

# **Uma revisão da esclerose lateral amiotrófica (ELA) com foco no tratamento com células estaminais**

**João Azevedo Lopes**

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

Orientador: Prof. Doutor Francisco José Alvarez Pérez  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Doutora Graça Maria Fernandes Baltazar

**março de 2024**



## **Declaração de Integridade**

Eu, João Carlos Azevedo Lopes, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição 41739 do Mestrado Integrado em Medicina da Faculdade Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 12 /03 /2024



## **Dedicatória**

Dedicado ao meu melhor amigo, padrinho e avô. És a razão disto, espero que estejas orgulhoso. Tenho saudades.



## **Agradecimentos**

Aos meus pais, cujo esforço incansável moldou o meu caminho. Ao resto da minha família, pelo orgulho que têm em mim. Aos amigos da Covilhã, a jornada não era possível sem vocês. Aos amigos de sempre, obrigado por serem o meu porto seguro. Ao orientador e coorientadora, pela orientação valiosa. E ao Renato, o meu grande apoio. Este trabalho é o reflexo de tudo que recebi ao longo destes seis anos.



## **Prefácio**

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é mais do que uma área de estudo para mim. É um compromisso que vem da proximidade pessoal com a doença através de um familiar muito próximo que a enfrentou. A decisão de explorar este tema, muitas vezes esquecido, é impulsionada pela urgência de trazer à luz a gravidade da ELA, uma realidade que afeta não apenas o corpo, mas também a esperança.

Não posso ignorar a falta de esperança que muitas vezes envolve esta doença implacável. Este trabalho é uma reflexão sobre o desespero que assombra não apenas os pacientes, mas também aqueles que assumem o papel de cuidadores. A ELA impõe não apenas uma batalha física, mas também uma batalha emocional, desafiando a resiliência de todos os envolvidos.

Ao contemplar a falta de opções terapêuticas eficazes, surge uma necessidade premente de investigação de novas abordagens e terapias. Este trabalho, ainda que a uma escala muito pequena, procura contribuir para a compreensão mais profunda da ELA e apelar pela necessidade de inovação e progresso nas opções terapêuticas disponíveis. A pertinência desta dissertação reside na sua tentativa de iluminar as dúvidas que ainda pairam sobre a ELA, trazendo à superfície não apenas a complexidade da doença, mas também a preciosa necessidade de esperança e avanços na investigação. Espero que estas páginas sirvam como um pequeno raio de luz na sombra que é a luta contra a ELA e ofereçam esperança onde muitas vezes parece não existir.



## Resumo

A esclerose lateral amiotrófica é uma doença neurológica progressivamente fatal que afeta os neurónios motores superiores e inferiores, dando origem a fraqueza, atrofia muscular e levando à morte, cerca de dois a cinco anos após o início dos sintomas. Na base da sua etiologia estão fatores genéticos e ambientais, mas os mecanismos patofisiológicos associados à doença, como o aumento do stress oxidativo, a excitotoxicidade e a disfunção da homeostase proteica, que levam à acumulação de agregados de proteínas nos neurónios, estão longe de serem completamente entendidos. O tratamento centra-se em cuidados de suporte, e em apenas duas opções farmacológicas disponíveis, o *riluzole* e o *edavarone*, que oferecem efeitos modestos e limitados. As células estaminais surgem como uma abordagem terapêutica promissora, dado a sua capacidade de diferenciação em diferentes linhagens celulares neuronais e não neuronais e o potencial de neuroproteção através da secreção de fatores tróficos, melhorando o ambiente circundante dos tecidos lesados, tendo já demonstrado segurança e eficácia em inúmeros ensaios clínicos. Apesar dos avanços científicos neste campo, alguns desafios persistem, como a seleção dos pacientes nestes ensaios, a janela terapêutica ideal e a otimização das doses terapêuticas. Apesar do potencial terapêutico, obstáculos como a tumorigénese e a diferenciação não controlada requerem uma avaliação rigorosa. O desenvolvimento de protocolos padronizados de investigação e tratamento é urgente, para atingir a consistência e a reprodutibilidade desejada, para que esta abordagem terapêutica possa revolucionar a gestão dos pacientes de uma doença devastadora como a esclerose lateral amiotrófica.

## Palavras-chave

Esclerose lateral amiotrófica; ELA; Mecanismos patofisiológicos; Tratamento; Células estaminais; Células estaminais mesenquimais; Células estaminais neuronais; Células estaminais pluripotentes induzidas



## **Abstract**

Amyotrophic lateral sclerosis is a progressively fatal neurological disease that affects both upper and lower motor neurons, resulting in weakness, muscle atrophy, and leading to death approximately two to five years after symptom onset. The etiology of ALS involves genetic and environmental factors, but the pathophysiological mechanisms associated with the disease, such as increased oxidative stress, excitotoxicity, and protein homeostasis dysfunction leading to the accumulation of protein aggregates in neurons, are far from completely understood. Treatment focuses on supportive care, with only two available pharmacological options, riluzole and edaravone, providing modest and limited effects. Stem cells emerge as a promising therapeutic approach due to their ability to differentiate into various neuronal and non-neuronal cell lineages and their potential for neuroprotection through the secretion of trophic factors, improving the surrounding environment of damaged tissues. They have already demonstrated safety and efficacy in numerous clinical trials. Despite scientific advancements in this field, challenges persist, including patient selection in these trials, the optimal therapeutic window, and the optimization of therapeutic doses, among others. Despite therapeutic potential, obstacles such as tumorigenesis and uncontrolled differentiation require rigorous evaluation. The development of standardized research and treatment protocols is urgent to achieve the desired consistency and reproducibility, allowing this therapeutic approach to revolutionize the management of patients with a devastating disease like amyotrophic lateral sclerosis.

## **Keywords**

Amyotrophic Lateral Sclerosis;ALS;Pathophysiological Mechanisms;Treatment;Stem Cells;Mesenchymal Stem Cells;Neural Stem Cells;Induced Pluripotent Stem Cells



# Índice

<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2. Metodologia</b>	<b>3</b>
<b>3. Uma revisão da esclerose lateral amiotrófica</b>	<b>5</b>
<b>3.1 Epidemiologia</b>	<b>5</b>
<b>3.2 Etiologia</b>	<b>5</b>
3.2.1 Fatores Genéticos	6
3.2.2 Fatores ambientais	6
<b>3.3 Manifestações clínicas</b>	<b>7</b>
<b>3.4 Fisiopatologia</b>	<b>9</b>
3.4.1 Distúrbios da homeostase proteica	9
3.4.2 Aumento do stress oxidativo	10
3.4.3 Excitotoxicidade glutamatérgica	10
3.4.4 Disfunção do transporte axonal	11
3.4.5 Neuroinflamação e reatividade das células não neuronais	11
3.4.6 Disfunção endotelial	12
3.4.7 Outros mecanismos	12
<b>3.5 Diagnóstico</b>	<b>12</b>
<b>3.6 Prognóstico</b>	<b>14</b>
<b>3.7 Tratamento</b>	<b>15</b>
3.7.1 Tratamento farmacológico	15
3.7.2 Tratamento de suporte	17
3.7.3 Estratégias inovadoras	18
3.7.4 Tratamento com células estaminais	19
<b>4. As células estaminais</b>	<b>21</b>
<b>4.1 Classificação</b>	<b>21</b>
<b>4.2 Células estaminais embrionárias</b>	<b>23</b>
<b>4.3 Células estaminais adultas</b>	<b>24</b>

4.3.1 Células estaminais mesenquimais	24
4.3.2 Células estaminais hematopoiéticas	25
4.3.3 Células estaminais neuronais	26
4.3.4 Células estaminais da polpa dentária	26
<b>4.4 Células estaminais pluripotentes induzidas</b>	<b>26</b>
<b>5. Tratamento da ELA com células estaminais</b>	<b>29</b>
<b>5.1 Princípios do tratamento</b>	<b>29</b>
5.1.1 Estratégias de substituição celular	29
5.1.2 Atividade neurotrófica	30
5.1.3 Atividade anti-inflamatória e imunomoduladora	31
<b>5.2 Ensaios clínicos</b>	<b>32</b>
5.2.1 Avaliação da eficácia e segurança do tratamento	32
5.2.2 Fontes de células estaminais para os ensaios clínicos	33
5.2.3 Procedimento	34
<b>5.3 Resultados</b>	<b>36</b>
5.3.1 Células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea	36
5.3.2 Células estaminais mesenquimais derivadas do tecido adiposo	40
5.3.3 Células estaminais derivadas do sangue periférico	40
5.3.4 Células estaminais derivadas da polpa dentária	41
5.3.5 Células estaminais neuronais	42
5.3.6 Células estaminais pluripotentes induzidas	42
<b>6. Conclusão</b>	<b>45</b>
<b>Anexos</b>	<b>49</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>51</b>

## Lista de Tabelas

**Tabela 1** – Critérios *El Escorial* modificados para o diagnóstico da ELA;

**Tabela 2** – Comparação entre *Riluzole* e *Edavarone*;

**Tabela 3** – Classificação das células estaminais segundo o seu potencial de diferenciação;

**Tabela 4** – Classificação das células estaminais segundo a sua fonte.



## Lista de Acrónimos

ALSFRS-R	Escala da avaliação funcional da ELA
ATMP	Medicamentos de tratamento avançado
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BiPAP	Pressão positiva em duas etapas nas vias aéreas
C9ORF72	Quadro de leitura aberto 72 do cromossoma 9
CVF	Capacidade vital forçada
DFT	Demência frontotemporal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECN	Estudo de condução nervosa
ECoG	Eletrocorticografia
ELA	Esclerose lateral amiotrófica
ELISA	Ensaio imunoenzimático por absorção
EMG	Eletromiografia
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FUS	Fundido em sarcoma
G-CSF	Fator estimulador de colónias de granulócitos
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GDNF	Fator de crescimento derivado das células da glia
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HSP	Proteína de choque térmico
ICC	Interfaces cérebro-computador
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL-10	Interleucina 10
IMC	Índice de massa corporal
iPSC	Células estaminais pluripotentes induzidas
ISSCR	Sociedade internacional de investigação de células estaminais
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MeSH	<i>Medical Subject Headings</i>
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade

microRNA	Micro ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
NMDA	N-metil D-aspartato
NTF	Fatores neurotróficos
PBSC	Células estaminais do sangue periférico
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
RM	Ressonância magnética
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SHED	Células estaminais de dentes decíduos exfoliados
SHED-CM	Meio condicionado de células estaminais de dentes decíduos exfoliados
SNC	Sistema nervoso central
SOD1	Superóxido dismutase 1 de cobre e zinco
SSRI	Inibidores seletivos da recaptção da serotonina
TARDBP	Proteína de ligação <i>ao DNA e RNA</i>
TDP-43	Proteína de ligação 43 <i>ao DNA e RNA</i>
TGF- $\beta$ 1	Fator de crescimento transformador beta 1
TTX	Tetrodotoxina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

## 1. Introdução

A esclerose lateral amiotrófica (ELA), descrita pela primeira vez por *Jean-Martin Charcot* em 1869, também conhecida como doença de *Charcot* ou doença de *Lou Gehrig*, é uma doença neurológica rara, idiopática e progressivamente fatal. (1) É caracterizada primariamente pela degeneração progressiva dos neurónios motores superiores e inferiores, responsáveis pelo movimento voluntário dos músculos, quer ao nível espinhal quer ao nível bulbar. Contudo, manifestações extra-motoras reconhecem esta doença como uma doença neurodegenerativa multissistémica. (2–4) As primeiras manifestações clínicas da ELA podem ser difíceis de identificar, e variam de pessoa para pessoa. Os primeiros sinais são a fraqueza e a atrofia muscular gradual, afetando todos os aspetos da vida dos pacientes como comer, falar, movimentar e até respirar. (1) A degeneração acaba por evoluir para a paralisia muscular e, nos estadios finais, os pacientes ficam totalmente paralisados. Em níveis avançados da doença o sistema respiratório é afetado levando a insuficiência respiratória e à morte, dois a cinco anos após o início dos sintomas. (5)

As células estaminais, células não especializadas presentes em tecido embrionários, fetais ou adultos, com elevado potencial de proliferação, diferenciação e autorrenovação têm o potencial de se tornar um dos mais importantes trunfos da medicina no futuro. O objetivo desta revisão é analisar os tratamentos que existem até ao momento e qual o seu impacto na sobrevida e na qualidade de vida dos pacientes com ELA. À medida que são examinadas as várias abordagens terapêuticas disponíveis para a ELA, será analisada ao detalhe a perspetiva das células estaminais como uma fronteira promissora na pesquisa por terapias inovadoras. Esta análise detalhada não só realça a singularidade desta abordagem, mas também nos leva a refletir sobre questões fundamentais. Será que as células estaminais, com a sua notável plasticidade e capacidade de diferenciação, representam verdadeiramente uma opção terapêutica viável para a ELA? As suas características intrínsecas, como a capacidade de regeneração e a interação complexa com o microambiente celular, podem oferecer uma resposta eficaz perante esta condição neurodegenerativa devastadora?

Ao ponderar sobre estas questões, torna-se imperativo explorar não só os aspetos promissores, mas também os desafios inerentes a esta terapia inovadora. A investigação aprofundada da segurança e eficácia da administração de células estaminais torna-se uma peça crucial. Afinal, o caminho para a implementação generalizada destas terapias exige uma compreensão abrangente dos riscos potenciais e dos benefícios tangíveis. Podemos afirmar, com confiança, que a administração destas células é não só segura, mas também eficaz na melhoria das condições dos pacientes?

Ao responder a estas perguntas, não só delineamos os contornos dos benefícios associados ao tratamento com células estaminais, mas também identificamos os obstáculos a serem superados. Esta revisão permite-nos ter um vislumbre de um futuro não muito distante, onde a ELA pode ser enfrentada com abordagens revolucionárias. No entanto, ao mesmo tempo, é crucial reconhecer as limitações e desafios que acompanham esta trajetória científica. Assim, esta revisão não só realça os avanços, mas também lança luzes sobre as complexidades inerentes a este campo dinâmico da pesquisa médica, indicando um terreno fértil para descobertas que podem redefinir a esperança para aqueles que enfrentam a ELA.

## 2. Metodologia

A elaboração desta dissertação seguiu uma metodologia minuciosa, orientada pela pesquisa e seleção criteriosa de artigos científicos que enriquecessem a compreensão da Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA).

No início, foram utilizadas as bases de dados *b-on* e *PubMed*, procurando os seguintes termos MeSH específicos, apenas no título de artigos: "*Amyotrophic Lateral Sclerosis*" OR "*ALS*" OR "*Gehrig\* Disease*" OR "*Lou Gehrig\* Disease*" AND "*Therapeutic*" OR "*Therapy*" OR "*Therapies*" OR "*Treatment\**" AND "*Stem Cell\**" OR "*Progenitor Cell\**" OR "*Mother cell\**".

