

Terapia celular na Esclerose Lateral Amiotrófica

Cell therapy in Amyotrophic Lateral Sclerosis

Ronald Pallotta¹, Antônio Andrade², Clara Magalhaes Paiva³

RESUMO

Introdução. A Esclerose Lateral Amiotrófica é a doença de neurônio motor mais comum na idade adulta, com prognóstico sombrio e limitadas opções de tratamento o que leva a exploração de terapias alternativas. **Método.** Este trabalho, através de uma revisão da literatura, buscou descrever os avanços da utilização de células-tronco no tratamento da esclerose lateral amiotrófica. **Resultados.** Foram analisados 12 artigos em modelos animais e oito estudos clínicos em modelos humanos, sendo observada melhora clínica ou estagnação do quadro na maioria dos trabalhos. Nenhuma piora foi relacionada ao procedimento, porém algumas dúvidas não foram elucidadas como a melhor fonte de células a ser utilizada, a via de aplicação mais adequada, a população a ser mais beneficiada, bem como a necessidade ou não de se utilizar imunossupressão previamente a terapia celular. **Conclusão.** Desta forma, pode-se concluir que a terapia celular guarda grande potencial terapêutico, porém novos ensaios clínicos devem ser elaborados com a finalidade de elucidar estas dúvidas remanescentes.

Unitermos. Esclerose Amiotrófica Lateral, Transplante de células-tronco, Terapia Celular.

Citação. Pallotta R, Andrade A, Paiva CM. Terapia celular na Esclerose Lateral Amiotrófica.

ABSTRACT

Introduction. The amyotrophic lateral sclerosis is the most common motor neuron disease in adults, with poor prognosis and limited treatment options, which leads to exploration of alternative therapies. **Method.** This paper, through a literature review, seeks to describe the advances in the use of stem cells in treatment of amyotrophic lateral sclerosis. **Results.** Twelve articles in animal models and 8 clinical trials in human models were analyzed, and observed either clinical improvement or stagnation of the disease in most of the cases. No worsening was related to the procedure, but some questions have not been elucidated, such as the best source of cells to be used, the most appropriate way to infuse, the population to be benefited, and the need or not to use immunosuppression therapy prior to the infusion. **Conclusion.** Thus we can conclude that cell therapy has a great therapeutic potential, but new clinical trials should be developed in order to clarify these remaining questions.

Keywords. Amyotrophic Lateral Sclerosis, Stem Cell Transplantation, Cell Therapy.

Citation. Pallotta R, Andrade A, Paiva CM. Cell therapy in Amyotrophic Lateral Sclerosis.

Trabalho realizado na Escola Baiana de Medicina e Saúde Pública – Fundação Baiana de Desenvolvimento das Ciências, Salvador-BA, Brasil.

1. Hematologista, Mestre pela Universidade de São Paulo, Professor Assistente da EBMSP-FBDC, na disciplina de clínica médica, núcleo de onco-hematologia e terapia celular, Salvador-BA, Brasil.
2. Neurologista, Livre Docente pela UFBA, Professor Titular da EBMSP-FBDC, na disciplina de clínica médica, núcleo de neurologia, Salvador-BA, Brasil.
3. Graduanda em medicina na EBMSP-FBDC, Salvador-BA, Brasil.

Endereço para correspondência:

Dr. Ronald Pallotta
Alameda dos Jasmins nº 88, apto 1902
Cidade Jardim
CEP 40296-200, Salvador-BA, Brasil.
E-mail: tmobahia@yahoo.com.br

Revisão

Recebido em: 02/02/09

Aceito em: 08/06/09

Conflito de interesses: não

INTRODUÇÃO

Em 1874, Charcot descreveu a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA)¹, que é a doença adulta de neurônio motor mais frequente, acometendo a população mundial na ordem de 1-5 por 100.000^{2,3} atingindo preferencialmente homens em torno da 4ª ou 5ª década de vida⁴. Pode ser do tipo esporádica (90-95%), ou familiar (10-5%)¹⁻⁵. A doença possui curso crônico e progressivo, que acomete neurônio motor, tanto inferior quanto superior, e culmina com a morte por comprometimento respiratório, tanto em sua forma familiar quanto na esporádica. Pode ter o início da sintomatologia bulbar, cervical ou lombar⁴. Tem um prognóstico sombrio, com a sobrevida após o início dos sintomas estipulada entre 32 a 60 meses⁴.

A patogenia da ELA é dita multifatorial e, apesar do estudo de diversas teorias, que não são necessariamente excludentes, sua etiologia não é bem elucidada. Já existem documentações da participação da enzima Cu/Zn Superóxido dismutase 1 (SOD1); da epidemiologia; do glutamato e de fatores imunológicos^{1,6}. A SOD1 e toda a sua cascata de reações têm seu papel em apenas 20% dos casos familiares; a epidemiologia é refletida pela incidência da ELA em localidades com a prevalência maior do que no resto do mundo, como a ilha no Pacífico Guam; o glutamato apóia-se na teoria da neurotoxicidade e, baseada nela, existe o único tratamento para ELA aprovado pelo FDA (Food and Drugs Administration): o Riluzole. Ele é um bloqueador dos canais de cálcio com efeitos na liberação do glutamato, inibindo-o⁷. Contudo, após o uso contínuo por 18 meses, essa droga aumenta a sobrevida somente em três a seis meses^{1,3,8}. Atualmente, um grande foco de pesquisa concentra-se no componente de ordem imunológica da ELA, que abrange a atuação de imunoglobulinas e principalmente das células da micróglia que possui suas ações moduladas por astrócitos e neurônios que através de citocinas e neurotransmissores, criam um complexo de interações entre eles⁹.

