

# ORGANÓIDES DO SISTEMA ENDÓCRINO: DE MODELOS EXPERIMENTAIS PARA PERSPECTIVAS CLÍNICAS PARA DESORDENS HORMONAIS

## *ENDOCRINE SYSTEM ORGANOIDS: FROM EXPERIMENTAL MODELS TO CLINICAL PERSPECTIVES FOR HORMONAL DISORDERS*

Pedro Henrique Gomes Santana<sup>1</sup>; Raysa Taynara Vasconcelos de Souza<sup>1</sup>; Daniel Mendes Filho<sup>2</sup>; Lucas Felipe Oliveira<sup>3</sup>; Adrieli Oliveira Raminelli<sup>4</sup>; Bruno Lemes Marques Ricardo<sup>4</sup>; Cambraia Parreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário de Mineiros (UNIFIMES), Goiás, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Goiás (UEG), Goiás, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Minas Gerais, Brasil.

<sup>4</sup>Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), São Paulo, Brasil.

### Resumo

**Introdução:** Nesta revisão narrativa sobre os organoides de glândulas e tecidos endócrinos são abordados o histórico desses modelos de cultura celular, assim como as perspectivas clínicas que os organoides oferecem para as diversas afecções endócrinas. **Objetivo:** Este trabalho tem como objetivos descrever a evolução do uso de organoides de tecidos endócrinos, bem como as perspectivas clínicas que esses modelos oferecem por meio do acompanhamento fisiopatológico e de teste farmacológicos específicos aplicados sobre o organoide cultivado a partir das amostras individuais. **Metodologia:** A pesquisa foi feita por meio de levantamento bibliográfico efetuado nas bases de dados PubMed, SciELO e Google Acadêmico a partir de palavras-chave registradas no DeCS/MeSH. **Resultados e Conclusão:** A compreensão do desenvolvimento de tecidos normais e tumorais pode favorecer tanto a engenharia de tecidos, como o desenvolvimento de drogas para um tratamento específico de uma determinada doença e a medicina regenerativa. Apesar de existirem algumas limitações e restrições dos organoides em modelos de animais, não há dúvida de que a cultura tridimensional a longo prazo possa fornecer oportunidades para desenvolver mecanismos de resolução de diversas patologias endocrinológicas.

**Palavras chave:** Organoides; Glândulas Endócrinas; Medicina Regenerativa; Medicina de Precisão; Medicina Personalizada.

## Abstract

**Introduction:** In this narrative review on organoids from endocrine glands and tissues, we discuss the history of these cell culture models and the clinical perspectives that organoids offer for different endocrine disorders. **Objective:** This work aims to describe the evolution of the use of organoids from endocrine tissues, as well as the clinical perspectives that these models offer through pathophysiological monitoring and specific pharmacological tests applied to the organoid cultivated from individual samples. **Methodology:** The research was done through a bibliographic search in the PubMed, SciELO and Google Scholar databases from keywords registered in DeCS/MeSH. **Results and Conclusion:** Understanding the development of normal and tumor tissues can favor tissue engineering and the development of drugs for specific treatment of a given disease and regenerative medicine. Although there are some limitations and restrictions of organoids in animal models, there is no doubt that long-term three-dimensional culture can provide opportunities to develop mechanisms of resolution of several endocrinological pathologies.

**Keywords:** Organoids; Endocrine Glands; Regenerative Medicine; Precision Medicine; Personalized Medicine.

Recebido em: 08-04-2023

Publicado em: 24-09-2024

## Autor correspondente

Daniel Mendes Filho

Endereço: Universidade Estadual de Goiás (UEG).

Av. Brasília N° 32, Setor Leste, CEP 76550-000 - Porangatu, GO - Brasil

Email: [mendesfilhod@alumni.usp.br](mailto:mendesfilhod@alumni.usp.br)

## 1. Introdução

A expressão “organoide” refere-se às células cultivadas em ambiente tridimensional (3D) in vitro, o qual permite a criação de minigrupos de células. Estas se organizam a fim de mimetizar um órgão in vivo – por isso, os organoides também são conhecidos como “miniórgãos”. Esses organoides são originados de células-tronco adultas (ASCs), embrionárias (ESCs) ou pluripotentes induzidas (iPSCs) através de uma organogênese que resulta em um órgão-específico. Para que ocorra o fenômeno de auto-organização, o

organoide necessita de ativação de vias de sinalização de componentes celulares intrínsecos e extrínsecos<sup>1</sup>. Do mesmo modo, é relevante entender o local onde o organoide irá se desenvolver, local este conhecido como nicho. Os nichos são microambientes especializados que exercem forte influência sobre a função da célula-tronco. Contudo, devido a interação célula-célula que o microambiente oferta, esses nichos são considerados ambientes críticos na definição da função da célula-tronco<sup>2</sup>.

Portanto, os organoides provindos de ASCs são preparados de tecidos adultos

ou pós-natais sob ação de diversos fatores de crescimento com intuito de reproduzir a homeostase do tecido normal. Por sua vez, os organoides de ESCs e iPSC possuem protocolos de diferenciação utilizando inibidores e fatores de crescimento que imitam os sinais da evolução no processo de organogênese e gastrulação, sendo útil para compreensão do desenvolvimento embrionário, principalmente na etapa inicial<sup>1</sup>. Atualmente, entende-se que os organoides são uma cultura 3D que reproduz o órgão ou tecido in vivo, que compartilham características fisiológicas do qual foram derivados que diferem dos modelos em cultura celular bidimensional (2D)<sup>3,4</sup>. A princípio, as células eram cultivadas apenas em cultura celular 2D. No entanto, as culturas 2D não oferecem as exigências necessárias para a organização e as relações celulares in vivo, além de apresentarem alterações nas vias de sinalização<sup>2</sup>. Alguns autores também relatam a dificuldade em isolar e cultivar células-tronco e manter a diversidade celular com estabilidade genética<sup>5,6</sup>. Historicamente, acredita-se que o termo “modelos de cultura tridimensionais” surgiu com Barcelos-Hoff et al. (1989) e Petersen et al. (1922). James Rheinwald e Howard Green em 1975 foram pioneiros no estudo dos organoides: esses pesquisadores demonstraram que a cocultura de ceratócitos humanos primários e fibroblasto de camundongo levou a formação de epitélio escamoso estratificado, que apresentava divisão celular contida na camada basal - sendo a primeira cultura a longo prazo cultivada a partir de células humanas<sup>7</sup>. A Figura 1 abaixo demonstra as diferenças entre os tipos de cultura, 2D e 3D.