A pesquisa inicial, gerou um conjunto inicial robusto de 355 artigos. Subsequentemente, foram excluídos estudos que não se alinhavam estritamente com os objetivos da dissertação, estudos não escritos em inglês, artigos em duplicado e foi realizada uma restrição com um intervalo de tempo de publicação entre 2016 e 2024, para assegurar a seleção de estudos mais recentes e pertinentes. Esta abordagem mais seletiva resultou numa base de dados mais precisa, composta por 35 artigos.

Com o intuito de ampliar ainda mais a revisão bibliográfica e proporcionar uma visão mais abrangente, foram elaboradas pesquisas adicionais no *PubMed*. Esta etapa visou identificar novas formas de tratamento, metodologias pouco abordadas e procedimentos não intensamente discutidos nos artigos previamente selecionados. Paralelamente, foram efetuadas pesquisas específicas para clarificar conceitos e intercalar ideias de maneira concisa, resultando na inclusão de mais 6 artigos, totalizando assim 41 artigos na base final.

Os artigos selecionados foram submetidos a uma análise aprofundada, com o propósito de extrair informações relevantes sobre terapias, procedimentos e abordagens terapêuticas inovadoras. A sistematização dessas informações desempenhou um papel crucial na construção dos argumentos e nas conclusões apresentadas nesta dissertação. A metodologia adotada reflete, assim, uma abordagem completa e atualizada, permitindo uma compreensão abrangente da ELA, integrando estudos recentes e com uma variedade de diferentes perspectivas no contexto do tratamento da doença.



## **3. Uma revisão da esclerose lateral amiotrófica**

### **3.1 Epidemiologia**

Apesar de ser uma doença rara, a maior exposição a riscos ambientais tem levado a um aumento da prevalência de ELA, sendo a doença do neurónio motor mais comum em adultos. (1,6) A incidência anual global é de 0,6 a 3 casos por 100.000 pessoas, e a prevalência global de 4,42 casos por 100.000 pessoas (1,7) Existem diferenças geográficas significativas na ELA, a título de exemplo, na Europa e nos Estados Unidos da América a incidência estimada de ELA é de 1.75 a 3 casos por 100.000 pessoas por ano, e a prevalência de 10 a 12 casos por 100.000 pessoas. (3,8)

Existem duas formas principais da doença, a forma esporádica e a forma hereditária. Cerca de 5 a 10% dos pacientes com ELA sofre da forma de ELA hereditária, enquanto 90 a 95% sofrem de ELA na sua forma esporádica. (9)

Relativamente à prevalência por sexo, foi demonstrado que os homens têm um risco maior de desenvolver ELA que as mulheres, com um rácio global homem/mulher de 1.2 a 1.5. (3,9)

### **3.2 Etiologia**

Apesar dos avanços recentes na determinação dos mecanismos genéticos e moleculares da morte dos neurónios motores na ELA, os mecanismos precisos da degeneração seletiva dos mesmos e os fenótipos clínicos heterogéneos não são completamente entendidos. (10) Apesar da etiologia ainda ser desconhecida, existe evidência científica que suporta que fatores genéticos, ambientais e a disfunção relacionada com o envelhecimento estão envolvidos, como acontece em outras doenças neurodegenerativas. (1)

### **3.2.1 Fatores Genéticos**

Mais de 30 mutações em diferentes genes foram associadas a um maior risco de desenvolvimento de ELA. (7) A arquitetura genética desta doença parece ser complexa, visto que as mutações monogênicas explicam apenas 15% dos pacientes. (3)

Há evidência que alguns destes genes mutados são herdados dos pais, mas apenas 5 a 10% dos pacientes apresentam o tipo familiar de ELA e mostram este padrão autossômico dominante. Os outros 90% a 95% representam casos de ELA esporádica, onde também ocorrem mutações nos mesmo genes. (1,2,11) Os genes mais frequentemente mutados e associados à ELA incluem o TARDBP, SOD1, FUS, C9ORF72, entre outros. Estes quatro referidos, são responsáveis por 70% dos casos de ELA familiar. (2,7,12) Particularmente as mutações de SOD1, a primeira a ser descoberta como uma mutação associada à ELA em 1993, é responsável por cerca de 20% dos casos de ELA familiar e 2% de ELA esporádica. (6,9) Até à data, mais de 140 mutações foram associadas ao gene SOD1. Contudo, a descoberta da mutação no gene C9orf72, revelou que esta é responsável por 40% dos casos de ELA familiar e 7% dos casos de ELA esporádica. (6,13) Algumas mutações estão associadas a um risco maior de desenvolvimento de um tipo de ELA do que outro. A título de exemplo, pacientes com mutações no gene C9orf72 têm maior probabilidade de desenvolver ELA bulbar e de desenvolver disfunção cognitiva e comportamental. (3)

### **3.2.2 Fatores ambientais**

Para além dos fatores genéticos, da idade e do sexo masculino, fatores ambientais foram associados ao desenvolvimento de ELA, tais como o tabagismo, o desporto de impacto (nomeadamente o futebol e o futebol americano), o serviço militar, a exposição a toxinas, metais pesados (nomeadamente chumbo e mercúrio), pesticidas agrícolas ambientais, campos eletromagnéticos, infeções virais e trauma ou lesões da cabeça. (1) Contudo, a relação causal destes fatores com a ELA permanece sem ser estabelecida. (3) De realçar que, até ao momento, nenhuma relação foi estabelecida entre o desenvolvimento de ELA e o consumo de álcool. (6)

Apesar do exercício físico ser protetor para muitas doenças, começou a ser descrito como um fator de risco importante no desenvolvimento de ELA desde que o jogador de *baseball* americano *Lou Gehrig*, e mais tarde outros casos acumulados de antigos atletas

profissionais, desenvolveram ELA. A evidência demonstra que existe uma associação linear entre o exercício físico e o risco de ELA, apoiando a teoria que o exercício físico vigoroso aumenta significativamente este risco. Contudo, também foi descoberto um aumento significativo no risco de ELA em pessoas que praticam exercício físico recreativamente, ou seja, de atividade considerada moderada. (14) Este aumento do risco é independente da idade, do sexo, do nível de educação, do consumo de álcool e de tabaco. Apesar destes resultados os estudos sugerem que o exercício físico não é um fator major na patogênese da ELA e pode ter um maior efeito em determinados subgrupos de pacientes. (14)

### **3.3 Manifestações clínicas**

Existe uma grande variabilidade na idade e forma inicial de manifestação dos sintomas, e na taxa de progressão da ELA. (3) A idade média de início dos sintomas é entre os 50 e os 60 anos, e quando a doença se torna perceptível, quase 80% dos neurónios motores já foram perdidos.(4)

Os sintomas são inicialmente focais e tendem a espalhar-se pelo resto do corpo à medida que a doença avança, ficando os doentes, na fase final, completamente paralisados. (1,3)

Os sintomas mais comuns afetam os músculos dos membros superiores e inferiores com fraqueza, fasciculações, atrofia e rigidez ou espasticidade. (1) À medida que os níveis bulbares são atingidos, ou seja, os músculos orofaríngeos, surge a disfagia, inicialmente mais para líquidos do que para sólidos, e a disartria, sendo que ambas levam à perda de peso e à anorexia. Ao nível dos nervos cranianos surge fraqueza facial com atrofia e fasciculações da língua, redução da elevação do palato, acumulação das secreções orais e hipersalivação. (6)

Ao exame neurológico, o maior sintoma de envolvimento dos membros é a fraqueza muscular sem dor. Como é uma doença que afeta os neurónios motores superiores e inferiores, apresentam sinais da síndrome do neurónio motor superior como hiperreflexia e hipertonia, e sinais da síndrome do neurónio motor inferior como atrofia e fasciculações. Concordantemente, estes pacientes apresentam sinal de *Babinski*. (3,4,6)

Os nervos oculomotores são poupados até às fases finais da doença e as vias sensoriais não são afetadas. A dor, contudo, é reportada em cerca de metade dos pacientes com ELA, sendo a sua etiologia provavelmente multifatorial, apesar desta ser sub-reconhecida e subtratada. (6)

Na ELA clássica, sinais de degeneração, quer dos neurónios motores superiores quer dos inferiores, estão presentes em pelo menos uma região do corpo. Contudo, podemos identificar uma variedade de subtipos de ELA baseados no envolvimento neuronal, sendo os dois principais a ELA do tipo espinhal e a ELA do tipo bulbar. (3)

A ELA é do tipo espinhal se os sintomas se iniciarem tipicamente com fraqueza e atrofia muscular unilateral, mais distal do que proximal dos membros superiores ou inferiores, o que acontece em cerca de dois terços dos pacientes, e do tipo bulbar se os sintomas se iniciarem nos músculos bulbares, com disfagia e disartria. (3,11) Os pacientes com ELA do tipo bulbar, cerca de um terço de todos os pacientes, associada a uma progressão mais rápida da doença, apresentam problemas respiratórios mais frequentemente. (3,5)

Na ELA espinhal com início nos membros superiores, o início é tipicamente na mão dominante. A maioria tem início apenas num membro, ou nos dois, de maneira assimétrica. (3,6) Na ELA bulbar para além da disartria e disfagia, surge disфонia e diminuição do encerramento labial. Em fases mais avançadas da doença surge fraqueza muscular axial, com queda da cabeça e problemas de postura. Em cerca de 30% dos pacientes podem surgir crises de riso ou choro incontroláveis, um efeito pseudobulbar, e ainda a ausência de expressão facial, conhecida como paralisia pseudobulbar. A ELA bulbar é uma variante devastadora, caracterizada por um rápido declínio e uma sobrevivência média de 2 anos após o início dos sintomas. Apesar de apenas cerca de 30% desenvolverem ELA do tipo bulbar, a maioria dos casos de ELA eventualmente sofrem de dificuldades no discurso e na deglutição. (3)

Apesar da maioria dos pacientes ser rotulado com um fenótipo espinhal ou bulbar, a ELA é um síndrome clinicamente heterogéneo com manifestações motoras e extra motoras. (3)

Em níveis avançados da doença, o sistema respiratório é afetado levando a insuficiência respiratória com necessidade de ventilação assistida para o resto da vida. (4) Os principais sintomas de envolvimento precoce da ventilação são a ortopneia, o sono pobre, cefaleias matinais, hipersonolência diurna e a dispneia, principalmente com a atividade. (6)

A insuficiência respiratória, causada pela respiração ineficaz devido à paralisia progressiva do diafragma, principalmente por disfunções motoras do nervo frénico, e dos outros músculos respiratórios, é a principal causa de morte, em cerca de 50%, dos pacientes com ELA, dentro de 3 a 5 anos após o início dos sintomas. A disfunção respiratória é propícia também ao desenvolvimento de infeções do trato respiratório associadas a uma capacidade reduzida de tosse e de libertação das secreções. (1,5,15)

Tradicionalmente, pensava-se que a ELA era uma doença exclusiva dos neurónios motores. Contudo, grande parte dos pacientes com ELA sofrem de algum nível de manifestações extra motoras, sugerindo o envolvimento de outros subtipos de neurónios. (3,16)

Em 10 a 15% dos pacientes é feito o diagnóstico de demência frontotemporal (DFT), enquanto que 35 a 75% dos pacientes apresentam alterações cognitivas e comportamentais. A demência frontotemporal é caracterizada pela degeneração dos lobos frontal e temporal anterior, e traduz-se clinicamente por mudanças comportamentais, disfunção da função executiva e da linguagem. (3,6) Estes pacientes parecem ter uma menor sobrevivência do que aqueles sem disfunção neurocomportamental. (6)

Uma das limitações na compreensão dos mecanismos da doença na ELA e, por isso, também na investigação de potenciais terapias, é a incapacidade de obter tecido cerebral ou da medula espinhal do paciente durante o curso da doença. Posto isto, os tecidos de autópsias destes pacientes podem ser importantes para providenciar informações. Contudo, como estes são obtidos num estadio final da doença, não refletem os mecanismos à medida que eles evoluem. (16)

### **3.4 Fisiopatologia**

Conhecer os mecanismos da ELA é crucial para o desenvolvimento das abordagens terapêuticas. (2) Apesar da causa de morte dos neurónios motores que ocorre na ELA ser desconhecida, os mecanismos que têm sido descritos como estando associados são conhecidos, sendo eles o distúrbio na homeostase proteica, o aumento do stress oxidativo, os distúrbios no metabolismo do RNA e do DNA, a disfunção mitocondrial, da reparação do DNA, do transporte núcleo-citoplasma, a excitotoxicidade glutamatérgica, a disfunção do transporte axonal, a neuroinflamação e a reatividade das células da glia (astrócitos, microglia e oligodendrócitos). (1,2,11)

#### **3.4.1 Distúrbios da homeostase proteica**

A disrupção da homeostase proteica e a consequente agregação de proteínas é o marcador de muitos distúrbios neurodegenerativos. (16) Os marcadores patológicos chave da ELA são os corpos ubiquitinados, que são maioritariamente compostos por agregados citoplasmáticos de proteínas TDP-43. A TDP-43 é uma proteína de ligação ao DNA e ao

RNA, codificada pelo gene TARDBP, envolvida em múltiplos processos. Estes agregados são encontrados em mais de 95% dos casos de ELA, quer esporádica, quer familiar, não sendo únicas nos pacientes com mutações no gene TARDBP. (2,3,7) Concordante com as suas funções nucleares, normalmente, a TDP-43 está localizada no núcleo, podendo transportar-se para o citoplasma sobre certas condições basais fisiológicas, mas na ELA desloca-se para o citoplasma para formar agregados que se tornam fosforilados, e que são o seu marcador patológico. Outros agregados proteicos, como os de SOD1, FUS e outros, são encontrados em pacientes com mutações nos seus respetivos genes. (3)

A disfunção cognitiva que ocorre em alguns pacientes com ELA sugere que esta patologia não é limitada aos neurónios motores, mas sim uma associação entre disfunção motora e cognitiva. Patologicamente, a ELA e a Demência frontotemporal partilham a presença de deposição de TDP-43 que começa nos neurónios motores corticoespinhais e nos neurónios motores espinhais e progride para os neurónios das regiões frontal, parietal, tronco cerebral e formação reticular. Seguidamente, pela deposição no prosencéfalo basal e frontal anterior, tálamo lateral, substância nigra e, em casos mais avançados, deposição de TDP-43 nos neurónios do lobo temporal, incluindo o hipocampo. (16)

### **3.4.2 Aumento do stress oxidativo**

Os neurónios motores que têm altas taxas metabólicas são particularmente suscetíveis ao stress oxidativo, que pode causar lesão celular irreversível e morte neuronal. Níveis aumentados de lesão oxidativa são repetidamente encontrados em pacientes com ELA. (2) O stress oxidativo envolve o aumento da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e aumento do dano oxidativo das proteínas, provocando a sua agregação. (9) Mutações no gene SOD1 aumentam o stress oxidativo e determinam a deposição de corpos de inclusão nos neurónios motores. (2,7)

