

LAURA DE GODOY ROUSSEFF PRADO

**ESTUDO LONGITUDINAL DE
PARÂMETROS CLÍNICOS E INFLAMATÓRIOS
NA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA**

**Programa de Pós-Graduação em Neurociências
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte, MG**

2017

LAURA DE GODOY ROUSSEFF PRADO

**ESTUDO LONGITUDINAL DE
PARÂMETROS CLÍNICOS E INFLAMATÓRIOS
NA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de Doutora em Neurociências.

Área de concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Antônio Lúcio Teixeira Junior

Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Cruz de Souza

Programa de Pós-Graduação em Neurociências

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, MG

2017

Dedico este trabalho aos pacientes com Esclerose Lateral Amiotrófica

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que, ao longo desses anos, sempre iluminou o meu caminho. À minha família pela paciência, apoio e exemplo, mesmo que à distância ou “em outras paragens”, em especial aos queridos Vassil, Heloisa, Andrey, Juliana e Vitor, que são o meu porto seguro.

Ao meu querido José Marx pelo amor e carinho.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Antônio Lúcio Teixeira Junior e Prof. Dr. Leonardo Cruz de Souza, que foram meus guias nessa caminhada, agradeço por terem compartilhado seu conhecimento.

À equipe multidisciplinar dos ambulatórios, em especial ao Dr. Mauro Vidigal Rezende Lopes, ao Dr. Rodrigo Santiago Gomez e à Isabella Carolina Santos Bicalho pelo apoio e cooperação.

À equipe do Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica; em especial, à Dra. Érica Vieira, Dra. Natália Rocha, Nayara Braz e Salvina Campos, pelo auxílio na coleta, análise e discussão dos dados.

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Hospital das Clínicas por, mais uma vez, abrirem suas portas para mim.

Aos pacientes agradeço por terem me ensinado a dar mais valor à vida e a viver intensamente cada momento.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho. Espero que nossos esforços hoje possam de alguma forma trazer benefícios e melhorar a qualidade do atendimento dos nossos pacientes no futuro!

“Continuons à rechercher, malgré tout. Il faut continuer à rechercher. En effet, c'est la meilleure méthode pour avancer. Peut-être, grâce à nos efforts, le verdict que nous donnerons à un tel patient demain ne sera pas le même que celui que nous devons donner à cet homme aujourd'hui..”

Jean-Martin Charcot (1889)

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xi
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 HISTÓRICO.....	17
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	19
2.3 FISIOPATOLOGIA.....	19
2.3.1 EXCITOTOXICIDADE MEDIADA PELO GLUTAMATO.....	19
2.3.2 FATORES GENÉTICOS.....	20
2.3.3 FATORES NEUROTÓFICOS.....	22
2.3.4 NEUROINFLAMAÇÃO NA ELA.....	25
2.3.4.1 CITOCINAS.....	26
2.3.4.2 QUIMIOCIAS.....	27
2.3.4.3 INTERLEUCINAS.....	27
ARTIGO 1.....	30
2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS.....	40
2.5 COGNIÇÃO NA ELA.....	43
2.6 ENSAIOS CLÍNICOS NA ELA.....	44
3. HIPÓTESES.....	46
4. OBJETIVOS.....	47
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
6. RESULTADOS.....	53
6.1 ARTIGO 2 (VER APÊNDICE)	53
6.2 ARTIGO 3 (VER APÊNDICE)	53
6.3 MANUSCRITO.....	54

6.4 RESULTADOS ADICIONAIS.....	72
7. DISCUSSÃO.....	75
8. CONCLUSÃO.....	79
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
ANEXOS.....	91
APÊNDICES.....	102

LISTA DE QUADROS

1 Aspectos históricos da ELA.....	18
2 Estados de ativação dos linfócitos T, micróglia e astrócitos na ELA.....	25
3 Citocinas e suas funções.....	29
4 Critérios de Airlie House – El Escorial revisado (1998)	41
5 Critérios de Awaji 2008	42

LISTA DE TABELAS

Tabela - Artigo 1

1 Estudos envolvendo mediadores inflamatórios no líquido e/ou sangue de pacientes com ELA	35
--	----

Tabelas - Manuscrito

1 Clinical parameters of controls and ALS patients at baseline.....	67
2 Comparison of Controls and ALS patients at baseline regarding plasma levels of inflammatory mediators.....	68
3 Logistic regression model (Step 8) to predict diagnosis of ALS.....	69
4 Comparison of ALS Follow-up subgroup at first and second assessments regarding plasma levels of inflammatory mediators.....	70

Tabelas - Resultados Adicionais

1 Comparação entre grupos controle e pacientes com ELA (avaliação transversal) em relação ao nível plasmático de fatores neurotróficos	72
2 Comparação entre a primeira e segunda avaliações de pacientes do subgrupo longitudinal em relação aos níveis plasmáticos de fatores neurotróficos	73

LISTA DE FIGURAS

Figura - Artigo 1

1 Mecanismos envolvidos na neuroinflamação na ELA.....34

Figura - Manuscrito

1 ROC curve of the logistic regression model (Step 8) to predict
diagnosis of ALS.....71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALSFRS-R	<i>ALS Functional Rating Scale Revised</i> (Escala funcional de avaliação em ELA)
AMPA	Receptor ionotrópico de glutamato
ATP	Adenosina trifosfato
BDN	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BHE	Barreira hematoencefálica
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
DFT	Demência Frontotemporal
DNNI	Doenças neurológicas não inflamatórias
DP ±	Desvio Padrão
EAAT-2	Transportadores de aminoácidos excitatórios do tipo 2
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
ELAe	Esclerose Lateral Amiotrófica esporádica
ELAf	Esclerose Lateral Amiotrófica familiar
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FHEMIG	Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia
GLT1	Transportador de glutamato 1
GluR2	Subunidade do receptor de glutamato 2
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
HAD	Escala Hospitalar de Ansiedade e Depressão
HC/UFMG	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
HJK	Hospital Júlia Kubitschek
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IL-1AR	Antagonista do receptor de IL-1
IP-10	<i>Induced Protein 10</i>
LIIM	Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>

MEEM	Mini Exame do Estado Mental
MG	Minas Gerais
MIG	Monokine induced by gamma interferon
MoCA	Escala Cognitiva de Montreal
NGF	Fator de crescimento neural
NK	Natural killer
NT3	Neurotrofina-3
NT4/5	Neurotrofina-4/5
p	Valor de p
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
r	Coeficiente de correlação
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD1	Superóxido dismutase do tipo 1
sTNFR	Receptores solúveis de TNF
SUS	Sistema Único de Saúde
T1	Tempo 1 (primeira avaliação do subgrupo longitudinal)
T2	Tempo 2 (segunda avaliação do subgrupo longitudinal)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
Th1	Linfócito T helper 1
Th2	Linfócito T helper 2
Th17	Linfócito T helper 17
TNF	Fator de necrose tumoral
Trk	Tirosina cinase

RESUMO

Objetivo: Avaliar pacientes com diagnóstico de esclerose lateral amiotrófica (ELA) e investigar possíveis associações entre as variáveis clínicas e marcadores inflamatórios.

Método: Uma série consecutiva de pacientes com ELA esporádica provável ou definida, conforme os critérios de Awaji, foi submetida a avaliação através de protocolo clínico e psiquiátrico (questionário de ansiedade e depressão) e a coleta de amostra de sangue. Um subgrupo destes pacientes foi reavaliado após 6-12 meses. O sangue de 62 controles hígidos foi coletado para a análise de comparação de grupos. Os níveis plasmáticos de quimiocinas e citocinas foram dosados.

Resultados: Dos 68 pacientes recrutados, 38 casos (56%) eram do sexo masculino. A idade média ao início dos sintomas foi de 55 anos (DP \pm 12,7). A média da duração da doença foi de 3 anos (DP \pm 2,7). Em relação à forma inicial, 79% dos casos eram da forma apendicular e 21% da forma bulbar. Cerca de um terço dos pacientes apresentava ansiedade ou depressão provável. Sintomas de ansiedade e depressão se correlacionaram positivamente. Ao comparar pacientes e controles, foi encontrado aumento significativo de IL-6, IL-10 e IL-17 nos pacientes. Análise de regressão logística encontrou diferença significativa em relação a idade, TNF e IL-10. Dos 68 pacientes, 24 foram reavaliados após 6-12 meses. Ao comparar estes pacientes nos dois momentos, houve redução significativa de RANTES na segunda avaliação. Idade avançada ao início dos sintomas foi um preditor de rápida taxa de progressão da doença.

Conclusão: De forma geral, o perfil clínico dos pacientes se assemelha aos dados da literatura. Sintomas de ansiedade e depressão foram frequentes e se correlacionaram positivamente. Os biomarcadores não foram preditores do curso da doença. Avançada idade de início dos sintomas foi um preditor de rápida taxa de progressão. A dosagem de IL-10 e TNF pode ser considerada em futuros estudos de biomarcadores do diagnóstico de ELA.

Palavras-chave: Esclerose Lateral Amiotrófica; Aspectos clínicos; Biomarcadores; Inflamação.

ABSTRACT

Objective: To assess patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in order to verify possible associations between clinical features and inflammatory markers.

Method: A consecutive series of patients with probable or defined sporadic ALS, according to Awaji's criteria, underwent clinical and psychiatric (anxiety and depression questionnaires) assessment and blood analysis. A subset of these patients underwent a new assessment after 6-12 months. A sample of blood of matched controls was collected for comparison of groups. Serum levels of chemokines and cytokines were measured.

Results: Of the 68 enrolled patients, 38 cases (56%) were male. The mean age at onset of symptoms was 55 years (SD \pm 12.7). The average of disease duration at assessment was 3 years (SD \pm 2.7). Regarding the initial form, 79% of the cases were appendicular and 21% were bulbar. About one-third of the patients had probable anxiety or depression. Symptoms of anxiety and depression were highly correlated. When comparing patients and controls, a significant increase of IL-6, IL-10 and IL-17 was found in patients. Logistic regression analysis has found a significant difference regarding age, TNF and IL-10. Of the 68 patients, 24 were assessed twice. When comparing these patients at two-time points, there was a significant decrease of RANTES in the second assessment. Older age of onset was the only variable that predicted a faster rate of disease progression.

Conclusion: The clinical profile of our patients is similar to literature data. Symptoms of anxiety and depression were frequent and correlated positively. None of the inflammatory markers influenced on predicting disease course. Older age of onset predicted a faster rate of disease progression. IL-10 and TNF may be considered for a future biomarker panel for ALS diagnosis.

Keywords: Amyotrophic Lateral Sclerosis; Clinical aspects; Biomarkers; Inflammation.

1. INTRODUÇÃO

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) foi descrita em 1874 pelo Dr. Jean-Martin Charcot (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Caracteriza-se por quadro progressivo de degeneração do neurônio motor e, conseqüentemente, paresia gradual da musculatura estriada esquelética com incapacidade funcional secundária e sobrevida média de 3-5 anos (EISEN *et al.*, 1993; KIERNAN *et al.*, 2011).

A incidência e prevalência da ELA são de 2,08/100.000/ano e 5,4/100.000, respectivamente. A idade média ao início dos sintomas é de 61,8 anos (CHIÒ *et al.*, 2013) e há um predomínio de casos no sexo masculino (LOGROSCINO *et al.*, 2010). Em relação à etiologia, a ELA é classificada em esporádica (90-95% dos casos) e familiar (5-10%). A ELA familiar (ELAf) segue, na maioria dos casos, um padrão de herança autossômica dominante, sendo descritos, até o momento, mutações em mais de 20 *loci* (ZUFÍRIA *et al.*, 2016). A etiologia da ELA esporádica (ELAe) é multifatorial e ainda não foi totalmente esclarecida. Evidências científicas sugerem que os mediadores inflamatórios liberados após o insulto inicial influenciam na taxa de progressão da doença (MALASPINA *et al.*, 2015; HENKEL *et al.*, 2009).

Possíveis fatores de risco já foram sugeridos, dentre eles: etnia branca, tabagismo, exercícios físicos extenuantes, jogadores de futebol, trabalhadores rurais, militares, traumas, choque elétrico e exposição a metais pesados (KIERNAN *et al.*, 2011). Contudo, recente trabalho contrapôs-se a esses fatores, ao mostrar que a maior parte dos pacientes com ELA não tem antecedentes ocupacionais em profissões que envolvem atividade física extenuante, nem contato com materiais e produtos tóxicos ou radioativos, mas estão envolvidos em atividades ligadas à educação, à arquitetura e à engenharia (*No authors listed*, JAMA, 2017).

