



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências da Saúde

# **Esclerose lateral amiotrófica**

## **Revisão bibliográfica da patofisiologia**

**Vanda Cristina Ng Godinho**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Medicina**  
(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Prof. Doutor Francisco Alvarez

**Covilhã, maio de 2013**

*"Toda a explicação pressupõe  
o conhecimento do inexplicável, ou seja,  
do que seria mais interessante explicar."*

Vergílio Ferreira

# Dedicatória

Dedico este trabalho a todos aqueles que me ajudaram a tornar este sonho em realidade.

# Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais, que me acompanharam e apoiaram incondicionalmente na realização deste sonho.

À minha irmã, que me mostrou a luz e o caminho quando tudo parecia impossível.

Ao meu orientador, Dr. Francisco Alvarez, por ter aceite o meu convite para orientação da minha dissertação de Mestrado e pelo seu apoio, ajuda, disponibilidade, dedicação e paciência demonstradas durante a realização do mesmo.

Aos meus amigos que estiveram dia e noite ao meu lado, nos bons e nos maus momentos.

Aos colegas, pela entajuda e pelo incentivo prestados.

A todos os tutores, professores e funcionários que comigo se cruzaram e que, de uma forma mais ou menos ativa, possibilitaram o desenvolvimento de atitudes e aptidões, não só profissionais, mas também, e mais importantes, pessoais e sociais no crescimento da minha pessoa.

# Resumo

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença do neurónio motor fatal e progressiva, cuja patogenia é ainda desconhecida.

O processo patológico decorre de uma degenerescência dos neurónios motores periféricos no tronco encefálico e medula espinhal, que leva a desnervação e consequente atrofia nas fibras musculares correspondentes. Nas regiões onde ocorre adelgaçamento das fibras nervosas há deposição de pigmentos lipídicos e outras substâncias conjuntamente com proliferação de astroglia e microglia. No início do processo patológico, alguns grupos musculares vão sendo afetados, levando a uma fraqueza muscular assimétrica pouco específica. Com o avançar da doença, vai sendo maior o número de músculos envolvidos, acabando por comprometer a musculatura respiratória e levando à morte.

O fenómeno que leva à destruição neuronal ainda não foi esclarecido, o que faz com que esta patologia de rápida progressão seja ainda um grande problema no seio da Neurologia. Devido à ausência de uma etiologia específica, fatores de risco exógeno estão a ser cada vez mais explorados como agente causal da doença. A descoberta contínua de mutações em genes de pacientes com ELA faz com que os fatores genéticos adquiram uma maior importância na etiopatogénese da doença, principalmente porque parecem estar diretamente relacionados com os diversos processos que levam à destruição dos neurónios motores.

Os mecanismos que levam à destruição são diversos, entre eles o mecanismo de *stress* oxidativo, excitotoxicidade pelo glutamato, agregação proteica, alteração da função dos astrócitos, alterações neurovasculares, processos inflamatórios e disfunção dos neurofilamentos e microtúbulos. Nenhum destes processos funciona de modo isolado e diversos estudos apontam para um mecanismo em constante interação que culmina no dano e morte neuronais.

O conhecimento escasso da fisiopatologia desta doença leva à dificuldade na elaboração de estratégias terapêuticas eficazes para abrandar o curso da doença. No momento apenas o Riluzole mostra resultados, embora com um aumento da sobrevivência dos pacientes em apenas alguns meses. Com o decorrer dos estudos, mais aspetos da ELA têm vindo a ser desvendados, abrindo assim novas possibilidades e hipóteses para estudos mais aprofundados.

**Palavras-chave:** Esclerose Lateral Amiotrófica; Doença do neurónio motor; patofisiologia; patogénese; etiologia

# Abstract

The Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a fatal and progressive motor neuron disease, whose pathogenesis is still unknown.

The pathological process stems from a degeneration of the peripheral motor neurons of the brainstem and spinal cord, which leads to denervation and consequent atrophy of the correspondent muscular fibers. In the regions where occurs muscular fibers' thinning, occurs deposition of lipid pigments and other substances, as so astroglial and microglial proliferation. In the beginning of the pathological process, some muscular groups are affected, leading to an unspecific asymmetrical muscular weakness. As the disease progresses, larger is the number of affected muscles groups, eventually compromising the respiratory muscles and leading to death.

The phenomenon inducing neuronal destruction has not been enlightened, that makes this fast progression pathology a huge problem in the Neurology field. Due to the absence of a specific etiology, exogenous risk factors are being increasingly explored as causative agent of the disease. The ongoing discovery of genes mutations in ALS patients increases genetic factors' importance in the pathogenesis of the disease, mainly because it seems to be directly linked to several processes responsible for motor neuron destruction.

The mechanisms leading to degeneration are several, among them there's the oxidative stress process, glutamate excitotoxicity, protein aggregation dysfunction, astrocyte dysfunction, neurovascular alterations, inflammatory processes as so neurofilament and microtubule dysfunction. None of this processes act isolated or independently and many studies suggests the existence of a complex mechanism in constant interplay, culminating in neuronal damage and death.

The scarce knowledge of ALS' physiopathology difficult the elaboration of efficient therapeutic strategies intended to slow disease progress. At the moment, only Riluzole shows some significant results, although with just a modest lengthening of the patient's survival in months. In the course of the studies many aspects of ALS had been discovered, clearing the way to new hypothesis and possibilities for deeper studies.

**Keywords:** Amyotrophic Lateral Sclerosis; motor neuron disease; pathophysiology; pathogenesis; etiology.

# Índice

Dedicatória.....	ii
Agradecimentos .....	iii
Resumo .....	iv
Abstract.....	v
Índice .....	vi
Lista de Figuras.....	1
Lista de tabelas .....	2
Lista de acrónimos.....	3
Introdução.....	5
Metodologia.....	7
Capítulo 1 - Esclerose lateral amiotrófica .....	8
1.1 - Definição.....	8
1.2 - Epidemiologia.....	8
1.3 - Histopatologia .....	9
1.4 - Manifestações clínicas.....	10
1.5 - Diagnóstico .....	12
1.6 - Abordagem terapêutica .....	15
Capítulo 2 - Patofisiologia.....	17
2.1 - Fatores de risco .....	17
2.1.1 - Fatores de risco exógenos.....	17
2.1.2 - Fatores genéticos .....	21
2.2 - Mecanismos patológicos.....	24
2.2.1 - <i>Stress</i> Oxidativo.....	25
2.2.2 - Excitotoxicidade pelo Glutamato .....	26
2.2.3 - Agregação proteica .....	29
2.2.4 - Alteração da função dos astrócitos.....	30

2.4.5 - Alterações neurovasculares .....	31
2.2.6. Processos inflamatórios .....	32
2.2.7 - Disfunção de neurofilamentos e microtúbulos .....	34
2.3 - Visão global .....	36
Conclusão .....	39
Bibliografia.....	41

# Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática dos mecanismos de dano neuronal .....	36
--	----

# Lista de tabelas

Tabela 1 - Classificação por grupos pelos Critérios El Escorial .....	13
Tabela 2 - Classificação por grupos pelos Critérios de Airlie House - El Escorial Modificado ..	13
Tabela 3 - Recomendações do consenso de Awaji-shima para a aplicação de testes eletrofisiológicos no diagnóstico de ELA, aplicado aos critérios El Escorial modificado (Airlie House 1998).....	14
Tabela 4 - Tratamentos sintomáticos para a ELA .....	16
Tabela 5 - Mutações na ELA.....	23

# Lista de acrónimos

- AMPA - Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
- ATP - Adenosina trifosfato
- BDNF (*Brain derived neurotrophic factor*) - fator neurotrófico derivado do cérebro
- BHE - Barreira hematoencefálica
- CNTF (*Ciliaryneurotrophic factor*) - fator neurotrófico ciliar
- DNA (Deoxyribonucleic acid) - Ácido desoxirribonucleico
- EAAT2 (*Excitatory amino-acid transporter*) - transportador excitatório de aminoácido 2
- ELA - Esclerose lateral amiotrófica
- F - Feminino
- G-CSF (*Granulocyte colony-stimulating factor*) - fator de estimulação de colônias de granulócitos
- GDNF (*Glia-derived neurotrophic factor*) - fator neurotrófico derivado da glia
- GLT-1 (*Glial Glutamate Transporter 1*) - Transportador glial de glutamato - 1
- HIV (Human immunodeficiency virus) - vírus da imunodeficiência humana
- HSV-1 (Herpes simplex virus - 1) - Virus herpes simples
- IFN  $\gamma$  - Interferão  $\gamma$
- IGF-1 (*Insuline-like growth factor 1*) - fator de crescimento semelhante à insulina 1
- IL - interleucina
- LCR - Líquido céfalo-raquidiano
- LPS (*Bacterial endotoxin lipopolysaccharide*) - Endotoxina bacteriana lipopolissacárida
- M - Masculino
- ME - Medula espinhal
- mRNA - RNA mensageiro

NM - Neurónios motores

NMDA - N-metil-D-aspartato

NMI - Neurónios motores inferiores

NMS - Neurónios motores superiores

NO (*Nitric oxide*) - óxido nítrico

NOS (*Nitric oxid synthase*) - óxido nítrico sintetase

RNA (*Ribonucleic acid*) - Ácido ribonucleico

SN - sistema nervoso

SNC - Sistema nervoso central

SNP - sistema nervoso periférico

SOD1 - Superóxido Dismutase 1

SUP - Sistema ubiquitina-proteossoma

TE - Tronco encefálico

TNF- $\alpha$  (*Tumoral necrosis factor  $\alpha$* ) - Fator de necrose tumoral  $\alpha$

VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) - fator de crescimento endotelial vascular

# Introdução

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença do neurónio motor fatal e progressiva, cujos processos etiológicos e fisiopatológicos são ainda desconhecidos [1-4].

Esta patologia atinge cerca de 1-3 novos casos por cada 100,000 habitantes anualmente, tendo uma prevalência detida entre os 3 e os 7 por 100,000 habitantes/ano. Ainda por razões desconhecidas, o sexo masculino tem um atingimento ligeiramente superior quando comparado com o feminino, com uma proporção M:F de 1,5:1 [1-5]. Habitualmente a idade média de aparecimento da doença ocorre entre os 55-65 anos de idade, embora em alguns casos, cerca de 5% [2,3] possa manifestar-se a partir da segunda década de vida [1-4, 6].

O processo patológico geral decorre de uma degenerescência dos neurónios motores desde o córtex motor, tratos corticoespinhais, tronco encefálico e medula espinhal que leva a uma desnervação dos feixes nervosos e consequente atrofia nas fibras musculares correspondentes. Nas regiões onde ocorre adelgaçamento por destruição das fibras nervosas há deposição de pigmentos lipídicos e outras substâncias, conjuntamente com proliferação de astroglia e microglia [1-3,7].

No início do processo patológico, há atingimento de alguns grupos musculares que geram uma fraqueza muscular assimétrica pouco específica. Com o avançar da doença, o número de músculos envolvidos vai aumentando, levando a um comprometimento progressivo dos membros superiores e inferiores, alterações na musculatura mais proximal e por fim, afetação da musculatura do aparelho respiratório, culminando em morte [1-3,7].

A sobrevida média dos pacientes situa-se entre os 3-5 anos após o diagnóstico de ELA [1-3, 5-7], embora se tenha verificado uma sobrevida mais curta em doentes cuja história familiar conta com fortes indícios de doenças neurodegenerativas [6].

O mecanismo etiológico que leva ao início da destruição dos neurónios motores ainda não foi esclarecido, o que faz com que esta patologia de rápida progressão seja ainda um grande problema no seio da Neurologia. Com a evolução biotecnológica tem sido possível descobrir um maior número de fatores determinantes que podem estar na origem e progressão desta neurodegenerescência do neurónio motor. Muitos dos mecanismos elementares de destruição neuronal já se encontram descritos, embora ainda se mantenha em aberto a discussão sobre os fatores e mecanismos que os desencadeiam.

A maioria dos casos de ELA surge esporadicamente, sendo por isso difícil de determinar o agente causal, embora cerca de 5-10% tenha carácter familiar mais

comummente com hereditariedade autossômica dominante, designada de ELA familiar [1-3, 5-8]. Foram isolados diversos genes que estão associados a uma maior incidência desta patologia em famílias com doenças neurodegenerativas. Embora essa associação não seja completamente causal, aumenta muito a probabilidade de novas ocorrências da patologia no seio da família [1-7].

Devido ao desconhecimento da etiologia desta doença tão rapidamente progressiva e ausência de meios de a controlar eficazmente, propus-me elaborar uma revisão bibliográfica da fisiopatologia desta doença do neurónio motor, a esclerose lateral amiotrófica.

Este trabalho pretende abordar a fisiopatologia da ELA, explorando os mecanismos patológicos já conhecidos e descritos nos mais conceituados livros no âmbito da Neurologia, relacionando aos mais recentes achados nesta área. Esta monografia tem como objetivos definir e descrever a ELA, documentar os mais recentes achados da sua fisiopatologia e relacioná-los, tendo como base livros de elevada relevância na área da Neurologia e complementando-os com os mais recentes artigos e publicações.

# Metodologia

Como metodologia para a realização desta monografia foi utilizado o motor de busca “*PubMed*” (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) pela sua credibilidade e impacto na comunidade científica médica.