### **3.4.3 Excitotoxicidade glutamatérgica**

A excitotoxicidade glutamatérgica também foi implicada na patogénese da ELA. O aumento dos níveis de glutamato, a hiperexcitação e desregulação dos seus recetores e a deficiente remoção na fenda sináptica foram demonstradas em pacientes com ELA, daí a

utilização de um agente antiglutaminérgico no tratamento, que é um dos únicos tratamentos modificadores da doença, o *riluzole*. (7)

### **3.4.4 Disfunção do transporte axonal**

A disfunção do transporte axonal foi também associada à ELA. As causas poderão ser explicadas por algumas mutações na maquinaria de transporte axonal que causam uma redução da estabilidade dos microtúbulos, alterações na fosforilação dos neurofilamentos e consequente acumulação de proteínas. (2)

### **3.4.5 Neuroinflamação e reatividade das células não neuronais**

Outros mecanismos sugeridos são respostas imunológicas alteradas, a neuroinflamação e as mudanças no microambiente providenciado pelas células da glia como as células da microglia, astrócitos e oligodendrócitos. (2)

Os astrócitos reativos são uma característica histopatológica da ELA e de outras doenças neurodegenerativas. Vários estudos mostram que os astrócitos reativos são mediadores da progressão da doença pela neuroinflamação associada. Posto isto, sugere-se que a inibição da astrogliose, ou seja, a inibição da mudança reativa das células da glia em resposta a danos do sistema nervoso central, pode ser uma estratégia terapêutica para evitar a neurodegeneração. (16)

Os oligodendrócitos são reconhecidos primariamente pela produção de mielina, para melhorar a condução axonal. Oligodendócitos anormais e zonas desmielinizadas foram observadas em autópsias de tecidos de pacientes com ELA, sugerindo também a sua associação com a patogênese desta doença. (16)

As células da microglia, células imunitárias residentes do sistema nervoso central, estão tipicamente em estados de repouso, sendo ativadas com alguma perturbação do tecido ou estímulo. A microglia reativa pode ocorrer com dois fenótipos, o fenótipo M1, que promove a toxicidade através da libertação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, e as M2, que têm efeitos neuroprotetores através da libertação de quimiocinas anti-inflamatórias, promovendo a fagocitose dos restos celulares ou promovendo a reparação tecidular. Estudos mostraram a presença da microgliose reativa em pacientes com ELA, e o

envolvimento da microglia como parte do neuroinflamossoma. Por isto, são um alvo terapêutico em alguns ensaios clínicos, como veremos mais à frente. (16)

### **3.4.6 Disfunção endotelial**

A ELA como patologia vascular é uma hipótese relativamente recente. A lesão dos capilares do sistema nervoso central é um achado comum e partilhado em modelos animais e em pacientes humanos com ELA, ou seja, a evidência tem demonstrado que a ELA é uma doença neurovascular. A disfunção das células endoteliais no cérebro e na medula espinhal resultam num comprometimento da integridade da barreira hematoencefálica. A disfunção destas células fora do sistema nervoso central, por exemplo nos pulmões, potencia a lesão pulmonar, podendo dar início às complicações respiratórias da ELA. (5)

### **3.4.7 Outros mecanismos**

Para além de todos estes mecanismos, o stress do retículo endoplasmático e a disfunção mitocondrial foram também associados à progressão da ELA. (9) Estes distúrbios causam também a acumulação de agregados de proteínas nos neurónios motores, que no fundo é a principal razão do desenvolvimento de ELA, que levam a múltiplos distúrbios da função da célula. (3)

Todos os distúrbios apresentados refletem-se em alterações microscópicas cerebrais na ELA que retratam a perda da conexão neuromuscular devido à morte neuronal principalmente no corno anterior da medula espinhal e nos núcleos motores cranianos inferiores do tronco cerebral. (3,7)

## **3.5 Diagnóstico**

Para realizar o diagnóstico da ELA não existe um teste único nem específico. O diagnóstico é principalmente clínico, baseado nas manifestações clínicas que mostram sinais de falência dos neurónios motores superiores e inferiores, em pacientes com fraqueza muscular progressiva, sem que outras explicações possam ser encontradas. (1,3)

A doença pode mimetizar outras doenças neurológicas, sendo o diagnóstico precoce muito difícil ou mesmo impossível. Em pacientes com apresentações muito precoces da doença, com progressão lenta ou com distúrbios do sistema nervoso periférico ou central concomitantes, o diagnóstico pode ser um desafio. A probabilidade de erro no diagnóstico é cerca de 7-8% e diz respeito a síndromes que mimetizam a ELA. (3)

Podem ser utilizados alguns métodos complementares para distinguir de outras doenças neurológicas como o estudo de condução nervosa (ECN), ressonância magnética (RM), exames de urina e de sangue, a eletromiografia (EMG), a biópsia muscular e testes genéticos. (1)

Os testes genéticos dos genes mais frequentemente mutados na ELA (C9orf72, SOD1, TARDBP e FUS) podem ser feitos a pacientes com história familiar positiva. Contudo, não existe consenso para a testagem em pacientes com ELA esporádica. (3)

Os biomarcadores clínicos e moleculares têm um papel importante no diagnóstico. Os biomarcadores clínicos são evidenciados pela eletromiografia que deteta a lesão do neurónio motor, pela estimulação magnética transcraniana que avalia a integridade funcional dos neurónios, pela miografia por impedância elétrica, que avalia a integridade funcional e a estrutura do músculo, e ainda por abordagens neurofisiológicas. Os biomarcadores moleculares como as citocinas inflamatórias podem ser detetados nos fluidos corporais incluindo o líquido cefalorraquidiano, urina, sangue e saliva, identificados principalmente através do método ELISA. (1)

Os critérios de diagnóstico *El Escorial* modificados, estão presentes na tabela 1. A maioria dos médicos não se baseia nestes critérios porque têm falta de sensibilidade, avaliando a progressão da doença, e apenas indiretamente a certeza diagnóstica. Para além disso, a maioria destes critérios foram desenvolvidos para propósitos de investigação para a seleção de pacientes em ensaios clínicos. (1,6,17)

É altamente necessária a criação de novos critérios diagnósticos clínicos da ELA que permitam diminuir o atraso no diagnóstico, que continua a ser cerca de 1 ano após início dos sintomas. (3)

**Tabela 1**

**Critérios *El Escorial* modificados para o diagnóstico da ELA (6)**

<b>Categoria de Diagnóstico</b>	<b>Critérios</b>
<b>ELA clinicamente definitiva</b>	Sinais de envolvimento do neurónio motor superior e inferior na região bulbar e em pelo menos duas regiões espinhais (lombossacral, torácica ou cervical) OU Sinais de envolvimento do neurónio motor superior e inferior em três regiões espinhais
<b>ELA clinicamente provável</b>	Sinais de envolvimento do neurónio motor superior e inferior a nível bulbar e em pelo menos duas regiões (bulbar ou espinhal) com sinais de envolvimento do neurónio motor superior rostrais aos sinais de envolvimento do neurónio motor inferior
<b>ELA clinicamente provável</b> (apoiada por estudos laboratoriais e de neuroimagem que excluem outros diagnósticos)	Evidência clínica de sinais de envolvimento do neurónio motor superior e inferior numa região do corpo ou de sinais de envolvimento do neurónio motor superior numa região e achados de envolvimento do neurónio motor inferior em pelo menos duas regiões do corpo na eletromiografia
<b>ELA clinicamente possível</b>	Sinais de envolvimento do neurónio motor superior e inferior apenas na região bulbar ou apenas na região espinhal OU Sinais de envolvimento do neurónio motor superior em duas ou mais regiões do corpo OU Sinais de envolvimento do neurónio motor inferior rostrais a sinais de envolvimento do neurónio motor superior

### 3.6 Prognóstico

O prognóstico da ELA é pobre e a esperança de vida é extremamente variável. Como outras doenças neurológicas, a ELA tem taxas variáveis de progressão entre os doentes. Para além disso, o tipo de ELA, bulbar ou espinhal, tem efeito no prognóstico. (4) As características clínicas associadas a um pior prognóstico são o rápido declínio funcional, medido por uma escala denominada ALSFRS-R, que analisaremos em detalhe mais à frente, a perda de peso

ou de IMC pronunciada, a presença de DFT, idade avançada de início de sintomas e CVF baixa. (3)

### **3.7 Tratamento**

A ELA não tem cura nem tratamento profilático. (1) É gerida predominantemente por tratamento de suporte através de cuidados multidisciplinares. (4) Os estudos apoiam que os cuidados de suporte por uma equipa multidisciplinar são a única estratégia de tratamento que melhora a qualidade de vida. (15)

Existem três pontos críticos nos cuidados de saúde dos pacientes com ELA. O *timing* de comunicação de diagnóstico, a disponibilidade de acesso a cuidados multidisciplinares e o *timing* de decisões relacionadas com a gestão de sintomas e cuidados de fim de vida. Estes mostraram resultados na melhoria da qualidade de vida dos pacientes, aumento da sobrevivência e redução das hospitalizações e dos tempos de internamento. (4) A educação do paciente e a comunicação com este reduz a sua ansiedade e os seus medos, e a maneira como o diagnóstico é comunicado determina a relação médico-paciente. Dedicar algum tempo a discutir o diagnóstico é um alto preditor de satisfação dos cuidados de saúde e, fazê-lo na presença de familiares, pode reduzir a ansiedade do paciente e dos cuidadores. (1,4)

#### **3.7.1 Tratamento farmacológico**

As únicas duas soluções farmacológicas aprovadas pela *FDA (Food and Drugs Administration)* são o *riluzole* e o *edaravone*, com efeitos terapêuticos modestos, aumentando a sobrevida média do paciente em 2 a 6 meses, variando de pessoa para pessoa. (10) Apesar de atrasarem a progressão da doença, em termos percentuais, a diminuição da progressão equivale a apenas 10%. (13) Na tabela 2 encontramos as principais diferenças entres estes dois fármacos.

O *Riluzole* é um agente anti-glutamatérgico que tem como alvo os canais de sódio sensíveis a TTX, os recetores NMDA e os recetores GABA (9,13). Contudo, tem alguns efeitos adversos como diarreia, náuseas, fadiga, tonturas e problemas a nível hepático, sendo mesmo contraindicado em pacientes com hepatopatia e aumento das transaminases. Apesar do Riluzole abrandar a progressão dos sintomas e melhorar a sobrevivência, os

sintomas continuam a manifestar-se e tornam a terapêutica da ELA mais complexa. Para além disto, sintomas não-motores como disfunção cognitiva e alterações psiquiátricas podem também ser observados. (7,18)

Em adição, outra opção são fármacos antioxidantes como o *Edaravone*. (1) O *Edaravone* é um quelante de radicais livres (*free-radical scavenger*) (9). Apesar de ainda não disponível em Portugal, está aprovado em alguns países como os Estados Unidos da América, Japão, entre outros, com efeitos adversos mínimos. (1)

**Tabela 2**

**Comparação entre Riluzole e Edavarone (19)**

<b>Fármaco</b>	<b><i>Riluzole</i></b>	<b><i>Edavarone</i></b>
<b>Nome comercial</b>	<i>Rilutek</i> ®	<i>Radicava</i> ®
<b>Estado aprovação</b>	Licença Global	Japão e EUA
<b>Formulação</b>	Comprimido oral	Infusão intravenosa
<b>Dosagem</b>	50 mg a cada 12h diariamente	60 mg por dia durante 14 dias, seguido de um período de 14 dias sem fármaco (ciclo 1), depois 10 dias por mês da dose diária
<b>Custo (mensal)</b>	~1000\$	~3000\$ Japão; ~12000\$ EUA
<b>Administração em casa</b>	Sim	Não
<b>Alvos moleculares e celulares</b>	Anti-excitotóxico. É um antagonista do glutamato e é usado como anticonvulsivante. O mecanismo preciso é desconhecido	Antioxidante. É um quelante de radicais livres. O mecanismo na ELA é incerto.
<b>Efeito nos pacientes</b>	Aumenta a sobrevivência dos pacientes 2 a 6 meses, variando de pessoa para pessoa	Diminui a progressão da doença, medida pela ALSFRS-R, variando de pessoa para pessoa

<b>Efeitos adversos</b>	Náuseas, astenia, tonturas, problemas gastrointestinais e aumento do nível das enzimas hepáticas	Glicosúria
-------------------------	--	------------

Desta maneira, é necessário identificar fármacos eficazes para múltiplos outros alvos terapêuticos na ELA. (9) Para além disso, também se tornou claro que ter como alvo apenas os neurónios não é uma estratégia suficiente, outras células devem ser consideradas, como as células da glia. Apesar de se considerar os mediadores inflamatórios produzidos pelas células da glia e a neuroinflamação como potenciais alvos terapêuticos, dada a extensa ativação da microglia e dos astrócitos na ELA, terapêuticas anti-inflamatórias e imunossupressoras falharam em induzir uma melhoria nestes pacientes. Não é claro o motivo do insucesso terapêutico, mas acredita-se que pode ser devido a efeitos sistémicos *versus* locais ou à incapacidade das atuais intervenções anti-inflamatórias em manter o equilíbrio correto de citocinas neuroprotetoras no cérebro. (13)

### **3.7.2 Tratamento de suporte**

Alguns sintomas de desconforto podem ser alvo de tratamento sintomático, farmacológico ou não farmacológico. Por exemplo, a epasticidade pode ser tratada com baclofeno, tizanidina e canabinoides. Já a sialorreia pode ser tratada com anticolinérgicos como amitriptilina, brometo de glicopirrónio ou injeções de toxina botulínica nas glândulas salivares. As câibras musculares podem responder bem a suplementos de magnésio, sulfato de quinina, gabapentina e carbamazepina. A labilidade emocional pode ser tratada com inibidores seletivos da recaptção da serotonina (SSRI), amitriptilina, benzodiazepinas, entre outros. Sondagens de alimentação são uma opção se o aporte calórico não for suficiente ou quando a deglutição se torna difícil. (3)

Como as opções que existem são limitadas ao suporte respiratório e sintomático, um tratamento eficaz é necessário dada a fatalidade da doença e o impacto significativo na vida dos pacientes e dos cuidadores. (2) Avanços tecnológicos nos cuidados de saúde têm sido feitos para prolongar a vida dos pacientes através de métodos como ventilação mecânica, traqueostomia e as sondagens de alimentação. Apesar de prolongar a vida dos doentes, não melhoram a sua qualidade de vida. Esta é atingida quando a abordagem está focada no

bem-estar mental, providenciando conforto, minimizando a dor e aproveitando tempo de qualidade com a família. (4)

Com objetivo de controlar e diminuir os sintomas existem outros métodos como suporte social e psicológico, terapia ocupacional, terapia da fala e fisioterapia. (1) A terapia de grupo pode também providenciar suporte social e promover benefícios adicionais (4)

No que toca a sessões de fisioterapia, existe ainda falta de evidência confirmatória de que o exercício físico durante as sessões cause deterioração nestes pacientes. Contudo, exercícios focados na força, resistência e treino aeróbico a intensidades moderadas não estão associados com a desaceleração ou aceleração do processo de progressão da doença. Contudo, exercício excessivo deve ser evitado porque pode induzir lesão muscular, para além de fadiga e dor. (4)

Os cuidados paliativos são apropriados para estes pacientes desde o momento do diagnóstico, e o envolvimento paliativo dever flutuar baseado nas necessidades de cada paciente e da sua família, à medida que a doença progride (4)

### **3.7.3 Estratégias inovadoras**

Estratégias inovadoras têm revolucionado a maneira com estes pacientes podem comunicar. As interface cérebro-computador (ICC) podem ser usadas como dispositivos de controlo de assistência em doenças neurológicas, como a ELA, que limitam a comunicação e o movimento. As ICC permitem o controlo de dispositivos e de aplicações de computador através da interpretação da intenção do paciente obtida através de sinais cerebrais. Podem ser utilizados em pacientes com paralisia severa para complementar ou substituir as suas capacidades de comunicação e para controlar dispositivos no seu ambiente. Estes pacientes com disartria severa operam uma aplicação de computador com 6 comandos de discurso intuitivos via um implante crónico eletrocorticográfico (ECoG) no córtex sensório-motor anterior. Os comandos de discurso são detetados com precisão e decodificados. Recentemente, e com a evolução da Inteligência artificial, é possível obter ICC com capacidade de discurso, em forma de áudio de frases diretamente traduzidas de registos intracranianos. Estas técnicas oferecem um caminho esperançoso no restauro da comunicação nestes pacientes, sem nenhum efeito adverso a ser relatado. (20)

### **3.7.4 Tratamento com células estaminais**

O tratamento com células estaminais é, de facto, um potencial tratamento promissor para a ELA. Apesar de necessitar de melhor compreensão, parece oferecer benefícios que nenhum outro tratamento, até à data de hoje, ofereceu aos pacientes com a doença. Por essa razão será o foco desta dissertação.