O tratamento é baseado em acompanhamento multidisciplinar (MILLER *et al.*, 2009) e no uso de riluzol, droga antilutamatérgica que reduz a excitotoxicidade mediada pelo glutamato e aumenta a sobrevida dos pacientes em 3-6 meses (BENSIMON *et al.*, 1994; KIERNAN *et al.*, 2011). Recentemente, o *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso do edaravone (antioxidante) após a publicação de estudos que demonstraram aumento da

sobrevida de um subgrupo de pacientes com ELA em fase inicial (ABE *et al.*, 2014; ABE *et al.*, 2017).

No Mestrado, concluído em 2015, foi realizado um estudo transversal e descritivo do perfil clínico de uma série de casos de pacientes com ELA provável ou definida, conforme os critérios de Awaji, que estavam em acompanhamento em dois centros de referência de Belo Horizonte: Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC/UFMG) e Hospital Julia Kubitscheck/FHEMIG (HJK/FHEMIG). Foi realizada uma revisão sistemática da literatura em relação aos estudos clínico-epidemiológicos nacionais de ELA. O perfil clínico da amostra foi avaliado e comparado aos estudos nacionais e internacionais.

No Doutorado, além do perfil clínico, avaliamos também possíveis associações dos parâmetros clínicos com variáveis laboratoriais (mediadores inflamatórios e fatores neurotróficos). Realizamos uma análise de comparação de grupos de controles hígidos e pacientes, além de investigar possíveis fatores de predição de diagnóstico. Um subgrupo de pacientes foi avaliado de forma longitudinal, com objetivo de investigar possíveis preditores de prognóstico da ELA. Os resultados serão apresentados, em sua maioria, na forma de artigos publicados ou em processo de revisão.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico

O primeiro relato de caso de paralisia progressiva dos membros e da língua, sem alteração da sensibilidade, foi feito por Bell em 1830. Em 1850, François Aran nomeou essa condição de atrofia muscular progressiva. Já em 1865, no Hospital Salpêtrière em Paris, Jean-Martin Charcot, importante médico, professor e cientista, descreveu a esclerose lateral primária e, posteriormente, a paralisia bulbar progressiva (1870) e a esclerose lateral amiotrófica (1874). Na descrição da ELA foram relatados 20 casos de pacientes com atrofia muscular (amiotrofia) associada à espasticidade. Nas 5 autópsias realizadas foram encontrados sinais de degeneração da coluna lateral (esclerose lateral) e do corno anterior da medula espinhal, por isso o nome de “esclerose lateral amiotrófica”. Devido à importância da descrição de Charcot, a doença é conhecida na França como “maladie de Charcot”. Nos Estados Unidos a doença é também conhecida como “Doença de Lou Gehrig”, um famoso jogador de beisebol, falecido em 1941 devido à doença (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Na década de 1950, subtipos da doença foram reconhecidos como a ELA-Plus (Surto de ELA/Demência/Parkinson na ilha de Guam) e a ELA familiar. O primeiro gene implicado na ELA familiar foi o *SOD1*, descrito em 1993 (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Os primeiros critérios diagnósticos utilizando a eletroneuromiografia foram publicados por Lambert em 1957 e 1969 (WILBOURN, 1998). Após um encontro do subcomitê de ELA da Federação Mundial de Neurologia no município de El Escorial na Espanha, foram formulados e publicados em 1994 os Critérios diagnósticos de El Escorial (BROOKS, 1994), que foram revisados e publicados em 1998 como critérios de Airlie House (BROOKS *et al.*, 2000). Entretanto, com o objetivo de aumentar a sensibilidade, foram publicados em 2008 os critérios de Awaji (DE CARVALHO *et al.*, 2008).

Em relação à abordagem dos pacientes, até a década de 1970 praticamente não existia nenhum tipo de tratamento de suporte, o qual foi sendo instituído progressivamente, sendo hoje de extrema importância na tentativa de prolongar a sobrevida e manter qualidade de vida dos pacientes (MILLER *et al.*,

2009; OLIVEIRA *et al.*, 2009). Em 1995, foi liberado o uso do riluzol, a primeira droga com efeito de prolongar a sobrevida dos pacientes (HUGON, 1996).

Em 2000, foi desenvolvido o primeiro modelo animal de ELA em um camundongo transgênico e, em 2002, foi descrito o primeiro ensaio clínico de tratamento com células tronco em pacientes com ELA (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Ensaio clínico com diversos tipos de medicamentos estão em andamento (MITSUMOTO *et al.*, 2014). Em maio de 2017, o FDA liberou o uso do edaravone em pacientes (ABE *et al.*, 2014; ABE *et al.*, 2017).

O Quadro 1 resume os aspectos históricos descritos acima.

Quadro 1: Aspectos históricos da ELA

1830	Bell - primeiro relato de caso de paralisia progressiva dos membros e da língua, sem alteração da sensibilidade
1850	François Aran - nomeou a doença acima de atrofia muscular progressiva
1865	Jean-Martin Charcot – descrição da esclerose lateral primária
1870	Jean-Martin Charcot – descrição da paralisia bulbar progressiva
1874	Jean-Martin Charcot – descrição da esclerose lateral amiotrófica
1952	Hirano – descrição do Complexo ELA/Demência/Parkinson
1957	Lambert - primeiros critérios diagnósticos utilizando a eletroneuromiografia (1957 e 1969)
1993	Descrição da mutação no gene <i>SOD1</i>
1994	Publicação dos critérios diagnósticos de El Escorial
1995	Liberado o uso do riluzol
1998	Revisão e publicação dos critérios de El Escorial (Airlie House)
2000	Primeiro modelo animal de ELA
2002	Primeiro ensaio clínico de tratamento com células tronco em pacientes
2008	Publicação dos critérios de Awaji
2011	Descrição das expansões repetidas de hexanucleotídeos (GGGGCC) do gene <i>C9ORF72</i>
2017	Liberado o uso de Edaravone pelo FDA

2.2 Epidemiologia

Em estudos internacionais, a incidência média da ELA foi de 2,08/100.000/ano e a prevalência de 5,4/100.000. A idade média ao início dos sintomas foi de 61,8 anos (CHIÒ *et al.*, 2013). Em estudos nacionais, a idade média do início dos sintomas variou entre 42-55 anos, sendo incertos os dados nacionais de prevalência e incidência (PRADO *et al.*, 2016). Há um consenso mundial em relação ao predomínio de casos no sexo masculino, sendo a razão homem:mulher variando entre 1,1-1,8:1 (LOGROSCINO *et al.*, 2010). Descrições mais detalhadas sobre o tema serão apresentadas no Artigo 2.

2.3 Fisiopatologia

Em relação à etiologia, a ELA é classificada em esporádica (90-95% dos casos) e familiar (5-10%) (KIERNAN *et al.*, 2011). A etiologia da ELA esporádica é multifatorial e ainda não foi totalmente elucidada. Evidências sugerem vários mecanismos envolvidos, sendo os principais: excitotoxicidade mediada pelo glutamato, mutação de diversos genes como *SOD1*, *TARDBP/TDP-43* e *FUS*, expansões da repetição de hexanucleotídeos (GGGGCC) do gene *C9ORF72*, anormalidades de fatores neurotróficos, neuroinflamação, entre outros (OLIVEIRA *et al.*, 2006, VUCIC *et al.*, 2014; MALASPINA *et al.*, 2015; EKESTERN, 2004).

2.3.1 Excitotoxicidade mediada pelo glutamato

A sinapse dos neurônios motores tem como neurotransmissor excitatório o glutamato e, em condições normais, o seu excesso é recaptado pelos astrócitos, por meio dos transportadores de aminoácidos excitatórios do tipo 2 (EAAT-2). A ativação astrocitária causada pela neuroinflamação promove uma hiporregulação (down-regulation) do EAAT-2, levando ao aumento do glutamato na fenda sináptica. O excesso de glutamato leva a uma ativação excessiva dos receptores inotrópicos pós-sinápticos, levando a um aumento dos níveis intracelulares de cálcio, que, por sua vez, ativam uma cascata de eventos que levam à morte neuronal (OLIVEIRA *et al.*, 2006; VUCIC *et al.*, 2014). A redução da expressão e da atividade do EAAT-2 no córtex motor e medula espinhal já foi vista em modelos animais e em pacientes com ELA (VUCIC *et al.*, 2014; TROTTI *et al.*, 1999).

Por outro lado, foi descoberto que na ELA há um aumento da expressão do receptor pós-sináptico AMPA sem a subunidade GluR2. Essa subunidade regula a permeabilidade ao cálcio, e esse receptor defeituoso aumenta a susceptibilidade do neurônio motor à excitotoxicidade do glutamato. Além disso, na ELA, os neurônios motores apresentam uma redução da capacidade de tamponamento do cálcio, o que os torna mais vulneráveis à degeneração (VUCIC *et al.*, 2014).

O riluzol, que é uma medicação antiglutamatérgica, aumentou a sobrevivência dos pacientes (BENSIMON *et al.*, 1994) e é utilizado no tratamento da ELA. Outras drogas antiglutamatérgicas, como a memantina, foram testadas, porém sem eficácia comprovada (DE CARVALHO *et al.*, 2010; MITSUMOTO *et al.*, 2014).

2.3.2 Fatores Genéticos

Até o momento, mutações foram descritas em mais de 20 *loci*, levando ao desenvolvimento de ELA pura ou associada a outras síndromes neurodegenerativas, como a demência frontotemporal (DFT) (ZUFÍRIA *et al.*, 2016). As mutações mais prevalentes ocorrem nos genes *C9ORF72* e *SOD1*. Outros genes envolvidos são: *ALS2* (*ALS2*), *18q21* (*ALS3*), *SETX* (*ALS4*), *SPG11* (*ALS5*), *FUS* (*ALS6*), *20p13* (*ALS7*), *VAPB* (*ALS8*), *ANG* (*ALS9*), *TARDBP* (*ALS10*), *FIG4* (*ALS11*), *OPTN* (*ALS12*), *ATXN2* (*ALS13*), *VCP* (*ALS14*), *UBQLN2* (*ALS15*), *SIGMAR1* (*ALS16*), *CHMP2B* (*ALS17*), *PFN1* (*ALS18*), *ERBB4* (*ALS19*), *HNRNPA1/A2B1* (*ALS20*), *MATR3* (*ALS21*), *SQSTM1*, *NEFH*, *GLE1*, *TAF15*, *TBK1*. A maioria dos casos segue um padrão de herança autossômico dominante (ZUFÍRIA *et al.*, 2016; MCCLUSKEY *et al.*, 2012).

A super-óxido dismutase tipo 1 (*SOD1*) é uma enzima que neutraliza radicais livres produzidos pelo metabolismo oxidativo neuronal. A primeira mutação no gene *SOD1* foi descrita em 1993. Desde então, mais de 166 mutações já foram encontradas nesse gene. Essa mutação corresponde a cerca de 20% dos casos de ELA_f e 1-7% dos casos de ELA_e (VUCIC *et al.*, 2014; PICHER-MARTEL *et al.*, 2016). Essas mutações levam a diversos fenótipos distintos e há evidências de variações inter e intra-familiares. A sua importância na patogênese da ELA é explicada por três mecanismos: ganho tóxico de função,

através da formação de proteína *SOD1* tóxica; alteração conformacional, levando a formação de agregados intracelulares; e perda de sua função original, acarretando aumento do estresse oxidativo (VUCIC *et al.*, 2014).

