

# Esclerose lateral amiotrófica e o tratamento com células-tronco\*

## *Amyotrophic lateral sclerosis and stem cells treatment*

Sabrina Rodrigues Lima<sup>1</sup>, Karina Braga Gomes<sup>2</sup>

\*Recebido da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG.

### RESUMO

**JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS:** A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa que afeta os neurônios motores inferiores e superiores e que, frequentemente, encontra-se associada às alterações bulbares e no trato piramidal. Apesar de existirem algumas variações nas manifestações clínicas, no padrão de progressão da doença e na expectativa de vida após o início dos sintomas, o diagnóstico é realizado através de exame clínico e, muitas vezes, é dado por exclusão. Para o tratamento da ELA existe, até o momento, apenas um medicamento aprovado pelo FDA, o riluzol, sendo que outros fármacos são frequentemente associados à terapia no intuito de amenizar os sintomas e melhorar a qualidade de vida do paciente. O objetivo deste estudo foi atualizar os conhecimentos referentes à doença, bem como discutir os protocolos de tratamento com células-tronco mais recentes para ELA.

**CONTEÚDO:** No sentido de se procurar um tratamento efetivo para a ELA, vários pesquisadores vêm utilizando células-tronco devido ao potencial destas de se diferenciarem em diferentes tipos de células nervosas *in vivo* e *in vitro* e que quando transplantadas no cérebro, são capazes de sobreviver, migrar e integrar, apresentando uma funcionalidade ativa. Assim, foi realizado um levantamento dos principais estudos que avaliaram o uso das células-tronco como tratamento da ELA.

**CONCLUSÃO:** Enquanto todas as indagações sobre o uso das células-tronco não forem elucidadas; e não forem propostas terapias que garantam a sua eficácia e segurança para os pacientes,

novas pesquisas ainda são necessárias a fim de utilizar a terapia celular como alternativa de tratamento da ELA.

**Descritores:** Células-tronco, Esclerose lateral amiotrófica, Tratamento.

### SUMMARY

**BACKGROUND AND OBJECTIVES:** Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease which affects upper and lower motor neurons and is frequently associated to alterations in bulbar and pyramidal tract. Although there are variations on clinical manifestations, on disease progression and life expectation after the first symptoms, diagnosis is usually made by clinical evaluation and exclusion. At the moment there is only one medicament approved by FDA, riluzole, which is frequently associated with others to decrease symptoms and improve patient's life quality. The present revision has the objective to bring up to date the knowledge about the ALS, as well discuss the more recent stem cells protocols for ALS treatment.

**CONTENTS:** As a tentative to find an effective treatment for ALS many researches are using stem cells due their capacities to differentiate in many neuronal cell types *in vivo* and *in vitro* and when transplanted into the brain, these cells are capable of survive, migrate and integrate showing a functional activity. The present work shows the main studies that had evaluated the use of the stem cells as treatment of ALS.

**CONCLUSION:** While all the investigations about the stem cells use aren't elucidated and there aren't proposals therapies that guarantee the effectiveness and patient's security, new research are still necessary in order to use the cellular therapy as alternative of treatment of ELA.

**Keywords:** Amyotrophic lateral sclerosis, Stem cells, Treatment.

### INTRODUÇÃO

A esclerose lateral amiotrófica (ELA), também conhecida como doença de Charcot ou doença de Lou Gehring, e pertencente ao grupo das doenças do neurônio motor, é caracterizada pela progressiva degeneração dos neurônios motor superior (NMS) e inferior (NMI), geralmente associada ao envolvimento bulbar e do trato piramidal. Os neurônios motores são responsáveis pelo controle e comunicação entre o sistema nervoso e os músculos voluntários, ao transmitirem mensagens dos neurônios localizados no cérebro (NMS) para os neurônios na medula espinhal (NMI), e destes aos músculos do controle voluntário. Assim, os sinais clínicos da ELA são evidenciados nos membros inferiores, superiores e, posteriormente, nas demais regiões do tórax e pescoço<sup>1,2</sup>.

1. Farmacêutica Industrial do Centro Universitário Newton Paiva; Especialista em Biotecnologia da Faculdade de Saúde Ibituruna; Pós-Graduada da Faculdade de Saúde Ibituruna. Montes Claros, MG, Brasil

2. Farmacêutica-Bioquímica da Universidade Federal de Minas Gerais; Doutorado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Minas Gerais; Professora da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG, Brasil

Apresentado em 04 de março de 2010

Aceito para publicação em 08 de setembro de 2010

Endereço para correspondência:

Dra. Karina Braga Gomes

Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais

Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha

31270-901 Belo Horizonte, MG.

Fone/Fax: 55 (31) 3409-6895

E-mail: karina@coltec.ufmg.br

Os sinais clínicos percebidos na ELA vão desde o envolvimento dos NMI (atrofia com posterior fraqueza muscular, hiporreflexia, câimbras musculares e fasciculações), ao envolvimento dos NMS (espasticidade, hiperreflexia, clônus e sinais de Hoffmann ou Babinski), e dos sinais bulbares (fraqueza na musculatura facial e do pescoço, disartria, disfagia e sialorréia). Estes sintomas culminam com o comprometimento do diafragma, acarretando dificuldade respiratória com conseqüente dependência crônica da ventilação, ou morte por parada respiratória. Os reflexos abdominais, o controle de esfíncter, o intelecto e os sentidos, na grande maioria dos casos, estão preservados<sup>1,3</sup>.