A terminologia “organoide” era considerada uma extensão de culturas

3D, antes de 2005. Logo no início da aplicação da técnica organoide, empregou-se primariamente órgãos a partir de estruturas epiteliais, como: estômago, intestino delgado, pâncreas, mama e próstata<sup>8</sup>. Durante um estudo retirou-se fragmentos de tecido mamário de roedores e conseguiu-se reproduzir, em géis de colágeno, a ramificação semelhante a glândula mamária<sup>2</sup>. Outro estudo, com a mesma técnica do fragmento mamário, porém usando géis de laminina, conseguiu reproduzir a morfogênese do tecido mamário<sup>9</sup>. No entanto, nos últimos 10 anos, a tecnologia de organoides passou a envolver uma variedade de técnicas de cultura de células<sup>2</sup>. Vale destacar que, os organoides derivados de células-tronco adultas e de iPSC têm a capacidade intrínseca de auto-organização e formação de estruturas 3D, semelhantes a tecidos in vivo, o que os torna um sistema modelo promissor para triagem de drogas e modelagem de doenças<sup>7</sup>.

Muito conhecimento foi adquirido nas últimas décadas sobre as células tronco originadas de blastocisto (célula tronco-embrionária) e sua aplicação em meio de cultura 3D. Isso possibilitou um avanço considerável na medicina regenerativa e grandes perspectivas com a criação de órgãos sintéticos<sup>10</sup>. Assim, esses sistemas em 3D reproduzem a morfologia complexa de uma interação célula- célula e célula- matriz, além de características físicas e moleculares dos organoides que compartilham características fisiológicas, diferenciando-os dos modelos tradicionais em 2D, que normalmente não tem semelhança física, molecular ou fisiológica<sup>4</sup>. Em resumo, os organoides são versões dos órgãos em miniaturas 3D, que contém a maioria ou se não todas as funções e interações celulares presentes nos órgãos in vivo<sup>11</sup>.

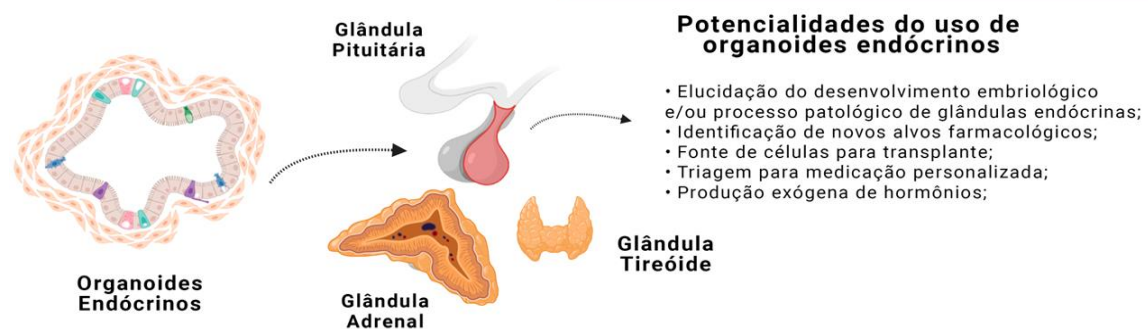


Figura 1 - Resumo gráfico.

Culturas tridimensionais de vários tecidos e/ou órgãos do sistema endócrino têm sido igualmente bem sucedidas. Organoides da glândula pituitária demonstraram robusta capacidade expansiva, diversidade celular e hormonal. Esses organoides, portanto, replicaram o fenótipo da “glândula mestra” incluindo seu processo de senescência<sup>12,13</sup>. Ademais, organoides de tireoide performam as funções tireoidianas, como síntese de tireoglobulinas, recaptção de iodo e produção/secreção hormonal - o que permitiu que tais organoides, ao serem transplantados in vivo, corrigissem um quadro de hipotireoidismo em modelo animal<sup>14,15</sup>. Do mesmo modo, culturas tridimensionais de glândulas adrenais<sup>16</sup>; testículos<sup>17,18</sup>; pâncreas<sup>19,20</sup> e ovários<sup>21,22</sup>, reproduzem a fisiologia e capacidade de secreção hormonal desses órgãos<sup>23</sup>.

Sendo assim, a tecnologia de cultura 3D aplicada ao sistema endócrino permite o estudo do desenvolvimento, diferenciação celular e secreção hormonal por esses organoides

endócrinos, além disso, possibilitam considerável avanço da medicina personalizada e regenerativa, uma vez que essas culturas podem ser feitas a partir de ASCs, iPSCs ou amostras neoplásicas de pacientes<sup>23-25</sup>. Logo, o acompanhamento fisiopatológico e testes farmacológicos específicos em quadros de neoplasia e disfunções endócrinas podem ser aplicados a organoides cultivados a partir dessas amostras individuais<sup>26-29</sup>. Em adição, os organoides podem ser futuras fontes para produção hormonal in vivo ou até mesmo para transplantes em caso de hipofunção glandular<sup>14,30-33</sup>.

