

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”
UNIGRANRIO

MIRELLA MATURANO MOREIRA

**EFEITOS DA TERAPIA CELULAR EM MODELO ANIMAL
DE ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA**

RIO DE JANEIRO

2020

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”
UNIGRANRIO

MIRELLA MATURANO MOREIRA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio “Prof. José de
Souza Herdy”, como requisito parcial para a
obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof.^a Dra. Fernanda Gubert.

RIO DE JANEIRO

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE/BIBLIOTECA - UNIGRANRIO

M838e Moreira, Mirella Maturano.
Efeitos da terapia celular em modelo animal de esclerose lateral amiotrófica).
/ Mirella Maturano Moreira. – 2020.
18 f. : il. ; 31 cm.

Trabalho de conclusão de curso (graduação em biomedicina) –
universidade do grande rio “prof. José de Souza Herdy”, escola de ciências
da saúde, duque de caxias, 2020.

“Orientadora: Prof^a. Fernanda Gubert”.

Bibliografia: f. 15.

1. Biomedicina. 2. Genética. 3. Esclerose. I. Gubert, Fernanda. II.
universidade do grande rio “prof. José de Souza Herdy”. III. título.

CDD – 610.28

MIRELLA MATURANO MOREIRA

**EFEITOS DA TERAPIA CELULAR EM MODELO ANIMAL
DE ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade do Grande
Rio “Prof. José de Souza Herdy”, como
requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof.^a Dra. Fernanda Gubert.

Aprovada em:

Barra da Tijuca, 03 de dezembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Fernanda de Mello e Souza Valente Gubert (orientador)

Prof. Juliana Ferreira Vasques

Prof. Natália de Moraes Cordeiro

AGRADECIMENTOS

A mim por ter chegado aonde cheguei mesmo depois de tudo.

À Marcela, por ser tudo.

Aos meus pais, por tudo.

À Ana, Camila e Gabi, pelos quatro anos incríveis.

À Bia por sempre estar aqui.

À minha avó que já não se lembra, mas que estaria mais feliz que eu.

À Fernanda por tornar isso real.

E a muitos que não cabem aqui.

Obrigada.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização dos neurônios motores acometidos na ELA.....	1
Figura 2: Mecanismos responsáveis pela neurodegeneração.....	2
Figura 3: Efeitos da administração de CTM na sobrevivência de camundongos SOD1 ^{G93A}	8
Figura 4: Análises quantitativas de neurônios motores no corno anterior.....	8
Figura 5: Avaliação funcional de camundongos SOD1 ^{G93A} injetados com CMMO.....	9
Figura 6: Teste do Rotarod de camundongos SOD1G93A tratados com CMMO por via intravenosa.....	11
Figura 7: Teste do Rotarod de camundongos SOD1G93A tratados com CMMO por via intramuscular.....	11
Figura 8: Teste do Rotarod de camundongos SOD1G93A tratados com CMMO por via intravenosa e intramuscular.....	12
Figura 9: Microgliose reduzida em camundongos SOD1G93A tratados por via IV + IM.....	12

LISTA DE ABREVIATURAS

ELA – Esclerose lateral amiotrófica
RNA – Ácido ribonucleico
SOD1 – Superóxido dismutase 1
CMMO – Células mononucleares de medula óssea
CTH – Células-tronco hematopoiéticas
CTM – Células- tronco mesenquimais
TNF α – Fator de necrose tumoral alfa
iNOS – Óxido nítrico sintase
BHE – Barreira hematoencefálica
GDNF – Fator neurotrófico derivado da glia
COX2 – Ciclooxigenase 2

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. METODOLOGIA.....	7
3. RESULTADOS.....	7
4. DISCUSSÃO.....	13
5. CONCLUSÃO.....	14
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15

EFEITOS DA TERAPIA CELULAR EM MODELO ANIMAL DE ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA

Mirella Maturano Moreira¹

Fernanda de Mello e Souza Valente Gubert²

RESUMO

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa que afeta os neurônios motores, causando fraqueza progressiva e morte. A patogênese da doença é resultado de uma combinação de mecanismos, como proteínas mal enoveladas, disfunção mitocondrial, dano oxidativo, excitotoxicidade mediada por glutamato, sinalização insuficiente por fatores de crescimento e inflamação. Ainda não existe cura para ELA, porém o uso da terapia celular tem ganhado força no tratamento de doenças neurodegenerativas. Alterações em alguns genes já foram associadas com ELA, principalmente com sua forma familiar que afeta 10% dos casos. O primeiro gene mutado associado a ELA foi o gene codificante da enzima SOD, o qual permitiu desenvolver o primeiro modelo animal para o estudo desta doença. Como as formas esporádica e familiar afetam os mesmos neurônios, estudar camundongos transgênicos SOD1 pode auxiliar em um melhor entendimento da manifestação da doença. Nesta revisão comparamos e avaliamos os melhores protocolos de terapia celular aplicados no modelo animal SOD1, a fim de definir as abordagens que obtiveram os resultados mais eficazes.

Palavras-chave: Esclerose lateral amiotrófica, terapia celular, camundongo SOD1.

¹ Graduanda em Biomedicina na Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO).

² Doutora em Ciências Biológicas – Fisiologia.

ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease that affects motor neurons, causing progressive weakness and death. The pathogenesis of the disease is the result of a combination of mechanisms, such as misfolded protein, mitochondrial dysfunction, oxidative damage, glutamate-mediated excitotoxicity, insufficient signaling of the growth factor and inflammation. There is still no cure for ALS, though the use of cell therapy has gained strength in the treatment of neurodegenerative diseases. Changes in some genes have already been associated with ALS, mainly with the familial form, which affects 10% of cases. The first mutated gene associated with ALS, was the SOD1 gene, which allowed the development of the first animal model for the study of this disease. As sporadic and familial forms affect the same neuron pool, studying transgenic SOD1 mice can help to better understand the manifestation of the disease. In this review, we compared and evaluated the best cell therapy protocols, in the animal model SOD1, in order to define the approaches that obtained the most effective results.

Keywords: Amyotrophic lateral sclerosis, cell therapy, SOD1 mice.

¹ Graduanda em Biomedicina na Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO).

² Doutora em Ciências Biológicas – Fisiologia

1. INTRODUÇÃO

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) foi descrita pela primeira vez em 1869 pelo neurologista francês Jean-Martin Charcot, sendo também conhecida como doença de Charcot, em sua homenagem. A ELA é uma das doenças neurodegenerativas do neurônio motor, e é caracterizada pela fraqueza muscular progressiva, fasciculações e posteriormente, paralisia total (BEERS *et al.*, 2011). Os músculos responsáveis pela deglutição e respiração, eventualmente, também são afetados, fazendo com que a sobrevivência média seja de três a cinco anos após o aparecimento dos sintomas (TANG *et al.*, 2017).