A pesquisa efetuada teve por base as seguintes palavras-chave:

- Amyotrophic lateral sclerosis
- Motor neuron disease
- Motor neuron degeneration
- ALS ethiology
- ALS pathogenesis
- ALS epidemiology
- ALS motor neuron death

Dado o grande volume de entradas, foram usados os seguintes critérios de inclusão:

- Artigos em língua inglesa
- Dados dos últimos 15 anos (1998-2013)

# Capítulo 1 - Esclerose lateral amiotrófica

## 1.1 - Definição

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa caracterizada por uma paralisia muscular progressiva que reflete a degenerescência dos neurónios motores do córtex motor primário, tratos corticoespinhais, tronco encefálico e medula espinhal [1-3, 5,7,8].

A destruição de neurónios motores periféricos no tronco encefálico e corno anterior da medula espinhal provoca uma desnervação nas fibras nervosas locais, o que gera uma atrofia das fibras musculares correspondentes, advindo desse fenómeno o termo “Amiotrofia”. Este fenómeno leva a uma fraqueza muscular assimétrica e ao aparecimento de fasciculações visíveis. [2,3, 5,7].

“Esclerose Lateral” refere-se ao processo de adelgaçamento das vias descendentes por perda dos neurónios motores que conseqüentemente culmina numa posterior proliferação da astroglia e microglia nos tratos corticoespinhais anteriores e laterais [1-3].

A maioria dos casos de ELA surge esporadicamente, denominada de ELA esporádica, embora cerca de 5-10% tenha carácter familiar mais comumente com hereditariedade autossómica dominante - ELA familiar [1-3, 5, 8,9].

## 1.2 - Epidemiologia

A incidência desta patologia detém-se entre os 1-3 casos por cada 100.000 habitantes/ano na maioria dos casos e uma prevalência que varia entre os 3-7 por 100.000 habitantes por ano [1-3, 5].

Um dado em comum em diversos estudos revela uma afetação superior desta patologia no sexo masculino que no feminino, com um M:F ratio de cerca de 1,5:1 [1,2,4] embora estudos recentes refiram que esta incidência esteja a atingir valores semelhantes em ambos os sexos [4].

A doença pode manifestar-se a partir da segunda década de vida numa minoria dos casos, cerca de 5% [2,3], embora a maioria dos casos se apresente inicialmente entre os 55-65 anos de idade [1-4,9].

A sobrevida média dos pacientes desde o momento do diagnóstico é consensual em diversos estudos, situando-se entre os 3-5 anos após o diagnóstico de ELA [1-3, 5-9], embora se tenha verificado uma sobrevida mais curta em doentes cuja história familiar conta com fortes indícios de doenças neurodegenerativas [6].

### 1.3 - Histopatologia

A ELA é uma doença primária do neurónio motor, das células e dos seus axónios. O mecanismo que leva ao aparecimento desta doença é ainda desconhecido, sendo uma importante fonte para a formulação de hipóteses patogénicas [1-3,5-9].

Esta patologia decorre da degenerescência e da perda dos neurónios motores do córtex motor, do tronco encefálico, tratos corticoespinhais, medula espinhal e feixes nervosos correspondentes. Com o decorrer do processo degenerativo, as células destruídas são substituídas por processos de proliferação astroglial e ativação da microglia [1-3,5,7,9].

A perda de células atinge as células piramidais do córtex motor do giro pré-frontal, assim como das fibras mielinizadas espessas das colunas anterior e lateral da medula espinhal, tronco encefálico e cerebelo. O núcleo hipoglossal é severamente atingido, enquanto certas estruturas como os núcleos de Onuf, os nervos oculomotor e troclear são geralmente poupados na maioria dos casos, embora acabem por ser atingidos no estadió pré-terminal da doença. Esta diferença no atingimento celular continua a intrigar a comunidade científica e diversos mecanismos de proteção foram estudados e ajudam a determinar uma parte da seletividade por determinados grupos neuronais [1,2,7,9].

A astroglia proliferada e a ativação da microglia não foram os únicos processos observados nos locais de destruição neuronal. Com o auxílio da microscopia ótica e eletrónica foram encontradas diversas estruturas: Lipofuscina, pigmentos lipídicos; esferóides, que consistem numa acumulação de neurofilamentos, proteínas e outras estruturas citoplasmáticas; corpúsculos de Bunina, pequenas estruturas eosinofílicas redondas; inclusões eosinofílicas semelhantes aos corpos de Lewy e inclusões com ubiquitina, que podem ser filamentosas ou esféricas [1-3,7,9].

No decorrer da destruição neuronal, as fibras musculares inervadas por estes vão sendo cada vez mais afetadas, levando a um aumento gradual de fraqueza muscular de um

modo assimétrico, ao aparecimento de fasciculações que progride para uma ausência total de atividade muscular, o que leva à atrofia de diversos grupos musculares [1-3,7,9].

## 1.4 - Manifestações clínicas

As manifestações desta doença são progressivas e variam dependendo da localização do neurónio motor envolvido, embora o quadro clássico da ELA é a de um paciente com uma deterioração motora progressiva que se manifesta com sinais e sintomas e ambos os neurónios superior e inferior. É importante considerar nesta hipótese de diagnóstico quando um paciente apresenta uma combinação de fraqueza marcada e fadiga, com reflexos vivos e espasticidade acompanhado de reflexos patológicos [1-3,7].

O quadro de fraqueza pode se iniciar numa área focal, com progressão para os grupos musculares contíguos da mesma região antes de haver envolvimento de regiões mais distantes. Mais comumente ocorre fraqueza de um membro, em músculos que derivam do mesmo nervo periférico e/ou raiz nervosa [1-4, 7]. As extremidades superiores são mais acometidas que as inferiores (clássica ou ELA espinal), mas em 25% dos casos pode acometer primeiro a musculatura inervada pelo bulbo (ELA de início bulbar) [1]. Numa minoria dos casos, cerca de 1-2% e mais frequentemente em indivíduos do sexo masculino, pode ter atingimento precoce da musculatura torácica e respiratória [1-7].

Dependendo do local inicialmente acometido, os sintomas de fraqueza têm diferentes formas de apresentação [1,3,7,9]. O atingimento das extremidades superiores e inferiores ocorrem geralmente de forma assimétrica, acompanhado por câibras com os movimentos voluntários nas primeiras horas da manhã, abalos espontâneos das unidades motoras ou fasciculações e os sintomas são exacerbados com temperaturas baixas [3]. Nas mãos é mais comum o predomínio de fraqueza extensora, podendo dar origem a “mãos em garra”. Nos membros inferiores por sua vez, a manifestação inicial mais comum é a perda de capacidade extensora do pé, provocando a queda do pé. Outras queixas deste atingimento inferior são a perda de equilíbrio e a instabilidade da marcha [1,7]. Com a progressão da doença e o maior envolvimento muscular, para além dos movimentos finos há também atrofia de grupos musculares maiores e conseqüentemente uma maior perda de funções. A fraqueza dos segmentos cervical e torácico dos músculos paraespinais leva à “queda da cabeça” para a frente [1,7].

Embora o acometimento possa ter um início assimétrico, mais tarde ou mais cedo os outros membros são também atingidos e um grande número de pacientes desenvolve sintomas bulbares e respiratórios [1-3,7].

Por sua vez, aquando do comprometimento da musculatura bulbar as manifestações vão ser mais superiores. Normalmente apresentam dificuldade na mastigação, na deglutição com presença de disfagia para sólidos ou líquidos (dependendo do grau de afetação). Esta dificuldade faz com que os doentes desenvolvam sialorreia por acumulação das secreções salivares e incapacidade de as deglutir continuamente. Há também a diminuição dos movimentos da região inferior da face e da língua, contribuindo para a dificuldade na mastigação e deglutição e para os movimentos fonéticos da comunicação, gerando uma voz nasalada num considerável número de doentes [1-3,7].

A degenerescência dos neurónios das projeções corticobulbares do tronco encefálico faz com que os doentes apresentem disartria, que em quadros iniciais pode ser apenas aparente após ingestão de pequenas quantidades de álcool. Os doentes podem também apresentar “afeto pseudobulbar”, que consiste em um aumento da labilidade emocional acompanhada por um exagero nas expressões motoras das emoções, com excesso de riso ou de choro. No caso de uma ELA com início bulbar, o atingimento dos membros pode ocorrer simultaneamente ou no decorrer do primeiro ou segundo ano após o início dos sintomas [1-3,7].

O comprometimento das vias corticoespinhais leva a um aumento da reatividade dos reflexos tendinosos tanto nos locais com marcada afetação, como nas regiões aparentemente não acometidas, sendo um achado muito útil no exame objetivo. Há também resistência espástica à movimentação passiva nos membros acometidos, acompanhados ou não por rigidez muscular. Em fases mais avançadas da doença, os doentes podem apresentar “espasmos de flexão”, que são espasmos involuntários que ocorrem durante o excesso de ativação do arco flexor no membro espástico [1-3,7].

Cerca de 5% dos casos, os pacientes apresenta dificuldade respiratória sem outros sintomas relevantes [3,10]. O quadro inicial engloba uma insuficiência respiratória tipo 2 ou hipoventilação noturna com dispneia, ortopneia, sono segmentado, cefaleias matinais, sonolência diurna excessiva, anorexia, diminuição da concentração, irritabilidade ou alterações bruscas de humor [10].

Existe ainda uma certa seletividade nos neurónios que são afetados e nos que não. Observou-se que os neurónios sensoriais são poupados desta patologia, tal como os responsáveis pelos mecanismos de regulação para o controlo e coordenação dos movimentos. Em estadios iniciais e intermédios da doença os neurónios da motilidade ocular e os parassimpáticos da medula espinhal sacral (aqueles que inervam os esfíncteres do intestino e da bexiga) são poupados, embora em estadios muito avançados da doença acabam também por ser atingidos [1-3,7,9].

Qualquer grupo muscular pode ser o primeiro a evidenciar sinais da doença, mas com o passar do tempo cada vez mais grupos musculares vão sendo envolvidos até que a doença

apresente um padrão simétrico. Por fim, complicações pulmonares e a própria paragem respiratória vão acabar por colocar fim à vida destes pacientes [1-3,7,10].

## 1.5 - Diagnóstico

A ELA é diagnosticada quando há envolvimento simultâneo dos neurónios motores superiores e inferiores, acompanhado de uma fraqueza progressiva [1-3,6,7,9]. O diagnóstico é clínico mas ao longo do tempo e com a descoberta de outras doenças do neurónio motor, esta forma de diagnóstico é pouco precisa, mesmo depois de excluídas outros diagnósticos diferenciais [1,2,7]. Num consenso da *World Federation of Neurology* foi estabelecido em 1990, em Espanha, critérios de diagnóstico que foram de suma importância no diagnóstico desta patologia, “El Escorial”. Em 1998 foram modificados em Airlie House, na Virgínia [11,12]. Estes critérios contemplam hoje em dia componentes clínicos, eletrodiagnósticos e patológicos e foram estabelecidos não só para o diagnóstico da patologia, mas também para a facilitar a inclusão/exclusão dos pacientes em ensaios clínicos [11-13].

O critério clínico divide os candidatos em grupos com base numa história clínica detalhada e examinação cuidada de quatro regiões importantes: bulbar, cervical, torácica e lombossagrada [1,11-13].

O diagnóstico de ELA requer:

1. Presença de:
  - a. Evidência de degeneração do neurónio motor inferior (NMI) por exame clínico, eletrofisiológico ou neuropatológico;
  - b. Evidência de degeneração do neurónio motor superior (NMS) por exame clínico, eletrofisiológico ou neuropatológico;
  - c. Progressão da síndrome motora dentro de uma região ou para outras regiões, determinado pela história clínica ou exame objetivo; e
2. Ausência de:
  - a. Evidência eletrofisiológica ou patológica de outros processos patológicos que possam explicar os sinais de degeneração do NMI ou NMS;
  - b. Evidência de neuroimagem de outros processos patológicos que possam explicar os sinais clínicos e eletrofisiológicos observados.

Tendo em conta estes princípios acima descritos, os pacientes são divididos em grupos tendo em conta os diferentes critérios. Segundo os critérios El Escorial os pacientes dividem-se em ELA definitiva, ELA provável, ELA possível e ELA suspeita. (Tabela 1). Por sua vez, os critérios de Airlie House, ou El Escorial modificado, determina quatro grupos distintos: ELA

cl clinicamente definitiva, ELA clinicamente provável, ELA clinicamente provável com suporte laboratorial e ELA possível (Tabela 2).

Tabela 1 - Classificação por grupos pelos Critérios El Escorial (Traduzido de [11])

<b>Critérios El Escorial</b>	
<b>ELA definitiva</b>	Atingimento do neurónio motor superior (NMS) e do inferior (NMI) em três regiões.
<b>ELA provável</b>	Atingimento do NMS e NMI em pelo menos duas regiões com sinais de NMS superiores aos do NMI.
<b>ELA possível</b>	Atingimento do NMS e NMI numa região; ou atingimento do NMS em duas regiões; ou atingimento do NMI superior ao do NMS.
<b>ELA suspeita</b>	Atingimento do NMI apenas em duas ou mais regiões.