## 2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivos: abordar as aplicações e limitações dos organoides 3D, identificando as perspectivas e a sua significância clínica e em pesquisas da área básica, bem como a evolução do uso de organoides de tecidos endócrinos; abordar o uso dessa biotecnologia nos testes farmacológicos,

na medicina regenerativa, na medicina personalizada e no tratamento de patologias endócrinas.

### 3. Metodologia

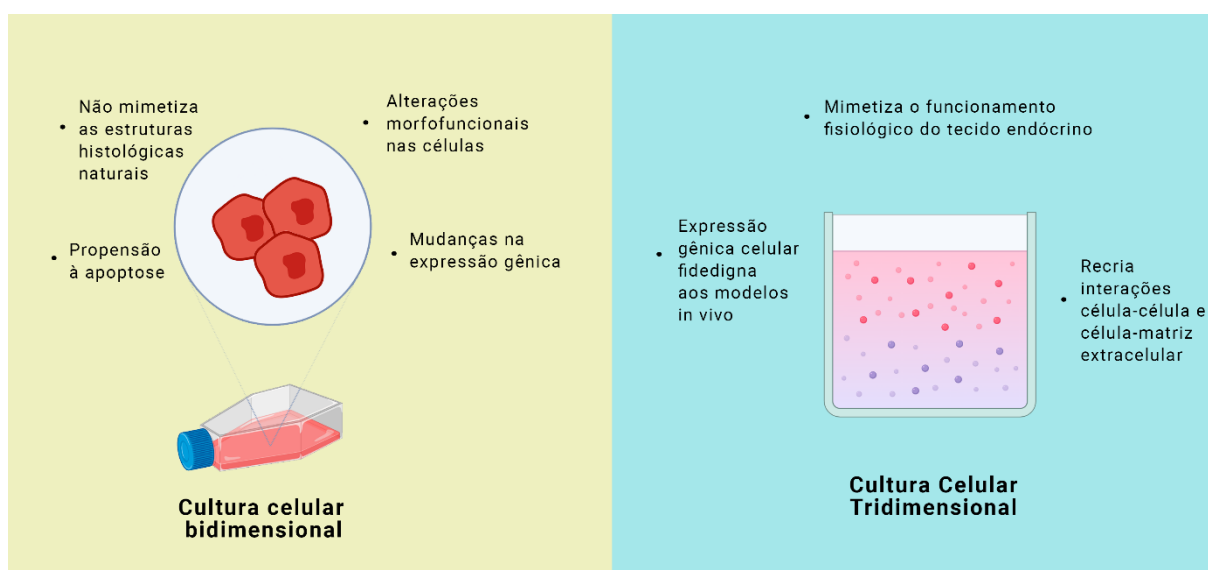
A revisão foi construída a partir de levantamento bibliográfico efetuado nas bases de dados PubMed, SciELO e Google Acadêmico utilizando-se palavras-chave registradas entre os Descritores em Ciências da Saúde (DeCS/MeSH)

disponíveis no site: <https://decs.bvsalud.org/>.

### 4. Resultados

#### Organoides endócrinos

Grande parte dos estudos abordaram as principais características dos organoides e o seu papel na clínica e em pesquisas da área básica. A seguir a FIGURA 2 representa as particularidades dos organoides endócrinos.



**Figura 2** - Características de dois tipos de culturas celulares. O painel esquerdo demonstra alguns aspectos da cultura 2D, enquanto à direita está sendo apresentada as particularidades da cultura 3D.

#### Glândula Pituitária

A formação do Sistema Nervoso Central inicia na terceira semana de vida intra-uterina (VIU) a partir do ectoderma<sup>34</sup>. A hipófise primitiva se forma a partir de duas porções, sendo: uma evaginação ectodérmica do estomodeu (cavidade oral primitiva) conhecida como bolsa de Rathke e uma extensão do diencéfalo, conhecida como infundíbulo. Quando o embrião tem cerca de seis semanas de VIU, a bolsa de Rathke cresce em sentido dorsal para o infundíbulo e perde sua conexão com a cavidade oral a partir do final do segundo mês, permanecendo em

íntimo contato com o infundíbulo. Logo, entre o décimo primeiro e o décimo sexto dia de VIU, a parede posterior dessa bolsa de Rathke forma a porção intermediária da hipófise e a parede anterior forma a parte anterior da hipófise (adenoi hipófise). Por sua vez, o infundíbulo dá origem a parte nervosa, conhecida como neuroi hipófise ou lobo posterior da hipófise<sup>34,35</sup>.

Existem diversos estudos sobre o mecanismo molecular de interação indutiva durante a formação da hipófise. Sinais como Lhx3+ que são progenitores pituitários, induzem o desenvolvimento

de várias linhagens específicas de células secretoras dos vários tipos de hormônios produzidos pela hipófise. Desse modo, uma linhagem que expressa o fator de transcrição Tbx19 diferencia-se em células corticotróficas (ou corticotrofos) produtoras de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Outra linhagem precursora que expressa o Pit1+, originará: células somatotróficas (somatotrofos) que produzem hormônio do crescimento (GH), hormônio prolactina (PRL) e linhagens das células produtoras de hormônio tireoestimulante (TSH). A terceira linhagem de células envolvem a guanina-adenina-timina-adenina 2 (GATA2), se diferencia em células produtoras de hormônio luteinizante (LH) de hormônio folículo estimulante (FSH)<sup>36</sup>.