A presença da micróglia na fisiopatologia da ELA, foi demonstrada utilizando ratos com mosaïcismo para a expressão de SOD1 mutante (mtSOD1), onde se observou que a localização dessas mutações poderia influenciar na presença de doença, criando um micro-ambiente prejudicial ao neurônio, pois, quando localizadas em um neurônio mutante envolto por glia não-trangênica, os sintomas não se desenvolviam; enquanto que, se a mutação localiza-se somente na glia, este neurônio saudável e sem mutações iria degenerar⁹. Posteriormente outros autores utilizando cultura de células de pacientes com ELA, também apresentaram

evidências onde as micróglia ativadas contribuiriam para que o cometimento do neurônio motor progredisse¹⁰. Neste mesmo período, também foi sugerido que a estimulação dos receptores metabotrópicos para o Glutamato (mGLuR, localizado nas células da glia) por substâncias do líquido cefalorraquidiano contribuiria para proliferação glial e astrogliose presentes na ELA¹¹.

A ELA é uma doença multifatorial e progressiva, com escassas opções de tratamento, com resultados pouco animadores e desfecho trágico. Desse modo, outras possibilidades terapêuticas, como a terapia celular^{4,12}, deveriam ser exploradas. Portanto, este artigo tem como objetivo descrever os avanços terapêuticos da utilização de células tronco na Esclerose Lateral Amiotrófica em estudos clínicos e experimentais, levando em conta a fonte de células, local de aplicação, presença de imunossupressão e impacto na evolução da doença.

MÉTODO

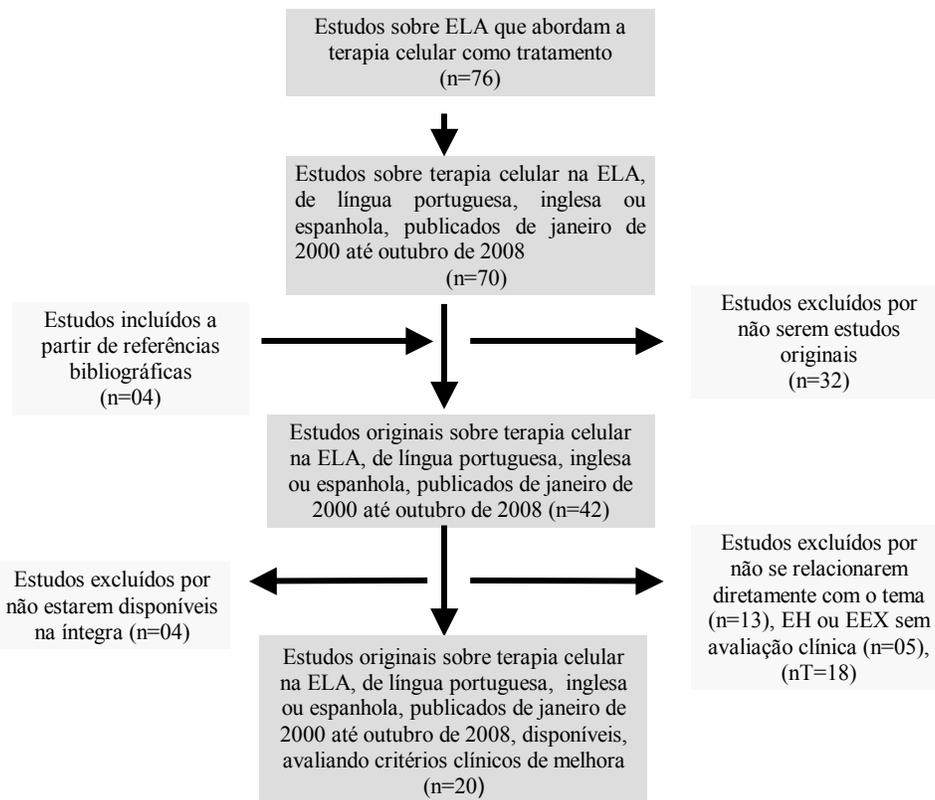
Foi realizado um estudo descritivo baseado na revisão da literatura. Foram selecionados artigos do período de janeiro de 2000 até outubro de 2008; utilizando as palavras-chave: “amyotrophic lateral sclerosis”, “treatment”, “stem cell” e os seus respectivos em espanhol. Os bancos de dados pesquisados foram: Pubmed, Medstudents, LILACS e OVID.

Foram utilizados como critério de inclusão, artigos do tipo estudos pré-clínicos, relatos de caso, série de casos, ensaios clínicos e meta-análise. Os estudos de revisão foram avaliados para obtenção de artigos não encontrados na estratégia de busca. Os critérios de inclusão dos estudos foram: ser publicados de janeiro de 2000 até outubro de 2008, abordar a utilização de células-tronco no tratamento da Esclerose Lateral Amiotrófica, nos idiomas português, inglês e espanhol. Foram utilizados como critério de exclusão a não abordagem direta ao tema, a não disponibilidade do artigo na sua íntegra, a não originalidade do artigo e a não realização de avaliação de critérios clínicos comparativos tanto nos estudos experimentais quanto nos estudos com humanos.

RESULTADOS

Foram encontrados 76 artigos e, após os critérios de exclusão aplicados, resultaram em 20 artigos (Figura 1). Desses 20 artigos, 12 eram estudos pré-clínicos em modelos animais e oito eram estudos clínicos em humanos.

Figura 1. Busca em banco de dados.



