2016). Atualmente já existem organoides de hPSCs estabelecidos para intestino, rim, fígado, cérebro e retina, entre outros (Lancaster e Knoblich, 2014).

Os organoides são derivados de células estaminais pluripotentes ou progenitores de órgãos isolados que se diferenciam para formar um tecido heterogêneo semelhante a um órgão. Para se considerar um organóide a estrutura deve conter mais do que um tipo de célula do órgão que modela, exibir uma função específica e as células devem ser organizadas de forma similar ao próprio órgão, por meio de segregação e agrupamento de células (*Cell sorting out*) e compromisso de linhagem espacialmente restrito (Lineage commitment), ilustrados na Figura 1, conforme o processo de morfogênese *in vivo* (Lancaster e Knoblich, 2014).

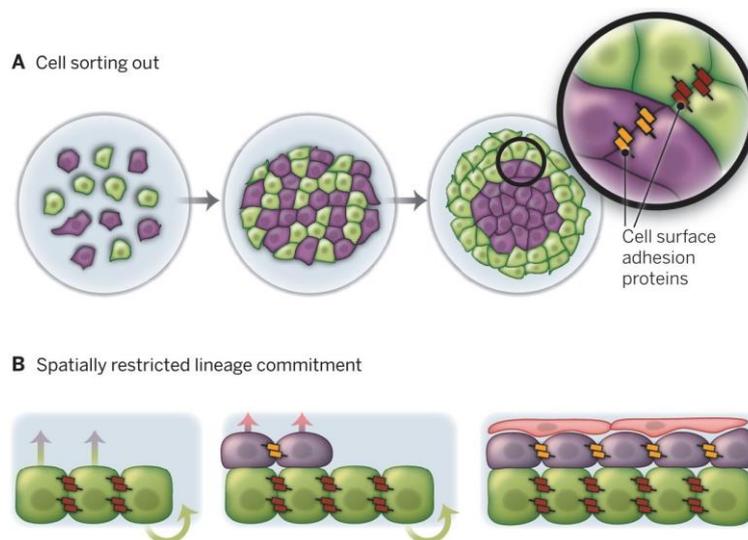


Figura 1 – Ilustração dois princípios da auto-organização celular. (A) Segregação de células: Diferentes tipos de células (verdes e roxas) segregam-se e agrupam-se devido às diferentes propriedades de adesão conferidas pelas moléculas de adesão celular que expressam, diferencialmente (barras castanhas e laranja); **(B) Compromisso de linhagem espacialmente restrito:** Os progenitores (verdes) dão origem a células-filhas com maior diferenciação (roxas), que, devido às restrições espaciais do tecido e orientação dos planos de divisão, são forçadas a uma posição específica. As divisões seguintes originam células progressivamente diferenciadas. **(Retirado de (Lancaster e Knoblich, 2014))**

4.1 Organoides cerebrais

Os organoides cerebrais, também denominados de organoides neurais ou, em inglês, *Brain-in-a-dish*, são modelos tridimensionais de tecido neural, com assinatura transcricional e epigenética de um cérebro humano em desenvolvimento (Trujillo e Muotri, 2018). São produzidos a partir de hPSCs que se diferenciam em progenitores neurais e resultam em estruturas altamente complexas contendo múltiplos tipos de neurónios organizados em áreas que apresentam características de regiões distintas do SNC, incluindo o córtex cerebral, com comparável disposição espaço-temporal (Rigamonti *et al.*, 2016; Lancaster *et al.*, 2013).

Os modelos atuais de organoides cerebrais abriram uma oportunidade sem precedentes de modelar diferentes aspetos celulares do desenvolvimento e doença do cérebro humano, tais como os processos proliferação, diferenciação e migração celular. Podem recapitular parte da estrutura, desenvolvimento e funcionalidade do cérebro e recapitular o microambiente celular (Willner *et al.*, 2021; Quadrato e Arlotta, 2017; Quadrato, Brown e Arlotta, 2016).

Estes organoides constituem tipos de células amplamente diversos, desde glia radial polarizada, progenitores intermediários, até neurónios corticais de camadas específicas. Avanços mais recentes permitiram gerar organoides cerebrais de regiões específicas, como o mesencéfalo, o hipotálamo, o cerebelo, ou ainda organoides cerebrais com tipos de células

sensíveis à luz, vascularização para compreender as interações da Barreira Hematoencefálica (BHE) e organoides cerebrais com microglia (Ramani, Pranty e Gopalakrishnan, 2021).

Para garantir a relevância fisiológica e robustez dos resultados é fundamental a sua análise. É analisada a resposta a fármacos, a atividade eletrofisiológica e perfis transcriptômicos e proteômicos. As alterações resultantes de mutações ou alterações específicas podem ser estudadas comparando os organoides de controlos àqueles que possuem modificações genéticas específicas ou originados de doentes (Willner *et al.*, 2021).

5. METODOLOGIAS DE OBTENÇÃO

Atualmente há vários modelos e protocolos para gerar organoides 3D, cada um com as suas vantagens e desvantagens ou limitações específicas (Quadrato, Brown e Arlotta, 2016). Ao decidir qual o método a utilizar, devem considerar-se várias variáveis, como considerações técnicas, tempo necessário para a sua formação e qual a questão biológica específica em estudo (Kelava e Lancaster, 2016). Abaixo são descritas as múltiplas descobertas e protocolos gerados para a obtenção das técnicas de culturas tridimensionais existentes.

5.1 Segregação – agregação

Os métodos de produção de organoides baseiam-se em estudos iniciais, *in vitro*, de dissociação e reagregação celular (Lancaster e Knoblich, 2014). Estes apontam para uma capacidade das células se organizarem entre si para formar estruturas com as mesmas propriedades histogénicas dos tecidos *in vivo*. A base para este rearranjo autónomo, conhecida como a hipótese de adesão diferencial de Steinberg, resulta de processos de segregação de células com propriedades adesivas semelhantes em domínios com diferentes forças adesivas, num padrão termodinamicamente mais estável, processo designado na literatura anglosaxónica por *cell sorting out*, ou segregação celular, descrito na Figura I (A). A adesão diferencial é mediada por proteínas de adesão à superfície celular. Por exemplo, a divisão celular da ectoderme neural e epidérmica dos vertebrados, resulta de uma expressão diferencial de caderina (Lancaster e Knoblich, 2014; Benito-Kwiecinski e Lancaster, 2020). Essa capacidade de dissociação e agregação foi demonstrada para um grande número de tecidos, incluindo rim, fígado, pele e várias regiões do SNC (Kelava e Lancaster, 2016).

Um segundo mecanismo, comprometimento de diferenciação numa linhagem ou *lineage commitment*, (ver Figura I (B)) que influencia a morfogénese tecidual, inclusivamente a formação de camadas estratificadas, está associado às decisões de destino do progenitor celular, temporal e espacialmente restritas. Essa estratificação depende da orientação

adequada da divisão das células progenitoras iniciais, da interação das divisões simétricas e assimétricas e da migração de células-filhas diferenciadas para locais definidos dentro do tecido (Lancaster e Knoblich, 2014).

Estes estudos sobre a dissociação-reagregação demonstraram que a formação de tecido ocorre independentemente de uma pré-padronização. Apesar de inicialmente agrupadas de forma aleatória, as células, reagregadas, organizam-se em regiões distintas de um tecido (Benito-Kwiecinski e Lancaster, 2020).

5.2 Rosetas neurais

A partir de células isoladas em estudos de dissociação-reagregação, os modelos de rosetas neurais foram os primeiros modelos do SNC estabelecidos, a partir de ESCs, em 2001. Provou-se que agregados de diferenciação espontânea de hPSCs, chamados Corpos Embrioides (EBs), podiam ser direcionados para uma linhagem neural e cultivados em placas revestidas para gerar grupos de células neuroepiteliais que se auto-organizavam para formar rosetas. Os EBs exibem características do tubo neural embrionário, incluindo um epitélio pseudoestratificado com polaridade apical-basal, e recapitulam as propriedades *in vivo* da glia radial (GR), geram populações intermediárias e detêm uma organização grosseiramente idêntica às zonas progenitoras ventricular (VZ) e subventricular (SVZ) (Kelava e Lancaster, 2016; Logan *et al.*, 2019; Lullo, Di e Kriegstein, 2017; Koo *et al.*, 2019).

As rosetas neurais são consideradas modelos bidimensionais de maior complexidade, modelos 2.5D. Por serem células epiteliais polarizadas, organizam-se para formar um arranjo radial característico que permite uma melhor recapitulação, *in vitro*, do desenvolvimento cortical, salientando a interdependência estrutura-função a nível celular (Kelava e Lancaster, 2016; Lancaster 2016; Chang *et al.*, 2020).

5.3 Cultura de corpos embrioides livre de soro (SFEBq)

Em 2003, foi desenvolvido um protocolo para diferenciar ESCs em precursores neurais na ausência completa de soro, fatores de crescimento ou outros sinais indutivos, demonstrando a notável capacidade das hPSCs adquirirem espontaneamente identidades neurais (Qian e Julia, 2021). A combinação da abordagem das rosetas neurais, derivadas de EBs, e a diferenciação na ausência de soro permitiu o estabelecimento do método denominado SFEBq: Cultura flutuante livre de soro de corpos embrioides, com reagregação rápida (Hartley e Brennand, 2017; Quadrato, Brown e Arlotta, 2016; Quadrato, Brown e Arlotta, 2016).

Desta técnica resultam estruturas auto-organizadas semelhantes ao córtex cerebral humano em desenvolvimento relativamente à citoarquitetura geral, transcrição e expressão proteica. Essas estruturas possuem complexidade específica de camada e os dois principais neurotransmissores do córtex, glutamatérgico e GABAérgico (Hartley e Brennan, 2017). A abordagem SFEBq tem-se revelado altamente proficiente na geração de uma variedade de regiões específicas do cérebro, incluindo adeno-hipófise, cerebelo, retina, prosencéfalo e hipocampo (Kelava e Lancaster, 2016).

5.4 Indução neural

Apesar do seu sucesso, o processo de diferenciação neural na ausência de soro e sinais indutivos não se mostrou totalmente eficiente, e nesse sentido foram feitas experiências usando fatores de indução neural (Kelava e Lancaster, 2016).

Normalmente, a indução neural em organoides cerebrais inclui a inibição da sinalização SMAD para inibir a formação da mesoderme e da endoderme, seguida do fornecimento de morfogénios específicos e moléculas que induzem especificação do destino celular (Lullo, Di e Kriegstein, 2017). A especificação da camada germinativa é altamente dependente da superfamília TGF β (Fator de Crescimento Transformador Beta), que sinaliza por meio de fatores designados de SMADs. Entre eles são inibidas, as Bmps (proteínas morfogenéticas ósseas) e Nodal/activina, que são promotores não neurais (Kelava e Lancaster, 2016). Os organoides do prosencéfalo, por exemplo, podem ser gerados pela dupla inibição das vias TGF β / Bmp e GSK-3 (Glicogénio Sintase Quinase 3). A formação de outras áreas cerebrais *in vitro* segue protocolos idênticos com diferentes fatores de indução (Trujillo e Muotri, 2018).