Apesar de parecer tentador utilizar uma estratégia de substituir neurónios motores degenerados com neurónios diferenciados a partir de células estaminais, dada a perda de neurónios motores ser uma das maiores características da ELA, existem limitações práticas a esta aplicação clínica. Os neurónios enxertados necessitam de formar sinapses neuromusculares por caminhos axonais de longa distância, em direção aos músculos alvo, com precisão, para estabelecer sinapses funcionais. Por isso, substituição direta dos neurónios motores degenerados pode não ser uma estratégia viável na ELA. Contudo, as células estaminais podem agir por outros mecanismos que influenciam a funcionalidade e sobrevivência das células residentes nos tecidos. (2,7)

Vamos analisar em detalhe, no próximo capítulo, quais as características das células estaminais que as tornam boas candidatas à terapêutica da ELA.



## 4. As células estaminais

As células estaminais têm um grande potencial de se tornar um dos mais importantes trunfos da medicina no futuro. O tratamento com células estaminais tornou-se num tópico promissor de estudo científico, e o desenvolvimento de métodos de tratamento criou grandes expectativas. (21) O estudo da proliferação, diferenciação e migração destas células pode contribuir para a descoberta de novas formas de promover a regeneração tecidual. Dentro das condições que mais beneficiam destes tratamentos encontramos a degeneração macular, os acidentes vasculares cerebrais, a osteoartrite, a diabetes *mellitus* e as doenças neurodegenerativas, o grande foco desta dissertação. (22)

### 4.1 Classificação

As células estaminais são células não especializadas do corpo humano capazes de se diferenciar em qualquer célula, com alto potencial de autorrenovação e proliferação. Existem quer em tecido embrionário quer em tecidos fetais ou adultos, como a medula óssea, tecido adiposo, polpa dentária, sangue, fluído amniótico, cordão umbilical, entre outros. (22) Na tabela 3 encontramos a classificação das células estaminais segundo o seu potencial de diferenciação e na tabela 4 encontramos a sua classificação quanto à sua fonte. Existem diferentes etapas de especialização e o seu potencial de diferenciação é reduzido a cada etapa, o que significa que uma célula estaminal multipotente não é capaz de se diferenciar em tantas células como uma pluripotente. (21)

**Tabela 3**

**Classificação das células estaminais segundo o seu potencial de diferenciação**

<b>Célula estaminal</b>	<b>Caraterísticas</b>
<b>Totipotente</b>	Capacidade de divisão e diferenciação em todas as células do organismo. A totipotência tem o maior potencial de diferenciação e permite que as células formem, quer o embrião, quer as estruturas extraembrionárias. O zigoto é totipotente e pode diferenciar-se em mais de 250 tipos de células. (21–23)

<b>Pluripotente</b>	<p>Capacidade de divisão e diferenciação em células de todas as camadas germinativas (endoderme, mesoderme e ectoderme), mas não em estruturas extraembrionárias, como a placenta.</p> <p>Um dos métodos de avaliar a sua atividade é a avaliação da formação de teratomas. Por exemplo, as células estaminais embrionárias ou as células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs) são pluripotentes. (21–23)</p>
<b>Multipotente</b>	<p>Capacidade de divisão e diferenciação mais estreita que as células pluripotentes, mas podem diferenciar-se em células de linhagens específicas.</p> <p>Por exemplo, células estaminais hematopoéticas são multipotentes. (21–23)</p>
<b>Oligopotente</b>	<p>Capacidade de divisão e diferenciação em vários tipos celulares.</p> <p>Por exemplo a célula estaminal mielóide é oligopotente (21–23)</p>
<b>Unipotente</b>	<p>Capacidade de divisão e diferenciação mais estreita de todas, apenas formam um tipo celular.</p> <p>Têm a propriedade de se dividirem repetidamente, o que as torna boas candidatas para terapias na área da medicina regenerativa.</p> <p>Por exemplo, os dermatócitos são unipotentes. (21–23)</p>

**Tabela 4**

**Classificação das células estaminais segundo a sua fonte**

<b>Células estaminais</b>	<b>Caraterísticas</b>
<b>Embrionárias</b>	<p>São células pluripotentes derivadas de uma massa celular interna de um embrião em estágio inicial de pré-implantação, 4-5 dias após a fertilização, o blastocisto. (2)</p> <p>A diferenciação destas células deve ser muito específica e controlada para evitar a formação de teratomas. (4,21–23)</p>
<b>Adultas</b>	<p>São células estaminais não diferenciadas encontradas entre células diferenciadas por todo o corpo. A sua função é a substituição das células que se perdem a cada dia. Estas células têm um espectro de diferenciação restrito e uma taxa de proliferação menor do que a das células estaminais embrionárias. (21)</p> <p>Estão presentes em diferentes tecidos como a medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical e em partes específicas do cérebro e da medula espinhal. (21–23)</p>

<b>Pluripotentes induzidas (iPSC)</b>	São células reprogramadas em laboratório a partir de células estaminais adultas de volta ao seu estado pluripotente através da transferência do seu núcleo adulto para o citoplasma de um oócito ou pela fusão com uma célula multipotente. (2,21)
---------------------------------------	--

As células estaminais humanas podem, espontaneamente, ou por indução, causar regeneração em caso de lesão ou envelhecimento, com o objetivo de manter a função do tecido e dos órgãos e, por conseguinte, manter o equilíbrio do organismo. (22)

Para serem úteis em tratamento, as células estaminais devem ser convertidas nos tipos celulares necessários. Compreender e utilizar as vias de sinalização para a diferenciação é um método muito importante. (21,22) Na diferenciação é comum reproduzir os sinais que são recebidos pelas células quando ultrapassam as diferentes fases do desenvolvimento. O microambiente extracelular tem um papel significativo no controlo do comportamento celular, e manipulando as condições da cultura é possível restringir vias de diferenciação específicas e gerar culturas ricas em certos percussores *in vitro*. Contudo, atingir o mesmo efeito *in vivo* é um desafio. É, por isso, crucial desenvolver condições de cultura que permitam a promoção da diferenciação homogénea das células nos tecidos desejados. (21)

## 4.2 Células estaminais embrionárias

O dilema ético, especialmente nas células estaminais embrionárias, limitou o seu uso em ensaios clínicos. À luz da ética, será a destruição precoce de um embrião humano, para pesquisar novas formas de tratamento, aceitável?

Em *guidelines* para a investigação com células estaminais e o seu transplante, apresentadas pela *International Society for Stem Cell Research* (ISSCR), até que novas evidências científicas e clínicas claras surjam, qualquer tentativa de modificar o genoma nuclear de embriões humanos para o propósito de reprodução humana deve ser proibido. Esta *guideline* combinada com uma mais recente da *Lancet Commission of experts* enfatizou as considerações éticas de todos os aspetos da terapia com células estaminais embrionários. (2)

Devido a estas preocupações éticas, o foco inicial nas células estaminais embrionárias mudou para as adultas e para as pluripotentes induzidas. De facto, a maioria dos ensaios

clínicos envolve células estaminais adultas mesenquimais ou células estaminais adultas neuronais. (2) Por essa razão, serão o principal foco desta revisão.

### **4.3 Células estaminais adultas**

Existem vários tipos de células estaminais adultas, as células estaminais mesenquimais, neuronais, hematopóéticas, da polpa dentária, da pele, entre outras. (21)

#### **4.3.1 Células estaminais mesenquimais**

As células estaminais mesenquimais ou estromais são células multipotentes adultas. Foram isoladas pela primeira vez da medula óssea em 1976 como unidades formadoras de colônias fibroblásticas e mais tarde detetadas noutros tecidos. (1)

Permanecem no tecido humano indiferenciadas até receberem um sinal para se desenvolverem em células especializadas com novas funções celulares. Servem, por isso, em muitos tecidos como reservatório interno, essenciais para o crescimento, desenvolvimento, sobrevivência e reparação. (1,26)

Exibem 3 propriedades fundamentais, a proliferação por mitose, para produzir descendência igual à célula original, a autorrenovação por longos períodos e a capacidade de se diferenciarem em diferentes linhagens como osteócitos, adipócitos, condrócitos, entre outros, sobre certas condições fisiológicas. São facilmente acessíveis e podem ser isoladas de células de fontes adultas como a medula óssea, tecido adiposo, sangue periférico, tecido dentário entre outros, incluindo fontes fetais como geleia de Wharton do cordão umbilical, placenta e outros tecidos. Contudo, diferentes fontes mostram diferenças na taxa de crescimento, expressão de marcadores celulares e capacidade de se diferenciarem em fenótipos neuronal ou não neuronal, como as células da glia. (1,25)

Existem vantagens na sua utilização dado não enfrentarem as considerações éticas associadas ao uso de células estaminais embrionárias, por poderem ser facilmente isoladas e expandidas *in vitro* através de um método simples e por possuírem propriedades imunomoduladoras e antiapoptóticas. Não são imunogénicas e não necessitam de uso de fármacos imunossupressores antes da injeção devido à falta de expressão de MHC (complexo principal de histocompatibilidade), permitindo o uso autólogo e alogénico. Exibem um comportamento migratório e podem diferenciar-se em vários tipos celulares.

(1) Para além das próprias células estaminais, os secretomas isolados ou ainda o meio condicionado da cultura das mesmas, são separados, expandidos *in vitro* e implantados, de fontes autólogas ou alogénicas. (25)

Apesar das primeiras células estaminais derivadas da medula óssea continuarem a ser mais usadas atualmente e, por isso, as melhores caracterizadas, podem ser usadas células estaminais mesenquimais de diferentes fontes. (2)

Grandes quantidades de células estaminais mesenquimais podem ser obtidas do tecido adiposo com um processo de isolamento simples e que não requer intervenções especializadas, sendo facilmente obtidas por lipossucção ou outras intervenções cirúrgicas. As células estaminais mesenquimais do tecido adiposo parecem ter características semelhantes às da medula óssea, como a expressão antigénios de superfície comuns, mas têm diferentes capacidade de proliferação e diferenciação. Alguns estudos apontam que as células estaminais mesenquimais do tecido adiposo são mais eficazes do que as da medula óssea, enquanto outros mostram o contrário. Estas diferenças podem ser devidas ao facto de estas células diferirem na libertação de citocinas e na expressão dos recetores de quimiocinas. Para além disto, as células estaminais mesenquimais do tecido adiposo mostram uma elevada atividade proliferativa, enquanto as da medula óssea têm uma taxa de proliferação celular mais lenta. (25)

O cordão umbilical é rico em células estaminais mesenquimais. Devido à possibilidade de criopreservação imediata as células podem ser armazenadas com sucesso e utilizadas em tratamentos no futuro. (21)

Posto isto, e sabendo que as células estaminais têm atividades biológicas diferentes, estas devem ser tidas em conta na seleção para ensaios clínicos específicos. (25)

As células estaminais mesenquimais têm sido utilizadas no tratamento de várias doenças para além da ELA como doenças cardiovasculares Diabetes *Mellitus*, *Covid-19*, doenças neurodegenerativas como doença de *Alzheimer*, doença de *Parkinson*, entre outras. (1)

#### **4.3.2 Células estaminais hematopoéticas**

O transplante de células estaminais hematopoéticas multipotentes é importante porque estas células são umas das mais bem caracterizadas. As células alvo são tipicamente derivadas da medula óssea, do sangue periférico, ou do cordão umbilical. O procedimento pode ser autólogo, quando as próprias células do paciente são utilizadas, alogénico, quando as células estaminais provêm de um dador, ou singeneico, quando as células

estaminais provêm de um gêmeo verdadeiro. Estas células são responsáveis pela geração de todas as linhagens hematopoiéticas do sangue. (21,22)

### **4.3.3 Células estaminais neuronais**

As células estaminais neuronais dão origem aos neurónios e às suas células de suporte. A descoberta das células estaminais neuronais veio contrariar a ideia de que o sistema nervoso central do adulto não é capaz de realizar neurogênese. (21,25)

As células estaminais neuronais são obtidas a partir de tecidos neuronais primários como cérebro ou medula espinhal fetal, neonatal ou adulta. São capazes de se diferenciar em neurónios, células da microglia, astrócitos e oligodendrócitos. (2,27)

### **4.3.4 Células estaminais da polpa dentária**

As células estaminais de dentes decíduos humanos exfoliados (SHED) têm a capacidade de se diferenciar em mais tipos celulares do que outros tipos de células estaminais. As técnicas da colheita, isolamento e armazenamento são simples e não invasivas. Para além disso, as células SHED garantem um transplante autólogo que causa reação imunitária mínima, simples e indolor. Tem ainda a vantagem de ter cerca de menos de um terço do custo do armazenamento do sangue do cordão umbilical e não enfrentar as considerações éticas das células estaminais embrionárias. Em contraste com as células do sangue do cordão umbilical, as células SHED são capazes de se diferenciar em tecidos como o tecido conjuntivo, neuronal, dentário ou óssea. As células SHED podem ainda ser utilizadas em familiares próximos do dador. (21,28)

## **4.4 Células estaminais pluripotentes induzidas**

A criação destas células foi considerada um ponto de reviravolta no tratamento com células estaminais em 2006. Este método abriu um novo campo na investigação com células estaminais com a criação de células estaminais pluripotentes induzidas que podem ser personalizadas para o paciente. A verdade é que os estudos mais recentes têm seguido este caminho. (21,29)