ELA= Esclerose Lateral Amiotrófica

n= número de artigos

EH= estudos em humanos

EEX= estudos experimentais

nT= número total de artigos do quadro

Resultados em estudos pré-clínicos (modelos animais)

Foram pesquisados 12 artigos que tratavam de estudos experimentais em ratos. Os artigos foram separados de acordo com o uso ou não de imunossupressão (Quadros 1 e 2).

Sem imunossupressão

Os autores que utilizaram células-tronco neurais Le+CX+ de cérebro de rato, sem terapia imunossupressiva, no nível de L1 de ratos SOD1 G93A demonstraram que o grupo tratado só apresentou sintomatologia 21 dias após o começo do quadro no grupo não tratado. Além disso observaram um aumento da sobrevida de 22-23 dias no grupo transplantado¹³.

Os autores que utilizaram ratos mdx (mutação de músculo deficiente, no cromossoma 19 do animal) como modelo experimental de ELA realizaram o transplante com células-tronco hematopoéticas infundidas

entre L4-S1, sem imunossupressão associada. Observaram uma tendência de melhorar o desempenho a partir da 2ª e 3ª semana, entretanto, posteriormente, houve um decréscimo progressivo até a 8ª semana. Com isso foi levantada a hipótese de que essa queda poderia estar relacionada com a reação enxerto contra hospedeiro. A sobrevida não foi avaliada¹⁴.

No estudo em que as células precursoras neurais de bulbo olfatório de rato foram transplantadas no corno ventral, da medula espinhal, na região lombar de ratos SOD1 G93A não foi utilizado esquema de imunossupressão, pois os autores consideraram que a ciclosporina poderia bloquear a morte neuronal, causar efeito protetor nos ratos SOD1 G93A e ser tóxica para olingodendrócitos. Os ratos transplantados tiveram um desenvolvimento dos déficits da função motora cerca de um mês após os animais não transplantados e apresentaram aumento da sobrevida⁷.

Quadro 1. Artigos animais sem imunossupressão.

Autores e ano	Animal	Imunossupressão	Terapia Celular	Resultados
Corti e cols., 2007 ¹³	SOD1-G93A	NÃO	- Células-tronco neurais LewisX+CXCR4+ - aplicação: tópica L4-L5	IS: atraso de 21 dias EV: aumento em 22-23 dias
Cabanes e cols., 2007 ¹⁴	Mutação mdx(músculo deficiente) Cromossomo 19	NÃO	- Células-tronco de MO - aplicação: tópica L4-S1	S: melhora clínica a partir da 2ª e 3ª semana EV: Não avaliada
Martin e cols., 2007 ⁷	SOD1-G93A	NÃO	- Célula precursora neural de bulbo olfatório de rato - aplicação: tópica Coluna Lombar	IS: atraso em 01 mês (aprox.) EV: aumento
Vercelli e cols., 2008 ¹⁵	SOD1-G93A	NÃO	- Células-tronco mesenquimais de MO humana - aplicação: tópica L1-L2	IS: atraso em 04-08 semanas EV: aumento
Morita e cols., 2008 ¹⁶	SOD1 Leu-126delITT	NÃO	- Célula embaiente olfatória - Células-tronco mesenquimais de MO ratos - aplicação: tópica-Quarto ventrículo	IS-G: sem alterações EV-G: sem alterações IS-M: sem alterações EV-M: sem alterações

IS: início da sintomatologia
S: Sintomatologia
EV: expectativa de vida
aprox.: aproximadamente
MO: medula óssea

No trabalho onde se utilizaram ratos SOD1 G93A divididos em 04 grupos (tratados e não tratados machos; tratadas e não tratadas fêmeas) e o tratamento foi feito através da infusão de células-tronco mesenquimais isoladas de medula óssea humana, implantadas no nível de L1-L2, antes que os sintomas da doença se manifestassem o que se percebeu foi um aumento da expectativa de vida nos grupos tratados quando comparados àqueles não tratados. Além disso houve um atraso do início da sintomatologia que variou de quatro a oito semanas, a depender do parâmetro clínico avaliado. Não foram descritas melhora na sobrevida das fêmeas com o tratamento¹⁵.

No artigo em que foram utilizados ratos SOD1 Leu126delITT divididos em 03 grupos: tratados com células embaientes olfatórias, tratados com células-tronco mesenquimais e grupo controle, a inoculação ocorreu intratecalmente, através do quarto ventrículo cerebral. Não foi utilizado tratamento imunossupressor. Não se observou diferenças entre o grupo em que

houve o transplante das células embaientes olfatórias e o grupo controle¹⁶.

Com imunossupressão

No estudo em que foram formados três grupos de ratos SOD1 G93A; um grupo sem tratamento, um grupo com tratamento utilizando células de medula óssea (MO) de rato e um grupo com células de cordão umbilical humano, os tratamentos quando aplicados foram com infusão retro-ocular. Os grupos que receberam células-tronco receberam também terapia imunossupressora com irradiação. Percebeu-se que houve um atraso no início da sintomatologia de sete dias nas células de MO e de 34 dias nas células de cordão umbilical; na sobrevida, houve um aumento de 13 dias no grupo que utilizou MO e 46 no que utilizou cordão umbilical¹⁷.

Os autores que inocularam células-tronco neuronais humanas a nível de L4-L5 em ratos SOD1 G93A, com uso de ciclosporina no período pós-trans-

Quadro 2. Artigos animais com imunossupressão.