A linhagem do Tbx19 antes da expressão do ACTH pode sofrer uma sinalização de entalhe que tem como finalidade a inibição do Tbx19. De modo contrário, o efeito de N- [N- (3,5-difluorofenacetil)-l-alanil] -S - fenilglicina t -butil éster como um inibidor de Notch (induzem neurônios precursores hipotalâmicos), aumenta a expressão de Tbx19 no progenitor Lhx3 (+) e conseqüentemente aumentou o número de ACTH<sup>36</sup>. Sabe-se que a linhagem NOTCH é ramificada em: NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 e NOTCH4, que exerce ação sobre os receptores transmembranas. Logo, dependendo do tipo de receptor acometido o mesmo se diferenciará em uma variedade de tecidos. Vale destacar, que o gene NOTCH, apresenta instrumentos para se diferenciar em qualquer tecido do organismo humano, além de controlar processos apoptóticos. Logo, a ativação da resposta NOTCH é controlada por um complexo pré-senilina- $\gamma$ -secretase. O N- [N- (3,5-difluorofenacetil)-l-alanil] -S - fenilglicina t -butil éster tem como função bloquear o complexo presenilina- $\gamma$ -

secretase. Assim, bloqueando a função do NOTCH<sup>37,38</sup>. De outro modo, antes da expressão da linhagem do Pit1, ocorre a sinalização com Wnt (promove a indução das placas neurais ventrais) que conseqüentemente promove a expressão do Pit1. Nesse achado o tratamento com agonista Wnt (aumenta a expressão do Pit1), resultando em uma maior diferenciação celular de GH, PRL e FSH, conseqüentemente mutações no Pit1 leva a deficiência de GH, PRL e FSH<sup>36</sup>.

O hipopituitarismo é uma das disfunções endócrinas mais graves, podendo causar complicações significativas, como por exemplo, a crise adrenal devido a insuficiência de glicocorticoide. O hipopituitarismo é dividido em desordens congênitas e adquiridas. As desordens adquiridas necessitam de suplementação hormonal exógena que controla a secreção de ACTH por feedback negativo. Assim, a terapia com hormônios exógenos é o único tratamento eficaz para o hipopituitarismo. No entanto, o hormônio exógeno (glicocorticoide) não pode mimetizar a secreção de hormônios endógenos, pois não controla a homeostase, ou seja, não apresentam resposta fisiológicas ao estresse físico, emocional ou psicológico do paciente<sup>36</sup>. Hahner et al. (2015) observaram que mesmo pacientes bem orientados (utilizando glicocorticoide) quanto ao seu quadro de insuficiência adrenal crônica, tiveram uma alta incidência (6%) de óbitos associados à crise adrenal, apresentando uma limitação farmacológica (hormônio exógeno) da não resposta fisiológica<sup>39</sup>. Assim, com os achados de linhagens celulares sugerem uma maior capacidade das células derivadas dos progenitores pituitários Lhx3, na bolsa de Rathke, poderem se desenvolver em múltiplas linhagens endócrinas in vivo ou in vitro.

Logo, a recuperação total da função hipofisária (incluindo sua capacidade de secreção de hormônios endógenos) é um fator limitante para aplicação clínica, porque é improvável que a glândula pituitária se regenere completamente. Como algumas disfunções hipofisárias, por exemplo, Insuficiência Adrenal Crônica e Acromegalia, não podem ser tratadas apenas por medicamentos, acredita-se que a medicina regenerativa possa ser uma nova forma de intervenção terapêutica<sup>39-41</sup>. Apesar de a medicina regenerativa para distúrbios hipotalâmicos e hipofisários ser complexa e carecer de mais pesquisas, é imprescindível conhecer as linhagens celulares de diferenciação pituitária pois, esse conhecimento e a tecnologia decorrente dele permitirá a geração de tecidos hipofisários *in vitro* e, portanto, futuros transplantes de organoides endócrinos<sup>36</sup>.

Contudo, para mimetizar a embriologia da glândula pituitária em uma cultura tridimensional, é necessário desenvolver um organoide do cérebro com a formação de todas as vesículas encefálicas, a partir de células iPSC. No entanto, conseguiu-se gerar organoides de partes do cérebro, como o prosencéfalo, mesencéfalo, cerebelo, córtex e hipocampo. Assim, pode-se recapitular e entender a fisiopatologia das doenças da glândula pituitária<sup>42</sup>. Para induzir a formação do hipotálamo e consequentemente da glândula pituitária, os organoides hipotalâmicos derivados de iPSC são submetidos a partir de uma linhagem neuroectodérmica em um sistema de cultura 3D. Posteriormente, a diferenciação das placas neurais é induzida por um tratamento adicional, sendo este realizado com Wnt3A, SHH (sonic hedgehog), and purmorphamine. Após 18 dias, as células apresentaram marcadores

consistentes e específicos do desenvolvimento do hipotálamo, como Nestin, Sox2 (sex-determining region Y-box 2), FoxA2, Nkx2.1 and Rax1 (Rax family small GTPase 1). Além disso, 40 dias após o marcador de neurônio hipotalâmico Otp (orthopedia homeobox) foi expresso por um subconjunto de células. Com essa metodologia, vários organoides cerebrais são desenvolvidos seguindo uma organogênese semelhante à do cérebro humano<sup>43</sup>.

Entretanto, esses organoides possuem limitações como a falta de um sistema circulatório, um microambiente biologicamente relevante e um sistema imunológico. Essas limitações restringem o potencial dos organoides como fontes de células-tronco para transplantes. Um estudo realizou a recapitulação de um ambiente semelhante *in vivo* e geraram um organoide do cérebro humano vascularizado *in vivo*, enxertando o organoide no córtex cerebral de um camundongo. O córtex apresentou diferenciação e maturação gradual, exibindo uma rede vascular<sup>37</sup>. Outro estudo realizado em 2019, por sua vez, desenvolveu organoides corticais vascularizados a partir de ESCs. Esses organoides foram projetados para expressar o fator de transcrição variante 2 (ETV2), formando assim estruturas semelhantes a vasos sanguíneos. Comparados aos organoides de controle que não expressam ETV2, os organoides corticais que expressam ETV2 exibiram redes de vasos mais complexas, de tamanho maior e menos morte celular. No geral, este modelo demonstra várias características únicas de maturação neuronal e desenvolvimento cerebral<sup>44</sup>.