Os neurônios motores são divididos em superiores, localizados no córtex motor e tronco e inferiores, que se encontram no tronco cerebral e na medula espinal. A perda dos neurônios motores superiores gera o aparecimento de rigidez e espasticidade muscular. Já quando os neurônios motores inferiores são afetados há irritabilidade elétrica excessiva, levando a espasmos musculares espontâneos (fasciculações). Conforme a degeneração progride, os neurônios perdem a conectividade sináptica com os músculos que, em seguida, atrofiam (BROWN *et al.*, 2017).

Figura 1: Localização dos neurônios motores acometidos na ELA.

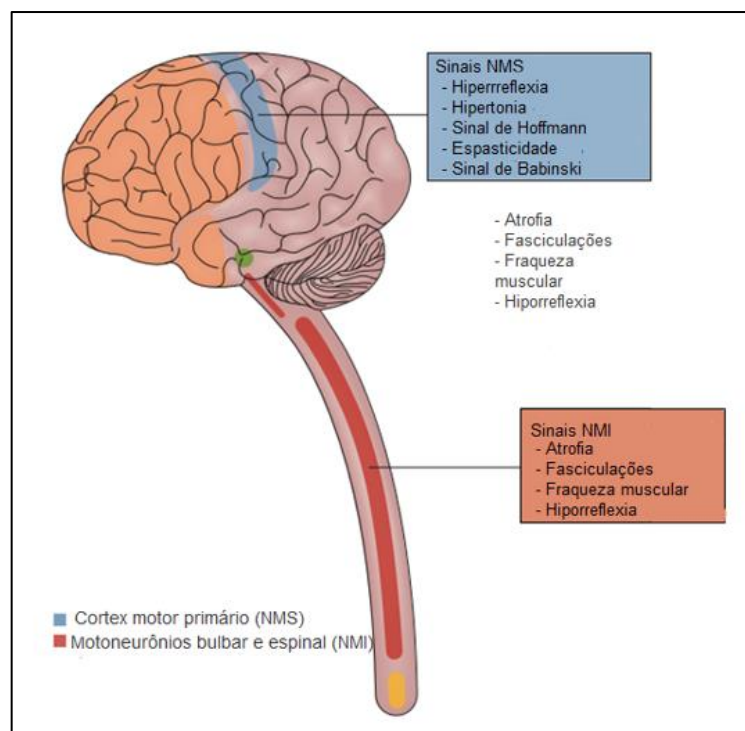
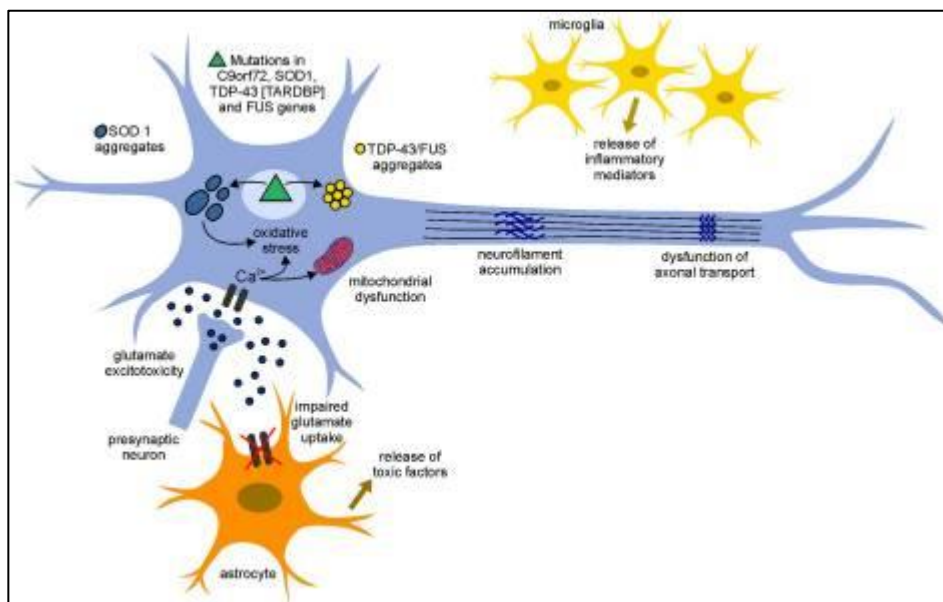


Ilustração da localização dos neurônios motores afetados pela doença e seus respectivos sintomas. **Fonte:** (Adaptado de Swinnen & Robberecht, 2014).

A manifestação inicial da doença pode ocorrer na região bulbar ou na região espinal. O início bulbar é menos comum, ocorrendo em cerca de um terço dos casos e é identificado pela morte dos neurônios motores situados no tronco cerebral, levando ao aparecimento de sintomas na fala e deglutição (TANG *et al.*, 2017). O início espinal é mais frequente e é caracterizado pela morte dos neurônios motores da medula espinal, fazendo com que se destaquem os sintomas relacionados a perda de controle dos membros. Até o estágio final da doença, os neurônios que inervam os músculos oculares e do esfíncter são preservados (HARDIMAN *et al.*, 2017).

O mecanismo exato de como a ELA se manifesta não é conhecido, por isso é considerada uma doença multifatorial. Isso quer dizer que inúmeros fatores contribuem simultaneamente para degeneração dos neurônios motores.

Figura 2: Mecanismos responsáveis pela neurodegeneração.



O comprometimento da captação de glutamato pelos astrócitos resulta em excitotoxicidade glutamatérgica, levando a um aumento dos níveis de íons Ca^{2+} . As proteínas mutantes como SOD1, C9ORF72 formam os agregados intracelulares e podem levar ao acúmulo de neurofilamentos, disfunção do transporte axonal e disfunção mitocondrial (gerando mais acúmulo de Ca^{2+}). Além disso, astrócitos e microglia são ativados e liberam mediadores inflamatórios e fatores tóxicos, contribuindo para a neurotoxicidade. **Fonte: (Adaptado de Bonafede & Mariotti, 2017).**

Aproximadamente 90% dos casos de ELA são idiopáticos, chamados de ELA esporádica, com uma proporção maior de homens em relação às mulheres. Os outros 10% dos casos são de natureza familiar (ELA familiar), onde mais de um membro da família foi acometido pela doença. Neste caso, mutações gênicas herdadas já foram observadas em diferentes genes, como será descrito posteriormente, e não há preferência de sexo (BROWN *et al.*, 2017).

Estima-se que a incidência anual de ELA seja de aproximadamente 1 a 2 casos a cada 100.000 habitantes e a prevalência mundial de 3 a 8 casos em 100.000 habitantes, com idade média de início de 58 a 60 anos. Em contrapartida, existem variações geográficas em relação à taxa de incidência, com maiores índices na Ilha de Guam (Nova Guiné Ocidental) e na Península de Kii (Japão) com 3,9 casos em 100.000 habitantes. Já índices mais baixos são vistos na China, com 0,3 casos em 100.000 habitantes. (PALERMO *et al.*, 2009)

A primeira evidência da doença no Brasil foi feita pelo Dr. Cypriano de Souza Freitas, em 1909, quando havia somente quatro casos conhecidos da doença. Estudos epidemiológicos descritos só existem a partir da década de 1980, por José Mauro Braz de Lima (QUADROS, 2006). Dados epidemiológicos sugerem que a doença no Brasil não difere muito dos valores internacionais, apenas na idade de início (PRADO *et al.*, 2015). Dessa forma, no Brasil, a idade média do início dos sintomas seria de 52 anos, mostrando diferença em relação à países da Europa, com média de 59 a 65 anos e da América do Norte, possuindo média acima de 65 anos (PALERMO *et al.*, 2009). Há dados que evidenciam também, o predomínio de casos em indivíduos do sexo masculino e a importância da ancestralidade, confirmando que em países com populações de origem miscigenada a média de casos é menor (HARDIMAN *et al.*, 2017).