5.5 Matrigel

Podem ser obtidas culturas celulares tridimensionais baseadas numa estrutura / matriz mediante cultivando as células numa matriz 3D ou suspendendo as células numa matriz líquida seguidamente polimerizada. Várias matrizes suporte (*Scaffolds*) foram concebidas, de entre as quais se destacam o Matrigel, e o ácido hialurónico e, baseados em material sintético, polietilenoglicol (PEG), álcool polivinílico (PVA) e policaprolactona (PLA) (Qian e Julia, 2021). O Matrigel, mais comumente utilizado, é uma matriz extracelular rica em lamininas, segregada pela linha tumoral Engelbreth-Holm-Swarm (Kelava e Lancaster, 2016; Lancaster e Knoblich, 2014).

Esta técnica levou à geração de organoides neurais únicos com representações de várias regiões cerebrais diferentes. A abordagem começa com EBs flutuantes, sem fatores de

crescimento adicionados para formação de regiões específicas. Estes agregados são incorporados no Matrigel permitindo o crescimento de grandes botões neuroepiteliais, que se desenvolvem espontaneamente em várias regiões como retina, córtex dorsal, prosencéfalo ventral, plexo coroide e hipocampo (Clevers, 2016).

5.6 Biorreator giratório

A adição de agitação posterior nas culturas flutuantes promoveu a formação de tecidos muito maiores do que os descritos anteriormente. Esta nova estratégia evita a reduzida disponibilidade de oxigênio e nutrientes observada nas construções tridimensionais (Hartley e Brennand, 2017). A combinação do crescimento de organoides cerebrais em gotículas de Matrigel com o uso de um biorreator giratório resultou em organoides com crescimento até 4 mm com lobos cerebrais contínuos de mais de 1 mm de comprimento, contendo cavidades cheias de líquido que se assemelham a ventrículos, em vez dos pequenos lumens semelhantes a tubos neurais das rosetas (Kelava e Lancaster, 2016; Hartley e Brennand, 2017).

A escalabilidade da geração de organoides por meio de biorreatores foi melhorada de forma dramática por meio da aplicação de um biorreator giratório miniaturizado de vários poços, SpinΩ, ilustrado na Figura 2, com o auxílio de *design* de *software* computadorizado e tecnologias de impressão 3D. O SpinΩ requer apenas um mínimo de meio, encaixa-se numa placa convencional de 12 poços e pode ser construído em versão empilhável, permitindo um projeto em larga escala, num sistema simples e económico com reduzida área ocupada (Hartley e Brennand, 2017; Qian *et al.*, 2016).

O baixo custo da plataforma permitiu otimizar os protocolos de geração de organoides do prosencéfalo com heterogeneidade e variabilidade minimizadas para análises quantitativas mais robustas e melhor recapitulação do córtex humano em desenvolvimento. Estes organoides exibem uma região semelhante à SVZ com Células Progenitoras Neurais (NPCs) que partilham características moleculares e morfológicas da glia radial, subtipos neuronais organizados encontrados em todas as seis camadas corticais e subtipos neuronais GABAérgicos (Qian *et al.*, 2016).

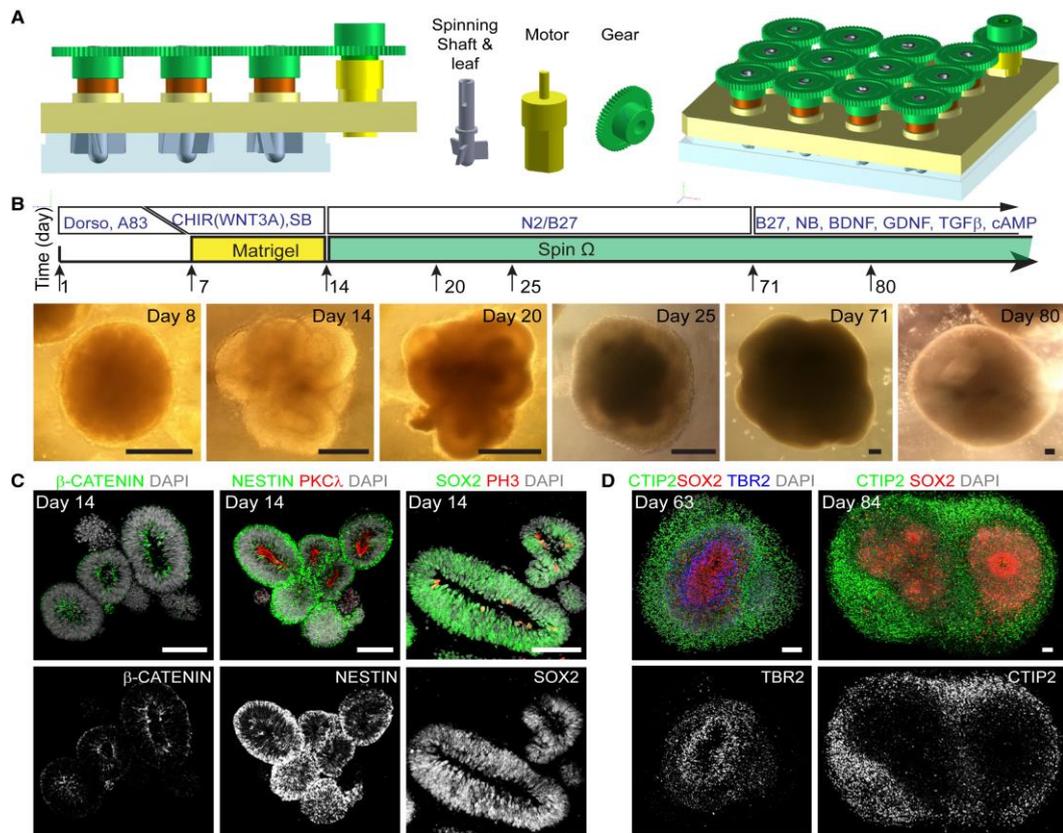


Figura 2 - Esquema de um biorreator rotativo Spin Ω e síntese do protocolo de organoide nele desenvolvido. (A) Desenho ilustrativo da versão de 12 poços do biorreator Spin Ω ; **(B)** Diagrama esquemático do protocolo de organoide do prosencéfalo com imagens de fase de amostra em diferentes dias, com barras de escala, 200 mm; **(C e D)** Imunocoloração de organoides do prosencéfalo nos dias 14, 63 e 84, barras de escala, 100 mm. **(Retirado de (Qian et al., 2016))**

5.7 Modelos organoides existentes atualmente

Em síntese, as culturas celulares 3D podem ser geradas por meio de duas vias: a) formação de uma estrutura/andaime com biomateriais ou matriz extracelular; b) esferoides livres formados associação espontânea (Qian e Julia, 2021). Estes organoides cerebrais, derivados de hPSCs, auto-organizam-se para formar EBs, cultivados ou não sob a presença de moléculas de indução neural e fatores de padronização, dão origem a organoides de cérebro, mais ou menos organizados, ou organoides de regiões cerebrais específicas, como ilustrado na Figura 3 (Willner et al., 2021).

A maioria dos modelos organoides focam-se na geração de tecido do córtex cerebral, porém foram já desenvolvidos modelos organoides de outras regiões específicas do cérebro humano importantes para modelar a disfunção presente nas várias áreas cerebrais (Quadrato, Brown e Arlotta, 2016). Estes organoides, de mesencéfalo, hipocampo, hipotálamo e cerebelo, etc., são coletivamente classificados como organoides cerebrais de regiões específicas (Chen, Song e Ming, 2019).

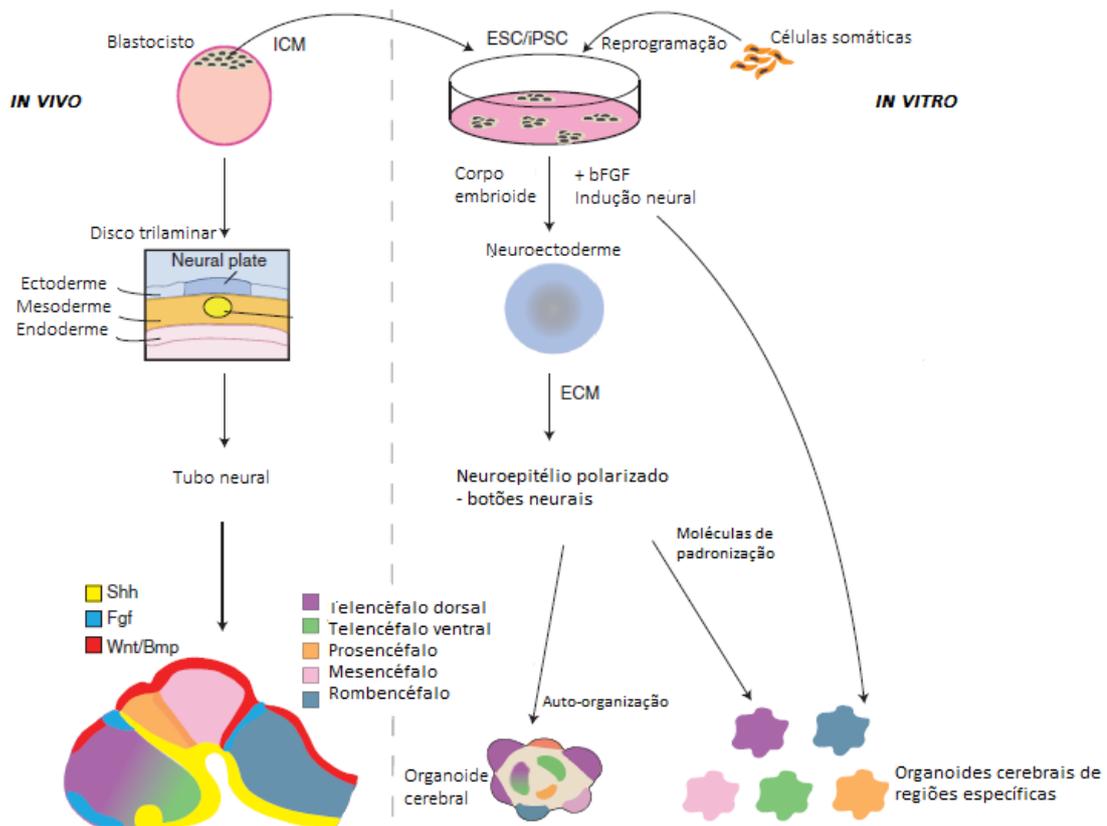


Figura 3 - Ilustração comparativa do desenvolvimento cerebral *in vivo* e *in vitro*. Na embriogênese, *in vivo*, após a formação do blastocisto, o embrião passa por gastrulação e formação das três camadas germinativas: ectoderme, mesoderme e endoderme, derivando o SNC da ectoderme neural. Esta origina a placa neural, que se dobra e funde para formar o tubo neural, uma lâmina fechada de epitélio com polaridade apical-basal radialmente organizado em torno de um lúmen cheio de fluido que posteriormente se desenvolve em ventrículos cerebrais. São estabelecidos dois eixos por meio da ação concertada de gradientes morfogênicos (**Shh, Fgf, Wnt/Bmp**) que permitem que o tubo epitelial se subdivida em quatro regiões principais: o prosencéfalo, o mesencéfalo, o rombencéfalo e a medula espinhal. *In vitro*, agregados de hPSCs (**ESC ou iPSC**) são guiados em direção a um destino neuroectodérmico e formam botões semelhantes a tubos neurais após a adição de componentes da matriz extracelular (**ECM**). Os organoide cerebral auto-organizam em várias identidades regionais do cérebro de uma maneira heterogênea e aleatória ou, sob direção de moléculas de sinalização, formando regiões cerebrais específicas. **(Adaptado de (Benito-Kwiecinski e Lancaster, 2020))**

Note-se que organoide padronizados que originam várias regiões cerebrais podem ser gerados, paralelamente, com diferentes protocolos e, posteriormente, fundidos em “*assemblóides*” para modelar as interações inter-regionais do cérebro. Estes *assemblóides* formaram-se por meio da fusão de organoide do prosencéfalo dorsal e ventral. Nessas estruturas, os intraneurônios originários da região ventral translocam-se para a região dorsal, de forma semelhante à situação *in vivo* (Amin e Paşca, 2018; Paspaspyropoulos *et al.*, 2020).