### Glândula suprarrenal

As glândulas adrenais provêm de dois folhetos embrionários, o mesoderma que origina o córtex adrenal, e o ectoderma

que dá origem à medula adrenal. Na quinta semana de VIU, as células mesoteliais começam a se proliferar e penetram no mesênquima subjacente. Nesse momento, as células se diferenciam em grandes células acidófilas que formarão o córtex fetal, ou córtex primitivo, da glândula suprarrenal<sup>34</sup>. Esse córtex a princípio produz desidroepiandrosterona que é transformado em estrógeno pela placenta e confere um fator protetor para a placenta e gestação. Após o nascimento, o córtex definitivo e o de transição começam a se diferenciar em três zonas, conhecidas como: zona glomerulosa (onde são produzidos hormônios mineralocorticoides como a aldosterona), a zona fasciculada (onde são produzidos os hormônios glicocorticoides como o cortisol) e a zona reticular (produtora de hormônios andrógenos)<sup>34,45</sup>.

Sinalizadores moleculares descobertos em um estudo realizado com ratos, indicaram a presença de progenitores como, SF-1 e DAX1 na zona definitiva. O mecanismo repressivo ocorreu quando as células expressaram altos níveis de SF-1 e DAX1, mantendo um estado indiferenciado. No entanto, devido a um equilíbrio entre a expressão SF-1 e DAX1, ocorreu uma organização estrutural da glândula suprarrenal definitiva semelhante à identificada na vida adulta<sup>46,47</sup>.

Com a formação do córtex da adrenal, entre 8 e 9 semanas, as células da crista neural invadem a região medial da glândula e se organizam em cordões e em grupos para originar a medula da glândula. A migração dessas células e os sinais para suas diferenciações, provém da aorta dorsal e de proteínas recombinantes humanas. Quando ocorre a diferenciação, as células no interior da

glândula mudam para uma coloração amarela-amarronzada conhecidas como células cromafins pois se coram com sais de cromo. A expressão dos marcadores funcionais como CHGA e TH é utilizada para confirmar a presença de medula primitiva originada das células da crista neural<sup>16</sup>.

Poli et al (2019) avaliaram a presença de 2 marcadores do córtex da adrenal, sendo o fator de transcrição GATA4 e IGF2. Para exemplificar melhor as características corticais, esse trabalho identificou diferentes sinalizadores como, CCN3 e CYP17A1 em diferentes idades semanais (9ª semanas) de VIU. Assim como, identificou-se os genes DAX1 e NOTCH1 que contribuem para os comandos característicos das células indiferenciadas encontradas em maior quantidade entre a 9ª e 11ª, semana de VIU, diminuindo energeticamente a entre a 11ª e 12ª, semanas de VIU, facilitando a diferenciação celular<sup>16</sup>.

A partir de 12ª semana de VIU, Poli et al (2019) identificaram uma deficiência de ICAM-1 e VCAM-1, menos evidentemente. Os organoides adrenais (AOs) formados in vitro foram analisados em diferentes idades gestacionais em todos os trimestres, e não foi evidenciada nenhuma alteração morfológica significativa. Os AOs também foram positivos para demonstrar marcadores neuroendócrinos da glândula, assim como a positividade de CHGA para confirmar atividade neuroendócrina. Marcadores adrenais como, ICF2, IGF1R e SF-1 são expressos em AOs em menor quantidade do que no indivíduo normal. A expressão DAX-1, CCN3 e NOTCH1 mostra o conjunto indiferenciado de progenitores corticais. Vale destacar, que o funcionamento esteroideogênico nos AOs, identificado por análise do exame Western blot, a constatação de enzimas



STAR e CYP17A1. Mais especificamente o gene chave da síntese de glicocorticoide é o HSD3B2 presente entre a 9ª e a 11ª semana de VIU com um pico na 9ª semana<sup>16</sup>.

Durante a embriogênese, os genes de NOV/CCN3 nas adrenais ficam restritos à zona definitiva externa subcapsular (não possui SF1 e apresenta altos níveis de DAX1), no qual permanece as células progenitoras indiferenciadas<sup>48</sup>. Com o avançar das semanas de VIU (aumentando a expressão do gene SF1), essas células iniciam a proliferação e se diferenciam em células da zona definitiva e zona fetal<sup>48-50</sup>. Para manter um estado de indiferenciação, verifica-se os genes DAX1 e NOTCH1. Logo, o CCN3 é regulado negativamente nas glândulas adrenais com o avançar das semanas gestacionais. Vale destacar, que o NOV/CCN3 são fatores pró apoptóticos e sua expressão está vinculado a um melhor prognóstico para doenças tumorais adrenocorticais<sup>51</sup>. Substancialmente, o gene CCN3 é suprimido pela expressão do SF1 de acordo com a idade gestacional<sup>52</sup>. Logo, o SF1 e o GATA4 incorporado ao IGF2 são regulados e coordenados positivamente para organizar o processo de crescimento e diferenciação de acordo com a idade gestacional<sup>16</sup>.

O gene HSD3B2 responsável pela produção do glicocorticoide, com o pico na 9ª semana, pode exercer um feedback negativo sobre a hipófise, especificamente sob o ACTH, podendo bloquear o sexo independente da produção dos andrógenos produzidos para desenvolvimento dos órgãos genitais externos. Estudos *in vitro* evidenciaram um pico na produção de cortisol na 9ª semana, que se mantém até a 11ª semana, e apresenta um declínio entre a 11ª e 12ª semanas de VIU, no qual, essa hipótese é apoiada com a

diminuição da expressão do gene MC2R, estando em desacordo com o tecido *in vivo*<sup>53</sup>.