Mesmo com a falta de conhecimento das vias causadoras da doença, existem alguns fatores intrínsecos e extrínsecos que parecem ter envolvimento direto com seu desenvolvimento, fazendo com que a ELA seja considerada uma doença multifatorial. Estudos sugerem que o desenvolvimento da doença ocorre devido à combinação de fatores genéticos e ambientais, levando a evolução da neurotoxicidade que pode ser mediada por múltiplos mecanismos como: disfunções mitocondriais, defeitos no processamento de RNA, proteínas citoplasmáticas agregadas, infiltração de linfócitos, astrogliose e microgliose (BEERS *et al.*, 2011).

Entre os fatores genéticos já descritos, estão as mutações de diversos genes associados ao aparecimento da ELA familiar, mas que também podem estar presentes em pacientes esporádicos, entre eles os genes *C9ORF72*, *SOD1*, *TARDBP* e *FUS* parecem ser os mais frequentes. No Brasil, há indícios de que o gene *VAPB* seja ainda mais frequente que os demais (SABERI *et al.*, 2015).

Entre os fatores ambientais, um fator bastante estudado seria a atividade física excessiva, como a observada em atletas de alto rendimento, causada por cargas elevadas de neurotransmissores excitatórios (BEERS *et al.*, 2011). No entanto, a causalidade não foi comprovada. Já as neurotoxinas, como as produzidas por cianobactérias, também são consideradas fatores de risco e podem estar relacionadas com a alta incidência em regiões como na Ilha de Guam (HARDIMAN *et al.*, 2017).

Ainda não há um diagnóstico específico e antecipado para ELA. Trata-se de avaliações clínicas em conjunto com a eletroneuromiografia e exames laboratoriais, com o intuito de descartar outras doenças do neurônio motor. Os critérios dessas avaliações foram estabelecidos pelo *El Escorial World Federation of Neurology*, revistos em 1998, com instruções baseadas na avaliação do número de regiões afetadas e no comprometimento de outras funções (CHIEIA *et al.*, 2010).

A presença de sinais de acometimento dos neurônios motores superiores e inferiores é avaliada nas regiões bulbar, cervical, torácica e lombossacral, além de alterações aparentes na eletroneuromiografia de músculos clinicamente normais e sinais de progressões em uma ou mais regiões. A ausência de comprometimento sensitivo e visual, síndrome de Parkinson e alterações em exames de neuroimagem de outras doenças, também são consideradas (PALERMO *et al.*, 2009).

Mesmo com inúmeros compostos testados, nenhum resultado clínico significativo foi obtido. Entretanto, dois medicamentos aprovados podem fornecer melhoria a curto prazo na patogênese da doença, o riluzol atuando na inibição do transporte de glutamato, evitando a exitotoxicidade glutamanérgica e a edaravona, que atua no estresse oxidativo, entretanto, apenas o riluzol é comercializado no Brasil. Atualmente, a combinação desses dois fármacos está em análise (DASH *et al.*, 2018).

A primeira mutação descrita em pacientes de ELA foi ao gene da Cu/Zn-superóxido dismutase (*SOD1*), importante no metabolismo do íon superóxido, um radical livre muito reativo. Com essa descrição foi possível desenvolver o primeiro modelo animal para estudo da ELA que superexpressa a *SOD1* humana mutada. A mutação consiste na substituição de glicina por alanina na cadeia de aminoácidos

posição 93 (GURNEY, *et al.*, 1994) e faz com que o animal apresente sintomas semelhantes à forma clínica de ELA em humanos.

Esse modelo permitiu um avanço significativo no entendimento da fisiopatologia da ELA. O mecanismo preciso de como a patogênese da ELA se manifesta não é conhecido, entretanto algumas alterações são conhecidas por contribuir simultaneamente para a degeneração dos neurônios motores. Os agregados de proteínas intracelulares parecem ser responsáveis pela maior parte dessas alterações (HARDIMAN *et al.*, 2017). Excitabilidade neural, ativação de microglia e astrócitos, mudanças na morfologia mitocondrial e estresse oxidativo também são identificados como componentes da neurodegeneração (BROWN *et al.*, 2017).

Dentro dos mecanismos observados no modelo animal e corroborados em pacientes, pode-se destacar a neuroinflamação. O envolvimento microglial é citado em diversos estudos como o maior mediador de neuroinflamação, por sua capacidade de manifestar diferentes fenótipos sob estresse patológico (BEERS *et al.*, 2011), incitando a liberação de citocinas pró-inflamatórias (BECHER *et al.*, 2016). Os linfócitos T também são identificados tendo participação na taxa de progressão da doença e influenciando respostas microgliais (BEERS *et al.*, 2011). Estudos relatam que a contribuição da microglia e astrócitos, esteja presente na progressão e não no início da doença. Os animais apresentam sintomas a partir de 3 meses, quando se mostram incapazes de esticar as patas quando suspensos pela cauda (VISANT *et al.*, 2013).

Devido à falta de tratamentos eficazes, a terapia celular se tornou alvo de pesquisas para o tratamento de doenças neurodegenerativas, como a ELA. As células-tronco existem tanto em embriões quanto em tecidos já maduros e são o foco da terapia por sua capacidade de autorrenovação e diferenciação, dependendo do tipo celular utilizado na terapia. As células perdem sua capacidade de diferenciação a cada nova etapa do desenvolvimento, então são divididas do maior poder de diferenciação ao menor.

As células totipotentes, por exemplo, possuem a maior potencia de diferenciação, podendo formar células embrionárias e extraembrionárias. Depois, as chamadas células pluripotentes, podem se diferenciar em qualquer célula somática e as células adultas encontradas principalmente na medula óssea e cordão umbilical e em vários outros tecidos, são conhecidas como multipotentes, por possuírem apenas a capacidade de se dividir e gerar tanto uma nova célula idêntica, quanto uma nova célula já diferenciada (ZAKRZEWSKI *et al.*, 2019).

Na medula óssea (CMMO), por exemplo, existem duas populações de células-tronco: as células-tronco hematopoiéticas (CTH) e as células-tronco mesenquimais (CTM). Ambas as populações podem ser obtidas na fração de células mononucleares de medula óssea (CMMO), assim como progenitores hematopoiéticos e células diferenciadas como monócitos e linfócitos. As células-tronco hematopoiéticas (CTH) são definidas como células adultas com grande capacidade de autorrenovação e potencial proliferativo, o que possibilita a sua diferenciação em células progenitoras de todas as linhagens hematológicas (GUARITA-SOUZA *et al.*, 2003).