Tabela 2 - Classificação por grupos pelos Critérios de Airlie House - El Escorial Modificado (Adaptado e traduzido de [12])

<b>Critérios Airlie House - El Escorial modificado</b>	
<b>ELA clinicamente definitiva</b>	Evidência clínica isolada de atingimento do NMS e NMI em três regiões.
<b>ELA clinicamente provável</b>	Evidência clínica isolada de atingimento do NMS e NMI em pelo menos duas regiões com alguns sinais do NMS de nível superior ao do NMI.
<b>ELA clinicamente provável - com suporte laboratorial</b>	Atingimento clínico de disfunção do NMS e NMI em apenas uma região, ou atingimento isolado do NMS numa região com atingimento do NMI definido por critérios de eletromiografia em pelo menos dois membros, juntamente com a aplicação apropriada de neuroimagem e protocolos laboratoriais clínicos que excluam outras causas.
<b>ELA possível</b>	Atingimento clínico de disfunção do NMS e NMI em apenas uma região, ou atingimento do NMS isolado em duas ou mais regiões; ou atingimento do NMI superior ao do NMS e o diagnóstico de ELA clinicamente provável com suporte laboratorial não possa ser provado.

Mais recentemente em 2006, numa conferência em Awaji-shima no Japão debateu-se os critérios diagnósticos da ELA e a importância dos achados eletrofisiológicos como complementar à informação clínica contemplada nestes. O algoritmo de Awaji acrescentou aos critérios a presença de potenciais de fasciculação achados no eletromiograma, como

sendo representativos de desnervação aguda complementando os achados clínicos de desnervação crónica [13].

Num estudo realizado por Carvalho and Swash (2009) comparando os critérios El Escorial modificado isoladamente e em conjunto com o algoritmo de Awaji, determinaram com esta ultima modalidade conseguiram obter um aumento na sensibilidade no diagnóstico da ELA bulbar de 38% para 87% [14]. Noutro estudo realizado, com o uso combinado dos grupos de critérios atingiu-se uma especificidade na ordem dos 95% [13], sugerindo que o uso conjunto dos critérios do El Escorial modificado e o algoritmo de Awaji uma mais-valia no diagnóstico da ELA (Tabela 3).

Tabela 3 - Recomendações do consenso de Awaji-shima para a aplicação de testes eletrofisiológicos no diagnóstico de ELA, aplicado aos critérios El Escorial modificado (Airlie House 1998) (Adaptado e traduzido de [15])

### 1. Princípios (dos critérios de Airlie House)

O diagnóstico de esclerose lateral amiotrófica (ELA) requer:

(A) Presença de:

- a) Evidência de degeneração do neurónio motor inferior (NMI) por exame clínico, eletrofisiológico ou neuropatológico;
- b) Evidência de degeneração do neurónio motor superior (NMS) por exame clínico, eletrofisiológico ou neuropatológico;
- c) Progressão dos sinais ou sintomas motores numa determinada região ou para outras, determinado pela história clínica, exame objetivo ou exames eletrofisiológicos; e

(B) Ausência de:

- a) Evidência eletrofisiológica ou patológica de outros processos patológicos que possam explicar os sinais de degeneração do NMI e/ou NMS; e
- b) Evidência de neuroimagem de outros processos patológicos que possam explicar os sinais clínicos e eletrofisiológicos observados.

### 2. Categorias diagnósticas

*ELA clinicamente definitiva* - Evidência clínica ou eletrofisiológica de atingimento do NMS e NMI na região bulbar e em pelo menos duas regiões medulares; ou a presença de sinais de atingimento do NMS e do NMI em três regiões medulares.

*ELA clinicamente provável* - Evidência clínica ou eletrofisiológica de atingimento do NMS e NMI em pelo menos duas regiões com alguns sinais de atingimento do NMS necessariamente mais superiores aos do NMI

*ELA clinicamente possível* - Evidência clínica ou eletrofisiológica de atingimento do NMS e NMI em apenas uma região; ou sinais de atingimento do NMS isolado em duas ou mais regiões; ou sinais de atingimento do NMI mais superiores aos do NMS. Estudos clínicos laboratoriais e neuroimagiológicos devem ter sido realizados e outras patologias excluídas.

**Nota:** estas recomendações enfatizam a equivalência entre testes clínicos e eletrofisiológicos em mudanças neurogénicas estabelecidas em regiões do corpo. A categoria de “ELA clinicamente provável suportada por laboratório” é considerada redundante.

## 1.6 - Abordagem terapêutica

A esclerose lateral amiotrófica é uma doença progressiva e fatal, ainda sem armas terapêuticas que consigam mudar o desfecho desta patologia. O único fármaco usado atualmente é o Riluzole, um fármaco com propriedades anti-excitotóxicas que diminui subtilmente a progressão da doença, aumentando a sobrevida em cerca de 2-3 meses [2, 9, 16].

Para além do fármaco referido, a terapêutica desta doença é apenas sintomática e de suporte (Tabela 4) [3]. Acompanhando as medidas ativas sobre o doente com ELA é importante fornecer cuidados psicológicos permanentes e fisioterapia, sendo de elevada importância a participação do paciente no decorrer da patologia [1,7].

Tabela 4 - Tratamentos sintomáticos para a ELA (Adaptado e traduzido de [3])

	<b>Fármacos</b>	<b>Outros tratamentos</b>
<b>Cãibras</b>	Carbamazepina Fenitoína Quinina	Fisioterapia, exercício físico, Massagem, Hidroterapia
<b>Espasticidade</b>	Baclofen Tizanidina Dantrolene Toxina botulínica tipo A	Fisioterapia Hidroterapia Crioterapia
<b>Sialorreia</b>	Atropina Hioscina Glicopirrolato Amitriptilina	Mecanismo de aspiração, nebulização, humidificador, injeções de toxina botulínica nas glândulas parótidas irradiação das glândulas salivares
<b>Salivação persistente e secreções brônquicas</b>	Carbocisteína Propranolol metoprolol	Mecanismo de aspiração Re-hidratação, diminuição da ingesta diária de produtos lácteos, álcool e cafeína
<b>Bocejo excessivo</b>	Baclofen	
<b>Laringospasmo</b>	Lorazepam	
<b>Dor</b>	Analgésicos, anti-inflamatórios não esteroides, opióides Antidepressivos tricíclicos	Medidas de conforto
<b>Labilidade emocional</b>	Inibidores seletivos da recaptação de serotonina Levodopa, quinidina ou dextrometorfano	
<b>Dificuldades na comunicação</b>		Técnicas de linguagem, material auxiliar de comunicação, amplificadores de voz, outras tecnologias
<b>Obstipação</b>	Lactulose	Hidratação, aumento da ingesta de fibras
<b>Depressão</b>	Amitriptilina, escitalopram	Apoio psicológico, aconselhamento
<b>Insónia</b>	Amitriptilina, zolpidem	Conforto, analgesia
<b>Ansiedade</b>	Lorazepam	Apoio psicológico, aconselhamento
<b>Fadiga</b>	Modafinil	

## Capítulo 2 - Patofisiologia

A esclerose lateral amiotrófica é uma doença cuja etiologia permanece desconhecida, assim como muitos dos mecanismos de progressão da doença. Ao ser uma doença rapidamente progressiva, com uma duração média de 3-5 anos desde o diagnóstico até à morte, e ainda sem cura torna-se um alvo preferencial de diversos estudos epidemiológicos, laboratoriais e genéticos [1-5,7,9].

### 2.1 - Fatores de risco

Volumosa tem sido a quantidade de dados que apontam para a existência de determinados fatores relacionados com o início da doença, tanto exógenos como endógenos. Prováveis agentes etiológicos ou apenas fatores desencadeantes, diversos fatores parecem estar relacionados com o aumento da incidência desta patologia em determinados grupos populacionais.

O estudo de fatores de risco exógeno tem resultado num número cada vez maior de possíveis agentes etiológicos, embora poucos tenham demonstrado uma correlação forte para a gênese da doença. Os fatores genéticos, por sua vez, têm ganho cada vez mais relevância no seio da etiologia da ELA e estão a ser cada vez mais explorados. Os resultados dos estudos têm sido promissores, embora seja apenas um pequeno passo para a descoberta do verdadeiro mecanismo patofisiológico desta doença progressiva e fatal.

#### 2.1.1 - Fatores de risco exógenos

Frente ao desconhecimento da etiologia da ELA e à predominância dos casos esporádicos sobre os familiares (sendo que a ELA familiar conta com cerca de 10% dos casos) [1-4,6,7-9] muitos investigadores questionam a possibilidade de existirem fatores de risco exógenos na gênese desta doença do neurónio motor.

Uma das primeiras hipóteses em causa foi a incidência da ELA em desportistas profissionais. O início dos trabalhos sobre esta relação remonta à década de 30, quando o famoso jogador de basebol Lou Gehrig foi diagnosticado com ELA [1-3,7]. Para além de ter dado outra designação à esclerose lateral amiotrófica nos Estados Unidos da América, como doença de Lou Gehrig, chamou também a atenção ao número relativamente elevado de

desportistas profissionais que no fim das suas carreiras apresentavam sintomas de fraqueza muscular e mais tarde eram diagnosticados com a doença [1-4,6-8].

Recentemente um estudo revelou a existência de uma associação positiva entre a incidência da ELA em jogadores de futebol americano, com uma mortalidade por esta doença neurodegenerativa cerca de 4 vezes superior nestes praticantes em relação à comunidade norte-americana em geral [17]. Ainda não está esclarecido o mecanismo que leva a esta associação, mas debate-se ainda se a prática de futebol americano profissionalmente será um fator de risco para o surgimento da patologia ou se estará associado a uma pré-disposição genética ou ao elevado número de traumatismos que advém dessa prática [3,17].

O trauma físico, englobando tanto traumatismos cranianos como os musculares, foi considerado um possível fator de risco para esta doença [6,17,18]. As lesões das fibras nervosas e musculares, com posterior regeneração desencadeiam processos de inflamação e cicatrização. A estimulação contínua dos mecanismos inflamatórios (ativação da microglia, libertação de mediadores pró-inflamatórios, entre outros) pode levar a dano neuronal e posterior morte celular [1,5,19,20]. Segundo estudos realizados por Armon e Chen (2007) a relação entre o trauma sucessivo e o aumento da incidência da ELA é inconclusiva, sugerindo que as lesões contínuas podem ser etiologicamente significativas em conjunto com outros fatores de risco, não isoladamente [19,20].

Na última década observou-se que um considerável número de antigos jogadores de futebol da Liga Italiana foi diagnosticado com ELA anos após a sua retirada do futebol profissional. Diversos estudos foram conduzidos para determinar se existiria uma relação causal e se se poderia considerar um possível fator de risco. Estudos realizados observaram que a incidência desta doença do neurónio motor dentro dos antigos jogadores de futebol profissional era superior à da população em geral em cerca de 10 vezes, que a idade média de surgimento da doença era em média aos 42 anos (em comparação com os 55-65 anos de idade na população em geral [1-4,9]) e que 2/3 dos indivíduos apresentava manifestações iniciais de predomínio bulbar [21,22]. Um dado relevante nestes indivíduos é que nenhum apresentava história familiar de ELA ou de alguma doença neurodegenerativa [21,22]. Dentro destes antigos jogadores observou-se que os indivíduos que jogavam como médios apresentavam uma incidência superior ao das outras posições em campo e que durante a prática desportiva apresentavam um aporte de oxigénio aos tecidos em relação à sua massa corporal muito superior aos dos outros jogadores e que estavam sujeitos a maior número de traumatismos que os restantes [21]. Comparado com outros dois grupos de desportistas, nomeadamente jogadores de basquetebol (com grande número de traumatismos) e ciclistas profissionais (com grande aporte de oxigénio aos tecidos), não foi possível obter uma relação causa-efeito, concluindo que nenhum destes fatores seriam fatores de risco isolado [21]. Quando inquiridos quanto ao uso de substâncias ilícitas durante a prática desportiva, a grande maioria dos praticantes de futebol profissional admitiu ter consumido substâncias para aumentar o

rendimento físico [19,20,23,24], podendo ser este um dos fatores determinantes para a etiologia da doença. Outro dos fatores estudados foi a exposição ocupacional aos campos de futebol, geralmente tratados à base de herbicidas, inseticidas e outras substâncias tóxicas, pondo em causa um fator ambiental na gênese da doença neste grupo de indivíduos [21,22,24].

A realização de atividade física regular (não profissionalmente) foi também alvo de estudos epidemiológicos como possível fator de risco para o desenvolvimento desta doença do neurónio motor, embora a associação tenha pouco ou nenhum significado estatístico [18,25]. Num estudo realizado recentemente foi possível observar um risco maior de ELA associado a maiores níveis de atividade física de lazer [26]. Os investigadores colocam ainda em causa a existência de um perfil genético associado à prática de exercício físico, atuando como fatores contribuintes para o aumento da suscetibilidade para o surgimento da patologia [3, 26].

Após a guerra do Golfo (2 de Agosto 1990 - 28 de Fevereiro 1991) [27] muitos foram os veteranos diagnosticados com ELA anos após a cessação bélica. Foram realizados diversos estudos para apurar a relação entre a prestação de serviços na guerra do Golfo e o aumento da incidência da patologia. Diversos estudos demonstraram uma associação positiva e estatisticamente significativa entre o serviço militar durante a Guerra do Golfo e o aumento da incidência de ELA [28-30]. A pré-disposição genética neste caso não foi relevante, pois apenas um número mínimo de indivíduos apresentavam história familiar de doenças neurodegenerativas. Segundo este estudo de Miranda et al. de 2008, a incidência de ELA chegou a 11,8 em cada 100.000 habitantes/ano [29], um valor muito superior à população em geral (cerca de 1-3 casos/100.000 por ano) [1-3,5]. Não foi possível isolar os fatores de risco, mas pensa-se que a exposição a químicos bélicos, o aumento das situações de *stress* em pleno campo de batalha e alguma influência genética possam ser determinantes para a patogénese desta doença [3, 28-30].