Autores e ano	Animal	Imunossupressão	Terapia Celular	Resultados
Ende e cols., 2000 ¹⁷	SOD1-G93A	Irradiação	- MO de rato ou - Célula de cordão umbilical humano - aplicação: sistêmica Retro-ocular	IS.MO: atraso de 07 dias (aprox.) EV.MO: aumento em 13 dias (aprox.) IS.CUh: atraso de 34 dias (aprox.) EV.CUh: aumento em 46 dias (aprox.)
Willing e cols., 2001 ¹⁸	SOD1-G93A	Ciclosporina	- Células-tronco neuronais humanas - aplicação: tópica L4-L5	IS: atraso em 01-04 semanas EV: aumento em 02 semanas
Garbuzona-Davis e cols., 2002 ¹⁹	SOD1-G93A	Ciclosporina	- Células-tronco neuronais humanas - aplicação: tópica L4-L5	IS: atraso em 03 semanas EV: aumento em 20 dias (aprox.)
Garbuzona-Davis e cols., 2003 ²⁰	SOD1-G93A	Ciclosporina	- Célula de cordão umbilical humano - aplicação: sistêmica Veia jugular	IS: atraso em 02-03 semanas EV: aumento em 03 semanas (aprox.)
Corti e cols., 2004 ²¹	SOD1-G93A	Irradiação subletal	-MO de ratos - aplicação: sistêmica Intraperitoneal	IS: atraso em 28 dias EV: aumento em 10-11 dias
Gao e cols., 2005 ²²	Rato axotomizado do nervo ciático esquerdo no período neonatal	Ciclosporina	- Células-tronco neurais humanas *estimulado *não-estimulado - aplicação: tópica L4	S: melhora da função motora no grupo estimulado EV: não avaliada
Habish e cols., 2007 ²³	SOD1-G93A	Ciclosporina A	- MO de humanos e cordão umbilical - aplicação: tópica Cisterna Magna	IS: sem alterações EV: sem alterações

IS: início da sintomatologia

S: Sintomatologia

EV: expectativa de vida

aprox.: aproximadamente

MO: Medula óssea

CUh: cordão umbilical humano

plante, observaram que o aparecimento dos primeiros sintomas ocorreu de uma a quatro semanas antes do grupo não transplantado do que no grupo transplantado. Houve também um aumento da sobrevivência em duas semanas para o grupo transplantado¹⁸.

O mesmo grupo de autores concluiu em outro estudo, que a terapêutica atrasava o início da sintomatologia por pelo menos três semanas. A expectativa de vida foi de 20 dias a mais nos ratos transplantados do que no grupo controle. Os autores sugerem que o decréscimo da sintomatologia poderia estar relacionado com o aumento da expectativa de vida¹⁹.

No trabalho no qual os autores utilizaram células-tronco de cordão umbilical humano, injetadas na veia jugular de ratos SOD1 G93A associado a ciclosporina no período após o transplante. Houve um aumento da expectativa de vida estimado em três semanas e atraso do início da sintomatologia variando de duas a três semanas no grupo tratado quando comparando ao não tratado²⁰.

Os autores que transplantaram células de medula óssea de rato, por via intraperitoneal, em ratos SOD1 G93A, realizaram antes do procedimento cirúrgico, condicionamento dos animais com um regime de

imunossupressão por irradiação. O que se observou foi um atraso em 28 dias do início dos sintomas e que a expectativa de vida em ratos transplantados foi de 12-13 dias a mais em relação aos ratos não transplantados²¹.

No estudo em que a terapia celular empregada foi células-tronco neurais humanas, implantadas nos cornos ventrais dos motoneurônios deficientes, no nível de L4, foi utilizado ciclosporina como tratamento imunossupressor três dias antes da cirurgia até o final do estudo. Utilizaram-se ratos que sofreram axotomia do nervo ciático esquerdo no período neonatal como modelo experimental da ELA e estes foram divididos em três grupos: os que receberam células estimuladas para tornarem-se neurônios colinérgicos; células não estimuladas e o grupo controle. O SFI (índice de função ciática) foi o parâmetro utilizado para acompanhamento clínico dos animais. Após um mês, houve a melhora sutil em todos os grupos e, no terceiro mês, somente aqueles ratos que receberam células estimuladas demonstraram melhora estatisticamente significativa na função motora²².

Os autores que separaram os ratos SOD1 em 5 grupos, onde o primeiro grupo foi o grupo controle e não recebeu transplante algum; o segundo grupo recebeu células estromais de medula óssea humana; o terceiro, células do tipo neuronal provenientes de estromais de medula óssea humana; o quarto, células sanguíneas de cordão umbilical humano e o quinto, células do tipo neuronal provenientes de células sanguíneas de cordão umbilical humano utilizou em todos a via intratecal, na cisterna magna para aplicação e, um dia antes da cirurgia, receberam como esquema imunossupressor com ciclosporina A. Esta medicação foi mantida até a morte dos animais transplantados. Os parâmetros avaliados não demonstraram diferenças significativas entre os grupos transplantados e o grupo controle, bem como entre os grupos transplantados entre si. A expectativa de vida não foi alterada com a realização do transplante²³.

Resultados de estudos clínicos (em humanos)

Foram analisados oito trabalhos: cinco séries de casos (sendo que três abordam uma mesma população, pois é feito acompanhamento após terapêutica), um relato de caso, um retrospectivo e um caso-controle totalizando seis populações diferentes. Os artigos foram separados de acordo com o uso ou não de imunossupressão (Quadros 3 e 4).