Expansões da repetição de hexanucleotídeos (GGGGCC) do gene *C9ORF72* foram descobertas em 2011 em famílias com diagnóstico de ELA, DFT e ELA-DFT (PICHER-MARTEL *et al.*, 2016). No caso da ELAf e ELAe, as expansões foram encontradas em 41% e 5% dos casos, respectivamente (BYRNE *et al.*, 2012). Pessoas saudáveis têm em média 10 repetições, enquanto os pacientes com a mutação podem chegar a mais de 1000 repetições. O mecanismo fisiopatológico que envolve as expansões ao desenvolvimento de ELA ainda não foi esclarecido, mas três potenciais mecanismos patogênicos foram sugeridos: haploinsuficiência, toxicidade mediada pelo RNA e formação de proteínas tóxicas (VUCIC *et al.*, 2014). A expansão do gene *C9ORF72* envolve diversos fenótipos clínicos (PICHER-MARTEL *et al.*, 2016). A forma de início bulbar parece ser mais frequente, assim como há fortes evidências da maior frequência de DFT associada (50% nos pacientes com a expansão versus 12% nos casos sem a expansão). A idade de início dos sintomas variou entre os estudos, por outro lado, a sobrevida média dos pacientes com a expansão foi menor (20 versus 26 meses) (BYRNE *et al.*, 2012; PICHER-MARTEL *et al.*, 2016). Cumpre sublinhar que descrição da expansão *C9ORF72* como mutação patogênica comum tanto à ELA quanto à DFT ensejou uma nova perspectiva na investigação de ambas doenças, de modo que hoje se considera a existência de um *continuum* ELA-DFT, tanto em termos fisiopatológicos, quanto cognitivos e de neuroimagem. Recente artigo por nós publicado durante o doutorado fez revisão de estudos de neuroimagem que exploraram o *continuum* ELA-DFT (PRADO *et al.*, 2015, ver em APÊNDICES).

Mutações nos genes *TARDBP* e *FUS*, que estão envolvidos no processamento do RNA, foram associados a 4-6% dos casos de ELAf e 0,7-2% dos casos de ELAe (VUCIC *et al.*, 2014). O gene *TARDBP* codifica a proteína TDP-43 e o gene *FUS* a proteína com o mesmo nome. Essas proteínas são transportadas para o núcleo, porém as mutações em seus respectivos genes levam à criação de proteínas defeituosas que, ao invés de serem transportadas para o núcleo, permanecem no citoplasma interferindo no metabolismo e regulação do RNA, além de formarem grânulos de estresse oxidativo que levam

à neurodegeneração. O acúmulo citoplasmático de TDP-43 e FUS também é observado no espectro ELA/ELA-DFT/DFT (SEELAAR *et al.*, 2011).

2.3.3 Fatores neurotróficos

Os fatores neurotróficos correspondem a um grupo heterogêneo de polipeptídeos solúveis produzidos por neurônios ou por células efetadoras periféricas, que atuam através de receptores específicos, e têm como função permitir a sobrevivência, diferenciação, manutenção e, quando possível, a regeneração axonal no sistema nervoso central e periférico (DA SILVA, 1995; RICHARDSON, 1991).

Os fatores neurotróficos englobam duas famílias: a das neurotrofinas e a do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF).

Os principais componentes da família das neurotrofinas são o fator de crescimento neural (NGF), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), a neurotrofina-3 (NT3) e a neurotrofina-4/5 (NT4/5). As neurotrofinas são importantes para o desenvolvimento, funcionamento e manutenção dos neurônios. Dentre essas funções podemos citar a regulação do crescimento axonal e dendrítico, regulação das conexões sinápticas e da liberação de neurotransmissores e a plasticidade neuronal (CHAO, 2003). As neurotrofinas são inicialmente sintetizadas como pró-neurotrofinas e, posteriormente, clivadas no meio intracelular em proteínas maduras. As neurotrofinas podem se ligar a dois tipos de receptores transmembrana: o receptor tirosina cinase (Trk) e o receptor p75, sendo que cada neurotrofina tem uma afinidade para um tipo de receptor. O NGF liga-se preferencialmente ao TrkA, o BDNF e o NT4/5 ao TrkB e o NT3 ao TrkC. Todas as neurotrofinas podem se ligar ao receptor p75, que também funciona como um co-receptor do Trk, podendo aumentar a afinidade de ligação deste último. Os níveis de neurotrofinas são imprescindíveis para o equilíbrio entre a sobrevivência e a morte neuronal. Camundongos que não secretavam neurotrofinas morreram poucas semanas após o nascimento e os que secretavam níveis reduzidos apresentaram alterações comportamentais e de função cerebral (CHAO, 2003).

Fatores neurotróficos e a doença do neurônio motor

A disfunção da produção, liberação e/ou recaptação de fatores neurotróficos foi sugerida como um dos mecanismos implicados na fisiopatologia da ELA. Dentre os fatores que têm a função de proteção do neurônio motor estão a NT3, NT4/5, BDNF e o GDNF (EKESTERN, 2004).

Sabe-se que a NT3 e o BDNF auxiliam no reforço sináptico neuro-muscular (CHAO, 2003). A NT3 é abundante no músculo esquelético (EKESTERN, 2004) e parece também exercer influência em motoneurônios espinhais, visto que sua ausência leva à perda desses neurônios, poupando, entretanto, os motoneurônios faciais (TOVAR-Y-ROMO *et al.*, 2014).

A NT4/5 apresenta similaridades funcionais com o BDNF e também auxilia na manutenção da sobrevivência dos neurônios motores (EKESTERN, 2004).

O GDNF é um dos mais potentes fatores neurotróficos que auxiliam no desenvolvimento e manutenção dos neurônios motores (HAASE *et al.*, 2002). Ele auxilia tanto na sinalização do correto posicionamento do neurônio motor na medula espinhal, quanto na orientação de seu axônio até o músculo-alvo (HAASE *et al.*, 2002). Sua importância foi confirmada através de estudos que inibiram a secreção de GDNF em camundongos mutantes. Estes, por sua vez, apresentaram ao nascimento redução de 25% do número de neurônios motores (HAASE *et al.*, 2002). Ele se liga ao receptor tirosina cinase RET (CHAO, 2003).

Já o BDNF é amplamente distribuído no sistema nervoso central e periférico. Estudos demonstraram que a aplicação de BDNF em neurônios córtico-espinhais lesionados aumentou significativamente o crescimento neuronal colateral, além de prevenir a morte de neurônios motores da medula espinhal *in vivo* (HE *et al.*, 2013). Em modelos animais com ELA, o tratamento com BDNF ou a manipulação gênica de seus receptores promoveram redução da velocidade de degeneração neuronal (HE *et al.*, 2013). Devido aos resultados positivos dos estudos pré-clínicos, foram iniciados ensaios clínicos randomizados, utilizando administração intratecal ou subcutânea de BDNF em 1.135 pacientes com ELA. Entretanto, não foi observada melhora significativa da sobrevivência em relação aos que utilizaram placebos (The BDNF Study Group, 1999; OCHS *et al.*, 2000). Diversos fatores foram sugeridos para explicar o resultado negativo, como meia vida curta do BDNF, capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) nas administrações subcutâneas, estágio da

doença, entre outros (HE *et al.*, 2013; TOVAR-Y-ROMO *et al.*, 2014). Novas estratégias estão sendo implantadas para auxiliar na eficácia do tratamento, como a utilização de implante de células-tronco secretoras de fatores neurotróficos (HE *et al.*, 2013; PETROU *et al.*, 2016). Por outro lado, alguns pesquisadores questionam a eficácia da reposição de fatores neurotróficos em um organismo sem déficit significativo (MILLER *et al.*, 1996), visto que o efeito neuroprotetor desses fatores é dose-dependente, mas declina ao exceder a sua concentração ótima (EKESTERN, 2004).

Fatores neurotróficos: estudos *post-mortem* de pacientes com ELA

O tecido muscular *post-mortem* foi analisado em 15 controles e 15 pacientes com ELA esporádica com idade entre 39-75 anos e duração da doença entre 7-96 meses. Houve aumento dos níveis de neurotrofinas (BDNF, NGF, NT3 e NT4/5) nos pacientes, sendo o BDNF já elevado no estágio inicial e os demais nos estágios avançados da doença (KUST *et al.*, 2002).

Por outro lado, na avaliação *post-mortem* do córtex motor cerebral de pacientes com ELA e controles não foi detectada diferença no número ou intensidade de neurônios imunofixados para as neurotrofinas NT3, NT4/5 e BDNF (DUBERLEY *et al.*, 1997).

Já na avaliação *post-mortem* da medula espinhal de pacientes com ELA comparados com controles houve redução da expressão de NT3 e alteração da expressão do seu receptor TrkC nos pacientes (DUBERLEY *et al.*, 1997).

Em relação ao GDNF, estudos que analisaram o líquido e o músculo de pacientes com ELA demonstraram níveis elevados desse fator comparados aos controles, sugerindo que a síntese de GDNF é aumentada na doença (LIE *et al.*, 1998; YAMAMOTO *et al.*, 1999; GRUNDSTROM *et al.*, 1999; GRUNDSTROM *et al.*, 2000).

Apesar de ter um papel de trofismo do sistema sensitivo, o NGF também foi avaliado em tecidos *post-mortem* de pacientes com ELA e controles. Na ELA houve redução da concentração de NGF no córtex motor cerebral e na coluna dorsal da medula espinhal e aumento da sua concentração na coluna lateral da medula espinhal, que inclui a região de degeneração do trato córtico-espinhal (ANAND *et al.*, 1995).

2.3.4 Neuroinflamação na ELA

Sinais de inflamação e ativação do sistema imunológico já foram evidenciados no sangue, líquido e em estudos *post-mortem* de pacientes com ELA, por meio da ativação das células da glia, em especial a micróglia e os astrócitos, além da infiltração de células T (MALASPINA *et al.*, 2015). O processo de neuroinflamação na ELA é provavelmente secundário às alterações que levam à morte neuronal, podendo influenciar na taxa de progressão da doença e não no mecanismo inicial (MALASPINA *et al.*, 2015; BOILLEE *et al.*, 2006; HENKEL *et al.*, 2009).

O quadro 2 resume os estados de ativação dos linfócitos T, micróglia e astrócitos na ELA, bem como suas principais funções.

Quadro 2: Estados de ativação dos linfócitos T, micróglia e astrócitos na ELA

TIPO CELULAR	ESTADO DE ATIVAÇÃO	FUNÇÃO	PRINCIPAIS CITOCINAS
LINFÓCITOS T HELPER	Th1	- Pró-Inflamatória - Defesa mediada por fagocitose	IFN- γ , IL-2
	Th2	- Moduladora - Auxilia na resposta imune humoral	IL-4, IL-5, IL-13
	Th17	- Patogênese de modelos experimentais de doenças autoimunes, doença do enxerto contra hospedeiro, defesa contra bactérias extracelulares e fungos	IL-17
MICRÓGLIA (Divisão didática*)	M1	- Pró-Inflamatória - Liberação de espécies reativas de oxigênio - Redução de fatores tróficos	IL-1, IL-6, TNF
	M2	- Anti-inflamatória - Liberação neurotrofinas	IL-10

ASTRÓCITO	Normal	-Liberação de fatores neurotróficos -Recaptação do glutamato sináptico -Liberação de TGF- β
	Ativado	- Redução da secreção de fatores neurotróficos - <i>Down-regulation</i> dos transportadores de glutamato

*Estudos recentes questionam essa divisão (RANSOHOFF *et al.*, 2016), mas, de forma didática, podemos classificar a micróglia em dois fenótipos (M1 e M2), que são guiados por estímulos do meio no qual a micróglia está inserida.

2.3.4.1 Citocinas

As citocinas são pequenos polipeptídeos ou glicoproteínas, produzidas por diversos tipos celulares, que têm a função de estabelecer interações e comunicações entre células. Sua ação pode ser exercida de forma autócrina, parácrina ou endócrina (ZHANG *et al.*, 2007; DE OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Citocina é um termo genérico que engloba diversas proteínas. Dentre elas podemos citar as linfocinas e monocinas (citocinas produzidas pelos linfócitos e monócitos, respectivamente), as quimiocinas, (com propriedades de quimiotaxia), as interleucinas (IL), produzidas por um leucócito com o objetivo de atuar em outro leucócito, os fatores de necrose tumoral (TNF) e os interferons (IFN). Diversos tipos celulares podem secretar a mesma citocina, e ela, por sua vez, pode atuar em diversas células. As citocinas podem ter funções semelhantes, podem atuar de forma sinérgica ou antagônica, e geralmente são produzidas em cascata (ZHANG *et al.*, 2007; DE OLIVEIRA *et al.*, 2011).

As citocinas têm papel fundamental no processo inflamatório, influenciando na atividade, diferenciação, proliferação e sobrevivência da célula imunológica, além de regular as respostas Th1 e Th2. Dentre as citocinas que participam da resposta Th1 podemos citar as IL-2, IL-6, IFN- γ e TNF, e, dentre as que participam da resposta Th2 estão IL-4, IL-5, IL-13 (ZHANG *et al.*, 2007; DE OLIVEIRA *et al.*, 2011).