As células-tronco mesenquimais (CTM) são células multipotentes inicialmente derivadas da medula óssea, mas, posteriormente, identificadas em diversos tecidos, como tecido adiposo, cordão umbilical, entre outros (ZAKRZEWSKI *et al.*, 2019). As CTMs são potencialmente antioxidantes e imunomoduladoras, permitindo que não haja rejeição na sua interação com o hospedeiro e influenciando a mudança de perfil das células gliais, se tornando uma opção interessante para o uso na terapia celular (SOUZA *et al.*, 2010).

As células-tronco neurais possuem potencial de autorrenovação altamente limitado e a grande maioria dessas células diminui com a idade (LAZUTKIN *et al.*, 2019), sendo responsáveis pela formação de neurônios e das demais células de glia. Existem várias maneiras de produzir ou alcançar as células-tronco neurais, como células-tronco embrionárias humanas, células progenitoras neurais, derivadas do cérebro fetal humano e células-tronco pluripotentes induzidas (GROCHOWSKI, *et al.*, 2018), sendo bastante promissoras para terapia de doenças neurodegenerativas. Estudos mostram que a terapia celular tem resultados significativos na fase pré-sintomática, sendo capaz de atrasar a progressão da doença (GUBERT *et al.*, 2016). Contudo, para que funcione na clínica, é preciso que determinados ajustes sejam feitos na quantidade de células, vias de administração e tipo celular utilizados (MOURA *et al.*, 2016), para que o protocolo mais eficiente seja desenvolvido. Dessa forma o objetivo desta revisão bibliográfica é avaliar o uso de terapia celular aplicada em modelo animal de esclerose lateral amiotrófica, comparando os métodos utilizados e seus respectivos resultados.

2. METODOLOGIA

A metodologia utilizada para a análise em questão, dispôs de plataformas digitais como PubMed, Scielo e CAPES, que auxiliaram na pesquisa realizada com as palavras-chave “cell therapy” e “amyotrophic lateral sclerosis”. Restringindo ao período entre 2007 e 2020, foram encontrados 1.273 artigos, tendo como critérios de exclusão artigos de revisão e artigos de testes em pacientes, sendo encontrados somente os 359 artigos que utilizaram modelo animal com alteração na SOD1.

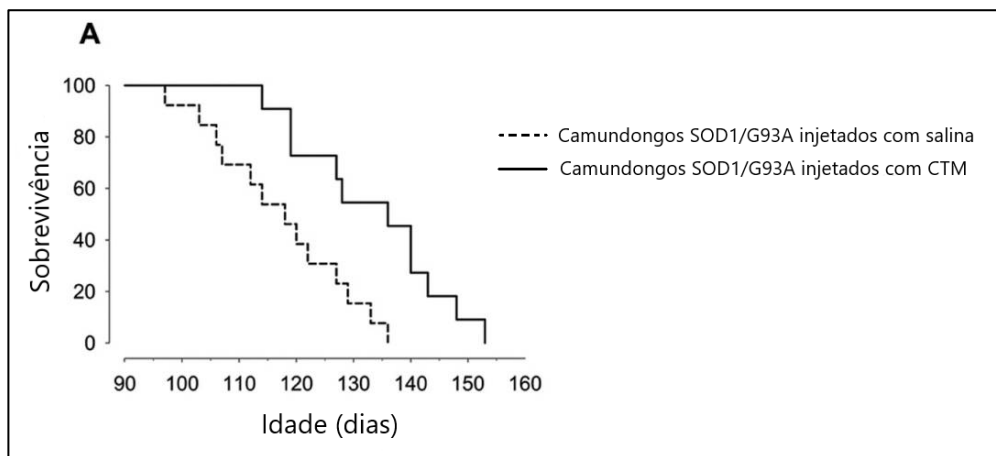
Foram selecionados 34 artigos (baseado em qual critério?) para o desenvolvimento do presente trabalho, sendo 6 destes escolhidos para comparação de dados a respeito do tipo celular utilizado na terapia, momento de início do tratamento (antes ou depois do aparecimento dos sintomas), via de administração, número de células injetadas e capacidade de sobrevivência dos animais. A revisão bibliográfica foi realizada com o propósito de definir os protocolos que obtiveram os melhores resultados com a aplicação da terapia celular.

3. RESULTADOS

Em 2012, Uccelli publicou um estudo sobre o uso de CTM por via intravenosa em fase sintomática, no qual são descritos atrasos significativos de sintomas e sobrevida estendida em torno de 20 dias (figura 3). Trabalhos anteriores já haviam demonstrado que as CTM são capazes de melhorar as funções motoras e aumentar significativamente a sobrevida dos animais

Os resultados de Uccelli se destacaram pelos efeitos positivos encontrados nos experimentos em fase sintomática, momento em que grande parte dos neurônios motores já foi perdida. Em seu estudo, o pesquisador demonstrou que a injeção de 10^6 células foi capaz de reduzir o número de astrócitos reativos na medula espinal, córtex motor e hipocampo. O número de células de microglia reativa também diminuiu significativamente na medula espinal, mas sem diferença no córtex.

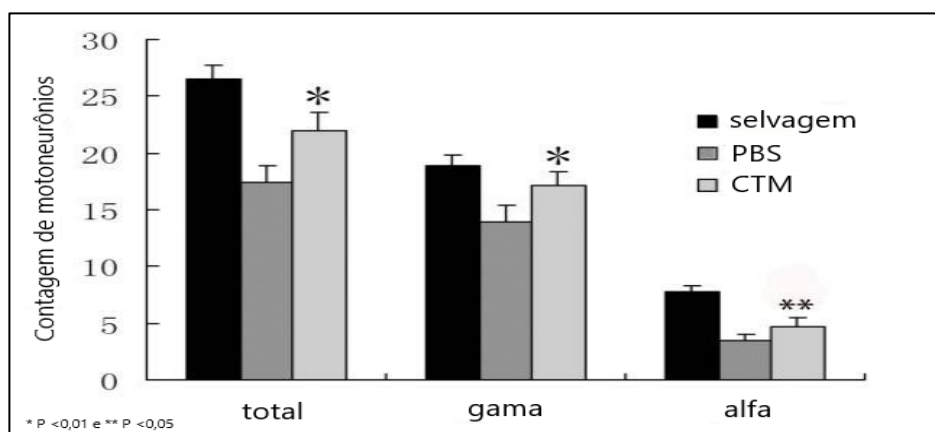
Figura 3: Efeitos da administração de CTM na sobrevivência de camundongos SOD1^{G93A}.