Os hábitos tabágicos, além de serem um determinante fator de risco cardiovascular, têm também uma correlação com o desenvolvimento da ELA. Muitos foram os estudos realizados há uma relação positiva entre o tabagismo e o desenvolvimento da doença [31,32]. Ainda é cedo para se considerar o tabagismo como fator de risco independente, necessitando de mais estudos para esclarecer o seu efeito sobre a doença [1,2,32].

A exposição a toxinas pode ser um fator de risco importante para a ELA. Estudos sobre a variante ELA-parkinsonismo do Pacífico Ocidental (ELA do Guam) revelaram uma forte associação entre a ingestão prolongada de sementes da palmeira *Cycas circinalis* e o aparecimento de disfunção do neurónio motor na população local que ingeria frequentemente essas sementes, sendo depois demonstrado em modelos animais essa associação [9, 33]. Outro estudo realizado teve como base a comparação de indivíduos residentes em áreas rurais, urbanas e suburbanas, onde foi possível determinar que existia apenas uma relação positiva entre o aumento da incidência de ELA em pacientes que viviam em ambientes rurais e que

estavam ligados à agricultura. Constatou-se que estes indivíduos tiveram exposição prolongada a diversos produtos químicos utilizados na agricultura, enquanto que outros residentes em áreas semelhantes sem atividades agrícolas não apresentavam os mesmos resultados [34].

Os metais pesados são substâncias intimamente relacionadas com o dano do SNC e periférico, como foi observado em diversas doenças ocupacionais derivadas de exposições prolongadas a estes [35,36]. Uma das condições mais comuns, a intoxicação por chumbo, leva a um quadro patológico caracterizado por fraqueza muscular nas extremidades (mãos, punhos, pés, tornozelos), dado este que conduziu a hipótese de ser um possível fator de risco para a ELA [35-37]. Pouca ou nenhuma evidência foi encontrada que relacionasse a exposição ao chumbo e o aumento da doença propriamente dita. Outros compostos como o mercúrio e o cádmio foram também estudados, mas os seus resultados demonstraram-se inconclusivos [36,37].

Na análise de outras substâncias, observou-se que a exposição prolongada ao selênio (usado em inseticidas) tem uma relação positiva com o aumento da incidência da doença, assim como a exposição a pesticidas [36]. Estes dois fatores podem funcionar como desencadeantes ou como agentes causais, mecanismo este que se encontra em estudo, embora tenha sido provado em ratos que o selênio apresenta seletividade para os neurónios motores [36].

O dano por choque elétrico moderado a severo leva a uma alteração na condução do impulso nervoso através da medula espinhal, o que fez com que se aumentasse a suspeita deste evento ser um fator desencadeante da ELA [3,38]. A corrente elétrica de alta voltagem pode levar a dano tanto do NMS como do NMI, embora não seja progressiva poderia levar a alterações dos mecanismos de morte neuronal e culminar no desencadear da ELA. Estudos revelam que pode ser um fator não-causal, mas que pode atuar como desencadeante de uma doença já em desenvolvimento [38].

Outro fator que pode estar relacionados é a raça, uma vez que a incidência da doença é superior em indivíduos caucasianos do que em africanos, asiáticos ou hispânicos. Decorrem estudos epidemiológicos para determinar se de fato existe uma correlação, ou se apenas é devido a um maior enfoque nos estudos sobre a população caucasiana [39]. Considera-se há bastante tempo a hipótese da dieta ter um papel como fator de risco exógeno na etiopatogénese, mas ainda não se obteve nenhum resultado estatisticamente significativo [40].

Presentemente decorrem inúmeros estudos epidemiológicos e laboratoriais para a determinação de outros fatores de risco da ELA. Embora já sejam conhecidos alguns que parecem estar relacionados com uma maior incidência, ainda não é claro se são

determinantes ou não. Cada vez mais se suspeita que estes fatores atuem em conjunto entre eles ou sobre o perfil genético do indivíduo. [1,3,6,7,9]

### 2.1.2 - Fatores genéticos

Apesar de contar apenas com 10% dos novos casos de ELA, os fatores genéticos têm cada vez mais importância na gênese da doença do neurônio motor, apesar de na maioria das vezes ser indistinguível da forma esporádica [1-9]. Pensa-se que essa percentagem seja maior à medida que mais mutações vão sendo descobertas e arquivadas [1,3,4,6-9]. De momento foram descobertas diversas mutações com fenótipos semelhantes e outras bastante distintas. Mutações diferentes podem dar o mesmo quadro de ELA, embora a mesma mutação pode apresentar fenótipos diferentes [1-3, 6-8].

A primeira mutação extensivamente estudada foi a do gene SOD1, codificador da proteína cobre-zinco superóxido dismutase [1-3,7,8]. Esta mutação localizada no cromossoma 21 altera a função da proteína SOD1 que, sucintamente, catalisa a reação que transforma o anião superóxido  $\cdot O_2^-$  em peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ). Esta alteração vai fazer com que o anião, que é um radical livre, se acumule e que cause dano celular [8]. É um processo complexo e que será explorado na próxima secção como um dos mecanismos fundamentais na destruição neuronal na patologia da ELA. Está estimado que esta mutação esteja presente em cerca de 20% dos casos herdados geneticamente [1,3,8].

A maioria das mutações, como se pode ver na Tabela 5 é transmitida por hereditariedade autossómica dominante. Existem certos casos como na ELA 2, com mutação em 2q33.1, que apresenta hereditariedade autossómica recessiva assim como a ELA 5 (mutação 15q15.1-21.1) e na ELA 6 (16p11.2). Estas variantes na transmissão genética são acompanhadas também por fenótipos da doença que não são os denominados “clássicos”. Nas duas primeiras mutações referidas, ELA 2 e 5, a idade de aparecimento da doença é muito precoce em relação à idade média de aparecimento, surgindo nas duas primeiras décadas de vida, ao contrário da idade clássica entre os 55-65 anos [3,6,41].

Com base na descoberta deste número elevado de mutações, foi possível evidenciar alterações que estão envolvidas em mecanismos de morte neuronal. Além da mutação que interfere na função da proteína SOD1, foram encontradas outras que interferem na codificação e a formação de outras proteínas. Mutações nos genes codificadores TDP-43, FUS/TLS, OPTN, VCP e UBQLN2 (Tabela 5), por exemplo, levam a alterações na formação das proteínas, tornando-as passíveis de dano neuronal [1-3,5,41]. Um dos achados histológicos mais evidentes nesta patologia é a presença de agregados proteicos nos locais de destruição neuronal, sendo por isso considerado um possível mecanismo implicado na morte neuronal [1-3,5-9,41].

Apesar da existência desta clara transmissão mutagénica de geração para geração, com história familiar positiva para ELA ou outras doenças neurodegenerativas, identificou-se recentemente uma mutação no cromossoma 9, denominada por C9orf72 que se caracteriza por ser uma expansão de um hexanucleótido repetido [6,41]. Esta mutação foi documentada em casos familiares mas foi encontrada também em um pequeno número de casos esporádicos, abrindo caminho para novas investigações sobre esta mutação [6,41].

A genética médica nas últimas décadas tem desvendado cada vez mais aspetos da patofisiologia da ELA, contribuindo para a sua melhor compreensão e abrindo caminho para novos estudos e a formulação de novas hipóteses terapêuticas.

Tabela 5 - Mutações na ELA (compilado e traduzido de [3,5,6,41])

Localização	Fenótipo	Hereditariedade	Gene/Locus
1p36.22	Degeneração lobar frontotemporal, relacionada com TARDBP	AD	TARDBP, TDP43, ALS10
1p36.22	Esclerose lateral amiotrófica 10, com ou sem DFT	AD	TARDBP, TDP43, ALS10
2p13.1	Esclerose lateral amiotrófica, susceptibilidade para ELA	AD	DCTN1, HMN7B
2q33.1	Esclerose lateral amiotrófica 2, juvenil	AR	ALS2, ALSJ, PLSJ, IAHSP
3p11.2	Esclerose lateral amiotrófica 17	AD	CHMP2B, DMT1, VPS2B, ALS17
6q21	Esclerose lateral amiotrófica 11	AD	FIG4, KIAA0274, SAC3, ALS11
9p21.2	Esclerose lateral amiotrófica e/ou demência frontotemporal	AD	C9orf72, FTDALS, ALSFTD
9p13.3	Esclerose lateral amiotrófica 16, juvenil	AD	SIGMAR1, SRBP, ALS16
9p13.3	Esclerose lateral amiotrófica 14, com ou sem demência frontotemporal	AD	VCP, IBMPFD, ALS14
9q34.13	Esclerose lateral amiotrófica 4, juvenil	AD	SETX, SCAR1, AOA2, ALS4
10p13	Esclerose lateral amiotrófica 12	AD	OPTN, GLC1E, FIP2, HYPL, NRP, ALS12
12q13.12	Esclerose lateral amiotrófica, susceptibilidade para ELA	AD	PRPH
12q24.12	Ataxia espinocerebelar 2	AD	ATXN2, ATX2, SCA2, ASL13
12q24.12	Esclerose lateral amiotrófica, susceptibilidade para ELA, 13	AD	ATXN2, ATX2, SCA2, ASL13
14q11.2	Esclerose lateral amiotrófica 9	AD	ANG, RNASE5, ALS9
15q15.1-q21.1	Esclerose lateral amiotrófica 5, juvenil	AR	ALS5
16p11.2	Esclerose lateral amiotrófica 6, com ou sem demência frontotemporal	AR	FUS, TLS, ALS6, ETM4
17p13.2	Esclerose lateral amiotrófica 18	AD	PFN1, ALS18
18q21	Esclerose lateral amiotrófica 3	AD	ALS3
20p13	Esclerose lateral amiotrófica 7	AD	ALS7
20q13.32	Esclerose lateral amiotrófica 8	AD	VAPB, VAPC, ALS8
21q22.11	Esclerose lateral amiotrófica 1	AD	SOD1, ALS1
22q12.2	Esclerose lateral amiotrófica, susceptibilidade para ELA	AD	NEFH
Xp11.21	Esclerose lateral amiotrófica 15, com ou sem demência frontotemporal	AD	UBQLN2, PLIC2, CHAP1, ALS15
Não identificada	Esclerose lateral amiotrófica, juvenil, com demência	AD	ALSDC

## 2.2 - Mecanismos patológicos

A etiologia da ELA permanece envolta num manto de dúvidas e incertezas. Apesar do grande número de mutações genéticas relacionadas e o ainda crescente número de possíveis fatores de risco, o certo é que ainda poucas certezas se têm desta doença do neurónio motor. Diversos mecanismos foram descobertos e relacionados com alterações genéticas, como o da proteína SOD1 entre outras referidas anteriormente [1-3]. Ao explorar a mutação SOD1 foi possível descrever o mecanismo de *stress* oxidativo e a sua relação com a morte neuronal. Também com essa descoberta foram realizadas inúmeras investigações em ratos com esse mutação e desde então os novos achados têm vindo a elucidar o mecanismo que leva à progressiva degenerescência motora [8].

A descoberta do único fármaco que provou ser eficaz em aumentar a sobrevivência (apesar de em pouco tempo), o Riluzole, e das suas propriedades anti-excitotóxicas ajudaram a definir um outro mecanismo que leva à destruição dos neurónios motores - a excitotoxicidade pelo glutamato [9]. Ao ser um neurotransmissor presente por todo o SNC tornou-se alvo de muitos estudos por ter uma capacidade de provocar dano celular em doses pouco mais elevadas que as normais. A seletividade pelos neurónios motores também é um dos aspetos mais intrigantes deste mecanismo cuja resposta ainda permanece incógnita.

O sistema nervoso central (SNC) e periférico são constituídos para além de células nervosas, por células de sustentação. Neste sistema em particular, esse papel é desempenhado pelos astrócitos e pela microglia, entre outros componentes. Estas unidades celulares têm a função de fornecer suporte físico, trófico e imune às células neuronais que envolvem. Um desequilíbrio nas suas funções pode deixar os neurónios vulneráveis e causar dano neuronal. De forma direta ou indireta este é um dos mecanismos mais importantes na génese da patologia, embora ainda estejam em estudo as diferentes formas como este fenómeno ocorre [42].

Os achados histopatológicos que marcam esta patologia são, para além da proliferação da astroglia e da microglia, a presença de material proteico, neurofilamentos, pigmentos e inclusões de ubiquitina [1-3,5,7]. Esta característica está intimamente relacionada com as diversas mutações referidas na subsecção do capítulo anterior - 2.2. Fatores genéticos - pois apresentavam alterações em genes codificadores dessas mesmas proteínas e neurofilamentos, entre outras substâncias. Foram encontradas as mesmas alterações em doentes com ELA esporádica, sem a presença de nenhuma mutação que pudesse ser associada podendo esta alteração proveniente de outros mecanismos ainda em investigação [1-3,5-7].