Segundo Andrews<sup>4</sup>, apesar das manifestações clínicas, do padrão de progressão da doença e da expectativa de vida após o diagnóstico variar de pessoa para pessoa, aproximadamente 50% dos pacientes sobrevivem por pouco mais de dois anos após o início dos sintomas e menos de 10% sobrevivem mais de 10 anos.

O diagnóstico da ELA é realizado através de exame clínico suportado por testes neurofisiológicos, não existindo testes laboratoriais de definição, o que acarreta muitas vezes em um diagnóstico por exclusão. O critério El Escorial, desenvolvido no final da década de 1980 e atualizado na década seguinte, é amplamente utilizado, apesar de ter suas limitações e de permitir que alguns pacientes venham a falecer da doença sem se qualificar nos critérios<sup>5</sup>.

A classificação de certeza do diagnóstico pelo El Escorial é dividida em: ELA típica (sinais de acometimento de NMI e NMS em três ou mais regiões: bulbar, cervical, torácica ou lombossacral); ELA provável (sinais de acometimento de NMI e NMS em duas regiões); ELA provável com evidências neurofisiológicas (NMI e NMS em uma região; ou NMS em uma região ou mais regiões com evidência eletromiográfica de deservação em dois ou mais membros); ELA possível (sinais de acometimento de NMI e NMS em uma região); ELA suspeita (sinais de acometimento de somente NMI em uma ou mais regiões; ou somente NMS em uma ou mais regiões)<sup>4,5</sup>.

Com relação à epidemiologia da doença, a ELA apresenta variações na Ásia, na Europa e nas Américas do Norte e do Sul. Segundo Palermo, Lima e Alvarenga<sup>6</sup>, a taxa de incidência varia de 0,3:100.000 habitantes/ano na China até 3,9:100.000/ano na Ilha de Guam e na península de Kii no Japão. Já a prevalência é de aproximadamente 2,5:100.000 habitantes para os países analisados, exceto no sul do Japão (penínsulas de Kii e Honshu) que apresenta uma média de 150:100.000 habitantes. A maior prevalência encontra-se entre os homens. Os sintomas geralmente iniciam-se com fraqueza muscular assimétrica e a idade média do início dos sintomas varia de 52 anos no Brasil, 59 a 65 anos

nos países da Europa e acima de 65 anos na América do Norte<sup>6</sup>. A ELA pode ser classificada de várias maneiras: quanto aos primeiros sinais clínicos apresentados; quanto à idade de início dos sintomas; quanto à variabilidade genética; quanto ao tempo de progressão; e a mais usual, pelo modo de herança (familiar, esporádica e Guam)<sup>7</sup>.

Vários genes já foram descritos até então associados a ELA. A ELA familiar representa entre 5% e 10% dos casos e pode ser classificada segundo o modo de herança: autossômica dominante, autossômica recessiva e ligada ao X dominante. O enquadramento neste tipo de ELA deve-se ao fato do paciente apresentar, pelo menos, uma pessoa afetada na família. A grande maioria dos casos está relacionada às formas dominantes e à ocorrência em adultos, conforme pode ser observado na tabela 1. Segundo Dellefave e Siddique<sup>3</sup>, a forma familiar ligada ao X foi descrita em apenas uma família na qual somente as mulheres eram afetadas e não havia evidências de transmissão aos homens.

A ELA esporádica representa entre 90% e 95% dos casos, ocorrendo em indivíduos que não apresentam história familiar de ELA. Os fatores envolvidos nas ELA esporádicas não foram, até o momento, elucidados embora, segundo Schymick, Talbot e Traynor<sup>8</sup>, dados familiares e epidemiológicos indicam que fatores genéticos contribuem para a patogenicidade. Além disso, mutações ou polimorfismos nos genes envolvidos nas formas familiares, aliados ao componente ambiental, podem atuar como fatores de predisposição, o que caracteriza a doença como complexa e multifatorial<sup>8,9</sup>.

Mutações no gene SOD1 (ALS1) são responsáveis por 20% da ELA familiar e 2% ou mais da ELA esporádica, sugerindo, neste último caso uma penetrância incompleta ou a ocorrência mutação *de novo* ou ambas. Entretanto, um estudo apresentado por Vivekananda e col.<sup>10</sup> demonstrou que a idade dos genitores não apresenta relação com o aparecimento da ELA esporádica e que mutações espontâneas não são os prováveis mecanismos, mas que existe um significativo componente ambiental, deleções em vários genes ou combinações de polimorfismos relativamente comuns<sup>2,10</sup>.

A ELA de Guam recebe este nome devido à sua localização (ilha de Guam) e as demais particularidades que a tangem, e apresenta-se associada à doença de Parkinson e à demência, ocorrendo a sobreposição de sintomas destas doenças na mesma família e, muitas vezes, no mesmo indivíduo. Embora suas causas ainda não tenham sido elucidadas, observa-se uma diminuição dos casos na população desde a sua descrição na década de 1940, quando a incidência chegava a ser 50 vezes maior que em outros lugares no mundo<sup>11</sup>.

Tabela 1 - Genética molecular para as formas autossômicas dominante e recessiva de esclerose lateral amiotrófica (ELA)<sup>3</sup>.