Sobrevivência de camundongos SOD1^{G93A} tratados com a injeção de 10^6 células-tronco mesenquimais. O estágio final de sobrevivência dos animais foi medido a partir de quando se mostraram incapazes de retornar a posição normal após 30 segundos virados de lado. **Fonte: Adaptado de (Uccelli, et al., 2012).**

O uso das CTM também foi relatado por Zhou em 2013, no qual os testes foram realizados em grupos de camundongos com 8, 10 e 12 semanas de idade, com a aplicação de 5×10^5 células via intratecal. O tratamento resultou na preservação significativa de neurônios motores (figura 4) e consequentemente, aumentou a sobrevida dos animais em 14 dias, em média.

Figura 4: Análises quantitativas de neurônios motores no corno anterior.



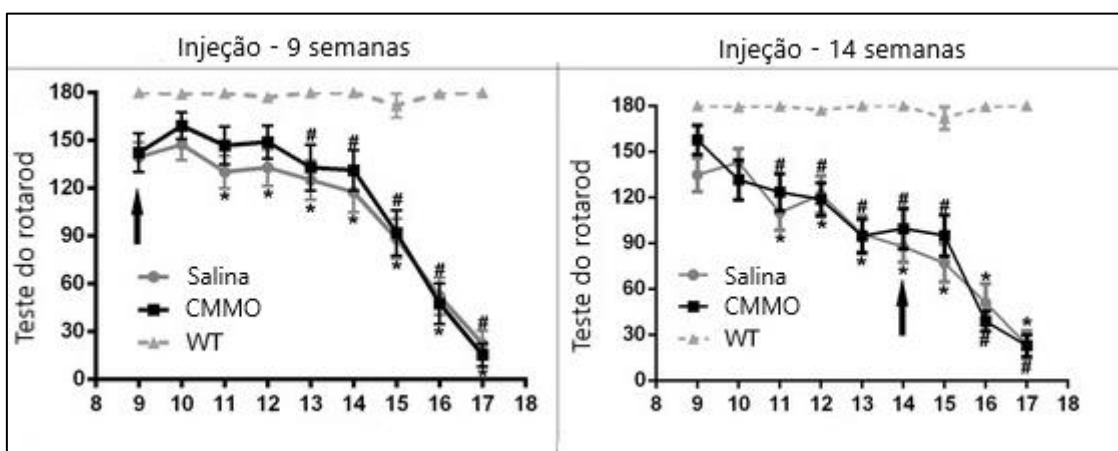
Análise quantitativa de perda neuronal no corno anterior. A administração de CTM resultou em atenuação da degeneração de neurônios motores em camundongos SOD1^{G93A}. **Fonte: (Adaptado de Zhou, et al., 2013).**

A diminuição de ativação microglial e da secreção de TNF α e iNOS - responsáveis por estimular um ambiente neuroinflamatório - prova que o tratamento foi capaz de inibir a resposta inflamatória através da secreção de moléculas difusíveis.

Assim como as CTM, as células mononucleares de medula óssea também são uma alternativa viável de terapia celular para ELA. Esse grupo celular é capaz deliberar fatores de crescimento e citocinas, conseguindo promover proteção neuronal e diminuição da ativação microglial em modelo animal da doença.

Em 2016, um estudo sobre a administração de células mononucleares em fase pré-sintomática (9 semanas) e sintomática (14 semanas) foi realizado (figura 5). A autora Gubert demonstrou que a injeção de 10^6 células na porção lombar da medula espinal, foi capaz de retardar a perda de função motora apenas quando realizada em fase pré-sintomática, mas sem aumentar a expectativa de vida. A administração em fase sintomática não obteve nenhum efeito ou diferença na progressão da doença ou na sobrevida dos animais. (Voce tem que chamar as figuras ao longo do texto)

Figura 5: Avaliação funcional de camundongos SOD1^{G93A} injetados com CMMO.



Comparação funcional de camundongos SOD1^{G93A} com a administração de CMMO. Animais tratados em fase pré-sintomática (9 semanas) apresentaram atraso de 2 semanas no início das falhas motoras em relação aos animais tratados em fase sintomática (14 semanas). **Fonte: (Adaptado de Gubert, et al., 2016).**

Entretanto, as CMMO parecem não permanecer no local de injeção, na medula espinal. O estudo investigou o destino dessas células com diferentes marcadores fluorescentes, mas sem sucesso em visualizá-las alguns dias após a injeção. O comprometimento da barreira hematoencefálica (BHE), tanto em pacientes quanto em modelos animais de ELA, já foi descrito em estudos anteriores.

Em 2018, Garbuzova-Davis também propôs o transplante de CMMO, dessa vez da fração hematopoiética, a fim de avaliar possíveis efeitos na integridade da BHE. As células foram administradas via intravenosa em camundongos com 13 semanas de idade (sintomáticos), em doses baixa (5×10^4), média (5×10^5) e alta (1×10^6) visando avaliar a influência da quantidade de células injetadas na sobrevivência dos animais.

Com isso, foi observado que, de fato, não houve melhora na morfologia capilar de camundongos que receberam a dose baixa de células. Nos animais que receberam dose média, foram observadas células quase normais em alguns microvasos, além de aumento discreto da redução de edema perivascular. Resultando em atraso na progressão da doença e aumento da expectativa de vida.

Melhorias estruturais e funcionais da microvasculatura das porções cervical e lombar da medula espinhal como, morfologia típica do endotélio e diminuição da permeabilidade capilar, foram demonstradas com a administração da dose alta de células. Apesar disso, ainda foram encontrados alguns axônios mielinizados degenerados e edema perivascular. Os benefícios na reparação da barreira hematoespinal parecem ocorrer pela substituição das células injetadas por células endoteliais, visto que após o transplante, se diferenciam e são enxertadas nos capilares da medula espinhal.

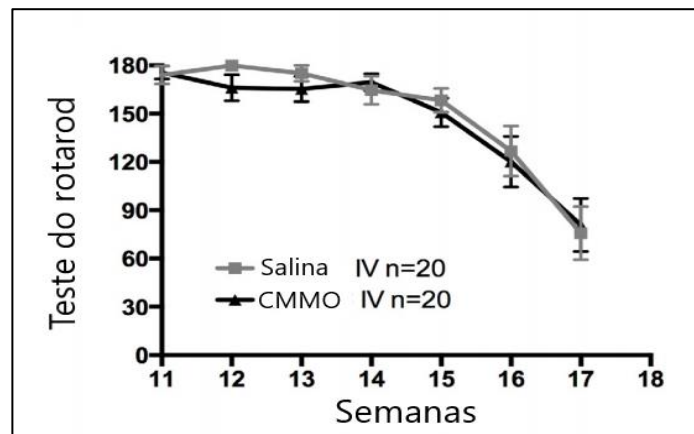
Em 2019, uma nova tentativa de terapia com camundongos em fase sintomática foi realizada. Com o uso das células-tronco neurais via intraespinal, o autor Zalfa avaliou a progressão da doença no 15º, 40º dia após o transplante e, no estágio final. Com o auxílio de marcadores, conseguiram detectar as células transplantadas em todos os três momentos avaliados, mostrando que as células-tronco neurais não só sobrevivem, mas são capazes de proliferar, se diferenciar em astrócitos, neurônios, precursores de oligodendrócitos e migrar do local de injeção para o eixo rostro-caudal, segmentos torácico e sacral da medula.