Por forma a verificar a robustez e comparabilidade dos organoide formados, pelas variadas técnicas, foram feitos diversos estudos, entre eles estudos de sequenciação de RNA (ácido ribonucleico) de uma única célula. Estes permitiram comparar os programas de expressão génica de células dentro de organoide cerebral aos do desenvolvimento do

neocórtex humano fetal, mostrando que são notavelmente semelhantes (Clevers, 2016). A análise revelou programas de transcrição de progenitor para neurónio em organoides cerebrais, semelhantes aos do córtex em desenvolvimento, e diversos tipos de células de linhagens neuronais e mesenquimais, o que se traduz na validação do estudo de aspetos do desenvolvimento cortical humano em culturas organoides (Hartley e Brennand, 2017).

6. VANTAGENS DOS MODELOS 3D

Os primeiros modelos de estudo do cérebro usados foram os modelos de tecido *post-mortem* e os modelos animais, os primeiros para a observação de características humanas, os segundos para o estudo do desenvolvimento cerebral e triagem de fármacos, em roedores; da manifestação clínica, nomeadamente traços cognitivos, comportamentais e sociais, em primatas (Kelava e Lancaster, 2016; Ardhanareeswaran *et al.*, 2017; Qian e Julia, 2021). Para estudos funcionais, foram desenvolvidos sistemas *in vitro* que recapitulassem as características de desenvolvimento cerebral *in vivo*. Métodos de cultura de células em monocamada permitiram a caracterização de diversos processos neuronais. São modelos simplistas, mas importantes pela homogeneidade e escalabilidade, para análises de morfologia celular, excitabilidade neural, formação de sinapses, para além de triagens genéticas e farmacológicas de alto rendimento (Kelava e Lancaster, 2016); (Ardhanareeswaran *et al.*, 2017; Amin e Paşca, 2018 Koo *et al.*, 2019); Quadrato, Brown e Arlotta, 2016).

Estes modelos, manifestamente úteis, apresentam inúmeras limitações, sintetizadas na Tabela A do Anexo II, que impedem o progresso no conhecimento sobre o cérebro humano e impulsionam o progresso em modelos celulares mais complexos.

Os modelos organoides são estruturas 3D sofisticadas que representam com precisão a morfologia dos órgãos. Estes modelos trouxeram inúmeras vantagens no que diz respeito à mimetização da arquitetura e funcionalidade dos tecidos, bem como na compreensão de aspetos celulares do desenvolvimento e doença do cérebro, tais como proliferação, diferenciação, e migração celular, assim como o estudo de terapias (Quadrato e Arlotta, 2017; Ho, Pek e Soh, 2018).

Os organoides 3D são capazes de se diferenciar para formar uma população celular heterogénea que se auto-organiza numa arquitetura complexa e estabelece um microambiente fisiologicamente relevante. Por exemplo, astrócitos, microglia e oligodendrócitos, geralmente ausentes nas culturas neuronais em monocamada, são importantes no estudo do cérebro humano pelas funções reguladoras que desempenham. Além disso, muitos estágios de maturação neuronal ocorrem em escalas de tempo muitas vezes mais longas do que a cultura

em monocamada típica pode ser mantida, limitando etapas finais do desenvolvimento como gliogénese, mielinização axonal e propriedades eletrofisiológicas/sinápticas (Amin e Paşca, 2018).

Adicionalmente, estas culturas fornecem uma oportunidade de recapitular o efeito essencial da matriz extracelular e a organização espacial dos recetores de superfície celular envolvidos nas interações entre as células (Quadrato e Arlotta, 2017).

Um outro valor fundamental destes sistemas assenta no facto de que, embora ainda reducionistas, são os únicos sistemas que podem modelar estados genéticos humanos que só podem ser estudados no contexto de todo o genoma humano, e que, portanto, por definição, não podem ser modelados em modelos animais. A natureza poligénica de muitas doenças de neurodesenvolvimento e neuropsiquiátricas oferece um excelente exemplo. De facto, a flexibilidade experimental dos organoides é mais uma vantagem, conseguida, por exemplo, pelas técnicas de edição do genoma (Quadrato e Arlotta, 2017); (Kelava e Lancaster, 2016); Chen, Song e Ming, 2019).

7. APLICAÇÕES

Os organoides são uma área em crescimento e com muito potencial (Lancaster e Knoblich, 2014). Os organoides derivados de hPSCs que foram estabelecidos apresentam múltiplas aplicações, cada uma adaptada ao órgão em causa, nomeadamente, *screening* de fármacos e toxicologia, particularmente em organoides de fígado, modelação de doenças (incluindo o cancro), terapia génica, identificação de biomarcadores ou estudo das interações microrganismo-hospedeiro (Hartley e Brennand, 2017; Clevers, 2016).

Os organoides são passíveis de essencialmente todas as análises biológicas celulares e moleculares que foram desenvolvidas para as primeiras linhas celulares de monocamada. Assim, fornecem mais uma etapa, entre as linhas celulares e os estudos *in vivo*, para estudar as funções genéticas básicas e os processos celulares (Clevers, 2016; Lancaster e Knoblich, 2014).

Relativamente aos organoides cerebrais, as principais aplicações centram-se no estudo aprofundado do neurodesenvolvimento, organogénese e neurogénese; e na modelação das múltiplas doenças que afetam este órgão.

7.1 Modelação de doenças do cérebro

O estudo que primeiro descreveu o protocolo para o cultivo de organoides usou-o para o estudo de uma patologia genética de neurodesenvolvimento - a microcefalia primária

(Kelava e Lancaster, 2016; Clevers, 2016). Fibroblastos de um doente com microcefalia grave, com mutação no gene que codifica a proteína 2 associada à subunidade reguladora de CDK5 (CDK5RAP2) foram usados para produzir iPSCs e cultivar organoides que apresentaram um fenótipo característico da doença (Kelava e Lancaster, 2016; Hartley e Brennand, 2017).

Uma outra área de grande interesse é o estudo de características fenotípicas de etiologia poligénica de doenças cognitivas e comportamentais, como transtornos do espectro autista ou esquizofrenia (Kelava e Lancaster, 2016). Neste caso, os modelos organoides fornecem tecido vivo e funcional para análise de características eletrofisiológicas ou comportamentos celulares dinâmicos (Lullo, Di e Kriegstein, 2017).

Atualmente, os organoides cerebrais estão a ganhar um papel de cada vez maior destaque no estudo de doenças neurodegenerativas, conforme descrito na secção seguinte (Bordoni *et al.*, 2018; Lancaster e Knoblich, 2014).

Os modelos organoides 3D demonstraram ser também muito importantes na observação da resposta biológica e efeitos resultantes a fatores ambientais, nomeadamente, infeções virais (Ardhanareeswaran *et al.*, 2017). Por exemplo estudos com estes modelos detetaram uma relação entre a infeção pelo vírus Zika (ZIKV) e o desenvolvimento de microcefalia, abrindo a porta para uma variedade de estudos potenciais de outros agentes infecciosos, como o citomegalovírus, ou muito atual, o SARS-CoV-2 (Kelava e Lancaster, 2016; Willner *et al.*, 2021; Ardhanareeswaran *et al.*, 2017; Bordoni *et al.*, 2018).

Esta revisão incide particularmente sobre estas duas últimas áreas. Relativamente às doenças degenerativas foca os modelos para a Doença de Alzheimer, pela prevalência, custo socioeconómico e desafio que ainda representa em termos de terapêutica; nas doenças infecciosas, explicita os modelos organoides desenvolvidos para o estudo dos efeitos neurológicos a nível fetal da infeção pelo ZIKV e apresenta uma síntese de estudos em curso com organoides cerebrais sobre efeito do SARS-CoV-2 no cérebro humano.

8. MODELAÇÃO DE DOENÇAS DEGENERATIVAS

8.1 Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência e afeta, globalmente, cerca de 50 milhões de indivíduos (Papaspypopoulos *et al.*, 2020; Bordoni *et al.*, 2018). Caracteriza-se por um declínio progressivo da capacidade cognitiva com grave compromisso da memória, podendo surgir adicionalmente sintomas não cognitivos como alterações neuropsiquiátricas associadas a depressão e apatia (Chang *et al.*, 2020; Logan *et al.*, 2019). Essas

manifestações diversas aumentam a complexidade dos mecanismos patogénicos (Qian e Julia, 2021).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define a Doença de Alzheimer como uma patologia neurodegenerativa de etiologia desconhecida com características neuroquímicas e neuropatológicas que incluem lesões positivas e negativas (World Health Organisation, 1992); (Serrano-Pozo *et al.*, 2011). As lesões positivas compreendem a formação de Tranças Neurofibrilares (NFTs) constituídas por agregados intracelulares de proteína Tau hiperfosforilada e a presença de placas amilóides, isto é, agregados extracelulares de peptídeo Beta-Amilóide (A β). Incluem também a neuroinflamação, desencadeada por uma ativação exacerbada da glia, e a disfunção cerebrovascular. As lesões negativas encerram a degenerescência e perda neuronal e sináptica resultantes (Serrano-Pozo *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2020).

A maioria dos casos clínicos de DA desenvolve sintomas em indivíduos com mais de 65 anos de idade e é atribuída à combinação de fatores genéticos e ambientais. Representa 95% dos casos, coletivamente referidos como DA esporádica (DAE). A forma familiar de DA (DAF), doença autossómica dominante, desenvolve sintomas de início precoce e está associada a mutações em diversos genes, incluindo APP (Proteína Precursora Amilóide), PSEN1 (Presenilina 1) e PSEN2 (Presenilina 2) (Chang *et al.*, 2020; Paspaspyropoulos *et al.*, 2020).

Note-se que os mecanismos da patogénese desta doença degenerativa permanecem insuficientemente compreendidos, em parte devido à falta de modelos relevantes que mimetizem de forma abrangente as interações intercelulares de vários estágios em cérebros humanos com DA (Park *et al.*, 2018). Embora ainda não seja claro quanto conhecimento se pode obter dos organoides, é neste momento considerada a melhor alternativa, particularmente para estudar os estágios iniciais da progressão da doença (Koo *et al.*, 2019; Costamagna *et al.*, 2019).

8.1.1 Modelos 3D de Doença de Alzheimer

Protocolos para meios de cultura tridimensionais derivados de células estaminais neurais podem suportar uma rede celular com representação realista dos tipos de células neurais, incluindo neurónios GABAérgicos, glutamatérgicos e dopaminérgicos, bem como astrócitos e oligodendrócitos (Robbins e Price, 2017). Estes modelos organoides, para modelação da DA foram relatados pela primeira vez em 2014. Incorporados em Matrigel, os organoides com células progenitoras neuronais humanas geneticamente modificadas para sobre-expressar a APP e a PSEN1, recapitularam com sucesso aspetos desta patologia como

placas amilóides, emaranhados neurofibrilares e proteína Tau hiperfosforilada (Chang *et al.*, 2020); (Papaspypopoulos *et al.*, 2020).