Dada a ausência de um fenómeno etiológico explicativo de toda a patologia da ELA, muitos mecanismos estão a ser estudados e outros em processo de formulação e

fundamentação. O desequilíbrio imunológico juntamente com as alterações neurovasculares são outros mecanismos prováveis de dano neuronal que possam aumentar incidência e a própria progressão da doença. Foi constatado que as infecções virais também influenciam a degenerescência dos neurónios motores [1-3,6,7]

### 2.2.1 - *Stress Oxidativo*

Uma das mutações genéticas mais estudadas no âmbito da ELA é sem dúvida a mutação da proteína cobre-zinco superóxido dismutase (SOD1). Foi a primeira mutação associada à ELA familiar, embora se saiba que esta corresponde apenas a 20% dos casos familiares [1-3,5,7]. Esta mutação está presente no cromossoma 21, tem hereditariedade autossômica dominante e manifesta-se por um quadro típico de ELA [2,3,6,8,41].

A proteína SOD1 atua sobre radicais livres de oxigénio ( $\cdot O_2$ ) dando origem a moléculas estáveis de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ). A mutação nessa proteína impede essa reação provocando a acumulação de radicais livres de oxigénio que ao serem tóxicos, provocam dano celular. Com o excesso de radicais livres de  $O_2$ , estes reagem com o óxido nítrico (NO), dando origem a peroxinitrito ( $ONOO\cdot$ ) que posteriormente reage com metais, formando radicais hidroxilo altamente reativos. Todos estes processos originam dano celular diretamente por reações de oxidação e por mecanismos indiretos [8,43].

Este mecanismo apresenta um fator atenuante, que faz com que a sua progressão não seja exponencial. As proteínas mutantes apresentam uma instabilidade molecular que faz com que o seu tempo de semi-vida seja mais curto, fazendo com que as proteínas sem a mutação continuem com o seu processo normal. Estas proteínas alteradas também têm a particularidade de se associarem ao ferro e metabolizarem o peróxido de hidrogénio em radicais hidroxilo, aumentando o dano celular. Foi também observado que as proteínas com a mutação SOD1 reagem sobre o peroxinitrito, reação essa que produz substâncias que interferem com o funcionamento normal das tirosinas quinase, diminuindo a sua ação na agregação dos neurofilamentos, provocando a sua acumulação nos tecidos [8,43].

Para além da ação direta sobre as células, foi observado que a proteína mutante tem um papel na ativação das vias de morte celular programada. A mutação SOD1 tem características pró-apoptóticas, aumentando a atividade das caspases essenciais para a apoptose. O aumento da atividade dessas caspases é feita, em parte, pelo aumento da concentração dos radicais livres de oxigénio que ativam vias apoptóticas. Constatou-se in vitro e in vivo que estas vias são inibidas quando administradas preparações contendo enzimas que provocam destruição de caspases [8].

Esta mutação é responsável também pela alteração da morfologia mitocondrial. Foi observado em diversos estudos que há um aumento do influxo dos iões cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) para o interior das mitocôndrias, provocando a libertação de maiores quantidades de radicais livres [3, 8, 43]. Além desse mecanismo, com o aumento da concentração do  $\text{Ca}^{2+}$ , a formação de ATP vai ser prejudicada, favorecendo o desgaste celular e conseqüentemente a morte. Esta destruição do neurónio pode suceder pela fadiga energética contínua ou despoletada pelo aumento da atividade mitocondrial devido aos mecanismos excitatórios provocados pelo glutamato, que leva a um maior influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e maior desgaste energético [1,3,8,9,43].

Esta mutação e conseqüente formação de proteínas alteradas não são exclusivas dos neurónios motores, estando presentes em outros locais do SN. Pensa-se que esta seletividade se possa dever ao grande tamanho dos neurónios motores, à sua grande atividade metabólica, à complexidade do citoesqueleto, ao baixo tamponamento do  $\text{Ca}^{2+}$  do neurónio devido à baixa quantidade de proteínas que se ligam a esse ião e talvez à maior densidade de recetores de glutamato na superfície neuronal [8,43].

De qualquer um dos modos, não é um mecanismo que atue isoladamente. Cada vez mais se observam sinergismos e inter-relações entre os mecanismos patológicos que levam à destruição neuronal [1-3,6,8,9].

### 2.2.2 - Excitotoxicidade pelo Glutamato

O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante do cérebro e da medula espinhal e está envolvido em quase todas as funções de processamento de sinal no sistema nervoso central, assim como se encontra alterado em diversas doenças deste [44-46].

Elevações dos níveis de glutamato no plasma e no líquido céfalo-raquidiano (LCR) foram documentados num número elevado de pacientes com ELA [47,48]. Além disso, sabe-se que este neurotransmissor desempenha um papel fulcral na fisiopatologia complexa desta doença multifatorial [5], uma vez que o único fármaco demonstrado que abranda a progressão da doença, o Riluzole, tem propriedades anti-excitotóxicas e que provoca a inibição da libertação do glutamato no neurónio pré-sináptico [9, 47].

Durante a neurotransmissão glutaminérgica, o glutamato libertado pelo neurónio pré-sináptico liga-se a recetores específicos no neurónio pós-sináptico. A ativação desses recetores resulta num influxo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  para dentro da célula, levando a uma despolarização e à geração de um potencial de ação [9]. Excitotoxicidade ocorre quando os recetores são estimulados exageradamente, causando degeneração neuronal [1, 3, 7, 9, 47].

A excitotoxicidade pode ocorrer por dois mecanismos. O primeiro, por excitotoxicidade clássica que ocorre quando existe um aumento do glutamato extracelular

que leva a degeneração neuronal, podendo ser devido a um aumento dos níveis libertados pelo terminal pós-sináptico ou quando há uma captação insuficiente pelos neurónios pós-sinápticos ou pelas células envolventes, os astrócitos [9,45-47].

No segundo, por excitotoxicidade lenta, quando ocorre morte de um neurónio pós-sináptico previamente lesado na presença de níveis normais de glutamato na fenda sináptica. No caso de neurónios com algum tipo de distúrbio da função mitocondrial, como no caso em que apresentem a mutação do gene SOD1, o metabolismo de produção de ATP é insuficiente e o neurónio ao não conseguir satisfazer todos os processos dependentes de ATP (como na neurotransmissão) vai ficando cada vez mais lesado, culminando na morte da célula neuronal [8,9,45-47]

Com isto, a função glial de recrutamento de glutamato é de suma importância para recaptação do neurotransmissor, diminuir a sua concentração na fenda sináptica e diminuir a lesão da célula neuronal. Uma alteração nesta função glial pode aumentar ainda mais os efeitos excitotóxicos, atuando sinergicamente [9, 42,47,49].

Existem dois tipos de recetores de glutamato no terminal pós-sináptico: os ionotrópicos, que atuam como canais de catiões sendo estes os recetores de N-metil-D-aspartato (NMDA), os de alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e os de cainato (receptores de cainato); e os metabotrópicos, que são ligados à proteína G e a sistemas de segundo-mensageiro [9].

Os recetores metabotrópicos atuam como sensores da homeostase do glutamato, modulando a sua expressão e atividade dos transportadores de glutamato [50,51]. Ainda se desconhece o processo, mas foram encontrados estes recetores nos neurónios motores núcleos de Onuf, oculomotores e trocleares (neurónios que não são afetados na ELA) sugerindo que estes recetores possam ter um papel protetor, embora o mecanismo como o façam permaneça em estudo. [9,50,51].

A ativação dos recetores ionotrópicos NMDA e AMPA provocam o influxo de iões cálcio ( $Ca^{2+}$ ), de sódio ( $Na^+$ ) e o efluxo de iões de potássio ( $K^+$ ). O influxo excessivo de  $Ca^{2+}$  pode induzir a morte dos neurónios pós-sinápticos. Um dos mecanismos estudados é a ativação de diversas enzimas nomeadamente lípases, fosfolipases, protéases, endonucleases, NO sintetase entre outras que vão provocar desequilíbrios na homeostase celular; um outro mecanismo mais estudado é a disfunção mitocondrial por excesso de iões cálcio provocada pela excessiva captação desses iões que gera a formação de radicais livres de oxigénio e consequentemente dano celular [3, 8, 9, 47].

Tendo em conta que o glutamato está presente por todo o SNC, a questão que se coloca é sobre o mecanismo que leva à seletividade dos neurónios motores na patologia desta doença. Estudos realizados demonstraram que os NM são particularmente vulneráveis a excitotoxicidade mediada por recetores AMPA. A administração de agonistas dos recetores

AMPA em ratos levou a morte dos neurónios motores, mas não em outros tipos de células nervosas [9, 47,48]. De momento decorrem estudos sobre a utilização de antagonistas dos recetores AMPA para a diminuição dos efeitos tóxicos por este mecanismo [9, 48].

Os neurónios motores contêm proteínas que se ligam ao cálcio, parvalbumina e calbindina, em menor quantidade comparando com células neuronais dos núcleos de Onuf, neurónios oculomotores, trocleares e abducentes. Esta diferença explica-se pela necessidade dos neurónios motores em geral necessitarem de mais iões de cálcio para a performance de atividades rítmicas de alta frequência, ao contrário que as outras. Esta diferença ajuda a compreender um dos mecanismos pelo qual estes neurónios (núcleo de Onuf, oculomotores, trocleares, etc) são pouco ou nada afetados no decorrer da ELA [1-3, 6,7,9,44].

Os recetores AMPA são constituídos por tetrâmeros com 4 subunidades com diferentes combinações (GluR 1-4). Uma destas subunidades, a GluR-2 tem uma configuração distinta, pois apresenta uma arginina carregada positivamente no seu interior que repele os iões de cálcio e impede a sua passagem por esse recetor. A formação desta subunidade deve-se a uma alteração na transcrição do mRNA, embora se pense que poderá também advir de uma mutação [9, 48]. Foi observado uma diminuição desses canais impermeáveis ao  $Ca^{2+}$  em doentes com ELA, embora pareça estar apenas presente em casos esporádicos e ausente em ratos com a mutação SOD1 [9,52].

A toxicidade provocada pelo glutamato é também consequente de uma diminuição pela captação pelos astrócitos, como foi referido anteriormente [1,7,9,27]. Estas células que envolvem os neurónios apresentam na sua membrana transportadores EAAT2/GLT-1, que apresentam grande afinidade pelo glutamato. Foi constatado uma diminuição deste transportador em áreas concretas do córtex motor e medula espinhal, embora ainda se desconheça a razão [9]. Permanece em curso diversos estudos e investigações na procura de alguma mutação no gene do transportador, embora tenham sido encontradas transcrições aberrantes do EAAT2/GLT-1 em áreas afetadas pela doença em casos de ELA esporádica [53], o que abre as portas a novos estudos não só no âmbito da forma familiar da doença, mas também na esporádica.

Recentemente constatou-se que os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos atuavam como potentes estimuladores da expressão do EAAT2/GLT-1, nomeadamente o ceftriaxone aumentou in vitro e in vivo o transporte do glutamato pelo EAAT2/GLT-1 [54]. Para além do efeito neste mecanismo, observou-se que a administração de ceftriaxone em ratos com a mutação SOD1 aumentava a sobrevivência em cerca de 11%, assim como prevenia a perda de NM e a astrogliose [54].

Sendo um dos mecanismos mais explorados, o papel do glutamato como excitotóxico e a sua relação com outros mecanismos de dano neuronal são dados de extrema importância

para a compreensão da patogénese da doença, assim como um bom ponto de partida para a formulação de novas hipóteses e tratamentos no combate desta patologia tão devastadora.

### 2.2.3 - Agregação proteica

Como já referido anteriormente, maioria das mutações genéticas relacionadas com o desenvolvimento da ELA está relacionada com alterações em genes codificadores de proteínas como por exemplo a TDP-43, FUS/TLS, OPTN, VCP, UBQLN2 (Tabela 5) [1-3,5,41]. Estas alterações podem resultar na perda de funções de proteínas específicas, como o caso da SOD1, pelo ganho de funções neurotóxicas ou funções mistas. Apesar de serem crescentes as hipóteses etiológicas desta patologia, uma marca da patologia da ELA é a acumulação de proteínas insolúveis que formam agregados intracelulares com diferentes morfologias [1-3, 5,6,41].

A esclerose lateral amiotrófica é muitas vezes considerada uma proteinopatia, uma vez que um achado comum nas formas familiar e esporádica é a geração de agregados proteicos de estrutura anormal que tendem a acumular-se nos neurónios. Esta alteração na transcrição das proteínas pode ter uma origem genética, devido a inúmeras mutações já descritas ou por rearranjo molecular posterior [5].

Em situações normais, o funcionamento correto do sistema ubiquitina-proteossoma (SUP) leva a uma eficaz destruição das proteínas anormais e evita assim a sua acumulação e consequente dano celular [5]. Observou-se nesta patologia que quando se adicionavam anticorpos específicos da ubiquitina, que o resultado era positivo num grande número de agregados, tanto em casos familiares como esporádicos: Inclusões tipo-skein (específica da ELA), inclusões hialinas redondas e inclusões hialinas tipo-corpos de Lewis, ao contrário que os corpúsculos de bunina, que são negativos para a presença de ubiquitina. Estas alterações estão relacionadas com disfunções no SUP, não apenas na transcrição das proteínas [1-3,5,7].