Como as células estaminais se podem propagar indefinidamente e diferenciar em qualquer tipo de célula, podem ser uma fonte ilimitada para reparar tecidos perdidos ou lesados. As iPSC ultrapassaram a necessidade da utilização de embriões na terapia com células estaminais e, como são feitas a partir das células do próprio paciente, são autólogas e não correm o risco de rejeição imunitária. (30)

Primeiramente, eram utilizados os fibroblastos como fonte de iPSC. Como era necessário realizar uma biópsia para atingir estas células começaram a usar-se células do sangue periférico, queratinócitos e células do epitélio renal encontradas na urina. (21)

Estas células necessitam de um controlo de qualidade, sendo um dos pontos mais importantes a avaliação da formação de teratomas, que mostrou ser mais elevada em iPSC humanas comparativamente às células estaminais embrionárias humanas. Esta diferença pode ser explicada pelos métodos de diferenciação e origem celular. (21,22,24)



## **5. Tratamento da ELA com células estaminais**

### **5.1 Princípios do tratamento**

Como mencionado anteriormente, múltiplos fatores estão envolvidos na patogênese da ELA, mas nenhum deles foi um alvo bem-sucedido de agentes farmacológicos. As células estaminais têm como alvo vários dos putativos mecanismos envolvidos no início e na progressão da doença. (9,30) Existem várias estratégias no uso das células estaminais, tais como atingir a substituição dos neurónios motores perdidos e de outras células não neuronais patológicas, por novas células funcionais, ou utilizar o papel neuroprotetor que elas podem oferecer. Estas células ajudam a melhorar o ambiente circundante dos neurónios através secreção de fatores tróficos e da remoção de moléculas tóxicas, assumindo um papel protetor dos neurónios, com sua ação imunomoduladora, anti-inflamatória, antiapoptótica, e de reparação e regeneração tecidual. (1,2,25,31)

#### **5.1.1 Estratégias de substituição celular**

As células estaminais podem atuar nas doenças neurodegenerativas, através da substituição das células que morreram. A substituição celular na ELA exigirá novas células com propriedades de neurónios motores. Os neurónios motores podem ser gerados *in vitro* a partir de células estaminais de várias fontes, incluindo células estaminais embrionárias, pluripotentes induzidas (iPSC) e neuronais. No entanto, para uma estratégia eficaz na ELA, esses neurónios motores teriam de inervar de novo os alvos apropriados e estabelecer sinapses fisiologicamente funcionais, enviando axônios por longas distâncias para os músculos alvo, com o objetivo de restabelecer a função neuromuscular. (30,32)

Contudo, não são apenas os neurónios motores que desempenham um papel na patogênese da ELA, já que as células não neuronais, como por exemplo os astrócitos, estão também envolvidos. Estudos demonstraram que a disfunção astrocítica é capaz de promover a neurodegeneração e que, para além disso, mesmo durante o envelhecimento normal, os astrócitos tornam-se menos úteis no suporte que oferecem aos neurónios motores. (30,32,33) Precusores de astrócitos ou astrócitos derivados de células estaminais

promovem o crescimento axonal, os mecanismos de suporte envolvidos na mielinização pelos oligodendrócitos, e são capazes de modular a resposta imunitária do hospedeiro, fornecer fatores neurotróficos e moléculas protetoras contra insultos oxidativos e excitotóxicos. Estes resultados apoiam a utilização das terapêuticas baseadas na substituição de astrócitos na ELA para diminuir a disfunção geral dos astrócitos, fornecer fatores neurotróficos e estimular habilidades endógenas de reparação tecidual no SNC. (30,32) Alguns estudos demonstraram ainda, a contribuição destas células não neuronais, principalmente células da glia, na degeneração dos neurónios motores na ELA por defeitos na comunicação neurónio-glia, secreção de toxinas ou falta de apoio trófico. Dado que as células estaminais têm a capacidade de se diferenciarem em células não neuronais, a substituição das células da glia pode ser uma estratégia eficaz mais exequível que a substituição dos neurónios motores. (2)

### **5.1.2 Atividade neurotrófica**

Um dos mecanismos principais pelo qual a sobrevivência dos neurónios motores é regulada consiste na libertação de fatores neurotróficos. Estes são proteínas essenciais para a sobrevivência neuronal, e o seu défice pode induzir a morte dos neurónios motores na ELA. Entre estes fatores encontramos o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) que desempenham um papel importante na sobrevivência dos neurónios motores. A maioria das células estaminais também produzem e libertam vários fatores neurotróficos. (30,32) No fundo, o papel benéfico das células estaminais na ELA pode ser explicado pela teoria da vizinhança, onde as células estaminais diminuem a toxicidade das células vizinhas através do seu potencial parácrino, secretando fatores neurotróficos e melhorando o microambiente dos neurónios, atrasando a progressão da doença. (7,25,34)

Os fatores de crescimento envolvidos são, como já mencionado, o GDNF e o BDNF, e ainda o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o fator crescimento fibroblasto (FGF), o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-1), o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), entre outros. (30)

### 5.1.3 Atividade anti-inflamatória e imunomoduladora

Como referido, a atividade anti-inflamatória tem um papel importante no tratamento da ELA. Um dos papéis mais importantes do tratamento com células estaminais diz respeito à sua capacidade de regular a inflamação e capacitar as células residentes a facilitar a reparação tecidular através da ativação de células estaminais endógenas ou da imunomodulação do ambiente. De facto, as células estaminais promovem a imunomodulação porque libertam biomoléculas e fatores solúveis, que formam os secretomas, que inibem a proliferação dos linfócitos T, dos linfócitos B e das células *natural killer*. Os secretomas contêm citocinas, antioxidantes, fatores de crescimento e imunomoduladores. (30) Fatores anti-inflamatórios como a IL-10 e o TGF-  $\beta$ 1 são também libertados e envolvidos na reparação e regeneração tecidular. Estes fatores parácrinos têm diferentes funções como proteger contra a fibrose, apoptose e stress oxidativo, promover a angiogénese, ação imunomoduladora e neuroprotetora. (25,35) Para além de tudo isto, a ação parácrina, mais do que a de substituição celular, apoia a resistência dos neurónios e das células da glia à apoptose. (25)

Além de múltiplos componentes solúveis como os fatores tróficos, o secretoma é ainda composto por diferentes vesículas extracelulares, com comprovada participação na neuroprotecção. (25) As vesículas extracelulares têm um papel importante na comunicação célula-célula, através da transferência de proteínas, lípidos, *mRNA*, entre outros. Os interesses nestas vesículas têm aumentado devido à sua imunogenicidade limitada e capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. (36)

Para além de todos os mecanismos apresentados, as células estaminais exibem uma importante propriedade, a capacidade de migrar para o local da lesão, um processo mediado por quimiocinas. (2)

Por tudo isto, o objetivo primordial desta terapêutica parece não ser a substituição dos neurónios lesados, mas preservar a sua função prevenindo a sua degeneração e regulando o nicho ambiente circundante através da produção de fatores neurotróficos. (2)

## **5.2 Ensaios clínicos**

O transplante de células estaminais, ou dos seus secretomas, é uma terapêutica emergente que demonstrou potencial em ensaios pré-clínicos e clínicos recentes. (25) O uso desta terapêutica tem sido suportado por ensaios pré-clínicos com modelos animais, ratos com SOD1 mutada, que têm sido criados, usando promotores para conduzir à sua expressão genética. Estes apresentam disfunção mitocondrial, acumulação de agregados de SOD1 e morte neuronal. (9) Estes modelos animais têm-se provado valiosos na compreensão da contribuição dos diferentes tipos celulares na doença. (16)

A maioria dos ensaios clínicos em pacientes humanos com ELA, até à data, usou células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea, provando a segurança e a eficácia do tratamento, como veremos mais à frente. (2) Contudo, a maioria destes ensaios não apresenta detalhes suficientes do tipo de células usadas, da dosagem das células e dos critérios de monitorização dos pacientes. Para além disso a maioria não inclui um período de seguimento superior a 24 meses. (25)

### **5.2.1 Avaliação da eficácia e segurança do tratamento**

A avaliação da segurança é baseada no número de eventos adversos e eventos adversos graves. A avaliação da eficácia é baseada na medição das mudanças na pontuação da ALSFRS-R, a escala de avaliação funcional da Esclerose Lateral Amiotrófica Revista, ou na capacidade vital forçada (CVF). (2) Para além disso, alguns estudos avaliam as mudanças no nível de força muscular, a massa muscular estimada por Ressonância Magnética, necessidade de traqueostomia e de ventilação assistida permanente, testes laboratoriais, estudos de condução nervosa, entre outros. (2) Contudo, a grande maioria dos ensaios clínicos mostraram o potencial de melhoria clínica medindo as mudanças na pontuação da ALSFRS-R. (7)

A ALSFRS-R é uma escala baseada num questionário que avalia a capacidade física dos pacientes com ELA em realizar atividades da vida diária, como representado no anexo 1. As questões na escala avaliam quatro domínios: tarefas motoras grosseiras e tarefas motoras finas, funções bulbares e funções respiratórias. Cada questão é pontuada de zero (completamente disfuncional) a quatro (normal) com um total de 12 questões e 48 pontos. A ALSFRS-R pode ser relatada apenas como uma pontuação ou como uma variação que é

interpretada como a taxa de mudança na pontuação do ALSFRS-R. A variação da ALSFRS-R é amplamente reconhecida como um indicador crítico de prognóstico em pacientes com ELA. (7,37)

Relativamente à Capacidade vital forçada, esta mostrou ser um parâmetro de avaliação pouco fidedigno. Nos ensaios clínicos o declínio da CVF foi significativamente maior no período pós tratamento comparado com o período pré-tratamento nos pacientes tratados com células estaminais, ou seja, os valores de CVF pioraram depois da intervenção, ao contrário da ALSFRS-R. A interpretação mais plausível é que a intervenção perturba um equilíbrio funcional respiratório delicado, e por essa razão, não é diferente das intervenções cirúrgicas que parecem acelerar o declínio da ALSFRS-R. Contudo, esta explicação pode ser pouco plausível para a administração intratecal, que é um procedimento pouco invasivo, levantando questões sobre potenciais efeitos fora do alvo da terapêutica com células estaminais. (7,11)

### **5.2.2 Fontes de células estaminais para os ensaios clínicos**

A fonte das células a serem transplantadas representa um ponto crítico na implementação da terapêutica celular em ensaios clínicos sobre doenças do sistema nervoso central. Uma fonte ideal para substituição neuronal deve ser renovável e dever permitir a viabilidade, a esterilidade, composição e maturação controlada, tudo isto enquanto é inerentemente não tumorigênica. As células candidatas para esta terapêutica devem ter a capacidade de sobreviver e influenciar o tecido envolvente e migrar para o local da neurodegeneração. Para além disso, é fundamental para a aplicação clínica que as células sejam seguras e que possam ser facilmente isoladas e expandidas. As células estaminais mesenquimais são muito atrativas devido à sua grande plasticidade e capacidade de fornecer ao tecido hospedeiro fatores de crescimento ou de modular o seu sistema imunitário. Como referido anteriormente, elas são facilmente isoladas da medula óssea e expandidas em cultura. (30) As células estaminais mesenquimais podem ser modificadas para secretar maiores quantidades de fatores neurotróficos, havendo já ensaios com estas células a decorrer. (2) O meio condicionado das células estaminais mesenquimais representa um produto livre de células e pode ser usado como alternativa visto que pode reduzir a imunogenicidade indesejada e permitir uma produção em massa, armazenamento fácil e disponibilidade imediata. (25) Pode ser obtido de várias fontes de células estaminais mesenquimais e

exibiu efeitos terapêuticos semelhantes aos observados no transplante das mesmas. (2) A injeção repetida do meio condicionado de células estaminais alogênicas pode substituir o tratamento baseado nas células estaminais propriamente ditas. (25)

A descoberta das células estaminais neuronais abriu um caminho para a implementação de uma abordagem com base nas próprias células estaminais do cérebro. Estudos recentes *in vivo* mostraram que o transplante de células estaminais neuronais apresenta uma boa capacidade de sobrevivência e integração no parênquima cerebral lesionado, enquanto proporciona efeitos terapêuticos em diferentes vias patológicas. Para além da diferenciação em células neuronais e não neuronais, exercem também o efeito imunomodulador. (30)

Estudos mais recentes com iPSCs revelam que são uma fonte ideal dado que derivam do paciente prevenindo a rejeição imunitária. Contudo o seu uso é ainda discutível porque a sua segurança precisa de ser demonstrada, dado o seu alto potencial tumorigénico. (30)

### **5.2.3 Procedimento**

Para garantir a qualidade e segurança dos tratamentos baseados com células, a Diretiva da União Europeia sobre a qualidade e segurança da doação, obtenção, testagem, processamento, preservação, armazenamento e distribuição de células humanas foi aprovada. A regulamentação europeia define o conceito de Medicamentos de terapia avançada (ATMP) definidos como diferentes terapias que exercem propriedades para o tratamento e prevenção de doenças em humanos ou que poderão ter sido utilizados em humanos com o objetivo de restaurar, corrigir ou modificar as funções fisiológicas exercendo uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica. As células estaminais são consideradas ATMP, e para serem utilizadas em ensaios clínicos devem ser produzidas rotineiramente segundo os protocolos de boas práticas de produção como ditado pela Agência Europeia do Medicamento. Assim, é garantido que as preparações celulares são produzidas e controladas a partir da colheita e manipulação de matérias primas, com correto processamento de produtos intermediários, com controlo de qualidade e armazenamento. Uma análise de risco durante todas as fases de produção e controlo garante um produto final com a qualidade esperada. O procedimento de colheita de tecidos, a manipulação das células, os procedimentos padronizados de produção e os critérios de validação de células devem receber aprovação formal e certificação pelo órgão regulador apropriado. Para além disso, é necessário realizar ensaios pré-clínicos e clínicos. (30)

Para qualquer tratamento, mas em particular para aqueles que têm como alvo o sistema nervoso central, devido às barreiras que o protegem, a entrega local ao alvo é crítica. Na ELA, a entrega local ao alvo, os neurónios motores superiores (intracorticais), inferiores (intraespinhais) ou junção neuromuscular (intramuscular) requerem procedimentos invasivos e múltiplas injeções, que representam risco de eventos adversos, que no parênquima cerebral podem produzir consequências sérias. Igualmente importante, com abordagens locais a distribuição celular é bastante restrita ao segmento ou área injetada, por exemplo com vinte injeções intraespinhais apenas 15%, ou seja, 8cm, da medula espinhal são cobertos. Isto tem de ser tido em conta quando se calcula a dose das células porque aumentado o número de células, sem aumentar a sua capacidade de propagação, pode ser prejudicial. Por outro lado, administração sistémica (intravenosa) de células estaminais provou ser a mais ineficaz. Enquanto isso, a administração intratecal por injeção no espaço subaracnoide apresenta o perfil mais favorável, atingindo uma distribuição mais ampla e possivelmente penetrando no parênquima por espaços perivasculares, enquanto se utilizam procedimentos pouco invasivos. Esta via torna mais viável a repetição da administração e a realização de um procedimento de controlo para avaliar separadamente o efeito do procedimento e os efeitos do produto, as células estaminais. (11)

A seleção de pacientes é uma variável muito importante, mas até ao momento não há concordância sobre critérios de inclusão. Uma população de estudo mais heterogénea pode mascarar a eficácia da intervenção do estudo em subpopulações de pacientes portadores de formas genéticas da doença ou fenótipos restritos. Quer o produto celular, quer a via de administração, precisam de ser cuidadosamente considerados e otimizados em estudos com modelos pré-clínicos adequadamente controlados, antes de avançar para pacientes com ELA. (11)

De facto, a injeção intratecal tem sido o método de eleição na maioria dos ensaios clínicos com pacientes com ELA, dado que injeções locais de células estaminais perto do corno anterior da medula espinhal tem as vantagens óbvias de colocar as células perto dos seus alvos terapêuticos e favorecer a difusão de fatores tróficos e imunomoduladores para estes e para as células da glia circundantes, aumentando a probabilidade de atingir os efeitos terapêuticos. Contudo, como sabemos, a patologia da ELA geralmente tem início focal e alastra-se pelo resto do cérebro e medula espinhal com a progressão da doença. Este efeito torna difícil a determinação do alvo ótimo para o transplante porque muitas regiões do cérebro e da medula espinhal estão afetadas. O transplante em regiões críticas da medula envolvidas em funções cruciais como capacidade respiratória ou o controlo dos membros

pode oferecer benefício clínico mais significativo. A insuficiência respiratória devido à perda do nervo frênico é a principal causa de morte nestes pacientes, logo uma estratégia eficaz na função respiratória pode alterar o prognóstico. (30)

Os resultados dos vários ensaios clínicos, como veremos a seguir, demonstraram que a abordagem intratecal de entrega celular em pacientes com ELA pode ser proposta sem efeitos adversos significativos.