Paralelamente, organoides derivados de hPSCs com sobreexpressão de variantes do gene APP ou PSEN1 de doentes com DAF, após um mês em cultura, desenvolveram estruturas semelhantes a várias regiões do cérebro, exibiram um aumento nos marcadores A β e deposição de placa amilóide, bem como tauopatia aumentada por comparação ao controlo (Chang *et al.*, 2020; Lullo, Di e Kriegstein, 2017; Costamagna *et al.*, 2019; Amin e Paşca, 2018).

Embora estes modelos 3D tenham recapitulado com sucesso as principais características patológicas da DA não continham um evento patológico essencial, a neuroinflamação, comumente induzida pela ativação da microglia e astrócitos. A ativação sustentada da microglia resulta numa resposta neuroinflamatória crónica com aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β (Park *et al.*, 2018).

Recentemente, um novo modelo organoide que integra neurónios, astrócitos e microglia foi desenvolvido para modelar a DA com o uso de uma plataforma microfluídica. O modelo exibiu características críticas da patologia da DA, como agregação de A β , hiperfosforilação de Tau, atividade neuroinflamatória, com aumento de quimiocinas e citocinas como CCL2, IL8, TNF- α e IFN- γ , recrutamento microglial, clivagem axonal por neurotoxicidade e libertação de espécies reativas de oxigénio com efeitos nocivos nos neurónios e astrócitos do modelo, remodelação da matriz extracelular e desregulação sináptica (Papaspypopoulos *et al.*, 2020; Chang *et al.*, 2020; Lullo, Di e Kriegstein, 2017).

Neste modelo sofisticado, neurónios e astrócitos derivados de NPCs foram cocultivados com microglia imortalizada humana, para investigar as interações neuroimunológicas relacionadas à patogénese da DA (Amin e Paşca, 2018); (Park *et al.*, 2018). O dispositivo microfluídico usado contém duas câmaras que mimetizam o ambiente da DA *in vivo* para observar as interações entre os vários tipos de células neuronais. Neste caso, na câmara central foram introduzidos neurónios e astrócitos 3D com uma variante mutante de APP, enquanto na câmara angular foi introduzida microglia. As câmaras, central e angular, foram ligadas por canais de migração formando gradientes de fatores solúveis. Usando esta plataforma, observamos a migração de células da microglia, em tempo real (Park *et al.*, 2018). Este sistema de tricultura facilita a compreensão das interações neural-glial da DA e abre uma oportunidade para criar uma plataforma fisiologicamente relevante para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos (Qian e Julia, 2021; Park *et al.*, 2018).

Noutra abordagem, ilustrada na Figura 4, células semelhantes à microglia, geradas a partir de iPSC com expressão de variantes da proteína APOE com diferentes suscetibilidades

à DA foram combinadas com organoides do prosencéfalo derivados de DAF para formar *assemblóides*. O alelo E4 da APOE (APOE4) é o fator de risco genético associado de forma mais significativa para a DA esporádica, aumentando de forma marcada o risco de DA em relação ao alelo APOE3. Organoides cerebrais isogênicos APOE4 gerados por edição de genes de iPSCs saudáveis exibiram aumento dos agregados A β , hiperfosforilação de Tau. Por outro lado, a alteração genética da variante do gene APOE4, de alto risco para a variante de baixo risco (APOE3) usando CRISPR-Cas9 resultou em organoides com acumulação reduzida de A β (Koo *et al.*, 2019; Amin e Paşca, 2018).

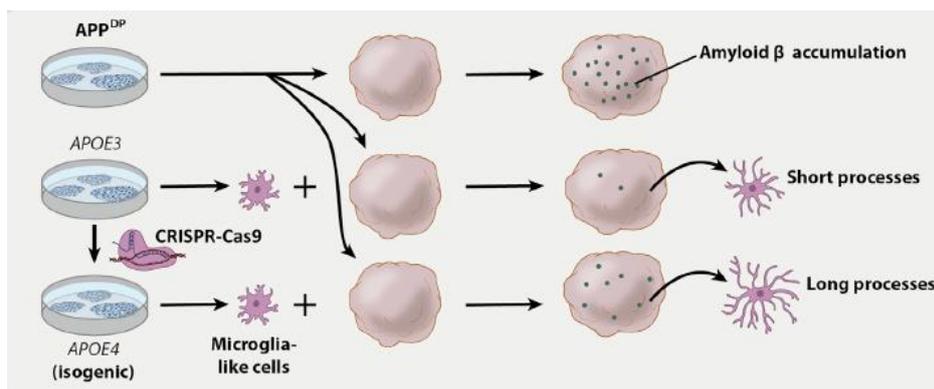


Figura 4 - Esquema representativo dos estudos da Doença de Alzheimer em organoides cerebrais. Para investigar o efeito da microglia na depuração das placas A β na Doença de Alzheimer, células semelhantes à microglia derivadas de iPSCs (Microglia-like cells) foram co-cultivadas com organoides exibindo sobreexpressão da proteína precursora de amiloide (APP). Organoides de células semelhantes à microglia com a variante do gene de baixo risco (APOE3) resultaram em menor quantidade de agregados A β (representado no número de círculos cinza) do que com células semelhantes à microglia isogênica da variante do gene de alto risco (APOE4) obtida pela técnica de edição de genoma, CRISPR-Cas9. **(Adaptado de (Amin e Paşca, 2018)).**

8.1.2 Agentes terapêuticos em estudo

Atualmente, já há estudos de organoides cerebrais com DA para avaliar o efeito de agentes farmacológicos em várias características da doença, com principal destaque na eliminação de placas de A β e proteína Tau (Chang *et al.*, 2020; Venkataraman *et al.*, 2020).

Por exemplo, organoides do plexo coroide poderão contribuir para a descoberta de fármacos, na medida em que este está envolvido na produção de Líquido Céfaloraquídeo (LCR), que regula o movimento de nutrientes e outras substâncias para o cérebro. Podem ser usados em testes de alto rendimento de medicamentos já aprovados que, com base na biodisponibilidade, eficácia, segurança e eliminação sejam redirecionados para tratamento da DA (Venkataraman *et al.*, 2020).

Diversos estudos destacam a potencial aplicação de inibidores da β e γ -secretase, como inibidores da BACE1. Estes compostos propiciam uma diminuição na formação de A β , bem

como alterações positivas na patologia da Tau (Willner *et al.*, 2021). O tratamento com estes inibidores em organoides com mutações DAF, diminuiu os níveis de Tau fosforilada e os níveis de A β 42 tóxico, sugerindo que fenótipos dependentes de Tau podem ser impulsionados pela acumulação excessiva de placas extracelulares A β (Papaspypopoulos *et al.*, 2020; Chang *et al.*, 2020). Os autores mostraram também que a inibição da espécie A β limitou a hiperfosforilação da proteína Tau apenas após a redução do peptídeo A β , sugerindo que os fenótipos impulsionados pela acumulação de A β na DA podem surgir antes da tauopatia (Papaspypopoulos *et al.*, 2020).

Os organoides cerebrais têm também sido usados para explorar modificações pós-tradução nas moléculas responsáveis pela degradação da proteína Tau. A desacetilase das histonas 6 (HDAC6), responsável pela desacetilação de α -tubulina e Tau, apresenta níveis elevados na DA e pode estar envolvida na degradação da Tau com base no seu envolvimento na via de autofagia e no sistema ubiquitina-proteassoma. De igual modo, em organoides de DA, níveis diminuídos de α -tubulina acetilada e aumentados de HDAC6 foram observados, em paralelo com os agregados patológicos de tau.

Um inibidor da HDAC6 que penetra a BHE, designado CKD 504, foi testado em organoides com variantes DAF, tendo os níveis de Tau e pTau diminuído, o que sugere o seu potencial para resgatar a patologia Tau. Adicionalmente, este inibidor reduziu os níveis de Tau na presença de um inibidor lisossomal, mas não degradou a Tau na presença de um proteassomal, permitindo indicar que esta é degradada por uma via proteassomal (Venkataraman *et al.*, 2020).

Apesar destes avanços, mais estudos em organoides são necessários para investigar se a remoção de espécies tóxicas de A β ou proteína Tau, antes do início da sua agregação, função sináptica alterada ou surgimento de défices cognitivos, podem prevenir ou retardar o desenvolvimento da patologia DA (Venkataraman *et al.*, 2020).

Como nota final, importa referir que outras patologias neurodegenerativas também foram investigadas com organoides cerebrais. Por exemplo, organoides do mesencéfalo recapitulam com sucesso a diferenciação anormal e aumento da morte celular de neurónios dopaminérgicos que caracterizam a doença de Parkinson (Willner *et al.*, 2021).

9. MODELAÇÃO DE DOENÇAS INFECCIOSAS

9.1 Vírus Zika (ZIKV)

O ZIKV pertence ao género flavivírus da família Flaviviridae de vírus de RNA de cadeia positiva, e é transmitido ao Homem por vetores artrópodes. (Qian e Julia, 2021). O agente infeccioso teratogénico foi descoberto pela primeira vez no sangue de um macaco rhesus na floresta Ziika, no Uganda, em 1947, e embora se tenha espalhado até à Ásia, causou apenas pequenos surtos esporádicos, até ao recente surto na América do Sul (Rooks, M.G and Garrett, W.S, 2017).

A OMS declarou, em 2016, o vírus Zika (ZIKV) como Emergência de Saúde Pública de Preocupação Internacional, em parte devido à incerteza em torno do aumento de casos de microcefalia e outros distúrbios neurológicos coincidente com surtos de infeção por ZIKV, na América do Sul (Qian *et al.*, 2016; Amin e Paşca, 2018; Rooks, M.G and Garrett, W.S, 2017). A suspeita de ligação entre a infeção pelo ZIKV e a microcefalia é uma preocupação global para a saúde (Tang *et al.*, 2017).

Apesar da evidência clínica mostrar que o ZIKV existia no feto e no líquido amniótico da mãe infetada, a compreensão mecanicista de como o ZIKV induzia danos durante o desenvolvimento cerebral embrionário era insuficiente para estabelecer uma relação causal (Koo *et al.*, 2019); (Costamagna *et al.*, 2019; Lullo, Di e Kriegstein, 2017).

Sabendo que células diferenciadas de iPSCs são suscetíveis a infeções com patógenos humanos e em conjunto com modelos animais, organoides do cérebro humano permitiram confirmar uma ligação mecanística entre o ZIKV e a microcefalia, assim como compreender os alvos celulares, a patogénese da doença e ainda testar intervenções terapêuticas (Trujillo e Muotri, 2018; Rooks, M.G and Garrett, W.S, 2017; Tang *et al.*, 2017; Costamagna *et al.*, 2019).

9.1.2 Estudos com organoides cerebrais

Os organoides cerebrais ganharam um impulso significativo ao permitirem modelar os mecanismos da doença associada ao ZIKV durante a epidemia de 2016 (Ramani, Pranty e Gopalakrishnan, 2021). De facto, os biorreatores giratórios miniaturizados, SpinΩ, referidos acima, foram usados primeiramente para gerar tecido organoide do prosencéfalo subsequentemente infetado com ZIKV de estirpe africana (MR766 ou ZIKVM). Esses organoides exibiram uma região semelhante à SVZ, NPCs com características moleculares e morfológicas da GR humana e subtipos neuronais organizados nas seis camadas corticais (Qian *et al.*, 2016; Hartley e Brennand, 2017).