Para além da base genética para estas alterações, está cada vez mais estudado o papel das reações imunológicas na patologia da ELA e mais concretamente a sua influência na formação proteica. A ativação da resposta imune leva a uma ativação da microglia, dos astrócitos e dos linfócitos T que podem levar a um aumento dos níveis de citocinas tais como IFN- $\gamma$  e/ou TNF- $\alpha$ . Estas citocinas podem exacerbar a formação de proteínas danificadas que tendem a agregar-se e acumular-se no local [1,3, 42].

O papel da agregação proteica isolada na destruição seletiva dos neurónios motores é ainda incerto. Sabe-se que estas inclusões estão presentes na doença, mas o modo como influenciam a patogénese é ainda questionável. Permanece ainda em debate se as inclusões

proteicas representam apenas o evento final de neurónios a serem destruídos ou se também contribuem para a progressão da doença. [1,3,5].

#### 2.2.4 - Alteração da função dos astrócitos

Os astrócitos são células do SNC que desempenham um papel crucial na regulação da função dos neurónios motores, assim como a sua sobrevivência. Estas células encontram-se intimamente relacionadas com os neurónios: secretam fatores neurotróficos, mantêm a homeostase do glutamato na fenda sináptica e modulam a suscetibilidade neuronal frente aos efeitos tóxicos do excesso deste neurotransmissor [1,3,7,9,42,49]. Dada a importância destas funções na sobrevivência do neurónio motor, a alteração na função dos astrócitos possivelmente têm um papel fundamental na patogenia da ELA [1,3,7-9,42,49].

Para além da função de sustentação e de nutrição dos neurónios motores adjacentes, os astrócitos protegem as células neuronais através da expressão de diversos fatores de crescimento em resposta a agressões no SNC, tais como fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain derived neurotrophic factor* - BDNF), fator neurotrófico derivado da glia (*glia-derived neurotrophic factor* - GDNF), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (*insulin-like growth factor 1* - IGF-1) e o fator neurotrófico ciliar (*ciliary neurotrophic factor* - CNTF). Estes fatores foram descritos como protetores neuronais *in vitro* e *in vivo* em diversas patologias neurodegenerativas, nomeadamente na ELA [42]. Outra propriedade protetora deve ao facto de quando a ativação dos astrócitos, estes aumentem a expressão dos transportadores EAAT2/GLT-1 [42].

A atividade protetora dos astrócitos face a uma agressão depende da causa, da duração e do microambiente. Em situações mais hostis os astrócitos podem responder de um modo anormal e provocar dano nas estruturas vizinhas, nomeadamente nos neurónios [42,49].

Esta atividade anormal pode resultar em libertação de fatores tóxicos e mesmo pró-apoptóticos, tais como o glutamato, a enzima óxido nítrico sintetase (*nitric oxid synthase* - NOS) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  - (*tumoral necrosis factor  $\alpha$*  - TNF- $\alpha$ ). A libertação do glutamato leva a processos de excitotoxicidade, enquanto que o aumento das enzimas NOS provocam um aumento do *stress* oxidativo celular e, conseqüentemente, ao dano neuronal como já foi explorado em subseções anteriores [9,42].

O sinergismo entre a alteração da função glial, a excitotoxicidade pelo glutamato e do *stress* oxidativo não se limita ao metabolismo intracelular pelo aumento da libertação destes fatores. Foi observado um aumento substancial dos níveis de glutamato em fendas sinápticas de modelos de ratos com a mutação da enzima SOD1. Constatou-se ainda que este aumento

dos níveis deste neurotransmissor estava intimamente relacionado à diminuição dos transportadores EAAT2/GLT-1 na superfície dos astrócitos [8,9,42].

A função patológica dos astrócitos não ocorre apenas aquando da sua ativação. Em astrócitos com a mutação SOD1, mesmo em repouso, foi observado que mantinham uma captação diminuída do glutamato e secreções mínimas de fatores neurotrófico [42].

Num estudo realizado por Rothstein et al. (2005) [54], foi constatado que os astrócitos com a administração de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, como o Ceftriaxone, aumentavam significativamente a expressão dos transportadores GLT-1 e aumentavam também a captação do glutamato, melhorando a sobrevivência dos ratos com a mutação SOD1 [42,54]. Ativando os astrócitos com a introdução de um cocktail de fatores de crescimento ou de endotoxina bacteriana lipopolissacárida (*bacterial endotoxin lipopolysaccharide* - LPS) e com ceftriaxone, constatou-se um aumento dos fatores neurotróficos BDNF e GDNF, que apresentam uma função protetora neuronal. Este aumento de fatores não foi observado em ratos com a mutação SOD1, sugerindo que para além dos mecanismos de *stress* oxidativo também haja outros mecanismos alterados [42,54].

A disfunção destes elementos celulares o SNC implicam grandes alterações no ambiente neuronal, sendo um dos mais importantes mecanismos desta doença. A sua estreita relação com o sistema imunitário e resposta inflamatória da microglia aumenta ainda o potencial efeito deletério sobre os neurónios motores, que será desenvolvido mais em frente (secção 2.2.6 - Processos inflamatórios).

#### 2.4.5 - Alterações neurovasculares

Há mais de 25 anos que foram publicados os primeiros artigos que referiam a possibilidade de existir alterações na permeabilidade das barreiras entre o conteúdo hemático e o líquido cefalorraquidiano (LCR) na doença do neurónio motor. A hipótese permanece ainda em estudo como sendo um dos mecanismos patológicos desta doença [55].

A barreira hematoencefálica (BHE) é responsável pela troca de líquido e substâncias entre o conteúdo hemático e o encéfalo, LCR e medula espinhal. O controlo desta troca de substâncias é de suma importância para a manutenção da homeostase do SNC [55,56]

Alterações estruturais e funcionais foram demonstradas em modelos animais com ELA em estadios iniciais da doença, piorando com a progressão da doença [56-58]. O comprometimento da BHE decorre da degeneração das células endoteliais e das terminações dos astrócitos que rodeiam a microvascularização, assim como da presença de edema, das alterações do sistema de transporte endotelial e das *tight-junctions*. Estas alterações levam à

ocorrência de vazamento vascular, microhemorragias e depósitos de hemossiderina no parênquima do SNC. O dano nas células endoteliais e o aumento da permeabilidade endotelial pode culminar em entrada de substâncias nocivas aos neurónios [42]. Todo este aparato pode levar à destruição dos neurónios motores na ELA.

Estas alterações estão intimamente com a mutação da proteína SOD1, onde foi evidenciado dano considerável nas células endoteliais e suas *tight-junctions*, com posterior dano no NM e um aumento da resposta inflamatória neurovascular [58], sugerindo que esta alteração possa atuar como iniciador e fator de progressão da doença [55].

O fluxo sanguíneo capilar reduzido na medula espinhal de ratos [58] e em cérebros de pacientes com ELA [59], podem levar a hipoperfusão dessas áreas. Outra alteração descoberta foi a diminuição do número de células endoteliais em circulação em pacientes com ELA, sugerindo alteração nos processos normais de endotelização nesta patologia, em relação a população geral [60].

Diversos estudos conduzidos por Garbuzova-Davis demonstraram alterações claras da BHE. Foi observável vazamento de um corante hidrossolúvel - azul Evans - nos capilares da ME em ratos com a mutação SOD1 [57]; alterações ultra-estruturais dos vasos que envolviam neurónios em degeneração no tronco encefálico (TE) e na medula espinhal (ME) [56]; degeneração de células endoteliais, mitocôndrias, astrócitos e edema extracelular extenso por microscopia eletrônica; e ainda a presença de eritrócitos no espaço extracelular de microvasos no TE de ratos em fase sintomática inicial, indicando rutura de capilares sanguíneos [56,57].

Estes achados foram confirmados por Zhong et al. (2008) [58], que detetou uma diminuição do fluxo sanguíneo em 30-45% nas regiões cervical e lombar da ME de ratos em fase pré-sintomática, assim como um total de cerca de 15% de redução no fluxo capilar total da ME. Estas observações sugerem que a hipoxia e a isquemia possam ter um papel importante na gênese desta patologia.

Estes novos achados no sistema vascular do SNC podem funcionar por si só como fatores iniciadores de dano neuronal, ou em complementaridade com outros mecanismos tais como o *stress* oxidativo e a disfunção da astrogliá. O reconhecimento da importância destas alterações na patogênese da ELA pode levar a estudos mais aprofundados nesta área, assim como a novas abordagens terapêuticas.

### 2.2.6. Processos inflamatórios

Os fenómenos imunológicos estão agora a ser estudados e considerados um dos mais importantes fatores na patogênese de diversas doenças neurodegenerativas, incluindo a

esclerose lateral amiotrófica [61]. A neuroinflamação é agora estabelecida como um importante aspeto patológico da ELA [62].

Análises de LCR de pacientes com a patologia demonstraram possuir uma desregulação de um número considerável de citocinas pro e anti-inflamatórias e de fatores de crescimento, tais como IL-6, IL-10, G-CSF, VEGF, IFN- $\gamma$ , entre outros [63,64], assim como existe uma marcada ativação e/ou proliferação da microglia e dos astrócitos circundantes [1-3, 5-7,62,63].

Os astrócitos desempenham também neste mecanismo um papel importante, tal como já foi referido anteriormente. Dada a sua localização próxima da BHE é importante na transferência de informação e sinais da periferia para o SNC [61], sendo também essencial na manutenção de um ambiente propício para a sobrevivência dos neurónios. Os astrócitos ativados face a uma agressão podem diminuir a secreção de fatores tróficos como o BDNF, GDNF e o VEGF. A ativação prolongada pode levar a sofrimento neuronal por ausência de fatores essenciais, mas também à diminuição da depuração do glutamato (por expressão reduzida do GLT-1) e posterior destruição dos neurónios [9,49,61,65]. Na presença da mutação SOD1 pode haver a formação de astrócitos aberrantes, cuja função está alterada e tornam-se prejudiciais para o SNC.

A microglia é o elemento mais importante na manutenção de uma resposta inflamatória adequada. Além de funcionar como suporte para os próprios astrócitos, apresenta também um papel imunológico [66]. A microglia pode ser de dois fenótipos:

- Tipo M2 - é o tipo predominante e tem a capacidade de produzir um ambiente neuroprotetor. Liberta fatores de crescimento como o IGF-1, que permite o crescimento neuronal e manutenção da restante glia [61,66]. A expressão deste fenótipo é devido à influência das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10, assim como são responsáveis pela intensidade da resposta inflamatória por estas estruturas celulares [66].
- Tipo M1 - apresenta características citotóxicas e libertam citocinas pró-inflamatórias [66]. Este tipo de microglia apresenta capacidade de se auto-ativar, assim como com o auxílio de neutrófilos e linfócitos.

A existência destas duas vertentes da microglia sugere a existência de um mecanismo de “destruição e limpeza” dentro do SNC [67].

A presença de fatores que polarizem a expressão aumentada de M1 pode ser um dos fatores mais importantes neste mecanismo. A citocina IL-1 $\beta$  tem sido estudada e tem-se verificado que aumenta a progressão da doença, melhorando com a administração de antagonistas de IL-1 [67]. De momento realizam-se diversos estudos com o uso desta citocina

como possível terapêutica da ELA, mas ainda sem resultados estatisticamente significativos. [61].

A infecção causada por vírus tem sido estudada por parecer existir uma relação entre as infecções víricas e os doentes com ELA, tendo estes história de infecções patentes, latentes ou recorrentes. A persistência de infecções virais no SNC causadas por replicações patogénicas contínuas (HIV e *C. pneumoniae*), infecções contínuas (vírus influenza) ou infecções latentes com reativações ao longo da vida (HSV-1) podem levar a um aumento da suscetibilidade dos neurónios e ter um valor aditivo a outros mecanismos que contribuem para a neurodegeneração já explorados, nomeadamente a resposta inflamatória, o desarranjo proteico, deposição de agregados de proteínas, aumento do *stress* oxidativo e promoção de eventos pró-apoptóticos celulares [1,68]. Os processos lesivos têm efeito cumulativo ao longo do tempo, contribuindo para a neurodegeneração contínua [68].

Qualquer um dos mecanismos anteriormente referidos pode ser ativador de resposta inflamatória e dos processos imunológicos da microglia. Face ao carácter inflamatório do mecanismo colocou-se a hipótese de controlar a progressão da doença com o uso de terapia anti-inflamatória [1, 61]. Estudos posteriores com uso de imunoterapia e terapia anti-inflamatória - incluindo ciclofosfamida, plasmaferese, corticosteróides, inibidores da COX-2, fosfodiesterase/inibidores TNF- $\alpha$  - até irradiação linfóide total não tiveram qualquer alteração no decurso da doença [1,3,68].

### 2.2.7 - Disfunção de neurofilamentos e microtúbulos

O citoesqueleto nos neurónios motores contém abundantes quantidades de neurofilamentos na sua estrutura. Estes, para além da função de sustentação, apresentam também a função vital de transporte axonal, através do sistema de transporte anterógrado - lento e rápido - através do complexo de proteínas cinesina e retrógrado, pelo complexo dineína-dinactina [1,3,69]. Estruturas derivadas de neurofilamentos, os esferóides, podem ser depositados nos axónios e perturbar as comunicações efetuadas através deles. Essas estruturas esféricas são encontradas no corno anterior da ME de doentes com ELA [1-3,7,69].

Outro fenómeno que ocorre é o denominado de “estrangulamento axonal”, onde há uma diminuição da velocidade de transmissão axonal por aumento da espessura dos neurofilamentos [1,3]. Supõe-se que esta alteração estrutural ocorra devido ao dano oxidativo nos neurofilamentos, embora também seja possível que o aumento da proliferação dos mesmos represente um mecanismo de defesa do corpo celular para níveis anormais de cálcio ou de outras substâncias [1,2,8,69].