2.3.4.2 Quimiocinas

A família das quimiocinas está envolvida na regulação do recrutamento e migração de células imunes até o sítio de lesão/infecção, atuando como mediadores inflamatórios com propriedades quimioatrativas (PALOMINO *et al.*, 2015; ROLLINS *et al.*, 1997). A família das quimiocinas se divide em subfamílias com base no primeiro resíduo de cisteína: a da CC e a da CXC, que apresenta um aminoácido entre as duas primeiras cisteínas. As quimiocinas CC atuam nos monócitos, basófilos, eosinófilos, linfócitos-T e células natural killer (NK). São exemplos de quimiocinas da família CC: **CCL2 ou MCP-1** (*Monocyte chemoattractant protein-1*) e **CCL5 ou RANTES** (*Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*). Já a subfamília CXC atua, principalmente, na quimiotaxia de neutrófilos. São exemplos de quimiocinas da família CXC: **CXCL8 ou IL-8, CXCL9 ou MIG** (*Monokine induced by gamma interferon*) e **CXCL10 ou IP-10** (*Induced Protein 10*) (PALOMINO *et al.*, 2015; RENTZOS *et al.*, 2007; BARON *et al.*, 2005).

2.3.4.3 Interleucinas

Interleucina 2 (IL-2)

A IL-2 é uma citocina pró-inflamatória produzida por células T-CD4+ e T-CD8+, que atua na resposta Th1. Ela estimula o crescimento e a proliferação de linfócitos-t e células-B, além de induzir a produção de outras citocinas pró-inflamatórias (como TNF e IFN- γ), resultando na ativação de monócitos, neutrófilos e células NK (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Interleucina 4 (IL-4)

A IL-4 é uma citocina que atua na resposta Th2, e é produzida por linfócitos-T e B, células NK, mastócitos, sinoviócitos e células endoteliais. Ela induz a diferenciação de linfócitos-B para a produção de imunoglobulinas, reduz os efeitos das citocinas pró-inflamatórias nos macrófagos ativados, inibe a produção de radicais livres de oxigênio e promove aumento da susceptibilidade dos macrófagos aos efeitos do glicocorticoide (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Interleucina 6 (IL-6)

A IL-6 é uma citocina produzida por diversos tipos celulares, dentre eles, macrófagos, monócitos e células da glia. Dependendo do meio, a IL-6 pode exercer função pró-inflamatória, através da promoção da maturação e ativação de neutrófilos, maturação de macrófagos, diferenciação/manutenção de linfócitos-T citotóxicos e células NK, ativação de astrócitos e micróglia e regulação da expressão de neuropeptídeos neuronais após lesão. Por outro lado, a IL-6 também pode exercer função plástica, através da liberação de receptores solúveis de TNF (sTNFRs) e IL-1AR, que são antagonistas endógenos das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-1, respectivamente (ZHANG *et al.*, 2007; DE OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Interleucina 10 (IL-10)

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, que atua em diversas respostas imunes, e é produzida por tecido neuroendócrino, neural e por células imunes. Ela inibe a expressão de citocinas pró-inflamatórias produzidas por macrófagos ativadas, promove uma hiperregulação (*up-regulation*) endógena dos receptores anti-inflamatórios e uma hiporregulação (*down-regulation*) dos receptores pró-inflamatórios, estimula a produção endógena de citocinas anti-inflamatórias, aumenta a produção de mastócitos e impede a produção de IFN- γ pelas células NK (ZHANG *et al.*, 2007; DE OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Interleucina 17 (IL-17)

A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por linfócitos-T-CD4, que atua na resposta Th17 e tem papel na patogênese de modelos experimentais de doenças autoimunes, doença do enxerto contra hospedeiro, defesa contra bactérias extracelulares e fungos (NORMANTON *et al.*, 2013; DE OLIVEIRA *et al.*, 2011; DE SOUZA *et al.*, 2010).

Fator de necrose tumoral (TNF)

Os fatores de necrose tumoral englobam o TNF- α e o TNF- β , que se relacionam estruturalmente e atuam nos mesmos receptores. Atualmente ambas as isoformas são denominadas apenas por TNF. O TNF é uma potente citocina

pró-inflamatória produzida por linfócitos-T, macrófagos, monócitos, neurônios e células da glia. É indutor do metabolismo muscular e da caquexia, influencia a apoptose celular, entre outras funções (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Interferon gamma (IFN- γ)

O IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória produzida por linfócitos-T e células NK. Ela promove ativação e regulação dos macrófagos e monócitos, regula a resposta imune humoral e a produção de imunomoduladores e de outras citocinas pró-inflamatórias como IL-2 e TNF (BACH *et al.*, 1997).

O quadro 3 resume as citocinas e suas funções.

Quadro 3: Citocinas e suas funções

QUIMIOCINAS	- Propriedades quimioatrativas	IP-10, MCP-1, MIG, RANTES, IL-8
INTERLEUCINAS	- Moduladora ou Anti-Inflamatória	IL-4, IL-10
	- Pró-Inflamatória	IL-2, IL-6, IL17
INTERFERON	- Pró-Inflamatória	IFN- γ
FATOR DE NECROSE TUMORAL	- Pró-Inflamatória	TNF

Estudo que analisou a medula espinhal em modelos animais de ELA com a mutação *SOD1* verificou aumento significativo da concentração de RANTES, IL-6, TNF e IFN- γ comparado aos controles (HENSLEY *et al.*, 2003). Em estudos *post-mortem* foi verificado aumento do MCP-1 no líquido e nas células da glia de pacientes com ELA em comparação com controles (HENKEL *et al.*, 2004).

Revisão não sistemática dos estudos envolvendo mediadores inflamatórios no líquido e sangue de pacientes com ELA encontra-se no Artigo 1.

ARTIGO 1

**Aceito pela Revista Brasileira de Neurologia
Em processo de edição para publicação**

**TÍTULO:
NEUROINFLAMAÇÃO NA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA
NEUROINFLAMMATION IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS**

**TÍTULO ABREVIADO:
NEUROINFLAMAÇÃO NA ELA
NEUROINFLAMMATION IN ALS**

Laura de Godoy Rousseff Prado^{1,2,3}, Érica Leandro Marciano Vieira^{1,2}, Natália Pessoa Rocha², Vitor de Godoy Rousseff Prado², Leonardo Cruz de Souza^{1,2,3}, Antônio Lúcio Teixeira^{1,2,3}

1 Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil;

2 Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil;

3 Ambulatório de Doenças Neuromusculares, Departamento de Neurologia, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil.

Conflito de interesse: nenhum

Correspondência: Laura de Godoy Rousseff Prado. Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Faculdade de Medicina, UFMG. Av. Professor Alfredo Balena, nº190 / sl 281. CEP: 30130-100, Santa Efigênia, Belo Horizonte, MG, Brasil; E-mail: laura.grp@hotmail.com

RESUMO

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) esporádica é uma doença neurodegenerativa que acomete o neurônio motor. Sua etiologia ainda não foi totalmente esclarecida e é considerada multifatorial. O objetivo desse trabalho é fazer uma revisão narrativa sobre os mecanismos fisiopatológicos da ELA esporádica, com foco no papel da neuroinflamação, além de descrever estudos envolvendo a pesquisa de biomarcadores de diagnóstico e prognóstico. O processo de neuroinflamação na ELA é considerado secundário às alterações que levam à morte neuronal, podendo influenciar na taxa de progressão da doença. Existem diversos estudos sobre o perfil dos fatores inflamatórios na ELA, por vezes com resultados contraditórios, reforçando a dificuldade de análise desses fatores num organismo dinâmico. Ainda assim, no contexto da ELA, o estudo de possíveis biomarcadores diagnósticos e/ou prognósticos é válido e de grande interesse, pois permitiria um avanço nos ensaios clínicos que buscam novos tratamentos, bem como na condução e planejamento de cada caso.

Palavras-chave: Esclerose Lateral Amiotrófica; Inflamação; Biomarcador.

ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease that affects the motor neuron. Its etiology has not been fully clarified and is considered multifactorial. The aim of this study is to perform a narrative review on the pathophysiological mechanisms of sporadic ALS, focusing on the role of neuroinflammation. It will also discuss studies investigating diagnostic and prognostic biomarkers. Neuroinflammation in ALS is considered to be a secondary event, triggered by neuronal death, and it may influence disease progression. There are several studies on inflammatory factors in ALS, some with contradictory findings, reinforcing the difficulty of assessing these factors in a dynamic organism. Even so, in ALS context, the study of possible diagnostic and/or prognostic biomarkers is valid and of great interest. This may allow the advance of clinical trials that investigate new treatments, as well as the management of individual cases.

Keywords: Amyotrophic Lateral Sclerosis; Inflammation; Biomarker

INTRODUÇÃO

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) caracteriza-se por quadro progressivo de degeneração do neurônio motor e, consequentemente, paresia gradual da musculatura estriada esquelética com incapacidade funcional secundária e sobrevida média de 3-5 anos. De acordo com os aspectos genéticos, a ELA pode ser classificada em: i) familiar, isto é, com causa genética definida (5 -0% dos casos); e ii) esporádica, quando não há evidência de padrão de herança familiar (90-95% dos casos)¹.

O processo fisiopatológico envolvido na ELA esporádica é multifatorial e ainda não foi totalmente elucidado. Evidências sugerem vários mecanismos envolvidos, sendo os principais: excitotoxicidade mediada pelo glutamato, mutação de diversos genes como *SOD1*, *TARDBP/TDP-43* e *FUS*, expansões repetidas de hexanucleotídeos (GGGGCC) do gene *C9ORF72*, anormalidades de fatores neurotróficos, neuroinflamação, desarranjo dos neurofilamentos e disfunção mitocondrial, entre outros².

Neste artigo abordaremos o papel da neuroinflamação na ELA, além de descrever estudos envolvendo a pesquisa de biomarcadores de diagnóstico e prognóstico.

MÉTODOS

Foi realizada uma revisão não sistemática na base de dados PubMed/MEDLINE. Os termos utilizados na pesquisa foram “amyotrophic lateral sclerosis” em associação com “inflammation”, “IL-2”, “IL-4”, “IL-6”, “IL-8”, “IL-10”, “IL-17”, “MCP-1”, “IP-10”, “RANTES”, “MIG”, “TNF”, “sTNFR” “IFN- γ ”, “biomarker”. A seleção dos artigos ocorreu a critério dos autores, sendo priorizados trabalhos originais da última década realizados em humanos.

NEUROINFLAMAÇÃO NA ELA

Sinais de inflamação e ativação do sistema imune já foram evidenciados no sangue, líquido e em estudos *post-mortem* de pacientes com ELA³. O processo de inflamação do sistema nervoso central (SNC) na ELA, também chamada de neuroinflamação, é provavelmente secundário às alterações que levam à morte neuronal, possivelmente influenciando na taxa de progressão da doença e não no mecanismo inicial³⁻⁵.

As células da glia, em especial as micróglia e astrócitos, são células não neuronais que promovem suporte e proteção aos neurônios, garantindo assim a homeostase do meio³. A micróglia atua como uma das primeiras linhas de defesa do sistema nervoso central, sendo considerada um componente do sistema imune inato⁶. A micróglia é sensível às mudanças patológicas encontradas na ELA, por exemplo, anormalidades no envelhecimento e agregação de proteínas e aumento de adenosina trifosfato (ATP) liberada de neurônios motores degenerados, modificando assim a sua estrutura e função após detectá-las^{6,7}. Estudos utilizando tomografia por emissão de pósitrons (PET) e marcadores microgliais (ex.: (18)F-DPA-714) possibilitam a avaliação da ativação microglial *in vivo*. Nesse sentido, pacientes recém-diagnosticados com ELA apresentaram aumento da ativação microglial na área motora primária, área motora suplementar e lobo temporal em comparação com controles⁸. A ativação microglial inicial leva à liberação de mediadores inflamatórios, que por sua vez, favorecem a disfunção da barreira hematoencefálica (BHE) e a entrada de leucócitos da periferia para o SNC⁹.