O cultivo de organoides adrenais permite avaliar a composição, distribuição espacial e a organização adrenal fetal. Contudo, entender o crescimento adrenal é um processo complexo, caracterizado não apenas por um aumento dramático do volume do órgão entre 10 e 12 semanas, mas também por um equilíbrio entre proliferação, diferenciação e expansão dos compartimentos progenitores<sup>16</sup>.

### Glândula tireoide

A formação da glândula tireoide, inicia no assoalho da faringe no ponto indicado pelo forame cego da língua. Posteriormente, a tireoide desce para frente do intestino faríngeo e com essa migração a tireoide permanece conectada pela língua por um canal estreito conhecido como ducto tireoglosso, que com o desenvolvimento desse ducto desaparece<sup>34</sup>.

Para constituir um modelo de organoide humano, primeiro foi estabelecido um sistema de cultura para os organoides tireoides de fetos humanos (hFTOs) *in vitro*. Para obter um sistema ideal de cultivo dos organoides de tireoide, Liang et al (2022) utilizaram meios de cultura modificados (matrizes) para imitar as condições semelhantes aplicadas em organoides epiteliais humanos, são elas: R-Spondin1, EGF, Noggin, FGF10 e A83-01. Em seguida foram retirados cada um dos elementos do nicho para testar o seu valor. Assim, percebeu-se que o R-Spondin1, EGF, FGF10 e A83-01, são necessários para o desenvolvimento primário do organoide de tireoide. Já em relação ao Noggin, a sua retirada não provocou impacto significativo no

crescimento primário, porém, diminuiu a vida útil do organoide<sup>43</sup>.

A estruturação folicular é tida como exigência para síntese do hormônio tireoidiano. Pesquisas que utilizaram a técnica de imunofluorescência, verificaram que o lúmen desenvolvido por células foliculares em monocamada com ZO-1 com abundante TG produzido intracelularmente foi armazenado para síntese do coloide. Dois fatores-chaves de transcrição da tireoide PAX8 e NKX2-1 são expostos restritivamente em células foliculares tireoidianas (TFCs), conforme demonstrado pela imunofluorescência<sup>54</sup>. Marcadores moleculares de mRNA de tireócitos como TG, TSHR e TPO foram encontrados em hFTOs. Vale destacar que, os hFTOs apresentam capacidade de responder à estimulação de TSH para produzir tiroxina (T4). Assim sendo, os hFTOs se assemelham às características de células foliculares. Para identificar o aparecimento do hormônio tiroxina, mediu-se o nível de T4 no sobrenadante. Após tratamento por 4 dias com Forscolina, um diterpeno do extrato da raiz de *Coleus forskohlii*, a secreção de T4 foi detectada apresentando um aumento significativo em comparação com os não tratados. Por outro lado, o agonista de cAMP forscolina é considerado uma estimulação opcional e mais eficiente para esse processo devido a sua ação secretora de hormônios T4, ser significativamente maior. A sinalização com AMPc é o principal mediador para multiplicação e diferenciação dos tireócitos estimulados por TSH em adultos nos organoides. Outros sinais também estão envolvidos na maturação dos tireócitos como o Wnt e mTOR. No entanto, a sinalização de AMPc ainda precisa ser explorada, para isso, adicionaram forscolina que é um agonista da via AMPc para o meio GF de cultura hFTO<sup>43</sup>.

## Limitações e perspectivas

Algumas limitações foram encontradas com o avanço dos organoides. Dentre elas podemos citar como as principais: a capacidade de auto-organização para produzir os organoides; reprodução dos nichos adequados para crescimento e diferenciação dos organoides; e a oferta da nutrição adequada ou estímulo do crescimento de novos vasos sanguíneos para o que miniórgão possa ter uma vida útil mais longa. Ademais, é necessário aprofundar o conhecimento sobre a complexidade morfofisiológica dos miniórgãos e superar questões bioéticas quanto a seu uso<sup>11,54</sup>. Contudo, novas drogas podem ser testadas previamente nesses organoides antes do tratamento clínico do paciente, identificando a toxicidade de cada substância testada<sup>55</sup>. Além disso, através dos organoides pode-se estudar a evolução dos tumores e compreender com exatidão o papel biológico das células-tronco cancerígenas e o mecanismo de metástase tumoral<sup>8</sup>.

## 5. Conclusão

Os organoides são órgãos criados in vitro derivados do tecido primário ou diferenciados a partir de células-tronco pluripotentes de ESCs ou iPSCs que simulam a organogênese. As matrizes dos organoides composta por colágeno IV, laminina e outros componentes específicos, como nas matrizes de hFTOs, fornecem um ambiente complexo e adequado para o desenvolvimento e crescimento celular. Assim, é primordial entender as propriedades físicas dos biomateriais das matrizes para entender o processo de interação célula/célula e célula/matriz dos biomateriais utilizados nos organoides. Visto que, uma compreensão mais profunda do

desenvolvimento de tecidos normais e tumorais pode favorecer tanto a engenharia de tecidos, como o desenvolvimento de drogas para um tratamento específico de uma determinada doença e a medicina regenerativa.

Entretanto, embora a aplicação de organoides para disfunções endócrinas tenham grande potencial terapêutico, é relevante discutir questões de biossegurança e bioética antes mesmo de ampliar os estudos clínicos. Ainda existem várias restrições para o uso dessa tecnologia, além disso, também tem sido discutido sobre a utilização dos embriões resultantes de fertilização *in vitro* para obtenção de novas linhagens celulares. Logo, os organoides derivados de células tronco adultas são uma melhor opção a fim de se evitar os problemas éticos relacionados ao uso de células embrionárias humanas.