Tipo ( <i>locus</i> )	Cromossomo	Modo de Herança	% Pacientes com ELA Familiar
ALS1	21q22.1	Dominante (Adulto)	20%
ALS2	2q33	Recessiva (Juvenil)	Rara
ALS3	18q21	Dominante (Adulto)	Rara
ALS4	9q34	Dominante (Juvenil)	Rara
ALS5	15q15.1-q21.1	Recessiva (Adulto)	Rara
ALS6	16q12	Dominante (Adulto)	Rara
ALS7	20ptel	Dominante (Adulto)	Rara
ALS8	20q13.3	Dominante (Adulto)	Rara

Os fatores desencadeantes da fisiopatologia da ELA são desconhecidos, mas algumas hipóteses tentam explicar a ocorrência da doença, como: excitotoxicidade pelo glutamato, estresse oxidativo, acúmulo de proteínas e estrangulamento axonal<sup>9,12,13</sup>.

Atualmente, há apenas um medicamento aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da ELA, o riluzol, um benzodiazol com efeito bloqueador na neurotransmissão glutamatérgica que diminui a lesão aos neurônios motores. Estudos clínicos controlados demonstraram a eficácia em reduzir a progressão da doença e aumentar a sobrevida dos pacientes de 3 a 6 meses, especialmente nos estágios iniciais e nos pacientes com ELA com sinais iniciais bulbares<sup>14</sup>. Estudo conduzido por Zoccollella e col.<sup>15</sup> demonstrou que o riluzol aumenta a sobrevida dos pacientes em, no mínimo, 4 meses e que após 18 meses este fármaco não possui ação, o que possivelmente pode estar relacionado ao fato de que nos estágios finais da doença o aumento de glutamato torna-se maior e incapacita o seu bloqueio.

São comumente incluídas no tratamento outras substâncias, como neuroprotetores e antioxidantes, com o intuito de amenizar os sintomas, e que, associados ao tratamento multidisciplinar, visam melhorar a qualidade de vida do paciente, como a fisioterapia, que pode ser útil para manter o tônus muscular e prevenir contraturas. Geralmente, os indivíduos apresentam dificuldade de deglutição e devem ser alimentados com extremo cuidado para evitar engasgos, sendo que um tubo de gastrostomia muitas vezes é indicado, principalmente nos estágios mais avançados da doença, assim como a utilização de ventilação assistida<sup>1,3</sup>.

As similaridades clínicas e patológicas entre a ELA familiar e a esporádica sugerem uma patogênese em comum. Entretanto, a ausência de um marcador biológico comum a todos os tipos de ELA e a ausência de características neuroradiológicas ou neurofisiológicas específicas algumas vezes torna difícil o diagnóstico e, neste sentido, alguns estudos têm sido conduzidos com o intuito de entender os mecanismos que desencadeiam a degeneração seletiva dos neurônios motores na ELA e desenvolver terapias que retardem a sua progressão<sup>16,17</sup>.

Na busca de um tratamento para ELA, alguns pesquisadores têm estudado a utilização de células-tronco que poderão atuar, hipoteticamente, na indução da diferenciação em NMI, visando substituir aqueles neurônios danificados pela doença; no resgate dos neurônios motores afetados, reconectando-os à parte deservada do músculo; na indução da diferenciação em NMS no córtex cerebral; na indução à diferenciação de células-tronco em células da glia (astrócitos ou oligodendrócitos), as quais produzem fatores de suporte para os neurônios motores<sup>18</sup>.

O objetivo deste estudo foi atualizar os conhecimentos referentes à doença, bem como discutir os protocolos de tratamento testados, utilizando células-tronco.

## CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco são consideradas primordiais de uma cadeia de processos altamente regulados que inclui: proliferação celular, migração, diferenciação e maturação, importantes fatores na manutenção da maioria das linhagens celulares de um organismo adulto, além de originarem diferentes células progenitoras<sup>19,20</sup>.

Em relação ao potencial de diferenciação, as células-tronco po-

dem ser: totipotentes, pluripotentes, multipotentes ou unipotentes. As totipotentes podem originar todos os tecidos embrionários e extra-embrionários; as pluripotentes podem originar todos os tipos celulares do embrião propriamente dito; as multipotentes podem originar várias linhagens celulares e as unipotentes somente originam um único tipo celular adulto<sup>21</sup>.

As células-tronco embrionárias são células pluripotentes derivadas da massa celular interna do blastocisto do embrião de mamíferos e podem se diferenciar nas três camadas germinativas: ectoderme, mesoderme e endoderme<sup>21</sup>.

As células-tronco somáticas são isoladas de células fetais, após gastrulação, ou de tecidos adultos, sendo encontradas em órgãos onde é necessária uma auto-renovação controlada. Esse tipo de célula-tronco é geralmente limitado a se diferenciar em somente alguns tipos de células.

A medula óssea é uma das fontes mais comumente utilizadas para a obtenção de células-tronco adulta, pois contém não somente células-tronco hematopoiéticas, mas também células-tronco que podem ser o esboço das células mesenquimais. A multipotencialidade das células-tronco mesenquimais, seu fácil isolamento e cultura, assim como seu alto potencial de expansão *ex vivo*, fazem destas células uma ferramenta terapêutica atrativa capaz de desempenhar diversas aplicações clínicas em um contexto, tanto de terapia celular quanto genética<sup>19</sup>.

A diferenciação das células-tronco em células adultas no organismo humano é rigorosamente controlada, devendo ser ativada ou desativada através de expressão gênica, a fim de obter as propriedades dos tecidos em diferentes estágios evolutivos. Na diferenciação das células progenitoras neuronais esse controle é ainda maior, uma vez que a efetiva função neural depende de vínculos precisos e interações entre diferentes neurônios individuais e classes de células nervosas<sup>22</sup>.

## REGENERAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Uma das maiores razões de lesão no sistema nervoso central (SNC) são as doenças neurodegenerativas, que interrompem funções fisiológicas importantes e, por isso, a lesão e a reparação do SNC têm sido a chave da pesquisa neurobiológica. A maioria das doenças neurodegenerativas desenvolve-se em idades mais avançadas, é de progressão lenta e de difícil diagnóstico, e não possui terapia efetiva<sup>20</sup>.

Recentemente, as células-tronco têm se mostrado eficazes no tratamento de modelos animais com doenças neurodegenerativas. Esse tipo de célula é um modelo ideal para o estudo da geração embrionária, diferenciação celular, expressão gênica e regulação. Com o desenvolvimento da engenharia de células-tronco, a terapia de reparação tecidual será um novo caminho para o tratamento de defeitos genéticos ou de doenças degenerativas<sup>1,6</sup>.

Estudos do potencial neurogênico das células-tronco têm sido direcionados para as células progenitoras neuronais, derivadas do tecido nervoso embrionário ou adulto, para as células progenitoras não neuronais, derivadas de outros tecidos e órgãos, e para as células-tronco embrionárias, que possuem a capacidade de gerar neurônios e outras células da glia<sup>21</sup>.

As células neuronais progenitoras, encontradas nos embriões, estão também presentes em adultos nos ventrículos cerebrais, nos

quais elas estabelecem ligação com o aprendizado e a memória recente através de suas divisões, diferenciações, migrações e inserções nos novos circuitos<sup>20</sup>.

Muitos protocolos têm permitido o isolamento e a expansão das células-tronco neuronais humanas. Entretanto, uma efetiva terapia com células-tronco para ELA exige estratégias complexas, com muitas técnicas moleculares e celulares, principalmente se levar em consideração o comprimento dos axônios dos neurônios motores e da crescente evidência de que a neurodegeneração na ELA pode ser mediada pela influência de outras células neuronais e da glia<sup>4,23,24</sup>.

O primeiro passo para o desenvolvimento destas técnicas seria a avaliação da fonte doadora da célula (autóloga *versus* alogênica) e a escolha da célula-tronco (neuronal *versus* não neuronal), seguido da manutenção e amplificação *in vitro* sem alterar suas propriedades. Antes do transplante, as células-tronco devem ser transdiferenciadas (se não neuronais) em fenótipos neuronais, e eventualmente modificadas geneticamente para liberar fatores tróficos. As condições adequadas seriam uma combinação de fármacos, proteínas extramatrix artificiais, antioxidantes, estimulantes de células-tronco endógenas e infusão de fatores tróficos que irão aumentar a sobrevivência do tecido transplantado e a integração ao tecido danificado do hospedeiro. Os locais ou a rota da(s) injeção(ões) também influenciarão a recuperação e o sucesso pós-transplante<sup>23</sup>.

## TERAPÊUTICA PARA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA

O conhecimento sobre a patogênese da ELA tem sido obtido, na maioria das vezes, a partir de modelos animais com a forma familiar, e este conhecimento tem permitido desenvolver modelos celulares *in vitro* para a forma esporádica e estudar as propriedades de sobrevivência destas células, sua interação com outros tipos celulares e a suscetibilidade em condições ambientais, que são alguns dos fatores envolvidos na patogênese da doença<sup>1,4</sup>.

As células-tronco podem resultar no desenvolvimento de novos tratamentos para retardar a progressão da ELA, visto que estudos da sua utilização em doenças neurodegenerativas (como Parkinson, Alzheimer e Huntington) têm obtido bons resultados, apesar de ainda se encontrarem nas fases iniciais e necessitarem de muitos ajustes<sup>25</sup>.

A utilização de células-tronco embrionárias, as quais embora possuam um potencial ilimitado para se diferenciarem em fenótipos neuroectodermiais, tem se mostrado aleatória *in vitro*, originando teratomas e rejeição imunológica depois de transplantadas<sup>20</sup>. Em contrapartida, as células-tronco neuronais têm se mostrado capazes de se diferenciar em diferentes tipos de células nervosas *in vivo* e *in vitro* e, quando transplantadas, foram capazes de sobreviver, migrar e integrar, tendo uma funcionalidade ativa. Entretanto, as células-tronco isoladas de cérebro adulto geram menos neurônios quando comparadas àquelas isoladas do cérebro embrionário ou fetal, tanto em casos de transplante como na diferenciação *in vitro*<sup>1</sup>.

O transplante de células hematopoiéticas da medula óssea de camundongos ou de células-tronco do cordão umbilical tem sido utilizado em camundongos SOD1-G93A, aumentando a expectativa de vida destes animais, provavelmente devido mais a um

fator neuroprotetor do que a uma neurogênese<sup>18</sup>.

O camundongo SOD1-G93 exibe uma progressiva degeneração dos NMI, diminuição do andar e perda de força muscular, sendo que a morte ocorre após 4 a 5 meses de idade. É um modelo conveniente, não somente para o entendimento da ELA, mas também para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Entretanto, a expressão gênica alterada neste modelo animal tem como fundamento o descrito para a ALS1 (Tabela 1) e não reproduz todas as peculiaridades da ELA, particularmente o envolvimento bulbar<sup>25</sup>.

Di Giorgio e col.<sup>26</sup> propõem o uso de células-tronco embrionárias para o estudo de doenças e a identificação de potenciais terapias, devido ao grande número de células que podem ser obtidas e diferenciadas a partir deste tipo de célula. Eles demonstraram, através da utilização de células-tronco embrionárias em placas, que os NMI são sensíveis aos efeitos tóxicos produzidos pela mutação no gene SOD1 de células da glia.