O uso desse tipo celular também conseguiu diminuir a astrogliose, microgliose e preservar os neurônios motores da medula espinhal. A perda das funções motoras foi postergada e a vida útil dos animais foi prolongada em aproximadamente 30 dias.

Regularmente autores mencionam a importância em conciliar diferentes abordagens terapêuticas devido à multifatorialidade da doença. Gubert e colaboradores realizaram um estudo em 2019 no qual administrava diferentes quantidades de células mononucleares por duas vias de administração simultaneamente. O tratamento foi distribuído em animais SOD1 via intravenosa, via intramuscular e vias intravenosa e

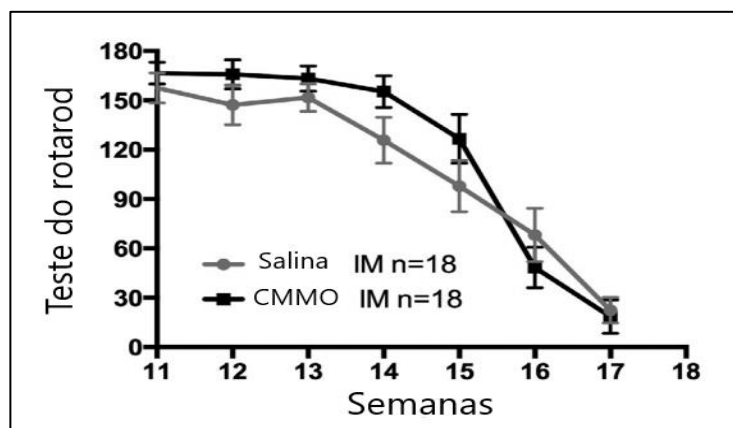
intramuscular ao mesmo tempo. O grupo tratado apenas por via intravenosa, recebendo 10^7 células, não demonstrou melhora no desempenho motor e nem alterações relacionadas à sobrevivência (figura 6). O grupo tratado exclusivamente apenas pela via intramuscular recebeu, uma vez por semana durante três semanas, doses de 4×10^6 células em quatro músculos levemente lesionados antes de cada injeção, apresentando também, leve melhora nas funções motoras em relação ao controle (figura 7).

Figura 6: Teste do Rotarod de camundongos SOD1^{G93A} tratados com CMMO por via intravenosa.



Comparação funcional entre camundongos SOD1^{G93A} tratados via intravenosa com CMMO e tratados com salina, nenhuma diferença significativa entre os dois grupos foram detectadas. **Fonte: (Adaptado de Gubert, et al., 2019).**

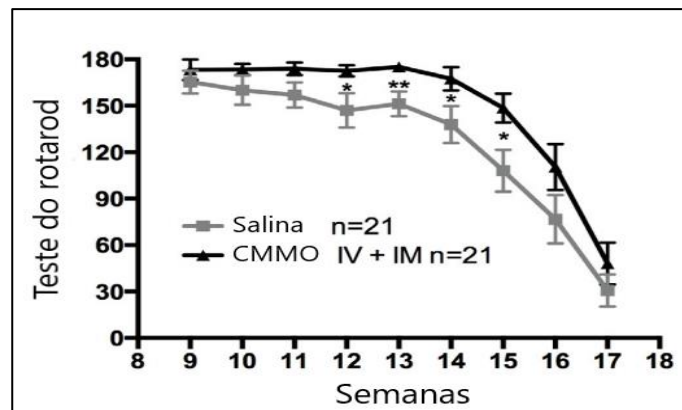
Figura 7: Teste do Rotarod de camundongos SOD1^{G93A} tratados com CMMO por via intramuscular.



Comparação funcional entre camundongos SOD1^{G93A} tratados via intramuscular com CMMO e tratados com salina, os tratados com CMMO apresentaram falhas no desempenho motor a partir da semana 15, enquanto os não tratados apresentaram falhas uma semana antes. **Fonte: (Adaptado de Gubert, et al., 2019).**

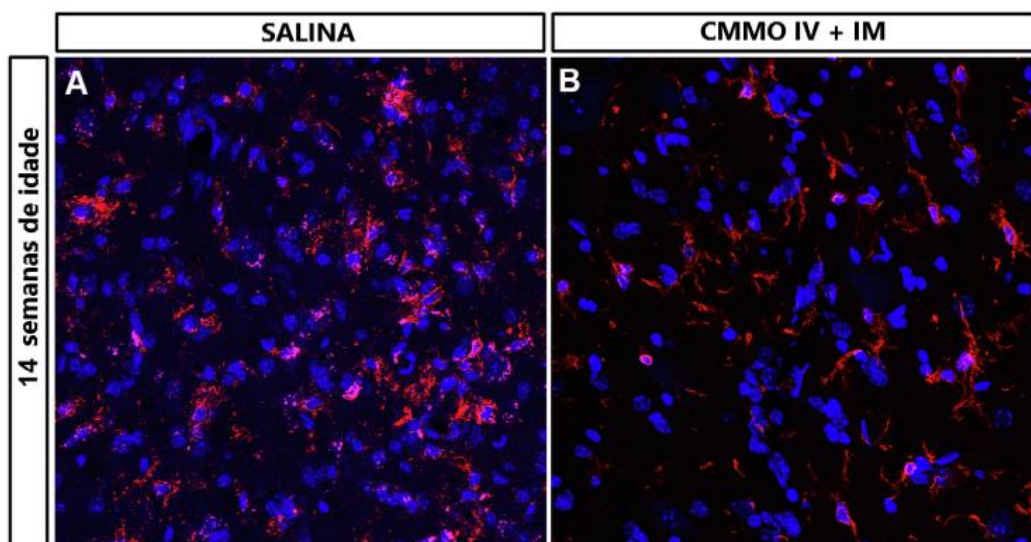
Quando administrado unindo as duas vias, o tratamento demonstrou retardo na progressão da doença em uma semana (figura 8) e redução de microgliose (figura 9). Em contrapartida, a terapia não se mostrou eficiente em diminuir a degeneração dos neurônios motores e nem a denervação da junção neuromuscular.

Figura 8: Teste do Rotarod de camundongos SOD1^{G93A} tratados com CMMO por via intravenosa + intramuscular.



Comparação funcional entre camundongos SOD1^{G93A} tratados com CMMO via intravenosa + intramuscular e tratados com salina. Houve diferença de uma semana no declínio do desempenho motor dos tratados com CMMO e tratados com salina. **Fonte: (Adaptado de Gubert, et al., 2019).**

Figura 9: Microgliose reduzida em camundongos SOD1^{G93A} tratados por via IV + IM.