Em estudo *post-mortem* foi verificado aumento da proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1) no líquido e nas células da glia de pacientes com ELA em comparação com controles¹⁰. A liberação de MCP-1 pela micróglia promove a infiltração de monócitos através da BHE. Esses monócitos adquirem fenótipo pró-inflamatório e contribuem para a morte do neurônio motor⁷. Não apenas os monócitos provenientes do

sistema imune periférico, mas também os linfócitos podem contribuir para a progressão do processo neurodegenerativo observado na ELA. Os linfócitos T podem se diferenciar em subtipos de T auxiliares (Th) 1, Th2, Th17 e T reguladoras (Treg), determinados pelo perfil de citocinas produzidas no meio extracelular^{7,9,11}. Estudos indicam que os subtipos Th1 e Th17 promovem um estado de inflamação crônica, contribuindo para o processo de neurodegeneração. Já os subtipos Th2 e Treg reduzem a ativação microglial e promovem um ambiente neuroprotetor, reduzindo assim a progressão da doença^{7,9}. Estudos que corroboram esta hipótese encontraram nos pacientes com ELA correlação negativa entre a concentração de linfócitos Treg e a taxa de progressão da ELA^{12,13}. Entretanto, sugere-se que esse ambiente neuroprotetor ocorra somente nas fases iniciais da doença^{7,12}.

Além de micróglia e células imunes periféricas infiltradas no SNC, os astrócitos também desempenham papel fundamental no processo neuroinflamatório associado à neurodegeneração. Postula-se que a liberação de fatores neurotróficos e a recaptção de glutamato pelos astrócitos atuem como neuroprotetores na fase inicial da ELA. A liberação do fator de transformação do crescimento-beta (TGF- β) por astrócitos também auxilia na supressão da ativação microglial. Entretanto, à medida que a doença progride, os fatores pró-inflamatórios liberados no meio promovem a ativação astrocitária, levando à redução da liberação de fatores neurotróficos, hiporegulação (*down-regulation*) dos transportadores de glutamato (GLT1/EAAT2) e liberação de fatores neurotóxicos e citocinas^{6,7}.

Importante lembrar que a degeneração neuronal na ELA não ocorre somente no corpo do neurônio motor, mas também na periferia, em seu axônio. A degeneração axonal promove o recrutamento de macrófagos para o sítio da lesão já detectado em estudos com modelos animais. Entretanto, não se sabe ao certo o papel do macrófago na progressão da doença, já que alguns estudos demonstraram efeitos neuroprotetores⁷.

A ativação imune leva a liberação de diversas citocinas anti e pró-inflamatórias no SNC e na periferia. Não se sabe ao certo o papel de cada citocina na fisiopatologia da ELA e se elas teriam uma ação individual ou em sinergismo³.

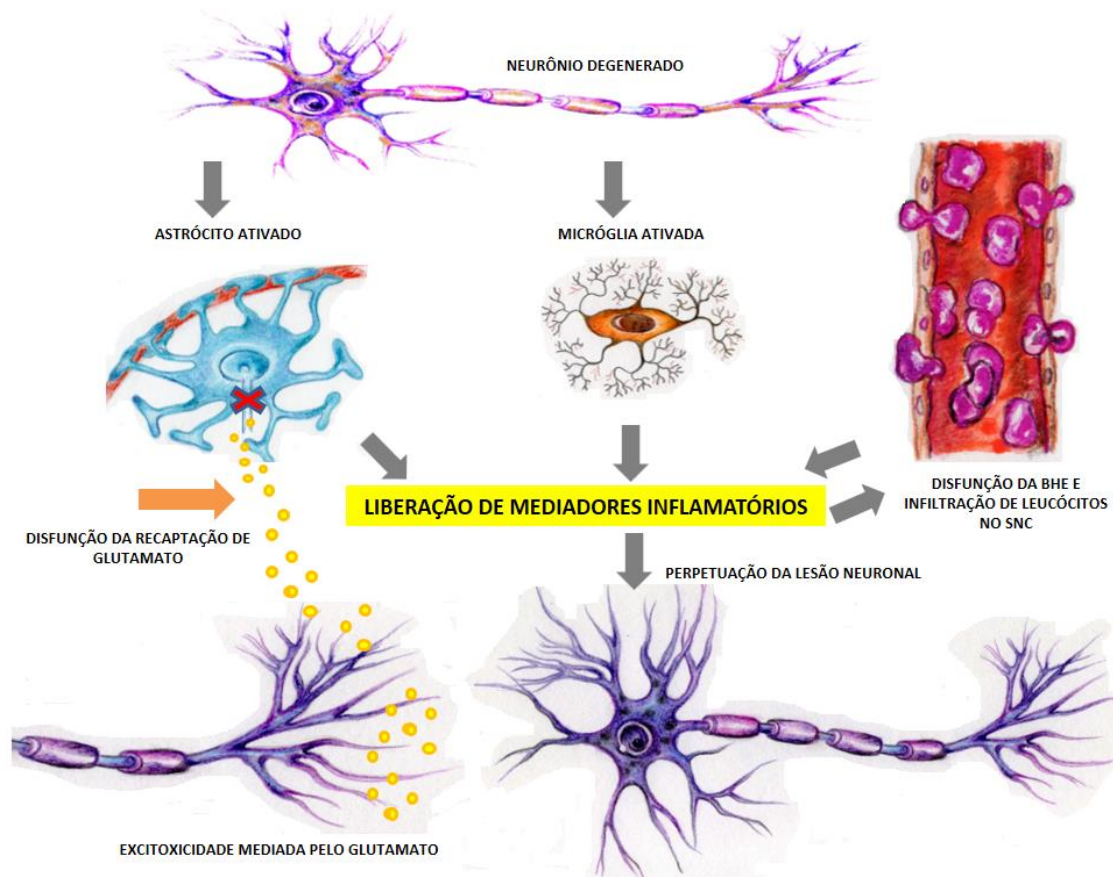
Disfunção da barreira hematoencefálica (BHE) na ELA

Há evidências de disfunção da BHE e redução do número de pericitos (célula mesenquimal que auxilia no suporte dos vasos sanguíneos) em pacientes com ELA quando comparados a controles. Além disso, foi descrita uma correlação negativa ($r=-0,75$; $p<0,01$) entre o número de pericitos e a magnitude da disfunção da BHE¹⁴. O aumento nos níveis de albumina, imunoglobulina (Ig)G e proteína do Complemento C3 no líquido de pacientes com ELA em comparação aos controles corrobora a hipótese de que há disfunção da BHE¹⁵⁻¹⁷. Estudos utilizando modelos animais de ELA também demonstraram ruptura da BHE nos estágios iniciais e avançados da doença¹⁸. A correlação positiva entre níveis de neurofilamentos no sangue e no líquido de pacientes com ELA também corrobora esse dado¹⁹.

Como já descrito anteriormente, a ativação microglial resulta em liberação de mediadores inflamatórios, que por sua vez, favorecem a disfunção da BHE na ELA⁹. Essa disfunção já foi evidenciada em outros trabalhos^{14,18,19} e sua importância está em permitir estudos com dosagem de fatores inflamatórios na periferia, como no soro/plasma, que possam refletir o que ocorre no SNC. A partir destes estudos, poderão ser identificados biomarcadores ou até medicamentos que possam ser dosados e administrados na periferia, sendo, portanto, menos invasivos para os pacientes.

A figura 1 mostra de forma simplificada como ocorre o processo de neuroinflamação na ELA.

Figura 1: Mecanismos envolvidos na neuroinflamação na ELA



Legenda: BHE: barreira hematoencefálica; SNC: sistema nervoso central
Cortesia: Heloisa Godoy

Perfil de citocinas séricas e líquóricas na ELA

Os resultados dos estudos transversais envolvendo a análise de fatores inflamatórios no líquido e/ou sangue de pacientes com ELA encontram-se resumidos na tabela 1^{10,20-30}. Poucos são os estudos que avaliaram o perfil de citocinas na ELA de forma longitudinal. Um deles avaliou 13 pacientes com ELA e 7 controles hígidos por meio de duas coletas de sangue com intervalo de 6 meses. Não foram feitas análises de pareamento entre os grupos em relação à idade e sexo. Na primeira avaliação (A1) houve aumento significativo do nível de IL-6 nos pacientes em comparação com controles ($p < 0,05$). Na segunda avaliação (A2), o nível de IL-6 foi semelhante entre os grupos, porém significativamente menor ($p < 0,01$) ao comparar os pacientes na A2 com A1. Ainda na A2, houve redução significativa de IL-2 ($p < 0,05$) e aumento significativo de IL-8 ($p < 0,01$) nos pacientes comparados com controles. A análise de TNF, IL-4 e IL-10 não evidenciou diferenças significativas entre os grupos²⁷.

Um estudo recente avaliou a concentração sérica de fatores inflamatórios de 95 pacientes com ELA e 88 controles (não pareados em relação à idade e sexo). Além disso, no mesmo estudo, foi realizada uma avaliação longitudinal de 59 pacientes com seis coletas realizadas a cada 2-4 meses, com o máximo de 2 anos de seguimento. Foi encontrado um aumento significativo nos níveis de TNF, IL-2, IL-8, IL-4 e IL-10 e

redução significativa nos níveis de IFN- γ em pacientes com ELA comparados com controles. Após análise multivariada, mantiveram-se os aumentos significativos nos níveis de IL-6, TNF e IL-4, e a redução significativa nos níveis de IFN- γ em pacientes comparados aos controles. Houve correlação negativa entre a pontuação na escala funcional e a concentração de IL-6 e TNF. Níveis elevados de IL-2 foram preditores de baixa sobrevida. Na análise longitudinal das citocinas (N=59), somente a IL-6 apresentou aumento significativo na comparação entre a primeira e a sexta coleta. Não foram encontradas associações entre as citocinas e a progressão da doença durante o estudo longitudinal²⁸.

De forma geral, os estudos demonstraram aumentos nos níveis das citocinas analisadas. No entanto, resultados controversos foram encontrados, reforçando a complexidade da análise desses fatores em humanos, já que diversas variáveis, por vezes difíceis de serem excluídas, poderiam influenciar o resultado final. Entretanto, dos trabalhos analisados, encontramos certa concordância de resultados em relação aos níveis de IL-8, IP-10, IL-6 e IL-17. Consideramos que esses fatores, se analisados em conjunto, podem ser considerados como possíveis biomarcadores, entretanto estudos longitudinais e envolvendo tamanhos amostrais maiores devem ser realizados para validar essa possibilidade.

A comprovação do papel da inflamação na fisiopatologia da ELA possibilitaria o desenvolvimento de medicamentos que atuem na redução da progressão da doença. De fato, diversos ensaios clínicos com agentes anti-inflamatórios e imunossupressores já foram realizados ou estão em andamento, infelizmente ainda sem eficácia comprovada. Dentre esses medicamentos podemos citar a ciclosporina, minociclina, celecoxibe e glatiramer³¹.

Tabela 1: Estudos envolvendo mediadores inflamatórios no líquido e/ou sangue de pacientes com ELA

FATOR	MATERIAL	RESULTADO	REFERÊNCIA
	Líquor	Aumentado*	10
	Líquor	Aumentado*	20
	Sangue	Sem diferença*	
		Sem associação com idade de início ou duração da doença	
MCP-1	Líquor	Aumentado*	21
	Sangue	Aumentado*	
	Líquor	Sem diferença*	22
	Sangue	Sem diferença*	
	Líquor	Preditor de maior sobrevida	23
	Líquor	Aumentado**	24
		Correlação negativa com escala funcional	
	Líquor	Aumentado**	25
	Sangue	Aumentado**	
RANTES			

		Sem correlação com duração da doença	
	Sangue		23
		Preditor de menor sobrevida	
	Líquor	Preditor de menor sobrevida	23
IL-8	Líquor	Correlação negativa com escala funcional	26
	Líquor	Aumentado**	24
	Sangue	Aumentado*	27
IP-10	Sangue	Correlação positiva com a duração da doença	23
	Líquor	Aumentado**	24
		Correlação positiva com a duração da doença	
	Líquor	Aumentado*	26
IL-2	Sangue	Reduzido*	27
	Sangue	Preditor de baixa sobrevida	28
	Líquor	Sem diferença**	24
IL-4	Sangue	Sem diferença*	27
	Sangue	Aumentado*	28
	Líquor	Aumentado*	26
IL-6	Sangue	Aumentado*	27
	Sangue	Aumentado*	28
		Aumentado no estudo longitudinal	
IL-10	Sangue	Preditor de maior sobrevida	23
	Sangue	Sem diferença*	27
IL-17	Líquor	Aumentado*	26
	Líquor	Aumentado**	24
	Sangue	Aumentado*	29
		Correlação positiva com a duração da doença	
TNF	Líquor	Aumentado**	24
	Sangue	Sem diferença*	27
	Sangue	Aumentado*	28
sTNFR	Sangue	Aumentado*	30

Sem correlação com duração ou gravidade da doença			
IFN- γ	Sangue	Aumentado*	29
	Correlação positiva com a duração da doença		
	Líquor	Aumentado**	24
	Sangue	Reduzido*	28

*Na comparação entre pacientes com ELA e controles ** Na comparação entre pacientes com ELA e controles com outras doenças neurológicas não-inflamatórias (DNNI)

MEDIADORES INFLAMATÓRIOS COMO BIOMARCADORES NA ELA

No contexto da ELA, a definição de um biomarcador diagnóstico e/ou prognóstico permitiria um avanço nos ensaios clínicos, bem como na condução e planejamento de cada caso. Diversos biomarcadores no líquido, sangue, urina e saliva já foram ou estão sendo testados. Dentre eles podemos citar aminoácidos, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, metabólitos e neurofilamentos^{19,23}.