Já Zhou e Melton<sup>27</sup> sugeriram que a obtenção de células-tronco pluripotentes a partir de células de mamíferos reprogramadas que iriam se diferenciar e originar outros tipos celulares, como qualquer outra célula-tronco pluripotente, como por exemplo, células da glia, poderiam ser convertidas em neurônios motores.

O processo de reprogramação através de alterações genéticas para que a célula retorne ao seu estado pluripotente pode ter consequências imprevisíveis e necessita de maiores estudos teóricos e laboratoriais antes de serem testados clinicamente, seja em animais ou em seres humanos. Todavia, o sucesso deste tipo de procedimento possibilitaria muitos ganhos não só para a terapêutica da ELA, como para várias outras doenças e distúrbios<sup>27</sup>.

Estudo recente demonstrou que fibroblastos da pele de humanos foram reprogramados para um estado pluripotente similar às células-tronco embrionárias, e que estas células induzidas, retiradas de um paciente com ELA familiar, foram diferenciadas em neurônios motores<sup>4</sup>.

A indução à diferenciação de células-tronco embrionárias de camundongos em células colinérgicas do neurônio motor foi realizada por Briscoe e col.<sup>28</sup>, através da expressão da proteína Hb9, uma proteína homeodomínio expressa seletivamente e presente em células somáticas que identifica neurônios motores pós-mitóticos. Estas células-tronco embrionárias, derivadas de neurônios motores, são capazes de preencher a medula espinhal do embrião, alargar axônios, e realizar sinapses com músculos alvo<sup>28</sup>.

Em outro estudo, Yan e col.<sup>29</sup> enxertaram células-tronco neuronais oriundas da medula espinhal de embriões humanos na porção lombar da coluna vertebral de camundongos SOD1-G93A imunossuprimidos com diferentes fármacos isolados ou em combinações. Os resultados indicaram que a imunossupressão combinada possibilita a sobrevivência das células-tronco enxertadas na medula espinhal, permitindo assim a diferenciação das células-tronco neuronais em neurônios motores, acarretando em melhora clínica.

Com relação à utilização de células-tronco adultas, segundo Bos-solasco e col.<sup>24</sup>, a migração e a diferenciação de células-tronco da medula óssea em neurônios e em astrócitos fenotipicamente compatíveis foi comprovada quando Lee e col.<sup>30</sup> administraram uma infusão de células-tronco mesenquimais humanas no cérebro de ratos e essas proliferaram, migraram e sobreviveram

similarmente aos astrócitos do camundongo, indicando que as células-tronco mesenquimais possuem um alto potencial de proliferação no microambiente do hospedeiro.

Mazzini e col.<sup>31</sup> utilizaram células-tronco mesenquimais da medula óssea, isoladas e expandidas *in vivo*, re-suspendidas em líquido cérebroespinal e transplantaram diretamente na coluna vertebral entre T7 e T9 em sete pacientes com ELA. Nenhum paciente apresentou falha respiratória e morte. Contudo, alguns apresentaram reversivelmente, dor intercostal e disestesia sensorial na perna. Não houve alteração do volume da medula espinal e nem proliferação celular anormal. A diminuição da capacidade linear da força vital foi significativamente desacelerada em quatro pacientes, 36 meses após transplante.

Dimos e col.<sup>32</sup> relataram procedimento no qual os pacientes com ELA receberam uma injeção com células-tronco autólogas mesenquimais da medula-óssea diretamente no líquido espinal. Este procedimento mostrou ser seguro, mas difícil de monitorar o caminho seguido pelas células e a sobrevivência destas, além de não ter sido evidenciada melhora significativa no quadro da doença. Para avaliar o potencial de células-tronco derivadas da medula óssea em modificar o fenótipo da ELA, Corti e col.<sup>33</sup>, utilizaram um camundongo quimérico, obtido a partir do camundongo SOD1-G93A, transplantado com células da medula óssea de camundongos expressando proteína fluorescente verde (GFP) e neurônios provenientes de uma variante de camundongo (Thy1-YFP) que expressa proteína fluorescente amarela. No córtex cerebral foram observados neurônios GFP+ e YFP+, os quais foram provavelmente gerados pela fusão celular. Células da microglia GFP+ foram observadas no cérebro e na medula espinal dos animais SOD1-G93A. Os animais quiméricos apresentaram uma significativa redução no aparecimento dos sintomas e aumento na expectativa de vida. Os benefícios obtidos foram caracterizados como sendo devido à mudança ambiental provocada pelo transplante das células da medula óssea no SNC, com a geração da microglia e a formação de neurônios, o que proporcionou uma melhora fenotípica nestes animais.

A organização, distribuição e função das células neuronais progenitoras na coluna vertebral durante a degeneração dos neurônios motores na ELA permanece desconhecida. Na tentativa de elucidar este fato, Chi e col.<sup>34</sup> utilizaram duas linhagens de camundongos transgênicos, a linhagem usualmente utilizada para a ELA (SOD1-G93A) e outra que possuía o promotor do gene nestin controlado pelo repórter LacZ, criando desta forma um duplo transgênico. A expressão de nestin no SNC é geralmente considerada como um marcador confiável de células neuronais progenitoras e tem sido bastante utilizada para a caracterização desse tipo de célula *in vivo* e *in vitro*.