Estudos iniciais usando culturas 2D de NPCs revelaram que as estirpes de ZIKV são neurotrópicas e causam apoptose de progenitores neurais (Kelava e Lancaster, 2016; Gabriel *et al.*, 2020). Os organoides cerebrais de iPSCs, por reproduzirem os eventos de desenvolvimento cerebral humano, com comparável organização estrutural, propriedades e assinatura molecular, permitem a investigação direta dos efeitos da infecção pelo ZIKV na espessura da camada cortical, para abordar questões relacionadas ao tropismo celular num tecido complexo (Rooks, M.G and Garrett, W.S, 2017). O modelo organoide cerebral oferece a oportunidade de avaliar a infecção à medida que ela progride ao longo do tempo para identificar os efeitos específicos de tempo, espaço e tipo de célula (Logan *et al.*, 2019).

A infecção por ZIKV de organoides em estágio inicial, correspondente ao primeiro trimestre do desenvolvimento fetal humano, levou a uma redução significativa tanto na VZ como na espessura da camada neuronal, semelhante ao que ocorre na microcefalia (Qian *et al.*, 2016). A análise quantitativa detalhada revelou que o ZIKV pode atingir diretamente as NPCs nas zonas ventriculares e que a infecção por ZIKV pode causar depleção destas células, levando à redução geral do tamanho dos organoides, conforme observado com a microcefalia primária hereditária (Amin e Paşca, 2018; Koo *et al.*, 2019). A nível molecular, a infecção pelo ZIKV leva à desregulação de diversas vias de sinalização, incluindo a regulação negativa dos genes do ciclo celular e a regulação positiva dos genes da apoptose em NPCs (Ardhanareeswaran *et al.*, 2017; Rooks, M.G and Garrett, W.S, 2017).

Foram estabelecidos diferentes protocolos de organoides cerebrais que geraram resultados coerentes. Entre eles, destaca-se o tropismo específico para NPCs no tecido 3D (Costamagna *et al.*, 2019). Sinteticamente, destacou-se uma diminuição geral do tamanho dos organoides, resultante de apoptose significativa, supressão da proliferação de NPCs e diferenciação neural prematura (Qian e Julia, 2021; Lullo, Di e Kriegstein, 2017; Trujillo e Muotri, 2018). A diferenciação prematura e proliferação reduzida afetam particularmente as células progenitoras apicais da zona ventricular em proliferação (Logan *et al.*, 2019). Observou-se também um aumento significativo no tamanho do lúmen dentro das estruturas ventriculares, semelhante ao observado em casos clínicos, paralelamente à redução da camada proliferativa e camada neuronal (Hartley e Brennand, 2017; Qian *et al.*, 2016). Em relação à proliferação de células infetadas, os estudos inicialmente divergentes confirmam o aumento significativo de células infetadas, consistente com infecção produtiva por ZIKV (Ardhanareeswaran *et al.*, 2017; Koo *et al.*, 2019; Tang *et al.*, 2017).

Foram estudados diferentes mecanismos potencialmente responsáveis pelos resultados acima observados. Estes incluem a regulação positiva do *receptor 3 toll-like* (TLR3), a regulação

positiva de vias pró-apoptóticas, ativação de p53, desregulação do ciclo celular, interrupção do crescimento e diferenciação de NPCs que regulam a proteína de ligação de RNA, destabilização do complexo de junção aderente e diferenciação prematura de NPCs (Gabriel *et al.*, 2020).

A infecção por ZIKV de organoides ativa a expressão do TLR3, associado à diferenciação prematura com comprometimento do destino celular, desregulação da neurogênese e apoptose. Um aspeto importante é que compostos que inibem competitivamente este recetor podem melhorar a patologia de ZIKV (Ho, Pek e Soh, 2018; Lullo, Di e Kriegstein, 2017; Qian e Julia, 2021). Os organoides que foram tratados com inibidor competitivo de TLR3 atenuaram, em parte, a apoptose severa e a redução do tamanho (Hartley e Brennand, 2017; Quadrato e Arlotta, 2017; Logan *et al.*, 2019).

O laboratório de Gergely identificou uma sequência na região não traduzida de uma estirpe de ZIKV, que controla a expressão de Musashi-I a nível pós-transcricional. A Musashi-I é uma proteína de ligação ao RNA neural que regula o crescimento e a diferenciação das NPCs e, curiosamente, foram identificadas mutações na Musashi-I em doentes com microcefalia primária. O ZIKV, ligando-se e impedindo a ligação do Musashi-I aos seus alvos fisiológicos, interfere com o ciclo de vida das NPCs, desencadeando a diferenciação prematura dos mesmos (Gabriel *et al.*, 2020).

Foram feitos outros testes para estudar a alteração da proliferação de GR na VZ de organoides cerebrais em desenvolvimento. Estes mostraram um número significativamente elevado de GR com planos de divisão vertical. De facto, há uma troca precoce de planos de divisão em progenitores em divisão, de horizontal, necessário para a expansão simétrica, para vertical, consistente com a diferenciação prematura, contribuindo para a depleção do número de progenitores e redução do manto cortical. Foram adicionalmente identificados defeitos estruturais nos centríolos da GR infetados, outro mecanismo crítico que poderá estar subjacente à diferenciação prematura (Gabriel *et al.*, 2020; Lancaster *et al.*, 2013; Amin e Paşca, 2018; Logan *et al.*, 2019).

Para investigar, a nível molecular, o impacto da infecção em NPCs, foram aplicadas análises transcriptómicas globais (RNA seq), que detetaram um grande número de genes expressos de forma diferencial após a infecção viral. Resultado da infecção viral, houve um enriquecimento particular de genes regulados negativamente em vias relacionadas com o ciclo celular e, simultaneamente, regulação positiva de genes associados à transcrição, transporte de proteínas e processos catabólicos. Por exemplo, consistente com o aumento da ativação da caspase-3 observada por imunocitoquímica, a análise de RNA-seq revelou a regulação

positiva de genes envolvidos na regulação da via apoptótica, resultando em morte celular, mediada por caspase-3 (Tang *et al.*, 2017; Amin e Paşca, 2018).

9.1.3 Agentes terapêuticos em estudo

Entre milhares de compostos selecionados em culturas de monocamada, o Emricasan foi o supressor mais potente da atividade da caspase em cultura celular. Quando testado em organoides do prosencéfalo, o Emricasan demonstrou ser anti-apoptótico e neuroprotetor, porém não foi capaz de suprimir a replicação do vírus no SNC em desenvolvimento (Qian e Julia, 2021; Amin e Paşca, 2018; Costamagna *et al.*, 2019). Num outro screening de fármacos em NPCs, diversos compostos inibiram a replicação do ZIKV sem afetar negativamente a proliferação celular. Destes, destacaram-se, pela eficácia, o Bromidrato de Hipeastrina (HH) e o Dicloridrato de Amodiaquina di-Hidratado. Quando testado em organoides do prosencéfalo infectados com ZIKV, o HH inibiu a apoptose mediada por ZIKV e suprimiu o ZIKV (Amin e Paşca, 2018; Ho, Pek e Soh, 2018). Noutra abordagem, fármacos bem-sucedidos noutras áreas, como a Cloroquina e o Sofosbuvir, também levaram ao tratamento de organoides humanos infectados com ZIKV, normalizando a espessura da placa cortical e impedindo a morte celular (Trujillo e Muotri, 2018).

9.2 SARS-CoV-2

O vírus da síndrome respiratória aguda grave coronavírus - 2 (SARS-CoV-2) provocou a atual pandemia mundial, responsável por mais de 194 milhões de infeções entre as quais 4 milhões de mortes, a nível mundial, à data de 25 de junho de 2021 (*COVID Live Update: 194,425,481 Cases and 4,168,714 Deaths from the Coronavirus - Worldometer*, [s.d.]; Qian e Julia, 2021). Assim, a pesquisa sobre o SARS-CoV-2 tornou-se uma necessidade devido à magnitude da sua disseminação por todo o mundo (Sanclemente-Alaman *et al.*, 2020). No início de 2020 a OMS declarou o surto como uma emergência de saúde pública de interesse internacional e anunciou a doença causada pelo SARS-CoV-2 como doença coronavírus 2019 (COVID-19) (Ge *et al.*, 2020).

Até ao momento, pensa-se que o SARSCoV-2 medeia sua entrada nas células hospedeiras através de uma glicoproteína da espícula do vírus (S) que compreende 2 subunidades. A subunidade S1 facilita a ligação do vírus à Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE2), recetor de superfície da célula hospedeira, e a subunidade S2 permite a fusão da membrana do vírus com a célula (Qian e Julia, 2021). Note-se que a ACE2 é expressa na superfície das células epiteliais do trato respiratório inferior, células endoteliais de artérias e

veias, células da mucosa intestinal, células renais, células do sistema imunitário, células gliais e neurónios (Sanclemente-Alaman *et al.*, 2020).

As principais manifestações clínicas de doentes infetados com SARS-CoV-2 incluem predominantemente febre, tosse, fadiga e dispneia (Ge *et al.*, 2020; Bodnar *et al.*, 2021). Assim, o foco até o momento tem sido principalmente o sistema respiratório, porém, um aspeto importante ainda desconhecido do SARS-CoV-2 é seu potencial impacto, a curto e longo prazo, no SNC (Sanclemente-Alaman *et al.*, 2020; Venkataraman *et al.*, 2020; Ramani, Pranty e Gopalakrishnan, 2021).

9.2.1 Manifestações neurológicas

Como acima referido, a ACE2, que atua como recetor de entrada do SARS-CoV-2, é detetada no cérebro, altamente concentrada em vários locais, incluindo substância negra, giro temporal médio e córtex cingulado posterior, sugerindo que o cérebro humano pode ser um alvo extrapulmonar da infeção por SARS-CoV-2 (Mao e Jin, 2020). Efetivamente, organoides cerebrais tratados previamente com anticorpos anti-ACE2 reduziram a entrada viral, mostrando o papel relevante da ACE2 na internalização do SARS-CoV-2 nos neurónios (Ramani, Pranty e Gopalakrishnan, 2021). Para além desta via de entrada, há mais duas hipóteses apontadas de momento para a entrada do vírus no cérebro que são os nervos olfatórios na cavidade nasal e a rutura da BHE, induzida pelas citocinas inflamatórias (Mao e Jin, 2020).

Efetivamente, estudos conduzidos em diferentes países indicam que cerca de 30% a 40% dos pacientes com COVID-19 desenvolverem efeitos nefastos no SNC, principalmente em casos de infeção grave (Sanclemente-Alaman *et al.*, 2020; Venkataraman *et al.*, 2020; Ramani, Pranty e Gopalakrishnan, 2021). Estes estudos, entre outros, destacam que, embora a taxa de sintomas neurológicos não seja alta, há um potencial invasivo do vírus no SNC e possibilidade de efeitos subsequentes da infeção do sistema nervoso central (Mao e Jin, 2020).