Mutações em genes que codificam os neurofilamentos aumentam o risco de desenvolvimento posterior de ELA. Formas familiares da doença apresentam mutações nos genes codificadores destas estruturas, como por exemplo a mutação no gene da dinactina - DCTN-1 [3,5,41]. O aumento da expressão da proteína intermédia específica no neurónio motor, a periferina, pode levar à acumulação tóxica de agregados intracelulares tanto em casos esporádicos, como em casos familiares [1,3,5,41].

## 2.3 - Visão global

O esforço contínuo de inúmeras equipas de investigação no campo da esclerose lateral amiotrófica contribuíram de um modo excecional para o desenvolvimento de hipóteses para a etiologia e a fisiologia desta doença sem cura. Apesar de todos os esforços e trabalho contínuo, a origem e a progressão desta doença permanecem envoltos em dúvidas e incertezas, dificultando o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. A forma como os fatores exógenos influenciam a doença ainda não está bem definida, ao contrário dos fatores genéticos que desempenham um papel importante na gênese da patologia. Os mecanismos descobertos apresentam uma relação cruzada entre eles, atuando conjuntamente e aumentando o dano neuronal. Nenhum mecanismo estudado consegue explicar na totalidade o fenómeno patológico que origina a ELA, tendo sido esta considerada uma doença multifatorial (Ilustração 1.)

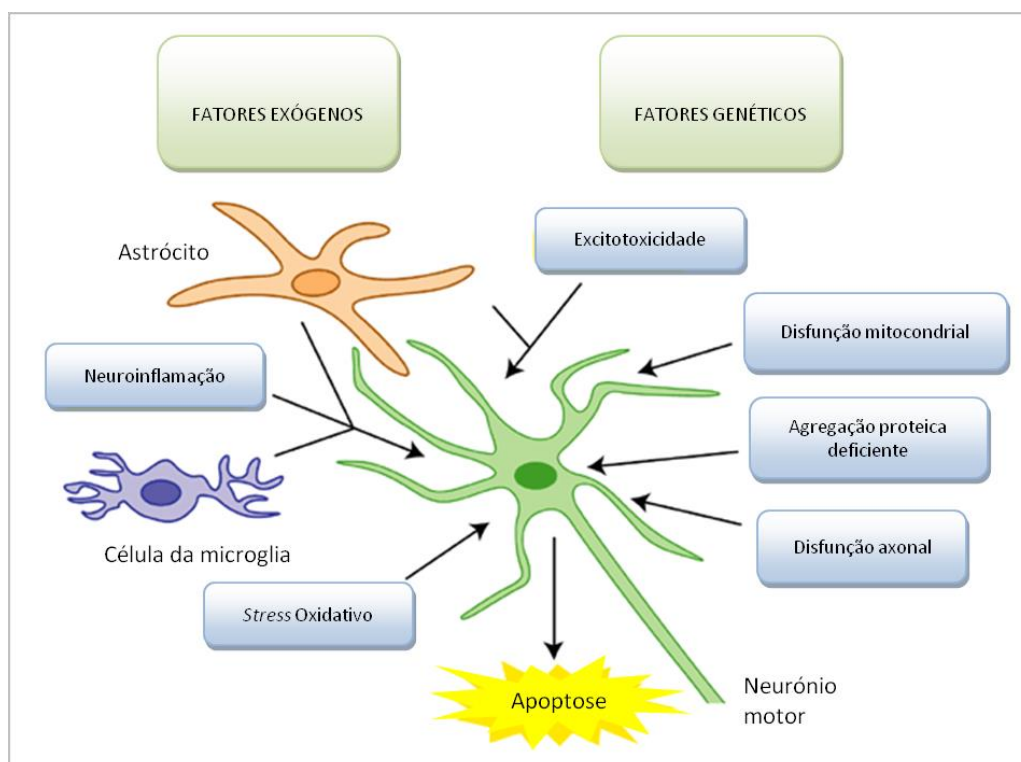


Figura 1 - Representação esquemática dos mecanismos de dano neuronal

A existência de fatores exógenos que sugiram uma origem ocupacional da doença tem tido resultados estatísticos bastante significativos. A correlação entre o surgimento de ELA em grupos de indivíduos com prática de exercício físico muito intensa (jogadores de futebol e futebol americano) tem sido cada vez mais evidenciado e estudado [17-24]. Foi observado que os níveis de consumo de oxigênio pelo organismo muito elevados juntamente com a exposição ocupacional aos relvados tratados com pesticida, inseticidas e outros produtos químicos levariam a um aumento da incidência desta patologia neurodegenerativa a indivíduos sem qualquer história de doença neuromuscular na família [21-23, 36].

Outro fator de risco exógeno muito relacionado com uma maior incidência de ELA é a exposição prolongada a toxinas. Tanto no caso dos relvados como em estudos realizados em populações rurais e urbanas, a associação entre a exposição a pesticidas e inseticidas químicos têm tido resultados estatisticamente positivos, revelando uma associação provável entre o fator e a doença [34,36]. Estudos relacionados com alguns compostos dessas substâncias agrícolas, como o selênio, revelam que apresentam neurotoxicidade seletiva para neurónios motores [36]. A exposição a metais pesados apresenta também fortes suspeitas de estarem relacionados com o desenvolvimento da doença através do mecanismo de *stress* oxidativo, como explicado anteriormente [8,34-37].

O tabagismo é um dos fatores mais estudados devido ao seu efeito deletério em todo o organismo. Foi também associado com a ELA, sendo considerado o fator de risco com uma relação mais clara de causa-efeito. Embora a sua consideração como fator de risco independente esteja posta em consideração no seio da comunidade científica, o modo como o faz permanece ainda em debate. O mecanismo mais relacionado com esta prática é o dano na vascularização, nomeadamente na que está intimamente relacionada com o sistema nervoso central [31]. A alteração no endotélio pode aumentar a permeabilidade a substâncias nocivas e aumentar o estado inflamatório, com conseqüente ativação da resposta inflamatória do SNC, libertação de citocinas pró-inflamatórias e pró-apoptóticas (como o TNF- $\alpha$ ) que levam a destruição do neurónio [9,42,55]. O efeito das substâncias contidas no fumo do tabaco aumentam o estado de *stress* oxidativo, gerando radicais livres que danificam o neurónio e o tornam mais exposto ao efeito excitotóxico do glutamato (mecanismo de excitotoxicidade lenta - subsecção 2.2.2) [8,9,45-47].

A maioria das mutações estudadas e relacionadas com o desenvolvimento de ELA tem caráter autossómico dominante e é um fator importante na etiologia da doença. Estas mutações estão ligadas a diversos mecanismos de dano neuronal, diretamente ou indiretamente [3,6,41].

A mutação da proteína SOD1, uma das mutações mais estudadas e descritas, gera diversas alterações intracelulares. Uma das inicialmente descobertas foi a disfunção da proteína cobre-zinco superóxido dismutase, proteína que atua sobre os radicais livres de oxigênio e origina moléculas estáveis de peróxido de hidrogênio [8,43]. A disfunção desta

proteína culmina na acumulação de radicais livres que danificam os neurónios por reações de oxidação diretamente ou alterando a conformação dos neurofilamentos, impedindo a transmissão do impulso nervoso [1,3,69]. Além da alteração da proteína SOD1, a mutação provoca alterações no metabolismo mitocondrial, diminuindo a produção de ATP que prejudica o funcionamento celular, diminuindo a sua ativação e aumentando a sua suscetibilidade a fatores externos como o glutamato [1,3,8,9,43]. Sabe-se, ainda, que esta mutação altera a membrana dos astrócitos, diminuindo o número de recetores EAAT2/GLT-1, responsáveis pela depuração do glutamato da membrana sináptica para o interior da célula, provocando uma acumulação e dano por excitotoxicidade [42].

Diversas mutações em genes codificadores de proteínas estão implicadas na gênese desta patologia, tais como o TDP43, FUS/TLS, OPTN, VCP, UBQLN2 [1-3,5,41]. A associação entre a presença destas mutações e o achado histológico de agregados proteicos disfuncionais não deixa dúvidas sobre a relação entre estes mecanismos. Estes agregados proteicos anormais alteram a conformação dos axónios, acumulando-se e provocando estrangulamento dos neurofilamentos que impedem o transporte axonal adequado [1-3,8,69]. Existem ainda alterações nos próprios neurofilamentos, como alterações da configuração da dinactina e da periferina, que alteram a estrutura e impedem a transmissão do impulso nervoso [1,3,5,41]. A presença e o depósito destas proteínas atuam como substâncias estranhas ao SNC e ativam a resposta inflamatória, provocando libertação dos mediadores inflamatórios continuamente, gerando dano neuronal [1,3,42].

Apesar de não estar ainda diretamente relacionado com nenhuma das mutações até hoje descobertas, o facto é que o papel do glutamato na patogénese desta doença é de suma importância, uma vez que o único medicamento que altera a progressão da doença, o Riluzole, tem um efeito anti-excitotóxico [9,47]. Os níveis excessivos de glutamato na fenda sináptica levam a uma ativação contínua dos canais pós-sinápticos, com influxo ininterrupto de cálcio e sódio impedindo os ciclos de despolarização-repolarização, gerando exaustão celular e dano do neurónio. Isto ocorre quando existe um desequilíbrio entre a libertação do glutamato pelo neurónio pré-sináptico e a diminuição da captação deste neurotransmissor pelos astrócitos, através dos recetores EAAT2/GLT-1 [1,3,7,9,47]. Foi observado que os astrócitos com a mutação SOD1 apresentavam menos recetores para o glutamato, assim como níveis diminuídos de fatores neurotróficos como o BDNF, GDNF e o VEGF [42]. Estudos realizados em 2005 demonstraram que a administração de  $\beta$ -lactâmicos, mais concretamente o Ceftriaxone, aumenta os níveis de neurotróficos (BDNF e GDNF) e da expressão dos recetores EAAT2/GLT-1 em modelos de ratos [54]. Decorrem estudos para esclarecer os processos que levam a estas alterações e se este grupo de antibióticos pode vir a ter, ou não, uma nova indicação terapêutica.

Dada a complexidade da patofisiologia e da incerteza dos seus mecanismos, esta doença continua sendo um dos principais enfoques das neurociências.

## Conclusão

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa caracterizada por uma paralisia muscular progressiva que reflete a degenerescência dos neurónios motores e que leva impreterivelmente à morte em cerca de 3-5 anos após o diagnóstico da doença.

A verdadeira origem da doença é ainda desconhecida. Com os avanços biotecnológicos desvendou-se inúmeros aspetos desta patologia que se desconhecia, principalmente no âmbito da genética. São cada vez mais as mutações descobertas e sabe-se agora que cada mutação pode dar mais de um fenótipo distinto, o mesmo sucedendo o contrário com diversas mutações para o mesmo fenótipo. Apesar de estatisticamente contar apenas com 20% de casos familiares, segundo novos achados suspeita-se que esse valor pode estar a subestimar o verdadeiro valor da transmissão desta doença. O aparecimento de uma nova mutação com carácter familiar e esporádico colocou em questão esta divisão de “ELA familiar” e “ELA esporádica”, colocando-se a questão da etiologia de novo em cima da mesa.

A associação da patologia com alguns fatores de risco tem ganhado adeptos e cada vez mais estudos incidem sobre este conjunto de possíveis causas etiológicas. A investigação sobre a atividade física, tanto em desportos profissionais como apenas em atividades de lazer, apresenta boas perspetivas para se tornar um dos fatores mais contribuintes na patogénese da ELA. O tabagismo é, sem dúvida, um hábito que afeta o organismo humano e que está presente em múltiplas doenças. Estima-se que possa atuar como fator de risco independente para o aparecimento desta doença do neurónio motor, embora ainda não haja consenso entre alguns autores.

Apesar da etiologia estar ainda indefinida, os mecanismos que desenvolvem morte neuronal estão a ser cada vez mais estudados e descritos. O mecanismo primeiramente descrito, o *stress* oxidativo e a sua associação com a mutação do gene da proteína SOD1 foi um dos mais estudados e auxiliou a descoberta de muitos outros fenómenos celulares que foram a base para o achado de outros tantos. A excitotoxicidade provocada pelo excesso de Glutamato foi de suma importância para a descoberta do único fármaco que comprovadamente diminui a progressão da doença e que aumenta a sobrevida - o Riluzole. A relação dos níveis aumentados do glutamato com o dano celular implica a disfunção das estruturas que envolvem a fenda sináptica. Os astrócitos desempenham um papel fundamental na homeostase dos neurónios motores e a sua alteração desencadeia um sem fim de mecanismos que danificam os neurónios e provocam a sua morte.

São diversos os mecanismos que provocam lesão nos neurónios motores e contribuem para a dinâmica da ELA. Apesar de ainda se desconhecer a etiologia, constatou-se que os

mecanismos descobertos até à data estão interligados e muitos ocorrem simultaneamente ou conseqüentemente, daí inúmeros autores considerarem a ELA como uma doença multifatorial. Resta ainda um longo caminho para descrever a patologia e a sua génese, assim como na procura de um possível tratamento. Mas com o avanço da tecnologia e com a contínua descoberta de novos dados da doença, novos estudos e investigações nas diversas áreas ajudarão a desvendar cada vez mais aspetos desta doença fulminante.