Os neurofilamentos são filamentos intermediários que compõem a maior parte do citoesqueleto neuronal e são divididos em relação ao seu peso molecular em cadeia leve, intermediária e pesada³². Uma revisão sistemática seguida por meta-análise concluiu que os neurofilamentos de cadeia leve e pesada no líquido, apesar de não serem específicos da doença, são potenciais biomarcadores de progressão da ELA, visto que se correlacionaram negativamente com a duração da doença³². Em relação aos demais possíveis biomarcadores da ELA, considera-se, atualmente, que os neurofilamentos estão em estágio mais avançado de estudos, com sensibilidade variando de 77-97,3% e especificidade entre 71-95%, podendo ser dosados no líquido ou no sangue¹⁹.

As citocinas e quimiocinas, já descritas anteriormente, também são consideradas potenciais biomarcadores na ELA. Entretanto, os diversos estudos nessa área não mostraram resultados concordantes, sugerindo que a inflamação na ELA possa ser regulada de forma independente por outros fatores ainda não totalmente compreendidos, como comorbidades clínicas, nível de atividade motora, uso de medicamentos e drogas¹⁹.

A excitotoxicidade mediada pelo glutamato é considerada um dos mecanismos fisiopatológicos da ELA. O riluzol, que é uma medicação antiglutamatérgica, foi liberada para o uso em pacientes em 1995 após estudo que demonstrou aumento da sobrevivência em relação ao placebo³³. Por esse motivo, a concentração sérica e líquórica de glutamato também foi avaliada nos pacientes. No líquido, alguns estudos demonstraram aumento, porém, outros, não evidenciaram diferença significativa ao comparar pacientes com ELA e controles¹⁹. Resultados controversos também foram encontrados ao avaliar a concentração de glutamato no sangue em resposta ao tratamento de 6 meses com riluzol¹⁹.

Dos estudos envolvendo análise de metabólitos na urina, podemos destacar o aumento do nível de receptor de neurotrofina p75 ao comparar pacientes com ELA e controles e sua correlação com o declínio na escala funcional³⁴. Achados semelhantes foram encontrados ao avaliar os níveis de 8-hydroxil-2'-deoxiguanosina, um marcador de dano do DNA secundário ao estresse oxidativo¹⁹. Ambos os metabólitos são potenciais biomarcadores de prognóstico na ELA, com a vantagem de serem dosados na urina.

Existem poucos estudos envolvendo análise de metabólitos na saliva. Dentre eles podemos citar a análise do nível de cortisol 30 minutos após acordar, que se mostrou

significativamente menor nos pacientes em relação aos controles. Essa redução apresentou correlação significativa com piora da funcionalidade e com a gravidade de sintomas depressivos³⁵.

Alguns biomarcadores em potencial já estão sendo utilizados em ensaios clínicos, como IL-6, IL-10, TNF, neurofilamentos, entre outros. Alguns são dosados sozinhos e outros em associação com o objetivo de aumentar a sensibilidade e/ou especificidade. Um desses exemplos é a análise líquórica da combinação de IL-10, IL-6, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), IL-2 e IL-15 que apresentou sensibilidade de 87,5% e especificidade de 91,2% para diferenciar pacientes com ELA de controles com outras doenças¹⁹.

Atualmente, os estudos longitudinais estão recebendo maior atenção com o objetivo de determinar se há mudança nos níveis dos biomarcadores ao longo da progressão da doença.

CONCLUSÃO

A ELA é uma doença neurodegenerativa incapacitante e incurável, que apresenta etiologia multifatorial. A inflamação está implicada na sua fisiopatologia, influenciando na taxa de progressão da doença. Os estudos em humanos são complexos e susceptíveis a variáveis de difícil exclusão. Apesar dessas dificuldades, a definição do papel da neuroinflamação na ELA é importante, pois pode permitir a descoberta de biomarcadores e de novos alvos terapêuticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Lancet*. 2011;377:942-55
2. Oliveira AS et al. Esclerose Lateral Amiotrófica: sua manifestação no Brasil. *Revista Neurociências*. 2006; 14(Supl 2)
3. Malaspina A, Puentes F¹, Amor S. Disease origin and progression in amyotrophic lateral sclerosis: an immunology perspective. *Int Immunol*. 2015;27(3):117-29.
4. Boillée S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, et al. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 2006; 312, 1389–1392
5. Henkel JS, Beers DR, Zhao W, Appel SH. Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting. *J NeuroimmunePharmacol*. 2009; 4:389–398
6. Hooten KG, Beers DR, Zhao W, Appel SH. Protective and Toxic Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2015;12:364–375
7. Zhao W, Beers DR, Appel SH. Immune-mediated Mechanisms in the Pathoprogession of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013; 8(4): 888–899
8. Corcia P, Tauber C, Vercoullie J, Arlicot N, Prunier C, Praline J et al. Molecular imaging of microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*. 2012; 7(12):e52941
9. González H, Pacheco R. T-cell-mediated regulation of neuroinflammation involved in neurodegenerative diseases. *Journal of Neuroinflammation*. 2014;11:201
10. Henkel JS, Enghelhardt JI, Siklos L, Simpson EP, Kim SH, Pan T, et al. Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann Neurol*. 2004;55:221–35
11. De Souza AWS, Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Cruvinel WM, Andrade LEC, et al. Sistema Imunitário – Parte III. O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os polos de tolerância e autoimunidade. *Rev Bras Reumatol* 2010;50(6):665-94
12. Rentzos M, Evangelopoulos E, Sereti E, Zouvelou V, Marmara S, Alexakis T, Evdokimidis I. Alterations of T cell subsets in amyotrophic lateral sclerosis: a systemic immune activation? *Acta Neurol Scand*: 2012; 125: 260–264.
13. Henkel JS, Beers DR, Wen S, Rivera AL, Toennis KM, Appel JE, Zhao W, Moore DH, Powell SZ, Appel SH: Regulatory T-lymphocytes mediate amyotrophic lateral sclerosis progression and survival. *EMBO Mol Med*. 2013, 5:64–79.

14. Winkler EA, Sengillo JD, Sullivan JS, Henkel JS, Appel SH, Zlokovic BV. Blood-spinal cord barrier breakdown and pericyte reductions in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* 2013;125(1):111-20
15. Leonardi A, Abbruzzese G, Arata L, Cocito L, Vische M. Cerebrospinal fluid (CSF) findings in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol.* 1984; 231: 75–78.
16. Annunziata P, Volpi N. High levels of C3c in the cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients. *Acta Neurol Scand.* 1985; 72: 61–64.
17. Apostolski S, Nolic J, Bugarski-Prokopljevic C, Miletic V, Pavlovic S, et al. Serum and CSF immunological findings in ALS. *Acta Neurol Scand.* 1991; 83:96–98.
18. Garbuzova-Davis S, Saporta S, Haller E, Kolomey I, Bennett SP, Potter H, et al. Evidence of Compromised Blood-Spinal Cord Barrier in Early and Late Symptomatic SOD1 Mice Modeling ALS. Westermarck P, ed. *PLoS ONE.* 2007;2(11):e1205
19. Vu LT, Bowser R. Fluid-Based Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics.* 2016 Dec 8. [Epub ahead of print]
20. Wilms H, Sievers J, Dengler R, Buffler J, Deuschl G, Lucius R. Intrathecal synthesis of monocyte chemo-attractant protein-1 (MCP-1) in amyotrophic lateral sclerosis: further evidence for microglial activation in neurodegeneration. *Journal of Neuroimmunol.* 2003;144:139–42
21. Baron P, Bussini S, Cardin V, Corbo M, Conti G, Galimberti D, et al. Production of monocyte chemoattractant protein-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 2005;32: 541–544.
22. Simpson EP, Henry YK, Henkel JS, Smith RG, Appel SH. Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden. *Neurology.* 2004 May 25;62(10):1758-65
23. Su XW, BS; Simmons Z, Mitchell RM, Kong L, Stephens HE, Connor JR. Biomarker-Based Predictive Models for Prognosis in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol.* 2013;70(12):1505-1511.
24. Tateishi T, Yamasaki R, Tanaka M, Matsushita T, Kikuchi H, Isobe N, et al. CSF chemokine alterations related to the clinical course of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroimmunology.* 2010;222:76–81
25. Rentzos M, Nikolaou C, Rombos A, Boufidou F, Zoga M, Dimitrakopoulos A, et al. RANTES levels are elevated in serum and cerebrospinal fluid in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis.* 2007; 8:283–287
26. Mitchell RM, Freeman WM, Randazzo WT, Stephens HE, Beard JL, Simmons Z, et al. A CSF biomarker panel for identification of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology.* 2009;72:14–19
27. Ehrhart J, Smith AJ, Kuzmin-Nichols N, Zesiewicz TA, Jahan I, Shytle RD, et al. Humoral factors in ALS patients during disease progression. *Journal of Neuroinflammation.* 2015;12:127
28. Lu CH, Allen K, Oei F, Leoni E, Kuhle J, Tree T, et al. Systemic inflammatory response and neuromuscular involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2016;3:e244
29. Babu GN, Kumar A, Chandra R, Puri SK, Kalita J, Misra UK. Elevated inflammatory markers in a group of amyotrophic lateral sclerosis patients from northern India. *Neurochem Res.* 2008;33(6):1145-9
30. Poloni M, Facchetti D, Mai R, Micheli A, Agnoletti L, Francolini G, et al. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha and its soluble receptors are increased in the blood of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett.* 2000;287(3):211-4
31. Mitsumoto H, Brooks BR, Silani V. Clinical trials in amyotrophic lateral sclerosis: why so many negative trials and how can trials be improved? *Lancet Neurol.* 2014; 13:1127–38
32. Xu Z, Henderson RD, David M, McCombe PA. Neurofilaments as Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016;12;11(10):e0164625
33. Hugon J. Riluzole and ALS therapy. *Wien Med Wochenschr.* 1996;146(9-10):185-7
34. Shephard SR, Chataway T, Schultz DW, Rush RA, Rogers ML. The extracellular domain of neurotrophin receptor p75 as a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *PLOS ONE.* 2014;9(1): e87398
35. Roozendaal B, Kim S, Wolf OT, Kim MS, Sung K-K, Lee S. The cortisol awakening response in amyotrophic lateral sclerosis is blunted and correlates with clinical status and depressive mood. *Psychoneuroendocrinology.* 2012;37(1):20-26

2.4 Manifestações clínicas e critérios diagnósticos

A ELA caracteriza-se por quadro progressivo de degeneração do neurônio motor e, conseqüentemente, paresia gradual da musculatura estriada esquelética com incapacidade funcional secundária e sobrevida média de 3-5 anos (EISEN *et al.*, 1993; KIERNAN *et al.*, 2011). A fraqueza muscular ocorre de forma insidiosa, focal e assimétrica. O paciente pode ser classificado conforme a forma de apresentação inicial: apendicular (70% dos casos), bulbar (25%), generalizada (1-9%) e a forma torácica, que corresponde a 1-5% dos casos (KIERNAN *et al.*, 2011; SHOESMITH *et al.*, 2007; MITSUMOTO *et al.*, 1998). As manifestações apendiculares levam a paresia gradual da musculatura dos membros e incapacidade funcional progressiva. As manifestações bulbares causam disfagia, disartria e dispneia, aumentando o risco de aspiração, desnutrição e insuficiência respiratória, que geralmente é a causa da morte desses pacientes. Outros sinais e sintomas que podem estar associados são hipermetabolismo, perda ponderal, câimbras e fasciculações, labilidade emocional, apatia, depressão, ansiedade e déficit cognitivo (MILLER *et al.*, 2009).