Comparação entre camundongos SOD1^{G93A} injetados com salina e injetados por vias IV + IM com CMMO, em que é possível visualizar a redução de microgliose no corno anterior. **Fonte: (Adaptado de Gubert, et al., 2019).**

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho revisamos estudos que apresentam diferentes protocolos para terapia celular na ELA, onde conseguimos observar que diferentes tipos celulares, vias de administração, número de células injetadas e momento de início da terapia, apresentam efeitos positivos no modelo animal SOD1.

Os efeitos benéficos das células mononucleares de medula óssea são explicados principalmente pela liberação de citocinas e fatores de crescimento, capazes de influenciar o perfil das células de glia e fornecer manutenção e proteção aos neurônios. Gubert afirmou que tanto monócitos quanto linfócitos T contribuem para os efeitos benéficos das CMMO (GUBERT *et al.*, 2016). Em 2011, Pastor demonstrou como as terapias com CMMO e CTM tem diferentes respostas na expressão de GDNF, por exemplo. O fator neurotrófico é conhecido por conseguir proteger os neurônios de inúmeros danos e em contraste com as CTMs, as CMMO aumentaram a expressão de GDNF, fazendo com que os neurônios fossem preservados significativamente.

A imunomodulação das CTMs foi bastante descrita nos estudos acima. Em 2007, um estudo publicado por Zhao já havia demonstrado que com a administração desse tipo celular, o início da doença pôde ser atrasado em 14 dias e a expectativa de vida em 18 dias. Mais tarde, Zhou apontou em seu trabalho que as CTMs atuam secretando mediadores anti-inflamatórios, comprovado pela redução dos níveis de TNF α em cerca de 20% e os de iNOS, em 31%, corroborando os níveis de redução da reatividade astrocítica apresentados por Uccelli.

Drachman e colaboradores demonstraram em 2002 que a inibição de COX2 – mediador de inflamação – pode aumentar a sobrevivência dos animais SOD1 em até 25%. Logo, o uso de células-tronco mesenquimais para terapia celular pode ser uma alternativa de grande potencial, principalmente pelo mecanismo anti-inflamatório que exercem sobre o ambiente e células lesadas.

Sabe-se que a integridade da BHE é comprometida em pacientes e modelos animais de ELA (GARBUZOVA-DAVIS *et al.*, 2007). Dessa forma, uma alternativa para a terapia seria o uso das células-tronco hematopoiéticas, muito utilizadas por Garbuzova-Davis em diversos de seus estudos. A autora confirmou indícios de reparação e permeabilidade capilar, restabelecendo a homeostase, que também pode influenciar na reatividade de células gliais, especialmente astrócitos.

As células-tronco neurais também foram apontadas por conseguir exercer ações na resposta inflamatória, principalmente por serem capazes de proliferar na região injetada, ou seja, dar origem a novas células progenitoras, migrar pela medula espinal e se diferenciar em neurônios e outras células de glia.

Diante de inúmeros estudos, está claro que diversos outros fatores podem interferir no curso da terapia. Garbuzova-Davis em seu estudo de 2018 determinou a diferença em seus resultados com o uso de quantidades crescentes de células injetadas, confirmando Kim (2010) que já havia apontado para resultados melhores administrando números maiores de células.

As vias intravenosa, intraespinal, intratecal e intramuscular, utilizadas em cada um dos estudos mencionados nesta revisão, obtiveram resultados positivos, porém transitórios. Mostrando que administrações simultâneas por múltiplas vias podem melhorar ainda mais os resultados de sobrevivência. Os experimentos de Gubert unindo via intravenosa e via intramuscular facilitam a circulação das células transplantadas, sugerindo que as células pudessem atingir órgãos de função imune – resultando em mudança do perfil de citocinas e outros mediadores – e ação local, atuando diretamente nas células da área lesionada, confirmando que esse tipo de abordagem é promissora, podendo agir nos diferentes locais afetados concomitantemente.

5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados positivos mencionados nesta revisão bibliográfica, é notório que a terapia celular para ELA caminha em direção ao objetivo principal de reverter o quadro de degeneração dos neurônios motores. Porém, ainda é necessário conciliar dados que obtiveram êxito, a fim de prolongar ainda mais a sobrevivência de modelos animais da doença e assim, posteriormente, conseguir chegar a um protocolo mais eficiente para ser usado em pacientes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BECHER B., SPATH S., GOVERVERMAN J. **Cytokine networks in neuroinflammation.** 2016. Doi: 10.1038/nri.2016.123
- BEERS D.R., HENKEL J.S., ZHAO W., WANG J., HUANG A., WEN S., LIAO B., APEEL S.H. 2011. **Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis.** Doi: 10.1093/brain/awr074
- BEERS D.R., ZHAO W., LIAO B., KANO O., WANG J., HUANG A., APEEL S.H., HENKEL J.S. 2011. **Neuroinflammation modulates distinct regional and temporal clinical responses in ALS mice.** Doi: 10.1016/j.bbri.2010.12.008
- BROWN R.H., AL-CHALABI A. 2017. **Amyotrophic lateral sclerosis.** Doi: 10.1056/nejmra1603471
- CHIEIA M.A., OLIVEIRA A.S.B., SILVA H.C.A., GABBI A.A. 2009. **Amyotrophic lateral sclerosis.**
- DASH RP, BABU RJ, SRINIVAS NR. **Two Decades-Long Journey from Riluzole to Edaravone: Revisiting the Clinical Pharmacokinetics of the Only Two Amyotrophic Lateral Sclerosis Therapeutics.** Clin Pharmacokinet. 2018 Nov;57(11):1385-1398. doi: 10.1007/s40262-018-0655-4.
- DRACHMAN DB, FRANK K, DYKES-HOBERG M, TEISMANN P, ALMER G, PRZEDBORSKI S, ROTHSTEIN JD. **Cyclooxygenase2inhibitionprotects motor neuronsandprolongssurvival in a transgenic mouse modelof ALS.** Ann Neurol. 2002 Dec;52(6):771-8. doi: 10.1002/ana.10374.
- GARBUZOVA-DAVIS S, HALLER E, SAPORTA S, KOLOMEY I, NICOSIA SV, SANBERG PR. **Ultrastructureofblood-brainbarrierandblood-spinalcordbarrier in SOD1 micemodeling ALS.** Brain Res. 2007 Jul9;1157:126-37. doi: 10.1016/j.brainres.2007.04.044.
- GARBUZOVA-DAVIS S, HALLER E, NAVARRO S, BESONG TE, BOCCIO KJ, HAILU S, KHATIB M, SANBERG PR, APPEL SH, BORLONGAN CV. **Transplantationofhumanbonemarrowstemcellsintosymptomatic ALS miceenhancesstructuralandfunctionalblood-spinalcordbarrierrepair.** ExpNeurol. 2018 Dec;310:33-47. doi: 10.1016/j.expneurol.2018.08.012. Epub 2018 Aug 30.
- GUARITA-SOUZA LC, CARVALHO KAT; REBELATTO C; SENEGAGLIA A; HANSEN P; FURUTA M; MIYAGUE N; FRANCISCO J C; OLANDOSKI M; WOITOWICZ V; SIMEONI R; FARIA-NETO JR; BROFMAN P. **A comparação entre o transplante de células-tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio.** Rev Bras Cir Cardiovasc, São José do Rio Preto, v. 20, n. 3, p. 270- 278, Sept. 2005.