O estudo demonstrou haver, no duplo transgênico, aumento na proliferação das células-tronco neurogênicas, migração e neurogênese (mas não astrogênese, oligogênese ou microgliogênese) na região lombar da coluna vertebral em resposta à degeneração. Esta proliferação, detectada através de um marcador do LacZ, foi restrita à zona epidual ao redor do canal central. No entanto, externamente a este canal, houve perda da capacidade proliferativa, mas a capacidade migratória das células-tronco neurogênicas foi mantida. Durante a progressão da ELA, estas células migraram inicialmente do canal central em direção ao corno dorsal e,

em seguida, ao corno ventral, onde os neurônios motores estão se degenerando. Foram detectadas, também, células neuronais progenitoras ao redor dos neurônios motores que estavam se degenerando, sugerindo que alguns fatores da degeneração podem induzir à migração e à diferenciação de células neuronais progenitoras. Além disso, estes fatores podem contribuir para retardar ou prevenir o aparecimento dos sintomas e reduzir a progressão da doença<sup>34</sup>.

Em outro estudo, Corti e col.<sup>18</sup> testaram um tratamento para alterar a progressão da ELA a partir da estimulação *in vitro* de uma subpopulação de células-tronco neuronais que foram transplantadas para a coluna vertebral de camundongos transgênicos SOD1-G93A. Os animais transplantados apresentaram uma diminuição na progressão da doença e sobreviveram aproximadamente 23 dias a mais que o grupo controle. Exames da coluna vertebral revelaram integração das células transplantadas (marcadas radioativamente) com as células do hospedeiro, e a diferenciação de grande parte destas células em neurônios.

Alguns estudos têm revelado que os astrócitos são deficientes na ELA e por isso o transplante de astrócitos derivados de células-tronco talvez possa trazer alguns benefícios. Para testar esta hipótese, Klein e col.<sup>35</sup> transplantaram células-tronco neuronais para a coluna vertebral de camundongos selvagens e puderam observar que estas podiam sobreviver e produzir astrócitos, além de liberarem fatores de crescimento, como o fator neurotrófico de células da glia (GDNF).

Os astrócitos derivados de células-tronco neuronais humanas expressam alguns marcadores gliais imaturos como transportadores de glutamato e podem, por isso, permitir a entrada do excesso de glutamato, diminuindo a quantidade desse neurotransmissor na fenda sináptica e, conseqüentemente, diminuindo a degeneração neuronal. Como o GDNF tem demonstrado eficiência em manter a sobrevivência de neurônios motores em diversas condições, sua presença na coluna vertebral talvez proporcione efeitos protetores extensíveis aos neurônios motores superiores e à junção neuromuscular. Embora a administração local de GDNF sozinha na coluna vertebral possa não ser suficiente para proteger os neurônios motores, a combinação com o transplante de astrócitos pode ser mais eficiente<sup>35</sup>.

Avaliando ainda a importância dos astrócitos na ELA, Marchetto e col.<sup>36</sup> promoveram uma co-cultura envolvendo astrócitos que superexpressavam SOD1 e células-tronco embrionárias humanas. Estas últimas foram induzidas à diferenciação em rosetas neuronais e, posteriormente, maturadas em células eletrofisiologicamente funcionais, expressando marcadores típicos de neurônios motores (como Hb9, ChAT, Islet). O meio de cultura foi suplementado com diversos compostos, dentre eles antioxidantes e flavonóides. O objetivo do estudo foi testar os níveis de oxidação e a taxa de sobrevivência dos neurônios motores em co-cultura com astrócitos mutados. O resultado obtido foi que a co-cultura proporcionou a sobrevivência dos neurônios motores e manteve as taxas de oxidação em níveis normais e que, embora os astrócitos superexpressados possam induzir a produção de radicais livres do tipo oxigênio e peróxido de hidrogênio, a adição de antioxidantes pode reverter esse processo, concluindo que a presença da enzima SOD1 é importante para a manutenção do neurônio motor.

Hou e Hong<sup>1</sup> demonstraram que células-tronco neuronais humanas, derivadas de neurônios motores, transplantadas para a medula espinhal lesionada de macacos, poderiam sobreviver e se diferenciar em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos e promover a recuperação funcional do animal. Uma das hipóteses sustentadas é de que estas células-tronco neuronais substituiriam os NMI danificados na ELA.

Embora alguns trabalhos apontem para uma resposta clínica favorável com o uso de células-tronco; Silani e col.<sup>23</sup> desenvolveram um estudo no qual a administração de uma injeção subaracnoidea de sangue periférico purificado com células CD34+ em três pacientes com ELA não mostrou eficácia clínica. No entanto, durante o acompanhamento, no período de 6 a 12 meses após a administração, nenhum efeito adverso foi observado, o que sugere segurança neste tipo de estudo clínico<sup>25</sup>.

Segundo Khaldoyanidi<sup>37</sup>, a regeneração promovida por células-tronco depende, em grande parte, do transporte destas células à área danificada e cita que a alteração na superfície de células CD44 (que funcionam como moléculas transportadoras para a medula óssea) promoveu eficiente interação adesiva das células-tronco mesenquimais manipuladas com vasos endoteliais e subsequentemente com a superfície endotelial até a chegada à medula óssea. Esse tipo de estratégia seria de grande importância para a ELA na qual o local de administração é limitante para a terapia. Entretanto, este sistema é baseado em uma entrega vascular sistêmica do local administrado até o local afetado; necessita de um grande número de células a serem administradas e depende de uma célula ou uma molécula que funcione como a CD44 descrita.