## **5.3 Resultados**

Apesar de todos os dados positivos com o transplante em modelos animais, a tradução dos ensaios para pacientes humanos com ELA é relativamente pobre. Poucos ensaios clínicos de fase I e II foram iniciados. (30) Analisaremos em seguida ensaios pré-clínicos e clínicos de acordo com o tipo de fonte de células estaminais utilizado.

### **5.3.1 Células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea**

Estudos pré-clínicos com células estaminais mesenquimais da medula óssea em modelos de roedores, baseados na sobre-expressão do gene SOD1 mutado, com padrões semelhantes de patologia e progressão da doença do observado em humanos, concluiu-se que a administração destas células por várias vias, como a intratecal, a intramuscular, a intravenosa e a intracerebral é segura e eficaz em travar o declínio das funções motoras e na promoção da neurogênese. A secreção de citocinas e fatores de crescimento contribuíram para a proteção dos neurónios e para a redução da inflamação. (1) Muitos estudos demonstraram que estas podem suprimir a ativação e a função de várias células do sistema imunitário inato e adquirido, incluindo macrófagos, neutrófilos, células *natural killer*, linfócitos e células dendríticas. (30)

Com estes ensaios conseguiu concluir-se que tratar a ELA com células estaminais mesenquimais pode aumentar as propriedades neuroprotetoras e neuroregenerativas que modulam as funções biológicas. O uso em ratos demonstrou resultados eficazes como o atraso na disfunção motora e aumento notável da sobrevivência, através do atraso da degeneração dos neurónios motores, levando mesmo a um maior número de neurónios motores de maior tamanho e com menos apoptose. Todo este impacto foi acompanhado de melhoria de parâmetros histológicos e bioquímicos. (1)

O primeiro ensaio pré-clínico com células estaminais mesenquimais em pacientes com ELA foi realizado em 2003 por *Mazzini et al.* Neste estudo, as células estaminais mesenquimais autólogas foram injetadas intratecalmente. As células foram injetadas através de um procedimento cirúrgico em diferentes níveis da medula espinhal torácica. Como não existiu um grupo de controlo neste estudo, não foram reportados resultados da eficácia destas células. Em termos de segurança as células foram bem toleradas em todos os pacientes sem efeitos secundários sérios observados. A tolerabilidade destas células trouxe esperança na investigação nesta área. (1) Noutro ensaio, com um seguimento de 9 anos de 19 pacientes com ELA a receber células estaminais mesenquimais, não existiram efeitos secundários sérios relacionadas com a injeção de células. Também demonstrou um declínio significativo na progressão da doença e um aumento na esperança de vida de 6 dos pacientes. (1)

Num outro estudo em 15 pacientes com ELA, 3 meses após injeções intravenosas e intratecais simultâneas de células estaminais mesenquimais da medula óssea, demonstrou-se um aumento significativo na pontuação da ALSFRS-R e na CVF, sem efeitos secundários sérios. Demonstrou-se também que a administração intratecal de células estaminais induz também um estado anti-inflamatório, particularmente por alterar o fenótipo das células da microglia do seu estado pro-inflamatória M1 para o estado anti-inflamatório M2. Por outro lado, embora a administração intravenosa seja considerada segura, demonstrou-se que tem efeitos modestos comparativamente à via intratecal. (7)

As células estaminais mesenquimais da medula óssea podem, ainda, ser modificadas e induzidas em cultura para secretar maiores quantidades de fatores neurotróficos (NTF), havendo já ensaios com esta abordagem a decorrer. (2,7)

Um ensaio com 257 participantes com ELA, realizou-se baseando-se num tratamento com *lenzumestrocel*. O *lenzumestrocel* é um produto autólogo das células estaminais mesenquimais da medula óssea isolado e expandido in vitro, aprovado pelo Ministério Coreano da Segurança da Alimentação e de Drogas em dezembro de 2013 como um fármaco para terapêutica concomitante com *riluzole* para o uso no tratamento de pacientes com ELA. Foi desenvolvido com o intuito de libertar fatores neurotróficos e promover a modulação imuno-inflamatória na ELA. O tratamento consistia em duas injeções repetidas com um mês de intervalo. Dentro deste grupo, 34 participantes receberam uma ou mais injeções de reforço em vários intervalos de tempo depois do ciclo normal de tratamento para almejar benefícios a longo prazo. (10)

Resultados de ensaios clínicos de fase I e II mostraram melhorias significativas no declínio da pontuação da ALS-FRS-R até 6 meses após a administração de lenzestrocet. Apesar da eficácia clínica, a falta de benefícios na sobrevivência a longo prazo numa análise *post-hoc* pode estar associada com o número limitado de injeções, apenas duas por ciclo, e com a perda gradual das células estaminais mesenquimais. A segurança foi avaliada tendo em conta a incidência de eventos adversos, reações adversas medicamentosas e eventos adversos graves, recolhidos durante todo o seguimento de 8 anos. Todos os efeitos adversos foram reportados no primeiro ano de injeção e foram consideradas reações adversas medicamentosas, não incluindo os sintomas neurológicos relacionados com a progressão natural da doença. No seguimento de 12 meses, foram experienciados eventos adversos por mais de 5% dos participantes. Os mais comuns foram dorsalgia, cefaleia, febre e dor nas extremidades. A maioria deles foi ligeira e transitória. A incidência de eventos adversos graves foi de mais de 1% dos participantes. Os eventos adversos graves incluíram falência respiratória, dorsalgia, coccidínia e dor musculoesquelética. Foram reportados um total de 36 hospitalizações e 20 mortes. Todas as falências respiratórias foram derivadas do curso natural da doença, contudo, a dorsalgia e a coccidínia podem potencialmente estar relacionadas com o tratamento com células estaminais mesenquimais da medula óssea, devido a uma plausível aracnoidite causada pela injeção das células estaminais. (10)

A análise da sobrevivência a longo prazo documentou 40 mortes no grupo de tratamento com células estaminais e 56 no grupo de controlo externo, sendo a probabilidade de sobrevivência significativamente maior no grupo com tratamento com células estaminais. O grupo com injeções múltiplas mostrou uma maior probabilidade de sobrevivência que o grupo com injeções de ciclo único, traduzido no declínio da pontuação da ALSFRS-R. Quando comparamos o grupo de múltiplas injeções com o de ciclo único, o grupo de múltiplas injeções teve uma diminuição menor da ALSFRS-R. (10)

Noutros ensaios clínicos semelhantes, as injeções repetidas intratecais de células estaminais mesenquimais da medula óssea demonstraram diminuir a taxa de deterioração da ALSFRS-R, com a estabilização da CVF em cerca de 6 meses, associada a um aumento da sobrevivência. Estes resultados levam-nos a concluir que temos resultados melhores e mais duradouros depois das aplicações repetidas das células estaminais. (25)

Dado estes resultados, surgiram extensões das investigações anteriores para realizar transplantes repetidos de células estaminais, e avaliar a sua eficácia ao longo do tempo. (38) Num novo ensaio clínico foram injetadas 3 vezes, com espaço de três meses de intervalo entre cada administração, células estaminais mesenquimais derivadas da medula

óssea. Para este procedimento, 2mL de líquido cefalorraquidiano foram colhidos e o mesmo volume da solução de células estaminais mesenquimais da medula óssea foi injetado. O mesmo cirurgião realizou todos os procedimentos, e os pacientes foram também tratados com *riluzole*. Nenhum paciente experienciou eventos adversos. (38)

Conclui-se, portanto, que é importante a análise do grupo de pacientes que vai receber o transplante, nomeadamente uma pesquisa pelos preditores da eficácia clínica com o transplante autólogo e a avaliação dos resultados com a administração repetida. A ausência de eventos adversos no curso das múltiplas injeções foi favorável. Contudo, os pacientes que beneficiaram do tratamento tinham ELA rapidamente progressiva antes da administração. A progressão da doença não diminuiu nos pacientes com doença lentamente progressiva. (2) Identificando os grupos dos pacientes passíveis de responder negativamente à terapia, é possível prevenir futuros ensaios em pacientes que não beneficiam do tratamento. São necessários mais estudos, em grupos de maiores dimensões de pacientes com ELA. (38)

Nestes estudos, a ALSFRS-R foi usada para determinar a eficácia do tratamento. É esperado que esta entre em declínio linearmente na maioria. Para todos os estudos, o tratamento com células estaminais teve um efeito positivo na desaceleração da progressão da doença como foi evidenciado na pontuação da ALSFRS-R entre o grupo de tratamento e de controlo. Todos os ensaios que administraram células estaminais mesenquimatosas da medula óssea com administração intratecal, observaram uma diminuição significativa na progressão do peso da doença com um declínio global da pontuação da ALSFRS-R. (7)

Importante referir que os estudos incluídos utilizaram períodos de follow-up diferentes. Todos aqueles que seguiram os pacientes por 6 meses observaram diferenças significativas na ALSFRS-R entre os grupos de tratamento e de controlo. Posto isto, como limitação a estes ensaios foi apontado o facto de o período de seguimento ser pequeno, tornado difícil determinar os efeitos a longo prazo. Os benefícios a longo prazo do tratamento devem ser interpretados com cautela devido à perda de pacientes durante o seguimento, dada a baixa sobrevida na ELA. (7)

Apesar da terapêutica com células estaminais ter sido primariamente projetada para os neurónios motores em degeneração, benefícios funcionais foram demonstrados da sua utilização, por administração intravenosa de células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea, na restauração da integridade capilar do sistema nervoso central em modelos animais. Como estratégia terapêutica da lesão endotelial na ELA,

foram administrados intravenosamente células estaminais progenitoras endoteliais em modelos roedores com SOD1 mutado. Os resultados demonstraram benefícios estruturais e funcionais no restauro da integridade da barreira hematoencefálica no sistema nervoso central, levando a um aumento da sobrevivência dos neurónios motores. A integridade foi melhorada devido à ampla distribuição das células implantadas pelo lúmen dos capilares do cérebro e da medula espinhal. A maioria das células transplantadas por via intravenosa ficam inicialmente presas nos pulmões, aumentando a dose de células requerida para obtenção de efeitos terapêuticos. (5)

### **5.3.2 Células estaminais mesenquimais derivadas do tecido adiposo**

Os estudos têm demonstrado que as células estaminais mesenquimais derivadas do tecido adiposo têm a capacidade de diferenciar em fenótipos neuronais e promover a remodelação do microambiente lesionado. Além disso, o seu meio condicionado, uma combinação complexa de fatores parácrinos, incluindo fatores neurotróficos como BDNF, IGF-1 e GDNF, demonstrou manter a inervação neuromuscular, reduzir a morte neuronal e retardar a progressão de sintomas em modelos roedores com ELA. Contudo, os estudos relatam a complexidade dos fatores envolvidos e a necessidade de compreender melhor os efeitos a longo prazo, especialmente em estágios intermédios da doença. (39,40)

### **5.3.3 Células estaminais derivadas do sangue periférico**

Existem muitas fontes de células estaminais usadas nos ensaios da ELA, nomeadamente as células estaminais de sangue periférico induzidas pelo fator estimulador de colónias granulocitário (G-CSF). A G-CSF, administrada subcutaneamente, não requerendo imunossupressão, diminuindo o risco de infeção, mobiliza as células estaminais hematopoiéticas da medula óssea para o sangue periférico, as quais atravessam a barreira hematoencefálica, onde geram células estaminais de sangue periférico (PBSCs). Em ensaios pré-clínicos o G-CSF provou estimular a produção de PBSCs que penetram no sistema nervoso central, onde se diferenciaram em células neuronais. (7) Num ensaio clínico, injetaram-se células estaminais autólogas isoladas do sangue periférico no córtex motor frontal de pacientes com ELA. A aplicação destas células prolongou o tempo de vida dos pacientes e a sua qualidade de vida, comparativamente com o grupo de controlo. Resultados do seguimento de pacientes com implantação na parte anterior da medula

espinhal de células estaminais de progenitores hematopoiéticos derivados da medula óssea, demonstrou que a maioria dos pacientes melhorou significativamente, comparando com o seu estado pré-intervenção. A administração intratecal parece ter vantagens relativamente à intravenosa. Nesta última as células podem ficar presas em diferentes órgãos. Intratecalmente as células espalham-se imediatamente do líquido cefalorraquidiano ao cérebro e medula espinhal, não precisando de atravessar a barreira hematoencefálica. No período de seguimento destes doentes, 30% experienciou cefaleia ligeira a moderada, tipicamente observada depois de uma punção lombar convencional. (25)

### **5.3.4 Células estaminais derivadas da polpa dentária**

Foram realizados ensaios com células estaminais de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED), que se tornaram num foco no campo da medicina regenerativa. Estão localizadas à volta dos vasos sanguíneos na polpa dos dentes decíduos e foram isoladas pela primeira vez em 2003. Estas células libertam fatores neurotróficos e citocinas, sendo, por isso, usadas no tratamento de doenças neurológicas. Apresentam bom potencial para o tratamento com células estaminais porque se podem diferenciar em várias células como condrócitos, células endoteliais e neurónios ativos estruturalmente e funcionalmente. (9)