Por fim, apesar de algumas limitações e restrições dos organoides em modelos de animais, não há dúvida de que a cultura 3D a longo prazo possa fornecer oportunidades para desenvolver mecanismos de resolução de diversas patologias endocrinológicas. Os organoides criados, estão sendo utilizados para testagem de medicamentos, avaliando sua toxicidade em diferentes doenças endocrinológicas congênitas e ou adquiridas.

## 6. Declaração de conflito de interesses

Todos os autores declaram que não há conflito de interesses.

## 7. Referências

1. Corrà C, Novellademunt L, Li VSW. A brief history of organoids. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2020;319(1).
2. Simian M, Bissell MJ. Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. *J Cell Biol*. 2017;216(1).
3. Schutgens F, Clevers H. Human Organoids: Tools for Understanding Biology and Treating Diseases. Vol. 15, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2020.
4. Hynds RE, Giangreco A. Concise review: The relevance of human stem cell-derived organoid models for epithelial translational medicine. Vol. 31, *Stem Cells*. 2013.
5. Neal JT, Kuo CJ. Organoids as Models for Neoplastic Transformation. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2016;11.
6. Rozich NS, Blair AB, Burkhart RA. Organoids: A model for precision medicine. In: *Precision Medicine for Investigators, Practitioners and Providers*. 2019.
7. Hofer M, Lutolf MP. Engineering organoids. *Nat Rev Mater [Internet]*. 2021;6(5):402–20. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41578-021-00279-y>
8. Yang L, Liu B, Chen H, Gao R, Huang K, Guo Q, et al. Progress in the application of organoids to breast cancer research. Vol. 24, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2020.
9. Fata JE, Mori H, Ewald AJ, Zhang H, Yao E, Werb Z, et al. The MAPK1-2 pathway integrates distinct and antagonistic signals from TGF $\alpha$  and FGF7 in morphogenesis of mouse mammary epithelium. *Dev Biol*. 2007;306(1).
10. Costa MC da, Barros APDN de, Louback RDA, Rossi MID. Modelos

- tridimensionais de cultura de células: aproximando o in vitro do in vivo. *Vigilância Sanitária em Debate*. 2018;6(1).
11. Ye S, Boeter JWB, Mihajlovic M, van Steenbeek FG, van Wolferen ME, Oosterhoff LA, et al. A Chemically Defined Hydrogel for Human Liver Organoid Culture. *Adv Funct Mater*. 2020;30(48).
  12. Cox B, Laporte E, Vennekens A, Kobayashi H, Nys C, Van Zundert I, et al. Organoids from pituitary as a novel research model toward pituitary stem cell exploration. *J Endocrinol*. 2019;240(2).
  13. J Vankelecom HE, Laporte E, Hermans F, Nys C, Vennekens A. Novel Pituitary Organoid Model as Powerful Tool to Unravel Pituitary Stem Cell Biology Across Ages and Disease. *J Endocr Soc*. 2021;5(Supplement\_1).
  14. Ogundipe VML, Groen AH, Hosper N, Nagle PWK, Hess J, Faber H, et al. Generation and Differentiation of Adult Tissue-Derived Human Thyroid Organoids. *Stem Cell Reports*. 2021;16(4).
  15. Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RGJ, Van Es JH, Van Den Brink S, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*. 2011;141(5).
  16. Poli G, Sarchielli E, Guasti D, Benvenuti S, Ballerini L, Mazzanti B, et al. Human fetal adrenal cells retain age-related stem- And endocrine-differentiation potential in culture. *FASEB J*. 2019;33(2).
  17. Alves-Lopes JP, Söder O, Stukenborg JB. Testicular organoid generation by a novel in vitro three-layer gradient system. *Biomaterials*. 2017;130.
  18. Sakib S, Voigt A, Goldsmith T, Dobrinski I. Three-dimensional testicular organoids as novel in vitro models of testicular biology and toxicology. Vol. 5, *Environmental Epigenetics*. 2019.
  19. Balak JRA, Juksar J, Carlotti F, Lo Nigro A, de Koning EJP. Organoids from the Human Fetal and Adult Pancreas. Vol. 19, *Current Diabetes Reports*. 2019.
  20. Broutier L, Andersson-Rolf A, Hindley CJ, Boj SF, Clevers H, Koo BK, et al. Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation. *Nat Protoc*. 2016;11(9).
  21. Heidari-Khoei H, Esfandiari F, Hajari MA, Ghorbaninejad Z, Piryaei A, Piryaei A, et al. Organoid technology in female reproductive biomedicine. Vol. 18, *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2020.
  22. Heremans R, Jan Z, Timmerman D, Vankelecom H. Organoids of the Female Reproductive Tract: Innovative Tools to Study Desired to Unwelcome Processes. Vol. 9, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021.
  23. Azar J, Bahmad HF, Daher D, Moubarak MM, Hadadeh O, Monzer A, et al. The use of stem cell-derived organoids in disease modeling: An update. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. 2021.
  24. Fatehullah A, Hui Tan S, Barker N. SERIES ON STEM CELL BIOLOGY Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nat Publ Gr*. 2016;18(3).