Recentemente, Mitrecić e col.<sup>38</sup>, com o intuito de fornecer informações sobre o potencial da administração intravenosa de células-tronco neuronais, observaram uma grande disponibilidade destas células no SNC de modelo animal com ELA sintomática, moderada em ELA pré-sintomática e menor em animais selvagens. As células-tronco injetadas preferencialmente colonizaram o córtex motor, o hipocampo e a medula espinhal, e sua diferenciação foi caracterizada por diminuição da expressão nestin e o aparecimento de células CD68 positivas.

Gu e col.<sup>39</sup> investigaram a influência de fatores solúveis, liberados por células-tronco provenientes de tecido adiposo, sobre a captação de glutamato em astrócitos cultivados de ratos SOD1 (G93A). Os resultados indicaram maior expressão do transportador de glutamato 1 (GLT1) cuja função é a de promover a captação do glutamato, além da inibição da ativação de caspase-3. Além disso, as células-tronco de tecido adiposo em co-cultura com astrócitos SOD1 produziram VEGF, HGF e IGF-1, os quais possuem efeitos neuroprotetores. Corroborando com estes achados, Corti e col.<sup>40</sup> avaliaram o efeito da terapia celular utilizando a injeção por via venosa de uma população específica de células-tronco/progenitoras c-kit (+) da medula óssea no modelo animal SOD1-G93A. O transplante de células-tronco prolongou a sobrevivência dos animais e promoveu a sobrevivência dos neurônios motores e melhora da função neuromuscular. Esta neuroproteção foi mediada em especial pelo aumento da expressão dos transportadores de glutamato GLT1. Estes resultados sugerem que o transplante de células-tronco pode tornar-se uma terapia eficaz para ELA e outras doenças neurodegenerativas.

## DISCUSSÃO

Dada a falta de tratamentos eficazes para ELA, os estudos atualmente têm investigado o uso e aplicação das células-tronco como candidatas na terapia de escolha contra a doença. O transplante de células-tronco tem se mostrado eficaz em vários modelos animais, mas os caminhos biológicos subjacentes aos processos de reparação ainda não foram elucidados. Vários mecanismos tais como a fusão celular, liberação do fator neurotrófico, proliferação de células-tronco endógenas e transdiferenciação, podem explicar resultados pré-clínicos terapêuticos em modelos animais em adição à reposição do neurônio motor perdido. O alvo clínico na ELA tem buscado ainda elucidar a interação entre neurônios motores e células não neuronais (principalmente astroglia ou microglia). De fato, uma das perguntas fundamentais sem resposta é se, e quanto a morte do neurônio motor depende de células vizinhas<sup>41</sup>.

A ética e o rigor científico nos estudos que utilizam as células-tronco devem ser meticolosos e apoiados por médicos, cientistas e pacientes que participam destes estudos. Os efeitos adversos e a segurança na utilização da terapia devem ser seriamente avaliados. Devem ser definidos os melhores critérios para a seleção dos pacientes e, antes da cirurgia, o procedimento de transplante deve ser personalizado, relacionando a dose e a localização das células enxertadas ao paciente, de modo a que a reparação seja tão completa quanto possível. Deve-se também avaliar qual a fonte mais apropriada para a obtenção das células-tronco que originarão as células desejadas, e se possível, buscar fontes alternativas para a obtenção de células-tronco. É necessário, ainda, avaliar minuciosamente os detalhes técnicos, verificando melhor local para implantação, o tempo após o diagnóstico da doença e o número de células mais adequadas. O sucesso da terapia com células-tronco dependerá de uma investigação mais aprofundada na biologia dessas células e da maior compreensão da patogênese da ELA<sup>23,42</sup>.

Enquanto todas as indagações a respeito das células-tronco não forem elucidadas, como a segurança aos pacientes e a eficácia, ou outras formas de tratamento sejam testadas, aprovadas e disponíveis, é imprescindível a busca por uma terapêutica adequada que possibilite aumentar a sobrevivência e a qualidade de vida do paciente.

Desta forma, novos estudos sobre o emprego das células-tronco no tratamento da ELA são necessários, mas, com base nos dados da literatura, os resultados obtidos até então sugerem que a terapia celular poderá ser, num futuro próximo, a maior ferramenta de cura ou de melhoria da qualidade de vida dos pacientes com ELA.

## REFERÊNCIAS

1. Hou LL, Hong T. Stem cells and neurodegenerative diseases. *Sci China Ser C-Life Sci*, 2008;51(3):287-294.
2. Shaw PJ. Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76(8):1046-57.
3. Dellefave L, Siddique T. Gene reviews: amyotrophic lateral sclerosis overview. National Institute of Health, 2009. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf>.
4. Andrews J. Amyotrophic lateral sclerosis: clinical management and