Sem imunossupressão

No estudo em que se descreveu a administração de células-tronco CD34+ autólogas em nível cervical e lombar sem regime de imunossupressão. Foram abordados três pacientes (dois do sexo masculino e um do sexo feminino) com idades de 51, 31 e 47 anos. Uma paciente apresentou discreto ganho de função motora, enquanto os outros dois progrediram com o quadro. Nenhum paciente se prontificou a repetir o procedimento²⁴.

Outros autores realizaram um estudo retrospectivo utilizando células de cordão umbilical transfundidas periféricamente em 29 pacientes (27 portadores de ELA e dois de moléstia cancerígena). Essa população geral era composta de 08 mulheres e 21 homens, sendo a mediana de idade 49 anos. A população específica de ELA tinha dez indivíduos com apresentação bulbar e 17 de início em membros. O tempo entre o início da sintomatologia e procedimento foi em torno de dois anos. Foram utilizadas 20 amostras de cordão umbilical HLA não compatíveis e nenhum esquema de imunossupressão associado. Porém, para diminuir as chances de reação enxerto *versus* hospedeiro, foram instituídas técnicas para diminuição das células T. Observou-se uma melhora, segundo o índice de Karnofsky, em nove pacientes, estagnação em 15 e piora em três. Quando se comparou este índice no grupo com início bulbar em relação com o grupo de início em membros, percebeu-se que a melhora no primeiro é substancial, enquanto no segundo grupo houve predomínio da desaceleração, porém com progressão, ou estagnação²⁵.

Nos estudos realizados pelo grupo italiano avaliou-se a exequibilidade e segurança do transplante autólogo de células-tronco mesenquimais a curto, médio e “longo” prazo, sem imunossupressão. Os estudos foram compostos pelos mesmos nove pacientes avaliados ao longo do tempo, com mediana de idade de 44 anos (variando de 21-75 anos), cinco mulheres e quatro homens. No momento do procedimento, os pacientes encontravam-se numa duração de moléstia que variava de seis a 96 meses (mediana de 24 meses). A força muscular decaiu em todos os pacientes seis meses após o implante das células-tronco; porém, a partir do 3º mês após implantação, observou-se em quatro pacientes uma tendência em atrasar a progressão linear na diminuição da força muscular nos grupos mais inferiores dos membros e, em dois pacientes, houve um aumento brando da força nos mesmos grupos musculares. Outros parâmetros também sofreram lentificação, porém

Quadro 3. Artigos humanos sem imunossupressão.

Autores e ano	Pacientes	Imunossupressão	Terapia Celular	Efetividade	Toxicidade	Tempo de acompanhamento
Appel e cols., 2008 ²⁹	-06 06: H -35 -49 an Md: 44 na	Radioterapia não-mieloablativa de 450 cGy + fludarabina e ATG equina	- Células tronco hematopoéticas - não autólogas, de irmãos HLA compatíveis - sangue periférico - aplicação: sistêmica	- Melhora: 0 - Estabilização: 0 - Progressão: 06	- doença enxerto <i>versus</i> hospedeiro tratada com esteróides (05)	7,5 anos
Pallotta e cols., 2006 ³⁰ (publicado em 2008)	-01 01: M -34 na	Fludarabina, Ciclofosfamida e timoglobulina	-TMO Células tronco autólogas - aplicação: sistêmica	- Melhora: 01 - Estabilização: 0 - Progressão: 0	- ausentes	02 meses

Md: mediana

an: anos

M: mulher(es) H: homem(ns)

TMO: Transplante de Medula Óssea

todos os pacientes progrediram com a doença. Todos os pacientes apresentaram boa aceitação do procedimento e 04 pacientes consideraram a possibilidade de um novo transplante²⁶⁻²⁸.

No trabalho em que se avaliou o potencial clínico das células olfatórias embaixantes em diminuir a progressão da deterioração funcional na ELA. Para tal, utilizou-se de transplante de células não autólogas provenientes de fetos humanos, na corona radiata, sem esquema de imunossupressão associada. Foram excluídos os casos mais graves (ALSFRS<15) e acompanhados de co-morbidades. Foram utilizados dois grupos, um caso e um controle. Eram 14 pacientes no grupo tratado, sendo 11 do sexo masculino e três do sexo feminino; as idades variavam de 20-68 anos, com média de 48,4 anos; o tempo de duração dos sintomas antes do tratamento foi de 0,6 a 8 anos, com média de 3,1 anos; o início bulbar estava presente em um paciente, enquanto 13 tiveram início da sintomatologia nos membros. No grupo não-tratado, tinham-se 17 pacientes, nove do sexo masculino e oito do sexo feminino; variação de idade de 25-61 anos, média de 46,6 anos; o tempo de duração dos sintomas antes do tratamento foi de 0,8 a sete anos, com média de 2,9 anos; o início bulbar estava presente em quatro pacientes, enquanto 13 tiveram início da sintomatologia nos membros. Não houve diferenças significativas entre os grupos no que diz respeito a gênero, idade, duração dos sintomas, forma de início da doença e ALSFRS. O estudo não foi cego

e teve como tempo de acompanhamento quatro meses. Nos dois primeiros meses não houve diferenças significativas, porém a partir do 3º mês, houve um atraso na taxa de deterioração no grupo tratado comparado com o grupo não tratado. Dos 14 pacientes tratados, sete tiveram melhora neurológica funcional e dois permaneceram estáveis; dos 17 pacientes não tratados, somente um permaneceu estável. Não foram observados efeitos adversos ao tratamento. Os autores ressaltam como umas das limitações do estudo o número de pacientes e o fato de que o cérebro é um local em que pode ocorrer resposta imune e que a imunossupressão poderia ser necessária para melhorar o resultado⁸.