25. Krokker L, Szabó B, Németh K, Tóháti R, Sarkadi B, Mészáros K, et al. Three Dimensional Cell Culturing for Modeling Adrenal and Pituitary Tumors. *Pathol Oncol Res.* 2021;27.
26. Nanki Y, Chiyoda T, Hirasawa A, Ookubo A, Itoh M, Ueno M, et al. Patient-derived ovarian cancer organoids capture the genomic profiles of primary tumours applicable for drug sensitivity and resistance testing. *Sci Rep.* 2020;10(1).
27. Pernik MN, Bird CE, Traylor JI, Shi DD, Richardson TE, McBrayer SK, et al. Patient-derived cancer organoids for precision oncology treatment. *J Pers Med.* 2021;11(5).
28. Takahashi T. Organoids for drug discovery and personalized medicine. Vol. 59, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 2019.
29. Verjans ET, Doijzen J, Luyten W, Landuyt B, Schoofs L. Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: Worth the effort? Vol. 233, *Journal of Cellular Physiology.* 2018.
30. Chen X, Sun J, Li X. Adipose derived stem cells to construct parathyroid organoid for hypoparathyroidism. *Med Hypotheses.* 2021;149.
31. Dayem AA, Lee S Bin, Kim K, Lim KM, Jeon T II, Cho SG. Recent advances in organoid culture for insulin production and diabetes therapy: Methods and challenges. Vol. 52, *BMB Reports.* 2019.
32. Lebreton F, Lavallard V, Bellofatto K, Bonnet R, Wassmer CH, Perez L, et al. Insulin-producing organoids engineered from islet and amniotic epithelial cells to treat diabetes. *Nat Commun.* 2019;10(1).
33. Sinagoga KL, McCauley HA, Muñera JO, Reynolds NA, Enriquez JR, Watson C, et al. Deriving functional human enteroendocrine cells from pluripotent stem cells. *Dev.* 2018;145(19).
34. Keith L. Moore, Mark G. Torchia TVNP. *Developing Human- Clinically Oriented Embryolog.* Vol. 10th Editi, The developing human. 2016.
35. Rizzoti K, Lovell-Badge R. Early development of the pituitary gland: Induction and shaping of Rathke's pouch. Vol. 6, *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders.* 2005.
36. Ozaki H, Suga H, Arima H. Hypothalamic–pituitary organoid generation through the recapitulation of organogenesis. Vol. 63, *Development Growth and Differentiation.* 2021.
37. Mansour AA, Gonçalves JT, Bloyd CW, Li H, Fernandes S, Quang D, et al. An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids. *Nat Biotechnol.* 2018;36(5).
38. Crawford TQ, Roelink H. The Notch response inhibitor DAPT enhances neuronal differentiation in embryonic stem cell-derived embryoid bodies independently of Sonic Hedgehog signaling. *Dev Dyn.* 2007;236(3).
39. Hahner S, Spinnler C, Fassnacht M, Burger-Stritt S, Lang K, Milovanovic D, et al. High incidence of adrenal crisis in educated patients with chronic adrenal insufficiency: A prospective study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(2).
40. Arima H, Wakabayashi T, Nagatani T, Fujii M, Hirakawa A, Murase T, et al. Adipsia increases risk of death in patients with central diabetes insipidus. *Endocr J.* 2014;61(2).

41. Sherlock M, Reulen RC, Alonso AA, Ayuk J, Clayton RN, Sheppard MC, et al. ACTH deficiency, higher doses of hydrocortisone replacement, and radiotherapy are independent predictors of mortality in patients with acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(11).
42. Chang Y, Kim J, Park H, Choi H, Kim J. Modelling neurodegenerative diseases with 3D brain organoids. *Biol Rev.* 2020;95(5).
43. Liang J, Qian J, Yang L, Chen X, Wang X, Lin X, et al. Modeling Human Thyroid Development by Fetal Tissue-Derived Organoid Culture. *Adv Sci.* 2022;9(9).
44. Cakir B, Xiang Y, Tanaka Y, Kural MH, Parent M, Kang YJ, et al. Engineering of human brain organoids with a functional vascular-like system. *Nat Methods.* 2019;16(11).
45. Sucheston ME, Cannon MS. Development of zonular patterns in the human adrenal gland. *J Morphol.* 1968;126(4).
46. Xing Y, Morohashi KI, Ingraham HA, Hammer GD. Timing of adrenal regression controlled by synergistic interaction between Sfl SUMOylation and Dax1. *Dev.* 2017;144(20).
47. Ito M, Yu R, Jameson JL. DAX-1 Inhibits SF-1-Mediated Transactivation via a Carboxy-Terminal Domain That Is Deleted in Adrenal Hypoplasia Congenita. *Mol Cell Biol.* 1997;17(3):1476–83.
48. Lerario AM, Finco I, LaPensee C, Hammer GD. Molecular mechanisms of stem/progenitor cell maintenance in the adrenal cortex. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017;8(MAR).
49. Ratcliffe J, Nakanishi M, Jaffe RB. Identification of definitive and fetal zone markers in the human fetal adrenal gland reveals putative developmental genes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(7).
50. Spencer SJ, Mesiano S, Lee JY, Jaffe RB. Proliferation and Apoptosis in the Human Adrenal Cortex during the Fetal and Perinatal Periods: Implications for Growth and Remodeling 1. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(3).
51. Doghman M, Arhatte M, Thibout H, Rodrigues G, De Moura J, Grosso S, et al. Nephroblastoma overexpressed/cysteine-rich protein 61/connective tissue growth factor/nephroblastoma overexpressed gene-3 (NOV/CCN3), a selective adrenocortical cell proapoptotic factor, is down-regulated in childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(8).
52. Parviainen H, Kiiveri S, Bielinska M, Rahman N, Huhtaniemi IT, Wilson DB, et al. GATA transcription factors in adrenal development and tumors. Vols. 265–266, *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2007.
53. Goto M, Hanley KP, Marcos J, Wood PJ, Wright S, Postle AD, et al. In humans, early cortisol biosynthesis provides a mechanism to safeguard female sexual development. *J Clin Invest.* 2006;116(4).
54. Matsumoto R, Takahashi Y. Human pituitary development and application of iPSCs for pituitary disease. *Cell Mol Life Sci [Internet].* 2021;78(5):2069–79. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03692-8>
55. de Witte CJ, Espejo Valle-Inclan J, Hami N, Löhmußaar K, Kopper O,

Vreuls CPH, et al. Patient-Derived Ovarian Cancer Organoids Mimic Clinical Response and Exhibit Heterogeneous Inter- and Inpatient Drug Responses. Cell Rep. 2020;31(11).