- research update. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2009;9(1):59-68.
5. Beghi E, Logroschino G, Chiò A, et al. The epidemiology of ALS and the role of population-based registries. *Biochim Biophys Acta* 2006;1762(11-12):1150-57.
  6. Palermo S, Lima JMB, Alvarenga RP. Epidemiologia da esclerose lateral amiotrófica - Europa/América do Norte/América do Sul/Ásia. Discrepâncias e similaridades. Revisão sistemática da literatura. *Rev Bras Neurol* 2009;45(1):5-10.
  7. Pardina JSM. Esclerosis lateral amiotrófica y otras enfermedades de la motoneurona. In: Gómez JP, (editor). *Tratado de neurología clínica*. Barcelona: Artes Médicas; 2008. p. 797-826.
  8. Schymick JC, Talbot K, Traynor BJ. Genetics of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 2007;16:R233-42.
  9. Shaw PJ. Genetic inroads in familial ALS. *Nat Genet* 2001;29(2):103-4.
  10. Vivekananda U, Johnston C, McKenna-Yasek D, et al. Birth order and the genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 2008;255(1):99-102.
  11. Plato CC, Garruto RM, Galasko D, et al. Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of Guam: changing incidence rates during the past 60 years. *Am J Epidemiol* 2003;157(2):149-57.
  12. Ching GY, Liem RKH. Neuronal intermediate filaments and neurodegenerative diseases. *Eurekah Bioscience* 2005;1:137-146.
  13. Nishimura AL, Mitne-Neto M, Silva HC, et al. A novel locus for late onset amyotrophic lateral sclerosis/motor neurone disease variant at 20q13. *J Med Genet* 2004;41(4):315-20.
  14. Groeneveld GJ, van Kan HJ, Lie-A-Huen L, et al. An association study of riluzole serum concentration and survival and disease progression in patients with ALS. *Clin Pharmacol Ther* 2008;83(5):718-22.
  15. Zoccollella S, Beghi E, Palagano G, et al. Riluzole and amyotrophic lateral sclerosis survival: a population-based study in southern Italy. *Eur J Neurol* 2007;14(3):262-8.
  16. Ryberg H, Bowser R. Protein biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Rev Proteomics* 2008;5(2):249-62.
  17. Zoccollella S, Beghi E, Serlenga L, et al. Classification of amyotrophic lateral sclerosis cases at presentation in epidemiological studies. *Neurol Sci* 2005;26(5):330-3.
  18. Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, et al. Neural stem cells LewisX+CXCR4+ modify disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis model. *Brain* 2007;130(Pt5):1289-305.
  19. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 2001;226(6):507-20.
  20. Stem cells: Scientific Progress and Future Research Directions. Report prepared by the National Institutes of Health. National Institutes of Health - Department of Health and Human Services, June 2001.
  21. Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, et al. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* 2002;110(3):385-97.
  22. Matías-Guiu J, García-Ramos R, Galán L, et al. Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurologia* 2008;23(8):518-29.
  23. Silani V, Cova L, Corbo M, et al. Stem-cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 2004;364(9429):200-2.
  24. Bossolasco P, Cova L, Calzarossa C, et al. Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro. *Exp Neurol* 2005;193(2):312-25.
  25. Cova L, Ratti A, Volta M, et al. Stem cell therapy for neurodegenerative diseases: the issue of transdifferentiation. *Stem Cells Dev* 2004;13(1):121-31.
  26. Di Giorgio FP, Boulting GL, Bobrowicz S, et al. Human embryonic stem cell-derived motor neurons are sensitive to the toxic effect of glial cells carrying an ALS-causing mutation. *Cell Stem Cell* 2008;3(6):637-48.
  27. Zhou Q, Melton DA. Extreme makeover: converting one cell into another. *Cell Stem Cell* 2008;3(4):382-8.
  28. Briscoe J, Pierani A, Jessell TM, et al. A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 2000;101(4):435-45.
  29. Yan J, Xu L, Welsh AM, et al. Combined immunosuppressive agents or CD4 antibodies prolong survival of human neural stem cell grafts and improve disease outcomes in amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice. *Stem Cells* 2006;24(8):1976-85.
  30. Lee H, Shamy GA, Elkabetz Y, et al. Directed differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived motoneurons. *Stem Cells* 2007;25(8):1931-9.
  31. Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, et al. Stem cell treatment in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neurol Sci* 2008;265(1-2):78-83.
  32. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 2008;321(5893):1218-21.
  33. Corti S, Locatelli F, Donadoni C, et al. Wild-type bone marrow cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice and contribute to CNS, heart and skeletal muscle tissues. *Brain* 2004;127(Pt 11):2518-32.
  34. Chi L, Ke Y, Luo C, et al. Motor neuron degeneration promotes neural progenitor cell proliferation, migration, and neurogenesis in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis mice. *Stem Cells* 2006;24(1):34-43.
  35. Klein SM, Behrstock S, McHugh J, et al. GDNF delivery using human neural progenitor cells in a rat model of ALS. *Hum Gene Ther* 2005;16(4):509-21.
  36. Marchetto MC, Muotri AR, Mu Y, et al. Non-cell-autonomous effect of human SOD1G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2008;3(6):649-57.
  37. Khaldoyanidi S. Directing stem cell homing. *Cell Stem Cell* 2008;2(3):198-200.
  38. Mitrecić D, Nicaise C, Gajović S, et al. Distribution, differentiation, and survival of intravenously administered neural stem cells in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Transplant* 2010;19(5):537-48.
  39. Gu R, Hou X, Pang R, et al. Human adipose-derived stem cells enhance the glutamate uptake function of GLT1 in SOD1(G93A)-bearing astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;393(3):481-6.
  40. Corti S, Nizzardo M, Nardini M, et al. Systemic transplantation of c-kit+ cells exerts a therapeutic effect in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 2010;19(19):3782-96.
  41. Zietlow R, Lane EL, Dunnett SB, et al. Human stem cells for CNS repair. *Cell Tissue Res* 2008;331(1):301-22.
  42. Silani V, Calzarossa C, Cova L, et al. Stem cells in amyotrophic lateral sclerosis: motor neuron protection or replacement? *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2010;9(3):314-24.