Com imunossupressão

No artigo em que se estudou os efeitos do transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas coletadas do sangue periférico de irmãos HLA compatíveis dos pacientes com ELA. Foram analisados seis pacientes, todos do sexo masculino, com idade entre 35-49 anos, mediana de 44 anos, que se encontravam em fase intermediária da doença (01 a 02 anos após início dos sintomas), um na forma bulbar e os outros cinco com início em membros e com a forma esporádica da doença. Foram excluídos do estudo pacientes com ELA familiar e com co-morbidades associadas. Os pacientes foram submetidos a condicionamento não-mieloablativo com irradiação corporal total (450cGy), fludarabina (120 mg/m²) e ATG equina (40 mg/Kg)

Quadro 4. Artigos humanos com imunossupressão.

Autores e ano	Pacientes	Imunossupressão	Terapia Celular	Efetividade	Efeitos adversos	Tempo de acompanhamento
Janson e cols., 2001 ²⁴	- 03 02: H 01: M -31 -51 an	NÃO	- Células tronco CD34+ - Autólogas - sangue periférico - aplicação: L3-L4 e C1-C2	- Melhora: 01 - Estabilização: 00 - Progressão: 02	-01: perda sensitiva em MMII (02 hs)	01 ano
Ghen e cols., 2006 ²⁵	- 27 - Md 49 an aprox.	NÃO	- Células de cordão umbilical HLA não compatíveis - Não autólogas - aplicação: sangue periférico	- Melhora: 09 - Estabilização: 15 - Progressão: 03	- Hematúria transitória	06 meses
Mazzini e cols. 2008 ²⁸ (2003 ²⁶ , 2006 ²⁷)	- 09 04: H 05: M - 21 -75 an Md: 44 an	NÃO	- Células-tronco mesenquimais - Autólogas - TMO - aplicação: T7-T9	- Melhora: 00 - Estabilização: 00 - Progressão: 09	-04: Dor irradiada-06: disestesia em MI	04 anos
Huang e cols. 2008 ⁷	*caso: -14 11: H 03: M -20 -68 an Média: 48,4 an *controle - 17 09: H 08: M -25 -61 an Média: 46,6 na	NÃO	- Células olfatórias embaintes - não autólogas - aplicação: Corona Radiata	*caso: - Melhora: 07 - Estabilização: 02 - Progressão: 05 *controle: - Melhora: 0 - Estabilização: 01 - Progressão: 16	Ausentes	04 meses

Md: mediana

an: anos

aut: autólogo

TMO: Transplante de Medula Óssea

H: homem(ns)

M: mulher(es)

e, posteriormente, as células-tronco foram infundidas. Para profilaxia de doença do enxerto contra hospedeiro, foi administrado tacrolimus (0,03mg/Kg/d infusão contínua). Encontrou-se que três pacientes apresentaram evolução clínica compatível com a maioria dos pacientes com ELA; três pacientes apresentaram desaceleração da moléstia, sendo que em um paciente essa desaceleração durou somente por 14 meses e depois evoluiu de acordo com o controle histórico. O paciente que teve melhor prognóstico foi o mais novo e os autores atribuíram isso ao fato de que a ELA de início mais precoce apresenta progressão mais lenta. Não fo-

ram encontradas mortes relacionadas ao procedimento e nenhuma toxicidade grave²⁹.

No relato de caso da paciente que foi submetida a transplante de medula óssea autólogo por ser portadora de doença auto-imune, mas que também apresentava ELA como comorbidade, foi utilizado como esquema de imunossupressão a Fludarabina, Ciclofosfamida e Timoglobulina, que foi bem tolerado pela paciente. Através do parâmetro de força muscular, observou-se que a melhora clínica foi de até dois meses após procedimento. Antes da terapêutica, a paciente apresentava-se com força muscular variando de Grau II a Grau III

nos membros. No 2º mês, todos os membros atingiram força muscular Grau IV³⁰.

DISCUSSÃO

Evolução

A maioria dos artigos descreve melhora clínica nos animais submetidos à terapia celular quando estes são comparados aos grupos controle. Estas melhoras atingem os desempenhos em provas de comportamento, provas motoras e até aumento da expectativa de vida. Em nenhum estudo experimental houve piora clínica relacionada com a terapia celular.

No que diz respeito à terapia celular em humanos, não foi relatada nenhuma aceleração da doença quando se comparou com o grupo placebo⁸. Foi relatado que 18 pacientes apresentaram melhora clínica, 17 estagnação do quadro e 25 progrediram na doença. Desses 25, 13 pacientes sofreram um processo de desaceleração da moléstia, enquanto 12 apresentaram evolução compatível com o quadro da ELA. Não foi relatada piora da doença devido uso da terapia celular.

Nos casos em que houve um acompanhamento a curto prazo, os resultados foram mais animadores, já que a maioria (34 de 42 pacientes) apresentou estagnação do quadro ou melhora clínica. Porém tal fato não se confirmou nos casos em que houve um acompanhamento por tempo igual ou superior a um ano, a maioria dos pacientes (17 de 18 indivíduos) progrediu com a doença, seja em velocidade compatível com a história natural, seja numa forma menos acelerada.