Na verdade, para além das síndromes respiratórias preponderantes, as complicações neurológicas descritas nos casos clínicos incluem convulsões, psicose, meningite e encefalopatia necrosante hemorrágica aguda (Qian e Julia, 2021). Os sintomas iniciais começam com cefaleia, tontura, distúrbios de sono e alteração do paladar e olfato, os últimos sintomas mostraram-se muito mais complicados e dependem de vários fatores, como faixa etária, condições pré-existentes e gravidade da infeção. Incluem deficiência visual, encefalite, psicose, deficiência neurocognitiva, demência, acidente vascular cerebral isquémico e hemorragia intracerebral (Ramani, Pranty e Gopalakrishnan, 2021). Evidências robustas acumuladas

indicam que estas observações clínicas, também denominadas Neuro - SARS2, podem desempenhar um papel importante no agravamento e mortalidade da doença (Bodnar *et al.*, 2021).

No entanto, é necessário esclarecer diversas questões, em particular se os distúrbios neurológicos são causados por infecção neuronal direta ou consequências indiretas, resultado da infecção por SARS-CoV-2 sistematicamente, isto é, pela resposta inflamatória sistêmica ou ainda uma combinação destes dois mecanismos patológicos (Qian e Julia, 2021; Ramani, Pranty e Gopalakrishnan, 2021). Nesse sentido, têm sido feitos variadíssimos estudos que vão desde a observação clínica a modelos celulares 3D (Qian e Julia, 2021).

9.2.2 Estudos em organoides cerebrais

Estudos experimentais em culturas primárias demonstraram que os coronavírus humanos podem infectar neurónios, astrócitos e microglia (Sanclemente-Alaman *et al.*, 2020). Exames histopatológicos *pos-mortem* em doentes com SARS2 revelaram evidências de danos hipoxico-isquémicos agudos, e, em autópsias de cérebro, foi detetada a presença de SARS-CoV-2 no LCR, por RT - PCR (Bodnar *et al.*, 2021).

Curiosamente, as células infetadas com SARS-CoV-2 podem desencadear também a morte de células vizinhas não infetadas. A formação sincicial robusta de células infetadas encontrada no pulmão de doentes com SARS-CoV-2 também pode ocorrer em células neurais, contribuindo para a neuropatogénese no cérebro (Bodnar *et al.*, 2021).

Estes dados indiciam a capacidade neuroinvasiva direta do SARS-CoV-2 no cérebro humano e fundamentam a utilização de organoides do cérebro humano para o estudo aprofundado do neurotropismo do SARS-CoV-2, ainda no decorrer do estado pandémico (Ramani, Pranty e Gopalakrishnan, 2021; Qian e Julia, 2021). Estudos exploraram os efeitos neurológicos deste vírus nos organoides cerebrais, contudo, há dados inconsistentes e ambíguos o que releva que são apenas o ponto de partida para o que pode vir a ser descoberto com estes modelos celulares 3D (Ramani, Pranty e Gopalakrishnan, 2021; Willner *et al.*, 2021).

Um estudo comparou o grau de infecção em culturas 3D de 15 e 60 dias e observou que neurónios relativamente maduros, ao dia 60, exibiram infecção por SARS-CoV-2 substancial em neurónios corticais, após 2 dias de exposição, em comparação com os do dia 15, sugerindo maior infecção em células mais maduras (Venkataraman *et al.*, 2020). Outros autores também testaram duas faixas etárias de organoides com 40 dias de intervalo e identificaram que as faixas etárias posteriores eram muito mais suscetíveis à entrada viral (Ramani, Pranty e Gopalakrishnan, 2021).

No primeiro estudo referido, observou-se também idêntica carga viral nos dois e quatro dias após a infecção dos organoides, indicando que o vírus não apresenta replicação ativa, corroborando a hipótese de que o SNC atua como um reservatório a longo prazo do vírus (Venkataraman *et al.*, 2020; Sanclemente-Alaman *et al.*, 2020). Não obstante, estudos posteriores contrariam estes dados. A infecção por SARS-CoV-2 em organoides cerebrais saudáveis de nove semanas exibiu um aumento significativo nos títulos virais entre as 24 e 96 horas após a infecção cumulativamente com o aumento da perda neuronal nas regiões mais infetadas. Outro grupo de investigadores observou o incremento de partículas virais em células neurais de organoides entre as 6 e 72h após a infecção por SARSCoV-2, comprovando a replicação ativa e infecção produtiva do vírus em células neurais durante os primeiros dias (Willner *et al.*, 2021; Ramani, Pranty e Gopalakrishnan, 2021). O conjunto destes estudos sugere, assim, a propriedade neuroinvasiva do SARS-CoV-2 em organoides cerebrais (Mao e Jin, 2020; Bodnar *et al.*, 2021).

No que respeita ao tropismo celular do SARS-CoV-2, as experiências indicam uma preferência pela infecção de neurónios maduros (Ramani, Pranty e Gopalakrishnan, 2021); (Sanclemente-Alaman *et al.*, 2020). Relativamente aos mecanismos de neurotoxicidade há vários dados já descritos que se prendem essencialmente com alteração da sinaptogénese, hipoxia celular, neuroinflamação e taupatia.

Por um lado, a expressão significativamente diminuída de vGLUT1, um marcador pré-sináptico excitatório, identificada em organoides cerebrais, sugere alterações na sinaptogénese em células infetadas com SARS-CoV-2, indiciando uma potencial implicação de longo prazo com efeitos semelhantes a sinaptopatia (Bodnar *et al.*, 2021; Ramani, Pranty e Gopalakrishnan, 2021).

Por outro lado, a avaliação de RNA-Seq de célula única (scRNA-Seq) de organoides infetados indicou que células positivas para SARS-CoV-2 exibem regulação positiva de genes relacionados à transcrição viral e hipóxia, indicando que o SARS-CoV-2 tem a capacidade de condicionar os processos metabólicos do hospedeiro, desencadeando características de neurodegenerescência (Venkataraman *et al.*, 2020; Willner *et al.*, 2021). O SARS-CoV-2 induziu um ambiente localmente hipóxico nas regiões neuronais, o que contribui para a redução do limiar de dano tecidual (Willner *et al.*, 2021; Bodnar *et al.*, 2021). O ambiente hipóxico e extensa apoptose celular neuronal observados em áreas densamente infetadas com SARS-CoV-2, sugere que a infecção promove a morte de células próximas (Ramani, Pranty e Gopalakrishnan, 2021).

Além disso, as junções célula-célula da camada de células epiteliais do plexo coroide, parte integrante da BHE que impede a entrada de patógenos, células imunes e citocinas no LCR e no cérebro, quando em contacto com o vírus, são visivelmente danificadas, o que pode permitir a entrada anormal destas células, resultando em neuroinflamação (Willner *et al.*, 2021). A exposição ao SARS-CoV-2, nos organoides puros de plexo coroide, conduz a infeção, replicação produtiva e indução de resposta inflamatória, com expressão aumentada de citocinas inflamatórias, fator de necrose tumoral alfa, interleucinas, e morte celular. Estes trabalhos corroboram a hipótese de que o epitélio do plexo coroide é suscetível à infeção e de que o vírus pode entrar no SNC como consequência do dano à BHE (Ramani, Pranty e Gopalakrishnan, 2021).

Curiosamente, identificou-se que neurónios positivos para o SARS-CoV-2 estavam especificamente associados à fosforilação da proteína Tau no aminoácido Thr-231. Organoides infetados mostraram um aumento do fenótipo semelhante à neurodegenerescência precoce, pois a pTau (T231) foi deslocada do axónio para o soma celular, o que pode desencadear vias de morte celular programada (Venkataraman *et al.*, 2020; Ramani, Pranty e Gopalakrishnan, 2021; Bodnar *et al.*, 2021). A tauopatia, reminiscência da DA e outras doenças neurodegenerativas, indicia que a COVID-19 possa causar danos crónicos ou de longo prazo no SNC (Willner *et al.*, 2021; Sanclemente-Alaman *et al.*, 2020).

Não há, até ao momento, estratégias profiláticas estabelecidas ou medicamentos antivirais aprovados para o tratamento com COVID-19, portanto, a utilização de fármacos aprovados para outras indicações, é uma abordagem emergente com vista à identificação de novos tratamentos da doença, sendo os organoides, cerebrais e não só, instrumentos de investigação muito promissores (Qian e Julia, 2021). Algumas terapias em estudo para tratar a doença e/ou a sua sintomatologia foram já testadas nestes organoides. O Sofosbuvir, por exemplo, desenvolvido para tratamento da Hepatite C e com capacidade para atravessar a BHE e para suprimir famílias virais com RNA de cadeia simples de sentido positivo, diminuiu com sucesso a morte celular neuronal, a acumulação viral e os danos sinápticos. Adicionalmente, outros estudos relatam que a infeção por SARS-CoV-2 foi inibida por anticorpos anti-ACE2 (Willner *et al.*, 2021).

Em síntese, os estudos com organoides cerebrais demonstraram que o vírus era capaz de infetar neurónios, incluindo NPCs e, especialmente, neurónios corticais maduros, e causar morte celular acompanhada pelo comprometimento das sinapses excitatórias (Sanclemente-Alaman *et al.*, 2020). Os dados reportados sugerem que se trata de modelos com grande

utilidade para prosseguir os estudos e tentar combater, em todas as frentes, os efeitos da pandemia, neste caso, no SNC.

9.2.3 Limitações/ Investigações futuras

Existem várias etapas futuras ainda a ser consideradas na hipótese de infecção cerebral por este vírus (Ramani, Pranty e Gopalakrishnan, 2021; Bodnar *et al.*, 2021).

Primeiro, os efeitos observados envolvendo infecção cerebral induzida por SARS-CoV-2 são de curto prazo. No entanto, na prática clínica, os sintomas neurológicos são frequentemente persistentes em pacientes com COVID-19, portanto, é essencial monitorizar de perto as consequências a longo prazo da infecção por SARS-CoV-2 no SNC (Mao e Jin, 2020; Ramani, Pranty e Gopalakrishnan, 2021).

Em segundo lugar, os modelos que são utilizados para a avaliação da infecção do SARS-CoV-2 no SNC, não possuem a estrutura cerebral completa, não incluindo por exemplo, a integridade da BHE (Mao e Jin, 2020). Uma modelação da Neuro-COVID-19 mais realista requer organoides cerebrais que expressem os diversos tipos de células maduras, tais como neurónios mielinizados, células epiteliais do plexo coróide, e outros tipos de células neurais, com particular interesse os astrócitos e microglia, pelo papel que desempenham na neuroinflamação como resposta à infecção por SARS-CoV-2 (Ramani, Pranty e Gopalakrishnan, 2021).

Embora um progresso significativo tenha sido feito no estudo do Neuro - SARS2, ainda há muito a ser aprendido sobre as rotas virais neuroinvasivas, transneuronal e hematogénica, e os mecanismos moleculares subjacentes ao desenvolvimento e progressão da doença (Bodnar *et al.*, 2021; Willner *et al.*, 2021). Apesar de raras, as complicações neurológicas graves, à escala global da pandemia e a longo prazo podem chegar a um grande número de casos, pois os sintomas e efeitos latentes do vírus continuam a manifestar-se, potencialmente deixando os pacientes com doenças neurológicas e/ou distúrbios neuropsiquiátricos (Bodnar *et al.*, 2021).

Dado que a pandemia do SARS-CoV-2 ainda se encontra longe duma resolução, mais esforços na investigação dos mecanismos do Neuro-SARS2 permanecem necessários e urgentes. A compreensão dos mecanismos celulares abrirá o caminho para estratégias terapêuticas clínicas (Bodnar *et al.*, 2021; Sanclemente-Alaman *et al.*, 2020).