O diagnóstico de ELA pode ser feito através dos critérios revisados do El Escorial (BROOKS *et al.*, 2000), também conhecidos como critérios de Airlie House (Quadro 4) ou pelos Critérios de Awaji, publicados em 2008 (Quadro 5) (DE CARVALHO *et al.*, 2008). Revisão sistemática e meta-análise de 8 estudos publicada em 2012 evidenciou sensibilidade de 81% e 62% para Awaji e El Escorial respectivamente, com especificidade de ambos em torno de 98% (COSTA *et al.*, 2012). O corpo é dividido em quatro segmentos (bulbar, cervical, torácico e lombossacro) e sinais de acometimento dos neurônios motores superiores e inferiores são investigados em cada segmento. Os exames complementares (laboratoriais, eletrofisiológicos e de imagem) são importantes para afastar diagnósticos diferenciais e, no caso da eletroneuromiografia, auxilia também na confirmação do acometimento do neurônio motor inferior.

Quadro 4**Critérios de Airlie House – EI Escorial revisado 1998 (BROOKS *et al.*, 2000)**

<i>ELA clinicamente definitiva</i>	<i>Evidência clínica isolada de acometimento do NMS e NMI em três regiões.</i>
<i>ELA clinicamente provável</i>	<i>Evidência clínica isolada de acometimento do NMS e NMI em pelo menos duas regiões com algum sinal do NMS rostral (acima) ao do NMI</i>
<i>ELA clinicamente provável – com suporte laboratorial</i>	<i>Evidência clínica de disfunção do NMS e NMI em apenas uma região, ou acometimento isolado do NMS numa região com acometimento do NMI definido por critérios de eletromiografia em pelo menos dois membros, juntamente com a aplicação apropriada de neuroimagem e protocolos laboratoriais clínicos que excluam outras causas.</i>
<i>ELA possível</i>	<i>Evidência clínica de disfunção do NMS e NMI em apenas uma região, ou acometimento do NMS isolado em duas ou mais regiões; ou acometimento do NMI rostral (acima) ao do NMS e o diagnóstico de ELA clinicamente provável com suporte laboratorial não possa ser provado.</i>
<i>ELA suspeita</i>	<i>Evidência clínica isolada de acometimento do NMS ou do NMI em 1 ou mais regiões</i>

Divide-se o corpo em 4 regiões: cranial (bulbar), cervical, torácica e lombossacra.

NMS: neurônio motor superior; NMI: neurônio motor inferior

Quadro 5

Critérios de Awaji 2008

Princípios: O diagnóstico de ELA exige: **(A) A presença de:** (1) evidência de degeneração do neurônio motor inferior (NMI) pelo exame clínico, eletrofisiológico ou neuropatológico; (2) evidência de degeneração do neurônio motor superior (NMS) pelo exame clínico e; (3) disseminação progressiva dos sinais e/ou sintomas de uma região para outras, determinado pela história, exame físico ou eletrofisiológico. **(B) Ausência de:** (1) evidência eletrofisiológica ou patológica de outras doenças que poderiam explicar os sinais de degeneração do NMI e / ou NMS, e (2) neuroimagem sugestiva de outras doenças que poderiam explicar os sinais clínicos e eletrofisiológicos observados.

<i>ELA definida</i>	<i>Evidência clínica ou eletrofisiológica de sinais de degeneração de NMI e NMS na região bulbar e em pelo menos duas regiões da medula espinhal (cervical, torácica ou lombossacra) ou a presença de sinais de NMI e NMS em três regiões da medula espinhal</i>
<i>ELA provável</i>	<i>Evidência clínica ou eletrofisiológica de degeneração de NMI e NMS em pelo menos duas regiões com algum sinal de NMS rostral (acima) aos sinais de NMI</i>
<i>ELA possível</i>	<i>Evidência clínica ou eletrofisiológica de degeneração de NMI e NMS em apenas uma região, ou sinais de NMS isolados em duas ou mais regiões, ou sinal de NMI rostral (acima) aos sinais de NMS</i>

2.5 Cognição na ELA

Contrariando a ideia de que a ELA seria uma doença exclusiva do neurônio motor, estudo publicado em 2005 revelou que cerca de 50% dos pacientes com ELA esporádica tinham algum tipo de alteração cognitiva (essencialmente disexecutiva) e que 15% preenchiam critérios para demência frontotemporal (DFT) (RINGHOLZ *et al.*, 2005). Meta-análise publicada em 2010 analisou dezesseis artigos e concluiu que, na ELA, os déficits cognitivos parecem abranger diversos domínios, principalmente funções executivas, mas também linguagem e memória. Entretanto, é ressaltado que os dados devem ser analisados com cautela devido a sua limitação, principalmente, em relação à interferência da incapacidade funcional nos testes cognitivos (RAAPHORST *et al.*, 2010). De fato, os déficits motores e a disartrofonía representam desafios na avaliação cognitiva de pacientes com ELA. A adaptação de instrumentos neuropsicológicos é essencial na avaliação dos pacientes. A versão reduzida da Bateria Cognitiva de Addenbrooke parece ser um instrumento bastante útil e adequado na avaliação desses pacientes (HSIEH *et al.*, 2016).

A alteração no teste de fluência verbal, que parece ser mediada por disfunção do córtex pré-frontal dorsolateral, foi considerada como um sensível marcador de déficit cognitivo na ELA (GOLDSTEIN *et al.*, 2013). Alguns estudos desenvolveram novos parâmetros para a realização do teste, na tentativa de reduzir o viés causado pela disartrofonía (ABRAHAMS *et al.*, 2000). A alteração da fluência verbal também foi avaliada por neuroimagem (ressonância magnética funcional e tomografia computadorizada por emissão de pósitrons), confirmando o envolvimento do córtex pré-frontal dorsolateral e também do giro do cíngulo anterior (GOLDSTEIN *et al.*, 2013). Além das funções cognitivas clássicas, mais recentemente foram descritos déficits de cognição social em pacientes com ELA, como em trabalho do nosso grupo, apresentado em 2015 no Meeting ALS-MND, realizado em Orlando, EUA (DE SOUZA *et al.*, 2015).

2.6 Ensaios clínicos na ELA

Até o momento, mais de 50 ensaios clínicos controlados e randomizados já foram realizados, mas somente o Riluzol e o Edaravone mostraram eficácia comprovada. O estudo que possibilitou a liberação do Riluzol para pacientes foi publicado em 1994. Foi um estudo prospectivo, duplo-cego e placebo controlado envolvendo 155 pacientes com ELA. Após 12 meses, foi observada maior sobrevida nos pacientes que fizeram uso do Riluzol em comparação ao grupo placebo (BENSIMON *et al.*, 1994). O ensaio clínico duplo-cego e placebo controlado que avaliou a eficácia do edaravone em reduzir o declínio funcional dos pacientes não mostrou resultados significativos (ABE *et al.*, 2014). Entretanto uma análise *post-hoc* deste ensaio verificou que um subgrupo de pacientes se beneficiou da medicação, com uma redução significativa do declínio funcional na comparação com o grupo que recebeu placebo (ABE *et al.*, 2017). Entretanto, as características clínicas deste subgrupo são muito restritas [tempo de doença ≤ 2 anos, capacidade vital forçada $\geq 80\%$, classificação 1 ou 2 na escala funcional japonesa (*Japan ALS Severity Classification*), dentre outros], e são encontradas em somente cerca de 7% do total de pacientes com ELA (HARDIMAN *et al.*, 2017).

Diversas razões são apontadas para explicar a ineficiência das demais medicações já testadas (MITSUMOTO *et al.*, 2014). A fundamentação lógica dos estudos é um importante fator que deve ser levado em consideração, visto que diversos ensaios foram baseados em estudos pré-clínicos feitos em modelos animais no estágio pré-sintomático, o que não se aplica em humanos; e/ou em modelos animais com a mutação *SOD1* que, por sua vez, corresponde a uma pequena parcela dos pacientes com ELA (20% dos casos de ELA_f e 5% dos casos de ELA_e). A metodologia dos ensaios também é alvo de críticas, visto que os critérios de inclusão dos pacientes por vezes são muito amplos, incluindo pacientes em estágios avançados da doença e/ou com fenótipos e formas iniciais distintas. Considerando a heterogeneidade genética, clínica e evolutiva da ELA, seria mais prudente estratificar os pacientes em relação a essas características e não avaliar todos num mesmo grupo. Outra questão importante é a duração do estudo que deve ser idealmente em torno de 18 meses para melhor definição da eficácia da droga ao longo da evolução da doença. Propriedades farmacológicas da medicação em teste (via de administração, acesso ao sistema nervoso

central, interação farmacológica, entre outros) também influenciam no resultado final e devem ser levadas em consideração. Por fim, a ausência de um biomarcador dificulta a avaliação da eficiência das drogas testadas, por isso a necessidade urgente de definição de um biomarcador confiável para os futuros ensaios clínicos (MITSUMOTO *et al.*, 2014).

3 HIPÓTESES

As principais hipóteses do presente estudo são:

- Considerando que a neuroinflamação pode influenciar no curso da ELA (MALASPINA *et al.*, 2015; BOILLEE *et al.*, 2006; HENKEL *et al.*, 2009), a principal hipótese do nosso trabalho é a de que algum biomarcador inflamatório seja preditor da taxa de progressão da doença/prognóstico.
- Outra hipótese é a de que haverá aumento significativo dos níveis de biomarcadores nos pacientes ao compará-los com controles, considerando as evidências de inflamação e ativação do sistema imune nos pacientes com ELA (MALASPINA *et al.*, 2015).
- Considerando a hipótese acima como verdadeira, é possível que alguns biomarcadores sejam também preditores do diagnóstico de ELA.

4 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Investigar possíveis associações entre as variáveis clínicas e laboratoriais (marcadores inflamatórios e fatores neurotróficos) em pacientes com diagnóstico de ELA esporádica avaliados transversal e longitudinalmente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a presença de sintomas de ansiedade e depressão nos pacientes e se há associação destes com os parâmetros clínicos.
- Investigar se há associação entre a pontuação na fluência verbal com parâmetros clínicos e níveis dos biomarcadores inflamatórios.
- Investigar se há diferenças nos níveis de biomarcadores inflamatórios entre pacientes e controles.
- Investigar se há diferenças nos níveis de biomarcadores inflamatórios entre os pacientes em dois momentos.
- Investigar se há algum preditor clínico e/ou laboratorial (biomarcador inflamatório) do diagnóstico de ELA.
- Investigar se há algum preditor clínico e/ou laboratorial (biomarcador inflamatório) da taxa de progressão da ELA.

5 MATERIAL E MÉTODOS

No estudo transversal foi avaliada uma série consecutiva de pacientes diagnosticados com ELA esporádica provável ou definida, conforme os critérios de Awaji, que estão em acompanhamento em dois centros de referência de Belo Horizonte. Para o estudo longitudinal, um subgrupo destes pacientes foi reavaliado num intervalo entre 6-12 meses.

O grupo controle foi composto por indivíduos saudáveis da comunidade pareados aos pacientes em relação à idade e gênero. Os critérios de exclusão dos controles foram: menores de 18 anos, presença de sintomas significativos de ansiedade e/ou depressão, presença de doenças crônicas inflamatórias, neoplasias, infecções nos últimos 3 meses; uso de antibióticos e anti-inflamatórios nos últimos 3 meses.

Os dados dos voluntários foram registrados em formulários em que constam suas iniciais, data de nascimento e um número de código, utilizados apenas para o estudo proposto, sendo mantido o anonimato dos participantes. Os resultados foram divulgados em eventos nacionais e internacionais, assim como publicações em revistas indexadas

Os centros de referência onde foram coletados os dados são: Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC/UFMG) e Hospital Júlia Kubitscheck (HJK/FHEMIG).

O HC/UFMG é um hospital terciário federal que presta serviços na área de neurologia. O Ambulatório de Neuromuscular do HC funciona como centro de referência em diagnóstico e acompanhamento neurológico dos pacientes com ELA.

O HJK é um hospital terciário da rede estadual (FHEMIG) que presta serviços na área da pneumologia. O Ambulatório de Neuromuscular do HJK é considerado centro de referência para acompanhamento da função pulmonar e suporte ventilatório e conta com uma equipe multidisciplinar formada por pneumologista, fisioterapeuta, psicóloga, fonoaudióloga e nutricionista.