Fonte de células

As fontes de células-tronco foram cordão umbilical, sistema nervoso e medula óssea. A terapia celular de cordão umbilical apresenta a desvantagem de ter pouca disponibilidade de células necessárias, provenientes de único doador, para a aplicação em um adulto. Alguns autores que realizaram estudo experimental, a fim de superar a dificuldade do número de células-tronco, misturaram amostras de diferentes doadores com HLA não compatíveis conseguindo, dessa forma, quantidade suficiente de células-tronco para um adulto. Não foram demonstrados efeitos desfavoráveis na contagem de cultura de células¹⁷. Outros pesquisadores em estudo clínico com humanos, utilizaram o mesmo racional e defenderam que essa seria uma opção segura e que o HLA não compatível não apresentava necessariamente maior risco de doença enxerto *versus* hospedeiro²⁵. As células provenientes do bulbo olfatório (SN) para uso em humanos guardam o inconveniente de serem obtidas a partir de fetos humanos⁸, o

que esbarra em questões ético-legais de terapêutica em muitos países. As células provenientes da medula óssea não apresentam restrições na forma de obtenção¹² ou no número de células necessárias e o risco existente no procedimento é o mesmo do transplante de medula óssea utilizado em outras enfermidades.

Os dados apresentados não permitem a identificação de uma melhor terapia celular em relação às demais. O mesmo aconteceu quando se comparou a origem autóloga com a não autóloga.

Via de aplicação

Quando se compara as vias de aplicação, não se observa diferenças no que tange à abordagem sistêmica *versus* a tópica. No caso das administrações sistêmicas, foram achadas células-tronco transplantadas em locais fora do sistema nervoso central^{17,20,21}. Não foram realizados estudos que avaliassem o potencial carcinogênico da implantação anômala.

Necessidade de imunossupressão

Apesar das células-tronco terem o potencial terapêutico de reposição neuronal, foi sinalizado que o sucesso dos procedimentos provavelmente se daria por conta não pela reposição e sim pela imunomodulação^{20,21}. A mudança no micro-ambiente neuronal se daria por modificações imunológicas locais bem como pela sinalização parácrina¹⁹ por fatores tróficos e neuroprotetores^{13,18}. O que corrobora esta hipótese é o fato de que neurônios criados a partir de células-tronco, apesar de ganhar o fenótipo correspondente, não apresentam condução nervosa compatível. Portanto, a melhora clínica observada nesses estudos dá-se pela imunomodulação local.

Não foram apresentados dados suficientes para que se chegasse a uma conclusão segura sobre a utilização ou não de imunossupressores. Alguns autores afirmam que as células-tronco mesenquimais podem ser transplantadas sem imunossupressão, devido à sua capacidade imunomodulatória¹⁵. Autores que não utilizaram imunossupressão em animais, observaram análise dos tecidos do sistema nervoso central sem sinais de imunorreação¹³. Entretanto, outro estudo que também não fez uso de imunossupressão, atribuiu o declínio da melhora clínica dos animais à reação enxerto contra o hospedeiro¹⁴. Isso leva a especular que se houvesse imunossupressão associada ao experimento de Cabanes e cols. talvez não houvesse interrupção do padrão de melhora dos animais. Além disso, os autores de um estudo de caso-controle realizado em 2008, apontam como sendo uma das limitações do seu estudo a não

utilização de terapia imunossupressora e levanta a hipótese de que, já que o SNC é um sítio passível de sofrer reações imunológicas, a utilização dessa terapia adjuvante poderia ser necessária para melhorar os resultados observados⁸.

A participação de fatores imunológicos e inflamatórios na patogênese da ELA, justifica o emprego de estratégias terapêuticas que produzam efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores⁶. Não está claro se somente a terapia celular desempenharia este papel ou se seria necessário utilizar uma terapia neoadjuvante, como os imunossupressores. É importante lembrar que a utilização de terapia imunossupressora também apresenta riscos, como o aumento potencial de infecções, e por isso deve ser bem ponderada antes de ser empregada.

População

Nem todos os artigos explicitaram as formas de ELA apresentadas por seus pacientes, o que não permite concluir com precisão se haveria uma população dentro da ELA que se beneficiaria mais com a terapia em questão ou se ela realmente poderia ser indicada para todos os casos. Alguns autores sugeriram que a melhora do quadro clínico observada, deu-se predominantemente com a forma bulbar, enquanto aqueles com a forma inicial em membros apresentaram uma progressão da doença, porém uma progressão mais lenta do que o curso natural da ELA²⁵. Nos estudos animais, o tipo de modelo de experimentação aparentemente não influenciou os resultados encontrados.

CONCLUSÃO

Devido a pouca homogeneidade dos estudos realizados, várias perguntas permanecem sem resposta. Dentre estas dúvidas, estão as relacionadas com a fonte e a via mais adequada para o implante das células tronco, se sistêmica ou topicamente, e se há necessidade de aplicar substâncias concomitantes como imunossupressores. O que determina se haverá sucesso ou não na terapia celular aplicada à Esclerose Lateral Amiotrófica permanece em suspense, porém os dados presentes são sugestivos que essa poderia ser uma das opções de tratamento. Os resultados obtidos nos modelos pré-clínicos corroboram a segurança deste procedimento para que estudos em humanos sejam levados adiante.

Por se tratar de um modelo terapêutico relativamente novo e com poucos estudos realizados, é importante que novos trabalhos sejam desenvolvidos, com um número maior de pacientes e avaliando a melhora clínica por parâmetros mais uniformes, a fim de per-

mitir melhor comparação entre os estudos. Além disso, deve-se investigar se haveria uma população dentro da ELA que se beneficiaria mais com o procedimento em questão. Ainda que não se tenha resultados conclusivos acerca do papel da célula tronco nesta doença, existe a certeza do seu potencial terapêutico.