Foi analisado, especificamente, se o meio condicionado de SHED (SHED-CM), que corresponde ao sobrenadante da cultura livre do soro de SHED, reduzia os agregados intracelulares e a neurotoxicidade induzidos por SOD-1 mutada. O SHED-CM contém uma variedade de fatores de crescimento como a insulina ou fator de crescimento de hepatócitos (HGF) em níveis muito mais elevados do que aqueles encontrados nas células estaminais derivadas da medula óssea. Os resultados demonstraram que o SHED-CM suprimiu os agregados intracelulares de SOD1 mutada e protegeu contra a sua neurotoxicidade em cerca de 50-70%. Os efeitos protetores devem-se em parte à proteína de choque térmico (HSP) e a ativação do recetor do fator de crescimento semelhante à insulina-1. O SHED-CM suprimiu também o stress oxidativo e o stress do retículo endoplasmático induzidos pela SOD1 mutada, e aumentou os níveis de HSP70. (9)

As HSP estão presentes em todas as células e aumentam a sua expressão quando as células são expostas a stress como calor ou privação de oxigénio. HSP como a HSP90, HSP70, entre outras, têm papéis importantes na manutenção da correta estrutura de proteínas intracelulares como as chaperonas. Vários estudos demonstraram já a relação entre HSP e

proteínas com conformação incorreta, incluindo SOD1, sinucleína e *tau*. *Western Blots* para HSP70 e HSP90 demonstraram que a expressão da HSP70 em particular aumentou com o tratamento com SHED-CM. A chaperona HSP70 é, portanto, em parte responsável pelo efeito protetor de SHED-CM. Concluindo, SHED-CM foi eficaz não só na ELA familiar como na ELA esporádica, mostrando ter potencial para ser uma terapêutica eficaz no atraso da progressão da ELA. (9)

### **5.3.5 Células estaminais neuronais**

Num ensaio com o transplante de progenitores de células neuronais humanas na medula espinhal cervical de ratos com SOD1 mutante pré-sintomáticos, preservou a sua capacidade de respiração e melhorou a sobrevivência do neurónio motor frénico. Para além disso, a administração de percussores das células da glia, aumentou a sobrevivência dos ratos e diminui o declínio da função respiratória, através da secreção de fatores neurotróficos e da redução da inflamação. (2,5)

Para além das células da glia, as próprias células estaminais neuronais secretam fatores neurotróficos e anti-inflamatórios que exercem um efeito neuroprotetor. Na ELA, a neuroproteção conferida por fatores neurotróficos foi atribuída ao GDNF, IGF-1 e o VEGF. A administração de células estaminais em vários níveis da medula espinhal, incluindo os segmentos cervicais e lombares têm sido conduzidas em ensaios pré-clínicos e clínicos. Os estudos demonstraram, que quando transplantadas, estas células integram-se eficazmente no parênquima do tecido do hospedeiro, diferenciam-se em células da glia e neurónios e têm um efeito benéfico através da libertação de fatores de crescimento e imunomodulação. Contudo, existem ainda algumas barreiras a ultrapassar incluindo o tempo de sobrevivência das células estaminais neuronais no tecido e a rejeição imuno-mediada do transplante alogénico. (2)

### **5.3.6 Células estaminais pluripotentes induzidas**

O desenvolvimento das técnicas de reprogramação das células somáticas, de onde advém a pluripotência, em células estaminais pluripotentes induzidas por *Takahashi* em 2007 ofereceu aos investigadores a capacidade de utilizar estas células em tempo real. Estas

células podem diferenciar-se em todas os tipos de células somáticas, e para os propósitos da ELA, em células do sistema nervoso central e periférico. (16)

Desde as primeiras, derivadas de fibroblastos da pele de ratos e de humanos, avanços tecnológicos têm sido feitos, reportando várias linhagens de células estaminais pluripotentes induzidas usando muitos tipos diferentes de células somáticas. (2) Como podem ser reprogramadas de células somáticas adultas, geralmente células mononucleares do sangue periférico ou fibroblastos da pele, podem ser obtidas de pacientes com ELA com apresentações geneticamente e fenotipicamente diferentes da ELA. (16) Utilizar células estaminais pluripotentes induzidas reprogramadas de células somáticas dos pacientes com ELA, quer com ELA familiar ou esporádica que se irão diferenciar em células do sistema nervoso central e periférico, tornou-se uma ferramenta poderosa para compreender os mecanismos da ELA. Os neurónios motores e outros subtipos de neurónios, assim como outras células não neuronais têm sido diferenciadas das iPSCs humanas e estudadas pelo seu potencial terapêutico. (16) A vantagem destas células na terapia de doenças neurodegenerativas inclui a não necessidade de imunossupressão visto que as iPSCs são autólogas e o facto de não existirem considerações éticas. Contudo, as iPSCs dos pacientes podem eventualmente desenvolver degeneração semelhante com o tempo, após o transplante. (2)

Neurónios motores e outros subtipos de neurónios, astrócitos, oligodendrócitos, células da microglia, células mesenquimais e células de Schwann foram diferenciadas a partir destas iPSCs humanas e foi estudado o seu potencial na patofisiologia da ELA.(16)

Existem, neste momento, vários ensaios clínicos a decorrer no mundo inteiro com células estaminais pluripotentes induzidas.



## 6. Conclusão

Compreender os mecanismos da ELA é crucial para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas. A compreensão abrangente dos mesmos revela uma interconexão complexa entre distúrbios da homeostase proteica, no stresse oxidativo e nas respostas imunológicas, resultando na progressiva degeneração dos neurónios motores. A identificação de marcadores patológicos, como alguns agregados de proteínas, destaca pontos críticos para intervenção terapêutica. A interação entre diferentes células não neuronais, como astrócitos, microglia e oligodendrócitos, aponta para potenciais alvos terapêuticos na modulação da neuroinflamação associada também à patofisiologia da doença.

O tratamento da ELA representa um desafio significativo. A gestão centra-se principalmente em cuidados de suporte por uma equipe multidisciplinar. A abordagem paliativa e o suporte social desempenham um papel crucial na melhoria da qualidade de vida, quer para o paciente quer para os cuidadores. As opções farmacológicas, como o *riluzole* e o *edaravone*, oferecem efeitos modestos na sobrevida média, cerca de 2 a 6 meses adicionais. O tratamento com células estaminais emerge como uma promissora frente terapêutica, embora com desafios práticos. A questão importante reside em determinar como é que a eficácia do tratamento com células estaminais é comparada às outras formas limitadas de tratamento. Enquanto que as células estaminais embrionárias enfrentam considerações éticas, as células estaminais adultas, com ênfase na utilização de células estaminais mesenquimais devido à sua plasticidade, facilidade de isolamento e expansão e por serem praticamente isentas de efeitos adversos, ganharam destaque nos ensaios clínicos. As células estaminais têm a capacidade de atuar em diversos mecanismos patogénicos associados à doença, como a substituição direta de células neuronais e não neuronais, a promoção de atividades neuroprotetoras, anti-inflamatórias e de regulação do ambiente circundante dos neurónios. Estratégias adicionais incluem a modificação dessas células para aumentar a secreção de fatores neurotróficos e o uso do meio condicionado livre de células como uma alternativa ao transplante celular direto, destacando-se pela redução da imunogenicidade e pela possibilidade de produção em massa.

Resultados positivos de ensaios pré-clínicos em roedores indicam que a administração de células estaminais mesenquimais por diferentes vias, como intratecal, intramuscular, intravenosa e intracerebral, é segura e eficaz, atrasando o declínio das funções motoras e promovendo a neurogênese. A secreção de fatores neurotróficos contribui para a proteção dos neurónios e redução da neuroinflamação. Ensaios clínicos em pacientes com ELA

demonstram segurança, tolerabilidade e benefícios, incluindo a estabilização e diminuição da ALSFRS-R e o aumento da sobrevida. Contudo, são necessárias mais pesquisas para entender a resposta variada dos pacientes ao tratamento, otimizar a administração e melhorar a eficácia a longo prazo, dado o reduzido tamanho da amostra e a falta de grupos de controlo. Tal como as células estaminais mesenquimais, também as células estaminais do sangue periférico e as células estaminais derivadas da polpa dentária (SHED) demonstraram eficácia na redução de agregados intracelulares e da neurotoxicidade. As células estaminais neuronais, mostraram também efeitos benéfico, dado que, quando implantadas, integram, diferenciam-se e sobrevivem predominantemente como células da glia capazes de libertar fatores de crescimento e restabelecer o circuito neuronal. A abordagem da terapêutica combinada de células estaminais mesenquimais e neuronais pode ser uma proposta viável em futuros ensaios clínicos. As propriedades biológicas das células estaminais e os resultados obtidos nos ensaios clínicos sugerem que elas podem ter um maior papel terapêutico na ELA quando são administradas intratecalmente.

As células estaminais pluripotentes induzidas representam uma ferramenta poderosa de células estaminais autólogas que contornam as considerações éticas e a necessidade de imunossupressão, mas a sua aplicação clínica necessita de mais investigação pois podem reter algum tipo de vulnerabilidade específica que vai afetar a sobrevivência e a eficácia a longo prazo. Vários ensaios clínicos com estas células estão neste momento a decorrer.

Com base nos benefícios supramencionados, o tratamento com células estaminais é bastante promissor para a ELA, mas a necessidade de entender melhor como se desenvolvem tratamentos experimentais baseados em células e como implementá-los em ensaios clínicos é urgente. Apesar das intervenções com células estaminais providenciarem esperança para condições neurológicas complexas, a evidência científica controversa que despromove a sua eficácia pode impedir a sua recomendação aos pacientes. Esta terapêutica não é imune a eventos adversos, especialmente quando nos referimos a procedimentos mais invasivos com a injeção de células no sistema nervoso central. É importante existir a preocupação com a obtenção das células estaminais sem risco de morbilidade ou dor para o paciente e para o dador. A verdade é que, até agora, apenas eventos adversos minor foram relatados. Contudo, as complicações relacionadas com a imunossupressão, como a infeção grave, podem ocorrer com transplantes não autólogos.

As limitações dos ensaios clínicos baseiam-se no facto da informação ser limitada aos pacientes com ELA que preenchem determinados critérios específicos de inclusão ou exclusão, o que poderá não traduzir resultados para outras populações. A verdade é que o número de pacientes que podem ser incluídos nos ensaios clínicos é muito restrito, visto

que a ELA é uma doença neurodegenerativa rara. Para além disso, dada a baixa sobrevivência dos pacientes a partir do momento do início dos sintomas, muitos são perdidos ao longo dos ensaios clínicos, alterando toda interpretação dos resultados. Para além disso, os resultados são limitados ao que é medido, e variáveis importantes como a qualidade de vida não foram incluídas em nenhum dos ensaios clínicos. O número de pacientes necessários para a eficácia de um ensaio clínico e como quantificar a resposta numa janela temporal tão pequena é difícil de realizar. Idealmente o grupo transplantado deve ser comparado com um grupo de controlo a realizar o mesmo procedimento, mas a receber um tratamento placebo.

Os pacientes, em fases clínicas distintas e com diferentes taxas de progressão da doença, fazem com que os ensaios clínicos sejam difíceis de desenhar, conduzir e interpretar. Será benéfico administrar células estaminais nos estádios mais precoces ou nos mais tardios da doença? Qual o melhor critério de seleção de pacientes? Delinear a janela terapêutica é crucial, ou seja, saber quem irá beneficiar mais com este tratamento e, se é apenas uma opção terapêutica no período precoce da doença. Qual será então o estadio ótimo do curso da doença para o transplante? Os pacientes com ELA podem beneficiar do transplante antes da doença se começar a espalhar. Contudo, a janela temporal é difícil de definir devido aos mecanismos complexos envolvidos na rápida progressão da doença e na grande variabilidade fenotípica. Como a ELA é usualmente uma doença que afeta idades mais avançadas, a influência negativa da idade no microambiente da medula espinhal pode afetar a sobrevivência das células e a atividade trófica das células estaminais. Existe ainda a tendência para os ensaios clínicos envolverem pacientes em fases mais avançadas da doença, porque poderão estar mais motivados e terem um perfil risco-benefício mais aceitável do que os pacientes nas etapas mais precoces. Contudo, as fases mais avançadas estão associadas a lesões significativas dos neurónios motores e, para além disso, os pacientes são mais suscetíveis a complicações devido às suas comorbilidades. Posto isto, podemos especular que pacientes mais novos podem beneficiar mais do transplante de células estaminais.

Apesar do tratamento com células estaminais parecer uma solução ideal, existem ainda muitos obstáculos que necessitam de ser ultrapassados como a tumorigénese, a migração descontrolada, a diferenciação não desejada e a rejeição imunitária. É impossível atingir 100% de diferenciação eficaz nos tipos de células desejadas. A população celular final pode ser heterogénea e conter células não desejadas que podem diminuir a eficácia do tratamento e causar efeitos secundários. É necessária uma avaliação rigorosa e mais estudos para garantir que o risco de tumorigénese é insignificante.

Surgem, então, questões para as quais ainda não existe uma resposta certa. Qual o tipo de células estaminais que produzem melhores resultados? Qual o método apropriado para a administração e qual a dose ideal? Que abordagem será a mais segura? Qual o número de células a ser transplantadas para calcular a dose terapêutica e a dose máxima tolerada antes da toxicidade se tornar um fator limitante?

Estabelecer fontes celulares apropriadas, doses efetivas, métodos de administração e de tempo, assim como métodos de medir os resultados serão imperativos para otimizar o futuro desta terapêutica na ELA. O objetivo deste tratamento deve ser implementar o maior número de substrato viável, neste caso células, para que o maior efeito benéfico local seja atingido. Para além disso, uma única dose não permite identificar eventos adversos que surgem em ensaios mais tardios ou até atingir efeitos terapêuticos maiores e a longo prazo.

Protocolos standardizados próprios para a investigação e terapia em pacientes com ELA são necessários, assim como, advogar para minimizar os procedimentos não éticos nos pacientes. A continuação destes ensaios clínicos com as modificações necessárias, nomeadamente, o aumento do número de pacientes e o seguimento destes a longo prazo, permitirá ter *insight* sobre a eficácia a longo prazo com segurança. Estes protocolos são urgentes para que cada preparação de células estaminais e o seu transplante possam atingir um resultado reprodutível. Atingir a consistência e reprodutibilidade entre laboratórios será crucial no desenvolvimento de estratégias efetivas. Um tratamento com células estaminais só será, de facto, útil se for reproduzida uma quantidade suficiente de vezes e com uma qualidade suficiente para tratar um número significativo de pacientes e, se o custo for justificável para os prestadores de cuidados de saúde. É necessário criar um programa clínico multicêntrico com o objetivo de ajustar e coordenar procedimentos e protocolos de transplante para alcançar resultados pós-transplante mais confiáveis e previsíveis e tornar a terapia celular uma realidade clínica para pacientes com ELA.