10. LIMITAÇÕES DA TÉCNICA E PERSPETIVAS FUTURAS

Uma das principais limitações destes modelos celulares tridimensionais prende-se com a falta de reprodutibilidade nos protocolos e insuficiente padronização dos organoides entre si (Quadrato, Brown e Arlotta, 2016; Ho, Pek e Soh, 2018). Nenhum dos métodos atuais gera tecidos com o padrão perfeitamente comparável ao do cérebro humano em desenvolvimento, como observável na Figura 3, presumivelmente devido à falta de eixos corporais embrionários anterior-posterior e dorsal-ventral que permaneçam contínuos através do organoide e orientem a direção do desenvolvimento cerebral (Kelava e Lancaster, 2016). Nos atuais protocolos *in vitro*, cada agregado 3D normalmente gera um número variável de estruturas neuroepiteliais semelhantes a tubos neurais, que contribuem para uma maior variabilidade espacial e celular de organoide para organoide (Quadrato e Arlotta, 2017; Lullo, Di e Kriegstein, 2017). A natureza estocástica dos protocolos de diferenciação não direcionada é obviamente evidente com os protocolos de obtenção sem fatores de indução neural, como SFEBq, tendo a indução neural aperfeiçoado, em parte, esta lacuna da técnica (Lullo, Di e Kriegstein, 2017; Costamagna *et al.*, 2019; Amin e Paşca, 2018). Os organoides de próxima geração devem aumentar a reprodutibilidade, escalabilidade e previsibilidade espacial interna dos tipos de células individuais e características macroestruturais.

Assim, a definição exata das condições necessárias para a derivação de regiões cerebrais específicas, contemplando parâmetros como a diversidade e concentração de fatores de padronização e número inicial de hPSC, é um componente crítico dos futuros protocolos organoides (Hartley e Brennand, 2017). Esta otimização cuidadosa das condições de cultura pode ser conseguida pela aplicação de modelos matemáticos, como *Design of Experiments* (DOE), uma estratégia estatística que permite selecionar a combinação e concentração mais eficiente de fatores de crescimento específicos necessários para a manutenção e proliferação celular (Trujillo e Muotri, 2018).

Melhorias adicionais poderão ser obtidas pela incorporação de técnicas como *bioprinting*, nanotecnologia, microfluídica e biomateriais (Amin e Paşca, 2018). A falta de tecido de suporte circundante e pistas axiais dos organoides cerebrais pode ser solucionada com recursos à bioengenharia e impressão 3D e o controlo espacio-temporal das moléculas de diferenciação pode ser conseguido usando nanopartículas de libertação controlada, mimetizando os eventos *in vivo* (Hartley e Brennand, 2017; Koo *et al.*, 2019). A tecnologia microfluídica, também chamada *organ-on-a-chip*, é outra estratégia recente que fornece uma plataforma controlável e reprodutível por meio da montagem de componentes essenciais dos

organoides cerebrais num pequeno dispositivo mecânico, como explicitado acima. (Koo et al., 2019).

Uma segunda grande limitação prende-se com a nutrição e vascularização dos organoides cerebrais, que impede a viabilidade do tecido numa cultura de longo prazo (Quadrato, Brown e Arlotta, 2016). A ausência de vasos sanguíneos nos organoides restringe a perfusão, causa necrose comprometendo a autorrenovação e diferenciação dos progenitores, dificulta a formação da placa cortical e maturação das estruturas cerebrais e induz diferenciação neural prematura na camada mais externa (Qian e Julia, 2021; Ho, Pek e Soh, 2018). De uma perspectiva terapêutica, um organoide vascularizado é também capaz de capturar a absorção, a circulação e o metabolismo de fármacos e quando se pretenda o seu transplante, um organoide vascularizado pode ser enxertado e integrado na rede vascular do cérebro do doente (Ho, Pek e Soh, 2018).

Não obstante, há já avanços recentes nesta área, inclusivamente, modelos 3D vascularizados de cancro foram produzidos para estudar os processos de tumorigénese e a angiogénese (Ho, Pek e Soh, 2018). As abordagens de vascularização existentes podem ser classificadas em dois tipos: Rede assistida por biomaterial, isto é, vascularização dependente de andaime, com recurso à impressão 3D, e vascularização espontânea. Relativamente à vascularização espontânea, têm sido estudadas duas opções, transplante do organoide *in vivo* e co-cultura endotelial (Qian e Julia, 2021).

Foram desenvolvidos organoides vascularizados de cérebro humano por transplante destes no córtex de murganhos. Os organoides não vascularizados são cultivados em gotículas de Matrigel e posteriormente transplantados para as extremidades livres da cavidade de ressecção de cérebros de murganhos imunodeficientes para integração vascular local. Estes organoides apresentam um crescimento interno robusto de capilares positivos para CD31 humano numa estrutura tubular contínua que penetra toda a área sem que nenhum capilar humano se infiltre na rede capilar local do murganho (Qian e Julia, 2021). A par da distribuição estável de oxigénio e nutrientes, a capacidade de transplantar organoides cerebrais para um ambiente *in vivo* abre a possibilidade de estudar um cérebro vivo e suas respostas a estímulos ambientais complexos e modelar doenças de forma integrada (Chang et al., 2020).

Paralelamente, organoides corticais vascularizados a partir de ESCs foram gerados por expressão ectópica de ETV2 (*ETS Variant Transcription Factor 2*), o que permitiu a formação de estruturas semelhantes a vasos sanguíneos, que imitam as características da BHE dado que apresentam expressão de junções oclusivas, astrócitos e marcadores pericíticos (Chang et al., 2020).

Adicionalmente há outros parâmetros a ser otimizados nestes novos modelos tridimensionais, sistematizados na Tabela I, para que possam ter uma produção mais rápida e menos dispendiosa e viável por longos períodos de tempo. Em síntese, esta técnica é muito recente e inovadora e ainda estão a ser dados os primeiros passos na descoberta do seu potencial. As limitações acima descritas são apenas pontos de partida para o seu aperfeiçoamento (Logan *et al.*, 2019).

Tabela I - Limitações e atuais abordagens da técnica de organoides cerebrais (Adaptado de (MODEL 19))

Limitação	Abordagens
Falta de reprodutibilidade	Tecnologias microfluídicas modulando estímulos locais para o microambiente celular Organoides padronizados
Custo e Tempo	Biorreatores giratórios miniaturizados
Orientação espacial aleatória	Andaimes de bioengenharia
Maturação de longo prazo	Transplante <i>in vivo</i> em modelos animais Otimização das condições de cultura
Falta de vascularização	Co-culturas Transplante <i>in vivo</i> em modelos animais

II. CONCLUSÃO

A presente revisão bibliográfica permitiu compilar informações científicas atuais e relevantes no âmbito dos modelos celulares cerebrais tridimensionais. A abordagem abrangente permitiu estabelecer a contextualização, aplicabilidade e relação vantagens-limitações, por forma a despertar o interesse da comunidade científica a aprofundar o tema e/ou usar a técnica em protocolos laboratoriais da área médica e farmacêutica.

Com uma história de cerca de uma década, a tecnologia dos organoides cerebrais está ainda a dar os primeiros passos. Os protocolos atuais de organoides cerebrais mimetizam o cérebro fetal humano na composição celular e molecular. Para uma completa maturação celular são necessárias culturas durante períodos de tempo alargados com sistemas eficientes de difusão de oxigénio e nutrientes. De igual modo, para simular o funcionamento integrado do cérebro humano são necessárias culturas com vasos sanguíneos, que mimetizem a Barreira Hematoencefálica, e com células de diferentes origens embrionárias. Estes são os principais desafios atuais da técnica que estão a ser ultrapassadas com várias abordagens inovadoras.

Atualmente, estes modelos são utilizados em combinação com modelos animais e celulares bidimensionais, para a formulação de conhecimento científico e clínico robusto.

Em suma, a tecnologia de organoides cerebrais representa uma ferramenta de última geração para diagnósticos preditivos, compreensão fisiopatológica e desenvolvimento de terapias individualizadas, principalmente quando otimizada com o conhecimento de outras áreas como a edição de genoma. Superando as limitações, e num futuro próximo, a técnica permitirá, entre várias aplicações clínicas, estudar a etiologia aprofundada de doenças neurológicas incompletamente compreendidas e tratadas, como as doenças degenerativas, ou novas e inesperadas patologias que possam surgir, como a COVID-19.

11. BIBLIOGRAFIA

1. AGIRMAN, Gulistan; BROIX, Loïc; NGUYEN, Laurent - Cerebral cortex development: an outside-in perspective. **FEBS Letters**. ISSN 18733468. 591:24 (2017) 3978–3992.
2. AMIN, Neal D.; PAŞCA, Sergiu P. - Building Models of Brain Disorders with Three-Dimensional Organoids. **Neuron**. ISSN 10974199. 100:2 (2018) 389–405.
3. ARDHANAREESWARAN, Karthikeyan *et al.* - Human induced pluripotent stem cells for modelling neurodevelopmental disorders. **Nature Reviews Neurology**. ISSN 17594766. 13:5 (2017) 265–278.
4. BENITO-KWIECINSKI, Silvia; LANCASTER, Madeline A. - Brain organoids: Human neurodevelopment in a dish. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. ISSN 19430264. 12:8 (2020) 1–18.
5. BODNAR, Brittany *et al.* - Cellular mechanisms underlying neurological/neuropsychiatric manifestations of COVID-19. **Journal of Medical Virology**. ISSN 10969071. 93:4 (2021) 1983–1998.
6. BORDONI, Matteo *et al.* - From neuronal differentiation of iPSCs to 3D neuro-organoids: Modelling and therapy of neurodegenerative diseases. **International Journal of Molecular Sciences**. ISSN 14220067. 19:12 (2018) 1–13.
7. CHANG, Yujung *et al.* - Modelling neurodegenerative diseases with 3D brain organoids. **Biological Reviews**. ISSN 1469185X. 95:5 (2020) 1497–1509.
8. CHEN, H. Isaac; SONG, Hongjun; MING, Guo Li - Applications of Human Brain Organoids to Clinical Problems. **Developmental Dynamics**. . ISSN 10970177. 248:1 (2019) 53–64.
9. CLEVERS, Hans - Modeling Development and Disease with Organoids. **Cell**. ISSN 10974172. 165:7 (2016) 1586–1597.
10. COSTAMAGNA, Gianluca *et al.* - iPSCs-Based Neural 3D Systems: A Multidimensional Approach for Disease Modeling and Drug Discovery. **Cells**. ISSN 20734409. 8:11 (2019).
11. **COVID Live Update: 194,425,481 Cases and 4,168,714 Deaths from the Coronavirus - Worldometer** - [Consult. 25 jul. 2021]. Disponível em: <https://www.worldometers.info/coronavirus/#countries>
12. EIRAKU, Mototsugu; SASAI, Yoshiki - Self-formation of layered neural structures in three-dimensional culture of ES cells. **Current Opinion in Neurobiology**. ISSN 09594388. 22:5 (2012) 768–777.
13. GABRIEL, Elke *et al.* - Human Brain Organoids to Decode Mechanisms of Microcephaly. **Frontiers in Cellular Neuroscience**. ISSN 16625102. 14:May (2020) 1–13.
14. GE, Huipeng *et al.* - La epidemiología y la información clínica sobre COVID-19. **Revista**