REFERÊNCIAS

1. Rowland LP, Sheider NA. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 2001;344:1688-700.
2. Cluskey S, Ramsden DB. Mechanisms of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2001;54:386-92.
3. Mitchell JD, Borasio GD. Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet* 2007;369:2031-41.
4. Przedborski S. Programmed cell death in amyotrophic lateral sclerosis: a mechanism of pathogenic and therapeutic importance. *Neurologist* 2004;10:1-7.
5. Palmieri RL. Unraveling the mystery of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroophthalmol* 2007;3:28-34.
6. Bromberg MB. Pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis: a critical review. *Curr Opin Neurol*. 1999;12:581-8.
7. Martin LJ, Liu Z. Adult olfactory bulb neural precursor cell grafts provide temporary protection from motor neuron degeneration, improve motor function, and extend survival in amyotrophic lateral sclerosis mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007;66:1002-18.
8. Huang H, Chen L, Xi H, Wang H, Zhang J, Zhang F et al. Fetal olfactory ensheathing cells transplantation in amyotrophic lateral sclerosis patients: a controlled pilot study. *Clin Transplant*. 2008;22:710-8.
9. Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boilee S, Rule M, et al. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 2003;302:113-7.
10. Zhao W, Xie W, Le W, Beers D, He Y, Henkel J et al. Activated microglia initiate motor neuron injury by a nitric oxide and glutamate-mediate mechanism. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004;63:964-77.
11. Anneser JMH, Chali C, Ince GP, Borasio DG, Shaw PJ. Glial Proliferation and metabotropic glutamate receptor expression in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;8:831-40.
12. Silani V, Cova L, Corbo M, Ciammola A, Polli E. Stem-cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet* 2004;364:9429:200-2.
13. Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, Del Bo R, Nizzardo M, Nardini M et al. Neural stem cells LewisX+ CXCR4+ modify disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis model. *Brain*. 2007;130:1289-305.
14. Cabanes C, Bonilla S, Tabares L, Martínez S. Neuroprotective effect of adult hematopoietic stem cells in a mouse model of motoneuron degeneration. *Neurobiol Dis*. 2007;26:408-18.
15. Vercelli A, Mereuta Om, Garbossa D, Muraca G, Mareschi K, Rustichelli D et al. Human mesenchymal stem cell transplantation extends survival, improves motor performance and decreases neuroinflammation in mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*. 2008;31:395-405.
16. Morita E, Watanabe Y, Ishimoto M, Nakano T, Kitayama M, Yasui K, Fukada Y et al. A novel cell transplantation protocol and its application to an ALS mouse model. *Exp Neurol*. 2008;213:431-8.
17. Ende N, Weinstein F, Chen R, Ende M. Human umbilical cord blood effect on sod mice (amyotrophic lateral sclerosis). *Life Sci*. 2000;67:53-9.
18. Willing AE, Garbuzova-Davis S, Saporta S, Milliken M, Cahill DW, Sanberg PR. hNT neurons delay onset of motor deficits in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Bull*. 2001;56:525-30.
19. Garbuzova-Davis S, Willing AE, Milliken M, Saporta S, Zigova T, Cahill DW, et al. Positive effect of transplantation of hNT neurons (Ntera 2/D1 cell-line) in a model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol*. 2002;174:169-80.
20. Garbuzova-Davis S, Willing AE, Zigova T, Saporta S, Justen EB, Lane JC, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood cells

- in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration, and differentiation. *J Hematother Stem Cell Res.* 2003;12:255-70.
21. Corti S, Locatelli F, Donadoni C, Guglieri M, Papadimitriou D, Strazzer S et al. Wild-type bone marrow cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice and contribute to CNS, heart and skeletal muscle tissues. *Brain.* 2004;127:2518-32.
22. Gao J, Coggeshall RE, Tarasenko YI, Wu P. Human neural stem cell-derived cholinergic neurons innervate muscle in motoneuron deficient adult rats. *Neuroscience.* 2005;131:257-62.
23. Habisch HJ, Janowski M, Binder D, Kuzma-Kozakiewicz M, Widmann A, Habich A et al. Intrathecal application of neuroectodermally converted stem cells into a mouse model of ALS: limited intraparenchymal migration and survival narrows therapeutic effects. *Neural Transm.* 2007;114:1395-406.
24. Janson CG, Ramesh TM, During MJ, Leone P, Heywood J. Human intrathecal transplantation of peripheral blood stem cells in amyotrophic lateral sclerosis. *J Hematother Stem Cell Res.* 2001;10:913-5.
25. Ghen MJ, Roshan R, Roshan RO, Blyweiss DJ, Corso N G, Zenga WT. Potential clinical applications using stem cells derived from human umbilical cord blood. *Reprod Biomed Online.* 2006;13:562-72.
26. Mazzini L, Fagioli F, Boccaletti R, Mareschi K, Oliveri G, Olivieri C, et al. Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: a methodological approach in humans. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2003;4:158-61.
27. Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, Vassallo E, Oliveri G, Boccaletti R, et al. Autologous mesenchymal stem cells: clinical applications in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res.* 2006;28:523-26.
28. Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, Vassallo E, Oliveri G, Nasuelli N, et al. Stem cell treatment in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurol Sci.* 2008;265:78-83.
29. Appel SH, Engelhardt JI, Henkel JS, Siklos L, Beers DR, Yen AA, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology.* 2008;71:1326-34.
30. Pallotta R, Torres A, Brito D, Lima DF, Gomes IML, Santo TE, et al. Células Tronco Mesenquimais, Aspectos Gerais e Possibilidades de Utilização na Terapêutica de Doenças Neurodegenerativas: Relato de Caso e Revisão de literatura. *RBNP* 2008;13:83-7.