## Bibliografia

- [1] Daroff RB, Fenichel GM, Jankovic J, Mazziotta JC. Bradley's Neurology in Clinical Practice. 6ª edição. Filadélfia: Elsevier-Saunders; 2012. Capítulo 72, Disorders of Upper and Lower Motor Neurons; p.1855-1889.
- [2] Hauser SL, Fauci AS, Eugene B, Kasper DL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J. Harrison's in Clinical Medicine. 2ª edição. Estados Unidos da América: McGraw-Hill Companies; 2010. Capítulo 27, Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Diseases; p.358-363.
- [3] Wijesekera LC, Leigh PN. Amyotrophic lateral sclerosis. Orphanet Journal of Rare Diseases. 2009;4:3.
- [4] Worms PM. The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies. Journal of the Neurological Sciences. 2001;191:3-9.
- [5] Bendotti C, Marino M, Cheroni C, Fontana E, Crippa V, Poletti A, et al. Dysfunction of constitutive and inducible ubiquitin-proteasome system in amyotrophic lateral sclerosis: implication for protein aggregation and immune response. Progress in Neurobiology. 2012; 97:101-26.
- [6] Turner MR, Hardiman O, Benatar M, Brooks BR, Chio A, de Carvalho M, et al. Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. Lancet Neurology 2013;12:310-322
- [7] Goetz CG. Textbook of Clinical Neurology. 3ª edição. Filadélfia: Elsevier-Saunders; 2007.
- [8] Gilbert DL, Colton CA. Reactive Oxygen Species in Biological Systems. Kluwer Academic Publishers; 2002. Capítulo 26, Oxidative Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis; p.639-650.
- [9] Van Den Bosch L, Van Damme P, Bogaert E, Robberecht W. The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. Biochimica et Biophysica Acta 1762 (2006) 1068-1082
- [10] Polkey MI, Lyall RA, Moxham J, Leigh PN: Respiratory aspects of neurological disease. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry 1999, 66:5-15
- [11] Subcommittee on Motor Neuron Diseases of World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases, El Escorial "Clinical Limits of ALS" Workshop Contributors. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Journal of the Neurological Sciences 1994; 124: 96-107.

- [12] Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. El Escorial revisited: Revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *ALS and other motor neuron disorders* 2000; 1:293-299
- [13] Douglass CP, Kandler RH, Shaw PJ, McDermott CJ. An evaluation of neurophysiological criteria used in the diagnosis of motor neuron disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2010; 81:646-9
- [14] Carvalho MD, Swash M. Awaji diagnostic algorithm increases sensitivity of El Escorial criteria for ALS diagnosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and frontotemporal degeneration*. 2009; 10: 53-57
- [15] Carvalho MD, Dengler R, Eisen A, England JD, Kaji R, Kimura J et al. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clinical neurophysiology: official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 2008;119: 497-503
- [16] Miller RG, Mitchell JD, Moore DH. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *The Cochrane database of systematic reviews [electronic resource]*. 2012 ;3
- [17] Lehman EJ, Hein MJ, Baron SL, Gersic CM. Neurodegenerative causes of death among retired National Football League players. *Neurology*. 2012; 79: 1970-4
- [18] Veldink JH, Kalmijn S, Groeneveld GJ, Titulaer MJ, Wokke JH, van den Berg LH. Physical activity and the association with sporadic ALS. *Neurology*. 2005; 64:241-5
- [19] Carmel Armon. Sports and trauma in amyotrophic lateral sclerosis revisited. *Journal of the Neurological Sciences*. 2007; 262: 45-53
- [20] Chen H, Richard M, Sandler DP, Umbach DM, Kamel F. Head Injury and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *American Journal of Epidemiology*. 2007;166
- [21] Chio A, Calvo A, Dossena M, Ghiglione P, Mutani R, Mora G. ALS in Italian professional soccer players: The risk is still present and could be soccer-specific. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 2009; 10: 205-209
- [22] Chiò A, Benzi G, Dossena M, Mutani R, Mora G. Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain*. 2005; 128:472-6
- [23] Belli S, Vanacore N. Proportionate mortality of Italian soccer players: Is amyotrophic lateral sclerosis an occupational disease? *European Journal of Epidemiology*. 2005; 20: 237-242
- [24] Taioli E. All causes mortality in male professional soccer players. *European Journal of Public Health*. 2007;17:600-604

- [25] Longstreth WT, McGuire V, Koepsell TD, Wang Y, van Belle G. Risk of amyotrophic lateral sclerosis and history of physical activity: a population-based case-control study. *Arch Neurology*. 1998; 55:201-6
- [26] Huisman MH, Seelen M, de Jong SW, Dorresteyn KR, van Doormaal PT, van der Kooij AJ et al. Lifetime physical activity and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2013
- [27] The Gulf War - A line in the sand [Internet]. 2013. Disponível em: [http://www.military.com/Resources/HistorySubmittedFileView?file=history\\_gulfwar.htm](http://www.military.com/Resources/HistorySubmittedFileView?file=history_gulfwar.htm)
- [28] Horner RD, Grambow SC, Coffman CJ, Lindquist JH, Oddone EZ, Allen KD, Kasarskis EJ. Amyotrophic lateral sclerosis among 1991 Gulf War veterans: evidence for a time-limited outbreak. *Neuroepidemiology*. 2008; 31: 28-32
- [29] Miranda ML, Alicia Overstreet Galeano M, Tassone E, Allen KD, Horner RD. Spatial analysis of the etiology of amyotrophic lateral sclerosis among 1991 Gulf War veterans. *Neurotoxicology*. 2008;29(6):964-70
- [30] Horner RD, Kamins KG, Feussner JR, Grambow SC, Hoff-Lindquist J, Harati Y et al. Occurrence of amyotrophic lateral sclerosis among Gulf War veterans. *Neurology*. 2003;61:742-9
- [31] Weisskopf MG, McCullough ML, Calle EE, Thun MJ, Cudkowicz M. Prospective Study of Cigarette Smoking and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *American Journal of Epidemiology*. 2004; 160:26-33.
- [32] Armon C, Smoking may be considered an established risk factor for sporadic ALS. *Neurology*. 2009; 73:1693-8.
- [33] Cox PA, Sacks OW. Cycad neurotoxins, consumption of flying foxes, and ALS-PDC disease in Guam. *Neurology*. 2002;58:956-9.
- [34] Govoni V, Granieri E, Fallica E, Casetta I. Amyotrophic lateral sclerosis, rural environment and agricultural work in the Local Health District of Ferrara, Italy, in the years 1964-1998. *Journal of neurology* 2005; 252 : 1322-1327
- [35] Kamel F, Umbach DM, Hu H, Munsat TL, Shefner JM, Taylor JA, Sandler DP. Lead Exposure as a Risk Factor for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuro-degenerative Diseases*. 2005;2:195-201
- [36] Vinceti M, Bottecchi I, Finkelstein AFY, Mandrioli J. Are environmental exposures to selenium, heavy metals, and pesticides risk factors for amyotrophic lateral sclerosis?. *Reviews on environmental health* 2012;27:19-41

- [37] Fang F, Kwee LC, Allen KD, Umbach DM, Ye W, Watson M. Association Between Blood Lead and the Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *American Journal of Epidemiology*. 2010; 171
- [38] Abhinav K, Al-Chalabi A, Hortobagyi T, Leigh P. Electrical injury and amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the literature. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2007;78:450-453
- [39] Cronin S, Hardiman O, Traynor BJ Ethnic variation in the incidence of ALS: a systematic review. *Neurology*. 2007;68:1002-7
- [40] Morozova N, Weisskopf M, McCullough M, Munger K, Calle E, Thun M. et al. Diet and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Epidemiology*. 2008;19:324-337
- [41] OMIM Phenotypic Series - Amyotrophic lateral sclerosis - 105400 [Internet] Johns Hopkins University;2013. Disponível em: <http://omim.org/phenotypicSeries/105400>
- [42] Benckler C, Ben-Zur T, Barhum Y, Offen D. Altered Astrocytic Response to Activation in SOD1G93A Mice and Its Implications on Amyotrophic Lateral Sclerosis Pathogenesis. *Glia*. 2013 ;61:312-26
- [43] Carri MT, Cozzolino M. SOD1 and mitochondria in ALS: a dangerous liaison. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2011;43:593-9
- [44] Kogan F, Singh A, Debrosse C, Haris M, Cai K, Nanga RP et al. Imaging of glutamate in the spinal cord using GluCEST. *Neuroimage*. 2013;77C:262-267
- [45] Petroff OA. GABA and glutamate in the human brain. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 2002; 8:562-573
- [46] Harrison PJ. Metabotropic glutamate receptor agonists for schizophrenia. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science* 2008.
- [47] Milanese M, Zappettini S, Onofri F, Musazzi L, Tardito D, Bonifacino T et al. Abnormal exocytotic release of glutamate in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurochemistry*. 2011;116:1028-42
- [48] Fiszman ML, Ricart KC, Latini A, Rodríguez G, Sica RE. In vitro neurotoxic properties and excitatory aminoacids concentration in the cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. Relationship with the degree of certainty of disease diagnoses. *Acta neurologica Scandinavica*. 2010;121:120-6
- [49] Sica RE. Is amyotrophic lateral sclerosis a primary astrocytic disease? *Medical Hypotheses*. 2012;79: 819-822

- [50] Berger JV, Dumont AO, Focant MC, Vergouts M, Sternotte A, Calas AG et al. Opposite regulation of metabotropic glutamate receptor 3 and metabotropic glutamate receptor 5 by inflammatory stimuli in cultured microglia and astrocytes. *Neuroscience*. 2012; 205:29-38
- [51] Aronica E, Catania MV, Geurts J, Yankaya B, Troost D. Immunohistochemical localization of group I and II metabotropic glutamate receptors in control and amyotrophic lateral sclerosis human spinal cord: upregulation in reactive astrocytes. *Neuroscience*. 2001 105:509-520
- [52] Kawahara Y, Sun H, Ito K, Hideyama T. Underediting of GluR2 mRNA, a neuronal death inducing molecular change in sporadic ALS, does not occur in motor neurons in ALS1 or SBMA. *Neuroscience research*. 2006;54:11-4
- [53] Lin CL, Bristol LA, Jin L, Dykes-Hoberg M, Crawford T, Clawson L, Aberrant RNA Processing in a Neurodegenerative Disease: the Cause for Absent EAAT2, a Glutamate Transporter, in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuron*. 1998;20:589-602
- [54] Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE. Beta-Lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature*. 2005;433:73-7
- [55] Garbuzova-Davis S, Rodrigues MC, Hernandez-Ontiveros DG, Louis MK, Willing AE, Borlongan CV. Amyotrophic lateral sclerosis: a neurovascular disease. *Brain research*. 2011;1398:113-25
- [56] Garbuzova-Davis S, Saporta S, Haller E, Kolomey I, Bennett SP, Potter H. Evidence of Compromised Blood-Spinal Cord Barrier in Early and Late Symptomatic SOD1 Mice modeling ALS. *PLoS One*. 2007;2:e1205
- [57] Garbuzova-Davis S, Haller E, Saporta S, Kolomey I, Nicosia SV, Sanberg PR. Ultrastructure of blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier in SOD1 mice modeling ALS. *Brain research*. 2007;1157:126-37
- [58] Zhong Z, Deane R, Ali Z, Parisi M, Shapovalov Y, O'Banion MK. ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration. *Nature neuroscience*. 2008;11:420-2
- [59] Rule RR, Schuff N, Miller RG, Weiner MW. Gray matter perfusion correlates with disease severity in ALS. *Neurology*. 2010 ;74:821-7
- [60] Garbuzova-Davis S, Woods RL 3rd, Louis MK, Zesiewicz TA, Kuzmin-Nichols N, Sullivan KL. Reduction of Circulating Endothelial Cells in Peripheral Blood of ALS Patients. *PLoS One*. 2010;5

- [61] Evans MC, Couch Y, Sibson N, Turner M. Inflammation and neurovascular changes in amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular and cellular neurosciences*. 2013;53:34-41
- [62] Philips T, Robberecht W. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurology*. 2011;10:253-6
- [63] Mitchell RM, Freeman WM, Randazzo WT, Stephens HE, Beard JL, Simmons Z et al. A CSF biomarker panel for identification of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2009;72:14-9
- [64] Tarasiuk J, Kułakowska A, Drozdowski W, Kornhuber J, Lewczuk P. CSF markers in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neural transmission*. 2012;119:747-57
- [65] Meissner F, Molawi K, Zychlinsky A. Mutant superoxide dismutase 1-induced IL-1beta accelerates ALS pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107:13046-50
- [66] Henkel JS, Beers DR, Zhao W, Appel SH. Microglia in ALS: The Good, The Bad, and The Resting. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. 2009;4:389-98
- [67] David S, Kroner A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nature reviews. Neuroscience*. 2011;12:388-99
- [68] De Chiara G, Marcocci ME, Sgarbanti R, Civitelli L, Ripoli C, Piacentini R. Infectious Agents and Neurodegeneration. *Molecular Neurobiology*. 2012;46:614-38
- [69] De Vos KJ, Grierson AJ, Ackerley S, Miller CC. Role of Axonal Transport in Neurodegenerative Diseases. *Annual review of neuroscience*. 2008;31:151-73