- Europea de Microbiologia Clinica y enfermedades Infecciosas.** ISSN 0934-9723. 39:6 (2020) 1011–1019.
15. HARTLEY, Brigham J.; BRENNAND, Kristen J. - Neural organoids for disease phenotyping, drug screening and developmental biology studies. **Neurochemistry International.** ISSN 18729754. 106:2017) 85–93.
 16. HO, Beatrice Xuan; PEK, Nicole Min Qian; SOH, Boon Seng - Disease modeling using 3D organoids derived from human induced pluripotent stem cells. **International Journal of Molecular Sciences.** ISSN 14220067. 19:4 (2018).
 17. KELAVA, Iva; LANCASTER, Madeline A. - Stem Cell Models of Human Brain Development. **Cell Stem Cell.** ISSN 18759777. 18:6 (2016) 736–748.
 18. KELAVA, Iva; LANCASTER, Madeline A. - Dishing out mini-brains: Current progress and future prospects in brain organoid research. **Developmental Biology.** ISSN 1095564X. 420:2 (2016) 199–209.
 19. KOO, Bonsang *et al.* - Past, Present, and Future of Brain Organoid Technology. **Molecules and cells.** ISSN 02191032. 42:9 (2019) 617–627.
 20. LANCASTER, Madeline A. *et al.* - Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. **Nature.** ISSN 00280836. 501:7467 (2013) 373–379.
 21. LANCASTER, Madeline A.; KNOBLICH, Juergen A. - Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. **Science.** ISSN 10959203. 345:6194 (2014).
 22. LOGAN, Sarah *et al.* - Studying Human Neurological Disorders Using Induced Pluripotent Stem Cells: From 2D Monolayer to 3D Organoid and Blood Brain Barrier Models. **Comprehensive Physiology.** ISSN 2040-4603. 9:2 (2019) 565–611.
 23. LULLO, Elizabeth DI; KRIEGSTEIN, Arnold R. - The use of brain organoids to investigate neural development and disease. **Nature Reviews Neuroscience.** ISSN 14710048. 18:10 (2017) 573–584.
 24. MAO, Xiao Yuan; JIN, Wei Lin - iPSCs-Derived Platform: A Feasible Tool for Probing the Neurotropism of SARS-CoV-2. **ACS Chemical Neuroscience.** ISSN 19487193. 11:17 (2020) 2489–2491.
 25. OBERNIER, Kirsten; ALVAREZ-BUYLLA, Arturo - Neural stem cells: Origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. **Development (Cambridge).** ISSN 14779129. 146:4 (2019).
 26. PAPASPYROPOULOS, Angelos *et al.* - Modeling and Targeting Alzheimer's Disease With Organoids. **Frontiers in Pharmacology.** . ISSN 16639812. 11:March (2020) 1–8.
 27. PARK, Joseph *et al.* - A 3D human triculture system modeling neurodegeneration and

- neuroinflammation in Alzheimer's disease. **Nature Neuroscience**. ISSN 15461726. 21:7 (2018) 941–951.
28. PASCA, Anca M. *et al.* - Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture. **Nature Methods**. ISSN 15487105. 12:7 (2015) 671–678.
 29. QIAN, Lu; JULIA, T. C. W. - Human iPSC-based modeling of central nerve system disorders for drug discovery. **International Journal of Molecular Sciences**. ISSN 14220067. 22:3 (2021) 1–36.
 30. QIAN, Xuyu *et al.* - Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. **Cell**. ISSN 10974172. 165:5 (2016) 1238–1254.
 31. QUADRATO, Giorgia; ARLOTTA, Paola - Present and future of modeling human brain development in 3D organoids. **Current Opinion in Cell Biology**. ISSN 18790410. 49:2017) 47–52.
 32. QUADRATO, Giorgia; BROWN, Juliana; ARLOTTA, Paola - The promises and challenges of human brain organoids as models of neuropsychiatric disease. **Nature Medicine**. ISSN 1546170X. 22:11 (2016) 1220–1228.
 33. RAMANI, Anand; PRANTY, Abida Islam; GOPALAKRISHNAN, Jay - Neurotropic Effects of SARS-CoV-2 Modeled by the Human Brain Organoids. **Stem Cell Reports**. ISSN 22136711. 16:3 (2021) 373–384.
 34. RIGAMONTI, Alessandra *et al.* - Large-scale production of mature neurons from human pluripotent stem cells in a three-dimensional suspension culture system. **Stem Cell Reports**. . ISSN 22136711. 6:6 (2016) 993–1008.
 35. ROBBINS, J. P.; PRICE, J. - Human induced pluripotent stem cells as a research tool in Alzheimer's disease. **Psychological Medicine**. ISSN 14698978. 47:15 (2017) 2587–2592.
 36. ROOKS, M.G AND GARRETT, W.S, 2016 - 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. **Physiology & behavior**. 176:3 (2017) 139–148.
 37. SANCLEMENTE-ALAMAN, Inmaculada *et al.* - Experimental Models for the Study of Central Nervous System Infection by SARS-CoV-2. **Frontiers in Immunology**. ISSN 16643224. 11:August (2020) 1–12.
 38. SERRANO-POZO, Alberto *et al.* - Neuropathological alterations in Alzheimer disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. ISSN 21571422. 1:1 (2011) 1–23.
 39. TANG, Hengli *et al.* - Zika Virus Infects Human Cortical Neural Precursors Attenuates Growth. **Cell Stem Cell**. 18:5 (2017) 587–590.
 40. TRUJILLO, Cleber A.; MUOTRI, Alysson R. - Brain Organoids and the Study of Neurodevelopment. **Trends in Molecular Medicine**. ISSN 1471499X. 24:12 (2018) 982–990.

41. VENKATARAMAN, Lalitha *et al.* - Modeling neurodegenerative diseases with cerebral organoids and other three-dimensional culture systems: focus on Alzheimer's disease. **Stem Cell Reviews and Reports**. ISSN 26293277. 2020).
42. WILLNER, Moshe J. *et al.* - Modeling SARS-CoV-2 infection in individuals with opioid use disorder with brain organoids. **Journal of Tissue Engineering**. ISSN 20417314. 12:2021).
43. WORLD HEALTH ORGANISATION - The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders. ISSN 00195545. 55:1993 (1992) 135–139.

ANEXOS

Anexo I - Ilustração esquemática com informação complementar do processo de neurogênese e expansão cortical.

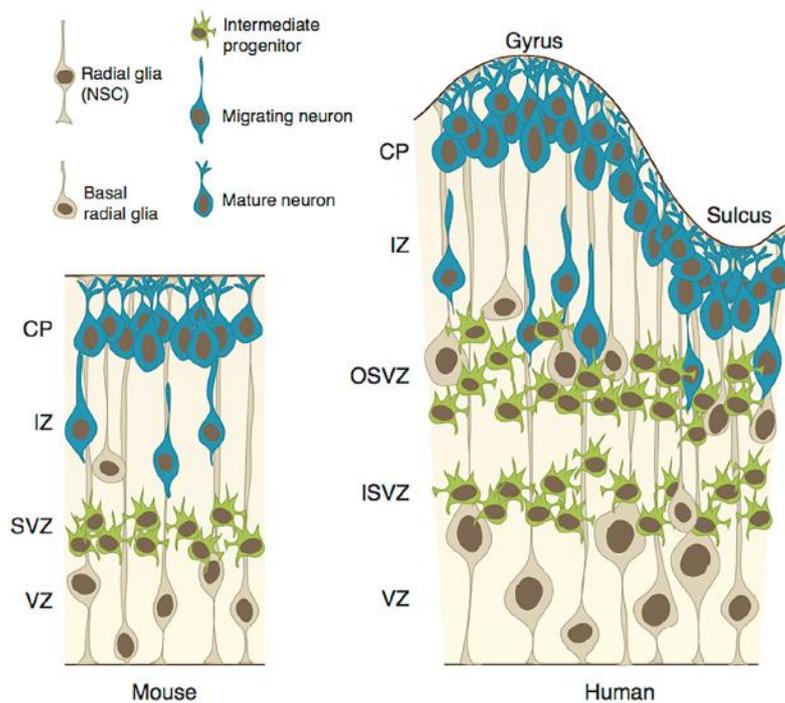


Figura A - Esquema ilustrativo do processo de neurogênese e expansão cortical no córtex cerebral humano (Human) e do murganho (Mouse). As células estaminais neurais (NSC), divide-se em células-filhas diferenciadas, tais como neurónios ou populações intermediárias - progenitores intermediários e glia radial basal - que posteriormente se diferenciam em neurónios. A glia radial ocupa a zona ventricular (VZ), os progenitores intermediários e a glia radial basal situam-se na zona subventricular (SVZ), podendo ambas ser distinguidas com base na orientação de células e expressão de alguns marcadores moleculares. Num primeiro momento há expansão lateral de número de progenitores neurais, formando a camada VZ de células neuroepiteliais que seguidamente transitam para a chamada glia radial, havendo um espessamento progressivo do tecido como resultado da produção de subtipos celulares diferenciados a partir de divisões assimétricas auto-renováveis. O córtex humano, à direita, tem a SVZ expressivamente mais expandida com separação em SVZ interna (ISVZ) e externa (OSVZ). As populações intermediárias têm sido implicadas no processo de expansão do cérebro humano. Os humanos exibem um número aumentado destes progenitores dentro da SVZ em comparação com os outros mamíferos. Os neurónios migram através da zona intermédia (IZ) para a placa cortical (CP) contando com um longo fascículo basal da glia radial como um guia para deslocar radialmente até à sua localização final. Nos seres humanos, a CP é muito extensa, por comparação com murganhos, e o córtex é altamente dobrado formando sulcos (**Gyrus; Sulcus**) (Kelava e Lancaster, 2016; Clevers, 2016; Obernier e Alvarez-Buylla, 2019). **(Imagem retirada de (Kelava e Lancaster, 2016))**

Anexo 2 - Tabela síntese das limitações dos primeiros modelos de estudo do cérebro humano.

Tabela A - Tabela das limitações dos primeiros modelos de estudo do cérebro humano: Modelos *pos-mortem*, Modelos animais e Modelos Celulares monocamada.

Modelos	Limitação	Referências
Modelos Pos-mortem	Leitura de ponto único	(Ardhanareeswaran <i>et al.</i> , 2017)
Modelos Animais	Limitados às características compartilhadas entre os animais e o Homem	(Kelava e Lancaster, 2016)
	Expressão genética e metabolismo celular intrinsecamente diferentes	(Qian e Julia, 2021)
	Disponibilidade limitada	(Amin e Paşca, 2018)
	Considerações éticas associadas	(Amin e Paşca, 2018)
Modelos Celulares Monocamada	Artificiais: não mimetizam o desenvolvimento natural de células	(Ho, Pek e Soh, 2018; Pasca <i>et al.</i> , 2015)
	Complexidade celular limitada	(Quadrato, Brown e Arlotta, 2016; Kelava e Lancaster, 2016)
	Propriedades mecânicas e adesivas não fisiológicas que podem alterar a morfologia neuronal e a expressão gênica.	(Ardhanareeswaran <i>et al.</i> , 2017)
	Culturas primárias de colheita invasiva	(Qian e Julia, 2021)
	Não permitem observar relações intercelulares e espaço-temporais	(Quadrato, Brown e Arlotta, 2016; Kelava e Lancaster, 2016)