GUBERT F, BONACOSSA-PEREIRA I, DECOTELLI AB, FURTADO M, VASCONCELOS-DOS-SANTOS A, MENDEZ-OTERO R, SANTIAGO MF. **Bone marrow mononuclear cell therapy in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: Functional outcomes from different administration routes.** Brain Res. 2019 Jun;1712:73-81. doi: 10.1016/j.brainres.2019.02.003.

GUBERT F., SANTIAGO M.F. 2016. **Prospect for bone marrow cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: how far are we from a clinical treatment?** Doi: 10.4103/1673-5374.181967

GURNEY ME, PU H, CHIU AY, DAL CANTO MC, POLCHOW CY, ALEXANDER DD, CALIENDO J, HENTATI A, KWON YW, DENG HX, et al. **Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation.** Science. 1994 Jun;264(5166):1772-5. doi: 10.1126/science.8209258.

GROCHOWSKI C, RADZIKOWSKA E, MACIEJEWSKI R. **Neural stem cell therapy-Brief review.** Clin Neurol Neurosurg. 2018 Oct;173:8-14. doi: 10.1016/j.clineuro.2018.07.013.

HARDIMAN O., AL-CHALABI A., CHIO A., CARR E.M., LOGROSCINO G., ROBBERECHT W., SHAW P.J., SIMMONS Z., VAN DEN BERG L.H. 2017 **Amyotrophic lateral sclerosis.** Doi: 10.1038/nrdp.2017.71

HICKMAN S., IZZY S., SEN P., MORSETT L., EL KHOURY J. 2018 **Microglia in neurodegeneration.** Doi: 10.1038/s41593-018-0242-x

KIM H, KIM HY, CHOI MR, HWANG S, NAM KH, KIM HC, HAN JS, KIM KS, YOON HS, KIM SH. **Dose-dependent efficacy of ALS-human mesenchymal stem cell transplantation into cisterna magna in SOD1-G93A ALS mice.** Neurosci Lett. 2010 Jan 14;468(3):190-4. doi: 10.1016/j.neulet.2009.10.074.

LAZUTKIN A, PODGORNÝ O, ENIKOLOPOV G. **Modes of division and differentiation of neural stem cells.** Behav Brain Res. 2019 Nov;374:112118. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112118.

MANCUSO R., NAVARRO X. 2015. **Amyotrophic lateral sclerosis: Current perspectives from basic research to the clinic.** Doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.07.004

MOURA M.C., NOVAES M.R.C.G., ZAGO Y.S.S.P., EDUARDO E.J., CASULARI L.A. 2016. **Efficacy of stem cell therapy in Amyotrophic Lateral Sclerosis: a systematic review and meta-analysis.** Doi: 10.14740/jocmr2495w

PALERMO S., LIMA J.M.B., ALVARENGA R.P. 2009. **Epidemiologia da Esclerose Lateral Amiotrófica – Europa/América do Norte/América do Sul/Ásia – Discrepâncias e Similaridades.**

PASTOR D, VISO-LEÓN MC, JONES J, JARAMILLO-MERCHÁN J, TOLEDO-ARAL JJ, MORALEDA JM, MARTÍNEZ S. **Comparative effects between bone marrow and mesenchymal stem cell transplantation in GDNF expression and motor function recovery in a motor neuron degenerative mouse model.** Stem Cell Rev Rep. 2012 Jun;8(2):445-58. doi: 10.1007/s12015-011-9295-x.

PHILIPS T., ROTHSTEIN J.D. 2016. **Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis.** Doi: 10.1002/0471141755.ph0567s69

PRADO, LGR; VIEIRA, E. L. M. ; ROCHA, N. P. ; PRADO, VGR ; DE SOUZA, LC ; TEIXEIRA, AL. **Neuroinflamação na Esclerose Lateral Amiotrófica.** REVISTA BRASILEIRA DE NEUROLOGIA, v. 54, p. 22-27, 2018.

SABERI S, STAUFFER JE, SCHULTE DJ, RAVITS J. **Neuropathology of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Its Variants.** Neurol Clin. 2015 Nov;33(4):855-76. doi: 10.1016/j.ncl.2015.07.012.

TANG B.L. 2017. **The use of mesenchymal stem cell (MSCs) for Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) therapy – a perspective on cell biological mechanisms.** Doi: 10.1515/revneuro-2017-0018

UCCELLI A, MILANESE M, PRINCIPATO MC, MORANDO S, BONIFACINO T, VERGANI L, GIUNTI D, VOCI A, CARMINATI E, GIRIBALDI F, CAMPONNETTO C, BONANNO G. **Intravenous mesenchymal stem cells improve survival and motor function in experimental amyotrophic lateral sclerosis.** Mol Med. 2012 Jul 18;18(1):794-804. doi: 10.2119/molmed.2011.00498.

VISANT S., MANSFIELD C., JIMENEZ-MORENO R., MOORE V.D.G., YOSHIKAWA M., HAMPTON T.G., PREVETTE D., CARESS J., OPPENHEIM R.W., MILLIGAN C. 2013. **Characterization of early pathogenesis in the SOD1 G93A mouse model of ALS: Part I, background and methods.** Doi: 10.1002/brb3.143

ZAKRZEWSKI W, DOBRZYNSKI M, SZYMONOWICZ M, RYBAK Z. **Stem cells: past, present, and future.** Stem Cell Res Ther. 2019 Feb 26;10(1):68. doi: 10.1186/s13287-019-1165-5.

ZALFA C, ROTA NODARI L, VACCHI E, GELATI M, PROFICO D, BOIDO M, BINDA E, De FILIPPIS L, COPETTI M, GARLATTI V, DANIELE P, ROSATI J, DE LUCA A, PINOS F, CAJOLA L, VISIOLI A, MAZZANI L, VERCELLI A, SVELTO M, VESCOVI AL, FERRARI D. **Transplantation of clinical-grade human neural stem cells reduces neuroinflammation, prolongs survival and delays disease progression in the SOD1 rats.** Cell Death Dis. 2019 Apr 25;10(5):345. doi: 10.1038/s41419-019-1582-5.

ZHAO CP, ZHANG C, ZHOU SN, XIE YM, WANG YH, HUANG H, SHANG YC, LI WY, ZHOUC, YU MJ, FENG SW. **Humanmesenchymalstromalcellsamelioratethephenotypeof SOD1-G93A ALS mice.** Cytotherapy. 2007;9(5):414-26. doi: 10.1080/14653240701376413.

ZHOU C, ZHANG C, ZHAO R, CHI S, GE P, ZHANG C. **Humanmarrowstromalcellsreduce microglial activationtoprotect motor neurons in a transgenic mouse modelofamyotrophic lateral sclerosis.** J Neuroinflammation. 2013 Apr30;10:52. doi: 10.1186/1742-2094-10-52.