No futuro novos protocolos de diferenciação e reprogramação serão desenvolvidos. Apesar do progresso atingido pelas iPSC nos últimos anos, as terapias que almejam apenas alvos nos neurónios motores têm efeitos limitados. Como referido ao longo da dissertação, muitos tipos de células e mecanismos diferentes têm um papel importante na morte dos neurónios motores, logo, terapias modificadoras da doença eficazes são provavelmente aquelas que requerem uma interação complexa entre os diferentes tipos de células.

## Anexos

### Anexo 1

#### Escala da avaliação funcional da ELA revista (41)

<b>Fala</b>	<p><b>4</b> - Processo da fala normal  <b>3</b> - Distúrbio da fala detetável  <b>2</b> - Compreensível com repetição  <b>1</b> - Fala combinada com comunicação não vocal  <b>0</b> - Perda da utilidade da fala</p>	
<b>Salivação</b>	<p><b>4</b> - Normal  <b>3</b> - Insignificante, mas notável o excesso de saliva na boca podendo ter baba noturna  <b>2</b> - Excesso de saliva moderada, podendo ter baba mínima  <b>1</b> - Excesso acentuado de saliva com alguma baba  <b>0</b> - Baba acentuada exigindo constante uso de lenço para a boca</p>	
<b>Deglutição</b>	<p><b>4</b> - Normal  <b>3</b> - Problemas precoces para comer, engasgos ocasionais  <b>2</b> - Alteração na consistência da dieta  <b>1</b> - Necessidade de suplemento alimentar pastoso  <b>0</b> - Nada pela boca, exclusivamente parenteral ou enteral</p>	
<b>Escrita</b>	<p><b>4</b> - Normal  <b>3</b> - Lentificada ou descuidada, todas as palavras são legíveis  <b>2</b> - Nem todas as palavras são legíveis  <b>1</b> - Capaz de segurar a caneta, mas incapaz de escrever  <b>0</b> - Não é capaz de segurar a caneta</p>	
<b>Manipulação de alimentos e utensílios</b>	<b>Indivíduos sem gastrostomia</b>	<p><b>4</b> - Normal  <b>3</b> - Um pouco lento e desajeitado, mas não necessita de ajuda  <b>2</b> - Pode cortar o alimento embora lento e desajeitado. Necessita de alguma ajuda  <b>1</b> - Alimentos cortados por outra pessoa, mas alimenta-se sozinho lentamente  <b>0</b> - Precisa de ser alimentado</p>
	<b>Indivíduos com gastrostomia</b>	<p><b>4</b> - Normal  <b>3</b> - Desajeitado, mas capaz de desempenhar todas as manipulações  <b>2</b> - Alguma ajuda necessária com tampas e fechos  <b>1</b> - Oferece assistência mínima ao cuidador  <b>0</b> - Incapaz de executar qualquer aspeto da tarefa</p>

<p><b>Vestuário e Higiene</b></p>	<p><b>4 - Normal</b>  <b>3 - Independente de autocuidado com diminuição do rendimento do esforço</b>  <b>2 - Assistência intermitente ou substituição dos métodos</b>  <b>1 - Necessita do cuidador para autocuidado</b>  <b>0 - Dependência total</b></p>
<p><b>Virar na cama e ajustar a roupa de cama</b></p>	<p><b>4 - Normal</b>  <b>3 - Um pouco lento ou desajeitado, não necessita de ajuda</b>  <b>2 - Pode virar sozinho ou ajustar o lençol com grande dificuldade</b>  <b>1 - Tem iniciativa, não consegue virar ou ajustar o lençol sozinho</b>  <b>0 - Incapaz</b></p>
<p><b>Andar</b></p>	<p><b>4 - Normal</b>  <b>3 - Deambulação precoce dificultada</b>  <b>2 - Passeios com assistência</b>  <b>1 - Movimento funcional não deambulatório somente</b>  <b>0 - Não apresenta movimentação voluntária das pernas</b></p>
<p><b>Subir escadas</b></p>	<p><b>4 - Normal</b>  <b>3 - Lentidão</b>  <b>2 - Ligeiro desequilíbrio ou fadiga</b>  <b>1 - Necessita de assistência</b>  <b>0 - Não realiza</b></p>
<p><b>Dispneia</b></p>	<p><b>4 - Nenhuma</b>  <b>3 - Ocorre quando caminha</b>  <b>2 - Ocorre quando come, toma banho e se veste</b>  <b>1 - Ocorre no repouso, sentado ou deitado</b>  <b>0 - Dificuldade significativa</b></p>
<p><b>Ortopneia</b></p>	<p><b>4 - Nenhuma</b>  <b>3 - Alguma dificuldade em dormir, falta de ar, não se utilizam rotineiramente mais que 2 almofadas</b>  <b>2 - Necessita de almofadas extra para dormir (mais do que 2)</b>  <b>1 - Dorme apenas sentado</b>  <b>0 - Não consegue dormir</b></p>
<p><b>Insuficiência respiratória</b></p>	<p><b>4 - Nenhuma</b>  <b>3 - Uso intermitente do BIPAP</b>  <b>2 - Uso contínuo do BIPAP à noite</b>  <b>1 - Uso contínuo do BIPAP durante o dia e à noite</b>  <b>0 - Ventilação mecânica invasiva por intubação</b></p>

## Referências Bibliográficas

1. Najafi S, Najafi P, Farkhad NK, Torshizi GH, Darban RA, Boroumand AR, et al. Mesenchymal stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients: A comprehensive review of disease information and future perspectives. *Iran J Basic Med Sci.* 2023 Aug 1;26(8):872–81.
2. Je G, Keyhanian K, Ghasemi M. Overview of stem cells therapy in amyotrophic lateral sclerosis. Vol. 43, *Neurological Research.* Taylor and Francis Ltd.; 2021. p. 616–32.
3. Masrori P, Van Damme P. Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. Vol. 27, *European Journal of Neurology.* Blackwell Publishing Ltd; 2020. p. 1918–29.
4. Hassan AA, Elkins J, Hassan HY. Case Report: Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis. *F1000Res.* 2021 Oct 25;10:1080.
5. Garbuzova-Davis S, Shell R, Mustafa H, Hailu S, Willing AE, Sanberg PR, et al. Advancing Stem Cell Therapy for Repair of Damaged Lung Microvasculature in Amyotrophic Lateral Sclerosis. Vol. 29, *Cell Transplantation.* SAGE Publications Ltd; 2020.
6. Talbott EO, Malek AM, Lacomis D. The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. In: *Handbook of Clinical Neurology.* Elsevier B.V.; 2016. p. 225–38.
7. Aljabri A, Halawani A, Bin Lajdam G, Labban S, Alshehri S, Felemban R. The Safety and Efficacy of Stem Cell Therapy as an Emerging Therapy for ALS: A Systematic Review of Controlled Clinical Trials. Vol. 12, *Frontiers in Neurology.* Frontiers Media S.A.; 2021.
8. Gugliandolo A, Bramanti P, Mazzon E. Mesenchymal stem cells: A potential therapeutic approach for amyotrophic lateral sclerosis? Vol. 2019, *Stem Cells International.* Hindawi Limited; 2019.
9. Ueda T, Ito T, Inden M, Kurita H, Yamamoto A, Hozumi I. Stem Cells From Human Exfoliated Deciduous Teeth-Conditioned Medium (SHED-CM) is a Promising Treatment for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Pharmacol.* 2022 Feb 3;13.
10. Nam JY, Chun S, Lee TY, Seo Y, Kim K, Park J, et al. Long-term survival benefits of intrathecal autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells (Neuronata-R®: lenzumestrocel) treatment in ALS: Propensity-score-matched control, surveillance study. *Front Aging Neurosci.* 2023;15.

11. Morata-Tarifa C, Azkona G, Glass J, Mazzini L, Sanchez-Pernaute R. Looking backward to move forward: a meta-analysis of stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis. NPJ Regen Med [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2023 Oct 3];6(1):1–10. Available from: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edb&AN=149595081&site=eds-live>
12. Forostyak S, Sykova E. Neuroprotective potential of cell-based therapies in ALS: From bench to bedside. Vol. 11, *Frontiers in Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2017.
13. Ninkina N. Stem cell therapy and FUS[1-359]-transgenic mice: A recent study highlighting a promising ALS model and a promising therapy. Vol. 26, *CNS Neuroscience and Therapeutics*. Blackwell Publishing Ltd; 2020. p. 502–3.
14. Visser AE, Rooney JPK, D’ovidio F, Westeneng HJ, Vermeulen RCH, Beghi E, et al. Multicentre, cross-cultural, population-based, case-control study of physical activity as risk factor for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018 Aug 1;89(8):797–803.
15. Ceravolo MG. Is cell-based therapy more efficacious for people with amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease than placebo or no treatment? - A Cochrane review summary with commentary. *NeuroRehabilitation*. 2020;46(4):613–5.
16. Ferraiuolo L, Maragakis NJ. Mini-Review: Induced pluripotent stem cells and the search for new cell-specific ALS therapeutic targets. Vol. 755, *Neuroscience Letters*. Elsevier Ireland Ltd; 2021.
17. Shefner JM, Al-Chalabi A, Baker MR, Cui LY, de Carvalho M, Eisen A, et al. A proposal for new diagnostic criteria for ALS. Vol. 131, *Clinical Neurophysiology*. Elsevier Ireland Ltd; 2020. p. 1975–8.
18. Bonafede R, Mariotti R. ALS pathogenesis and therapeutic approaches: The role of mesenchymal stem cells and extracellular vesicles. Vol. 11, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers Research Foundation; 2017.
19. Jaiswal MK. Riluzole and edaravone: A tale of two amyotrophic lateral sclerosis drugs. Vol. 39, *Medicinal Research Reviews*. John Wiley and Sons Inc.; 2019. p. 733–48.
20. Luo S, Angrick M, Coogan C, Candrea DN, Wyse-Sookoo K, Shah S, et al. Stable Decoding from a Speech BCI Enables Control for an Individual with ALS without Recalibration for 3 Months. *Advanced Science*. 2023 Dec 15;10(35).

21. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: Past, present, and future. Vol. 10, Stem Cell Research and Therapy. BioMed Central Ltd.; 2019.
22. Tian Z, Yu T, Liu J, Wang T, Higuchi A. Introduction to stem cells. Prog Mol Biol Transl Sci. 2023 Jan 1;199:3–32.
23. Han YH, Kim KH, Abdi S, Kim TK. Stem cell therapy in pain medicine. Vol. 32, Korean Journal of Pain. Korean Pain Society; 2019. p. 245–55.
24. Mazzini L, Ferrari D, Andjus PR, Buzanska L, Cantello R, De Marchi F, et al. Advances in stem cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis. Expert Opin Biol Ther. 2018 Aug 3;18(8):865–81.
25. Sykova E, Cizkova D, Kubinova S. Mesenchymal Stem Cells in Treatment of Spinal Cord Injury and Amyotrophic Lateral Sclerosis. Vol. 9, Frontiers in Cell and Developmental Biology. Frontiers Media S.A.; 2021.
26. Sykova E, Forostyak S, Rychmach P, Konradova S, Matejckova N. A stem cell therapy of amyotrophic lateral sclerosis: From bench to bedside. Cytotherapy. 2018 May;20(5):e3–4.
27. Czarzasta J, Habich A, Siwek T, Czaplinski A, Maksymowicz W, Wojtkiewicz J. Stem cells for ALS: An overview of possible therapeutic approaches. Vol. 57, International Journal of Developmental Neuroscience. Elsevier Ltd; 2017. p. 46–55.
28. Wang J, Zuzzio K, Walker CL. Systemic dental pulp stem cell secretome therapy in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Brain Sci. 2019 Jul 1;9(7).
29. Jaiswal MK. Therapeutic opportunities and challenges of induced pluripotent stem cells-derived motor neurons for treatment of amyotrophic lateral sclerosis and motor neuron disease. Vol. 12, Neural Regeneration Research. Wolters Kluwer Medknow Publications; 2017. p. 723–36.
30. Mazzini L, Vescovi A, Cantello R, Gelati M, Vercelli A. Stem cells therapy for ALS. Expert Opin Biol Ther. 2016 Feb 1;16(2):187–99.
31. Moura MC, Novaes MRCG, Zago YSSP, Eduardo EJ, Casulari LA. Efficacy of Stem Cell Therapy in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. J Clin Med Res. 2016;8(4):317–24.
32. Abati E, Bresolin N, Comi G, Corti S. Advances, Challenges, and Perspectives in Translational Stem Cell Therapy for Amyotrophic Lateral Sclerosis. Vol. 56, Molecular Neurobiology. Humana Press Inc.; 2019. p. 6703–15.
33. Hajivalili M, Pourgholi F, Kafil HS, Jadidi-Niaragh F, Yousefi M. Send Orders for Reprints to [reprints@benthamscience.ae](mailto:reprints@benthamscience.ae) Current Stem Cell Mesenchymal Stem

- Cells in the Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Vol. 11, Research & Therapy. 2016.
34. Tang BL. The use of mesenchymal stem cells (MSCs) for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) therapy - A perspective on cell biological mechanisms. *Rev Neurosci*. 2017 Oct 26;28(7):725–38.
  35. Kim SH, Oh KW, Jin HK, Bae JS. Immune inflammatory modulation as a potential therapeutic strategy of stem cell therapy for ALS and neurodegenerative diseases. *BMB Rep*. 2018;51(11):545–6.
  36. Garbuzova-Davis S, Willing AE, Ehrhart J, Wang L, Sanberg PR, Borlongan C V. Cell-Free Extracellular Vesicles Derived from Human Bone Marrow Endothelial Progenitor Cells as Potential Therapeutics for Microvascular Endothelium Restoration in ALS. *Neuromolecular Med*. 2020 Dec 1;22(4):503–16.
  37. Gabr H, Kishk N, Belal E, Aboelfotooh A, M E. Intrathecal autologous bone marrow derived mesenchymal stem cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis. *Cytotherapy*. 2017 May;19(5):S199–200.
  38. Siwek T, Jezierska-Woźniak K, Maksymowicz S, Barczewska M, Sowa M, Badowska W, et al. Repeat administration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Medical Science Monitor*. 2020 Dec 10;26.
  39. Walker CL. Adipose-derived stem cell conditioned medium for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis: Pre-clinical evidence and potential for clinical application. Vol. 14, *Neural Regeneration Research*. Wolters Kluwer Medknow Publications; 2019. p. 1522–4.
  40. N. Staff, B. Oskarsson, I. Muzyka, N. Madigan, D. Figdore, M. Turner, et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cells A PHASE 2 CLINICAL TRIAL OF REPEATED INTRATHECAL TREATMENT WITH AUTOLOGOUS ADIPOSE-DERIVED MSC IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS.
  41. Guedes K, Pereira C, Pavan K, Cataldo B, Valério O. Cross-cultural adaptation and validation of als Functional Rating sca le-Revised in Portuguese language. Vol. 68, *Arq Neuropsiquiatr*. 2010.