O atendimento realizado nesses hospitais é gratuito e faz parte do Sistema Único de Saúde (SUS). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa

do HC/UFMG e do HJK/FHEMIG (Anexo 1). A coleta de dados ocorreu entre maio/2013 e abril/2016.

Critérios de inclusão dos pacientes

- Diagnóstico de ELA esporádica provável ou definida conforme os critérios de Awaji;
- Concordar em participar e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – Ver Apêndice.

Critérios de exclusão dos pacientes

- Menores de 18 anos.
- Presença de doenças inflamatórias crônicas ou agudas

Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão/exclusão foram recrutados durante o atendimento ambulatorial de rotina. Os que aceitaram participar assinaram o TCLE em duas vias, sendo uma do pesquisador e a outra entregue ao voluntário.

Análise clínica

O protocolo clínico (Anexo 2) consiste em:

1) Dados para caracterização clínica da amostra: data de nascimento, sexo, escolaridade, idade ao início dos sintomas, sintomas iniciais, comorbidades, uso de medicamentos.

2) Escala funcional: versão traduzida e validada para o português da *ALS Functional Rating Scale Revised* (ALSFRRS-R) (GUEDES *et al.*, 2010). Essa escala é composta por 12 itens (fala, salivação, deglutição, escrita, manipulação de alimentos, vestuário e higiene, virar na cama e ajustar a roupa de cama, andar, subir escadas, dispnéia, ortopnéia, insuficiência respiratória). Cada item tem 5 opções de resposta numeradas de 0 a 4. Os escores variam de 0 (incapacidade completa) a 48 (normal).

3) Avaliação da presença de sintomas depressivos e ansiosos: Escala Hospitalar de Ansiedade e Depressão (HAD). Essa escala é composta por 14 itens, divididos igualmente entre sintomas ansiosos e depressivos. Cada item tem quatro opções de resposta, numeradas de 0 a 3. Somam-se os pontos para

obter o escore em sintomas de ansiedade e outro escore para os sintomas depressivos. O diagnóstico de depressão provável foi atribuído aos pacientes que obtiveram escore ≥ 9 em sintomas relacionados à depressão. O mesmo critério foi utilizado para o diagnóstico de ansiedade provável (BOTEGA *et al.*, 1995).

4) Rastreamento de déficit cognitivo:

- Teste de Fluência verbal com a letra F: pede-se ao paciente para dizer todas as palavras que começam com a letra F em um minuto, exceto nome de pessoas ou de locais. Não são computadas palavras repetidas. A pontuação de corte varia conforme a escolaridade, sendo considerado normal ≥ 9 palavras em um minuto se escolaridade até 7 anos de estudo e ≥ 13 palavras em um minuto se escolaridade ≥ 8 anos de estudo (BRUCKI *et al.*, 1997).

- Mini Exame do Estado Mental (MEEM): avalia diversos domínios cognitivos, com pontuação variando de 0 a 30 (BRUCKI *et al.*, 2003). O ponto de corte da normalidade é definido conforme a escolaridade do indivíduo, sendo: analfabetos (20 pontos), 1-4 anos de estudo (25 pontos), 5-8 anos de estudo (26,5 pontos), 9-11 anos de estudo (28 pontos) e >11 anos de estudo (29 pontos) (BRUCKI *et al.*, 2003).

- Escala Cognitiva de Montreal (*Montreal Cognitive Assessment – MoCA*): avalia diversos domínios cognitivos, com pontuação variando de 0 a 30, sendo indicada para pacientes com escolaridade mínima de 4 anos (MARTINELLI *et al.*, 2014; MEMÓRIA *et al.*, 2013). A pontuação de corte da MoCA é de 26 pontos (<www.mocatest.org> Acesso em: 11/09/2017). Entretanto, estudo que comparou controles com pacientes com comprometimento cognitivo leve, ambos com escolaridade mínima de 4 anos, concluiu que o ponto de corte que melhor distinguia os grupos era 25 pontos (MARTINELLI *et al.*, 2014).

Análise Laboratorial

Dos controles e pacientes foram coletadas amostras de 10mL de sangue no período da manhã, utilizando tubos com heparina sódica. As amostras foram codificadas, centrifugadas a 3000 rpm, por 10 minutos, a 4°C, e em seguida, o plasma foi separado, armazenado em *ependorfs* estéreis e estocado em freezer a -70°C até o uso para o experimento. Todos os processos da análise molecular

foram realizados no Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica (LIIM) localizado na Faculdade de Medicina da UFMG.

As dosagens dos fatores neurotróficos (BDNF, GDNF, NGF, NT3 e NT4/5) foram realizadas pelo método ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), de acordo com as instruções do fabricante (Dou Set R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). A leitura da intensidade de marcação foi realizada em leitor de ELISA utilizando-se o comprimento de onda de 490 nM (SOFTmaxPro – versão 2.2.1). Os resultados foram expressos em pg/mL.

As dosagens de citocinas e quimiocinas foram realizadas pelo método de *Cytometric Bead Array* (CBA), conforme instruções do fabricante (*BD Bioscience, San Diego, CA, USA*). Utilizaram-se dois kits para quantificação de proteínas inflamatórias: *Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit*, que quantificou IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL-17 e o *Human Chemokine Kit* para quantificar IP-10, MCP-1, MIG, RANTES e IL-8.

Brevemente, as amostras de sobrenadante e plasma foram incubadas com as microesferas de captura recobertas por anticorpos específicos para as respectivas citocinas e quimiocinas, assim como as proteínas da curva padrão. Adicionou-se em seguida o reagente de cor (Ficoeritrina - PE) e as amostras foram incubadas por 3 horas. Após a incubação, as amostras foram lavadas (Wash buffer®) e centrifugadas (200 rpm, 5 minutos, temperatura ambiente). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado contendo as microesferas foi ressuspensionado com 300 μ L de Wash buffer. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton & Dickinson, San Jose, CA, USA). Os resultados foram analisados pelo software FCAP (BD Bioscience) e representados em pg/mL.

Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada pelo programa SPSS versão 22.

Após a realização de análises descritivas, a normalidade dos dados foi investigada com o teste de Kolmogorov-Smirnov.

Para as análises comparativas das variáveis contínuas, que seguiam distribuição normal, foi utilizado o Teste - T. Para as variáveis contínuas que não seguiam a distribuição normal foram utilizados os testes de Mann-Whitney e Wilcoxon. Para a comparação de variáveis categóricas foram utilizados o teste

Qui-quadrado e o teste exato de Fisher. Para a análise de correlação foi utilizado o teste de Spearman. Para a análise de variáveis de predição de diagnóstico foi realizado o teste de regressão logística na moldagem *backward stepwise* utilizando como variável dependente o grupo controle (sem doença) e o grupo transversal de pacientes (com a doença). Para a análise de variáveis preditivas da taxa de progressão da doença foi realizado a transformação logarítmica da taxa de progressão e, posteriormente, o teste de Kolmogorov-Smirnov para confirmar sua normalidade. Em seguida, foi utilizado o teste de Regressão Linear Múltipla na moldagem *stepwise*.

Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6 RESULTADOS

6.1 Artigo 2 (Ver Apêndice)

Prado LGR, Bicalho IC, Vidigal-Lopes M, Ferreira CJ, Mageste Barbosa LS, Gomez RS, et al. Amyotrophic lateral sclerosis in Brazil: Case series and review of the Brazilian literature. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2016;17(3-4):282-8.

6.2 Artigo 3 (Ver Apêndice)

Prado LGR, Bicalho ICS, Vidigal-Lopes M, Prado VGR, Gomez RS, De Souza LC, Antônio Lúcio Teixeira AL. Depression and anxiety in a case series of amyotrophic lateral sclerosis: frequency and association with clinical features. *Einstein.* 2017;15(1):58-60.

6.3 Manuscrito

Submetido na *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*

LONGITUDINAL ASSESSMENT OF CLINICAL AND INFLAMMATORY MARKERS IN PATIENTS WITH AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

Laura de Godoy Rousseff Prado^{1,2,3}, Natália Pessoa Rocha^{3,4}, Leonardo Cruz de Souza^{1,2,3}, Isabella Carolina Santos Bicalho^{1,2}, Rodrigo Santiago Gomez², Mauro Vidigal-Lopes⁵, Nayara Felicidade Tomaz Braz^{1,3}, Érica Leandro Marciano Vieira³, Antônio Lúcio Teixeira^{1,2,3,4}

1 Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais (MG), Brazil;

2 Ambulatório de Doenças Neuromusculares, Departamento de Neurologia, Hospital das Clínicas/UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil;

3 Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Faculdade de Medicina da UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil;

4 Neuropsychiatry Program, Department of Psychiatry & Behavioral Sciences, University of Texas Health Science Center at Houston, Houston, TX, USA;

5 Ambulatório de Doenças Neuromusculares, Departamento de Pneumologia, Hospital Júlia Kubitschek, Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG), Belo Horizonte, MG, Brazil.

Correspondence: Laura de Godoy Rousseff Prado; Avenida Professor Alfredo Balena, nº190 / sl 281. CEP: 30130-100, Santa Efigênia, Belo Horizonte, MG, Brasil; E-mail: laura.grp@hotmail.com

ABSTRACT

Objective: To evaluate potential associations between clinical features and inflammatory markers in patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS).

Method: A consecutive series of patients with sporadic ALS underwent comprehensive clinical assessment and blood sampling. A subset of these patients underwent a new assessment after 6-12 months. For comparison, a control group of 62 subjects composed by age and sex-matched healthy subjects were also enrolled. Plasma levels of chemokines and cytokines were measured by cytometric bead array.

Results: Among 68 enrolled patients, 38 cases (56%) were male. The mean age at onset of symptoms was 55 years (± 12.7). The average of disease duration at assessment was 3 years (± 2.7). When comparing patients and controls, a significant increase of IL-6, IL-10 and IL-17 was found in patients. After multivariate analysis, IL-10 and TNF were different between groups. When evaluating the subset of patients assessed longitudinally, there was a significant decrease in CCL5 levels. Older age at ALS onset was the only factor associated with a faster rate of disease progression.

Conclusion: IL-10 and TNF levels could discriminate between ALS and controls, and may be regarded as potential biomarkers of the disease. None of the inflammatory markers influenced or predicted ALS course.

Keywords: Amyotrophic Lateral Sclerosis; Inflammation; Biomarkers; Cytokines; Chemokines.

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is characterized by upper and lower motor neuron degeneration, with a mean survival of 3-5 years (1,2). The main symptoms include progressive paresis of striated skeletal muscles, but non-motor symptoms such as pseudobulbar affect, apathy, cognitive impairment, depression and anxiety can also occur (3,4). The incidence and prevalence rates range from 0.3-3.6 cases/100,000 persons/year and 1.0-11.3 cases/100,000 persons, respectively (5).

ALS may be sporadic (90-95% of the cases) or familial (5-10% of the cases). The etiology of sporadic ALS is multifactorial and has not been fully elucidated. It seems to involve multiple mechanisms including glutamate-mediated excitotoxicity, neuroinflammation, derangement of neurofilaments, mitochondrial dysfunction, impairment of the production and/or release of neurotrophic factors, among others (6,7). Neuroinflammation is characterized by microglial activation, astrogliosis and infiltration of peripheral immune cells such as monocytes and T-cells in the central nervous system (CNS) (8). Signs of inflammation and activation of the immune system have already been reported in blood, cerebrospinal fluid (CSF) and post-mortem brain samples of ALS patients (9). A positron emission tomography (PET) study using (18)F-DPA-714 also found evidence of increased microglia activation in primary and supplementary motor areas and temporal cortex of patients with ALS (10). In ALS, neuroinflammation seems to be a secondary event that contributes to neurodegeneration and, as consequence, to disease progression (9).

Clinical markers such as older age, bulbar onset and a fast rate of disease progression were associated with a poor outcome (11,12). Using both hypothesis and non-hypothesis driven approaches, a range of studies has searched for biomarkers of diagnosis, prognosis or related to pathophysiological pathways in ALS (13). Regarding inflammation-related biomarkers, higher plasma levels of ferritin and interleukin (IL)-2 have been associated with shorter survival (14), while increased serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) predicted longer survival in ALS patients (15). In addition, higher plasma levels of the chemokine CCL5/RANTES (an acronym for Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted) have been associated with shorter

disease duration, while higher plasma levels of IL-10 with longer disease duration in ALS patients (16). Regarding the potential of inflammatory molecules as diagnostic biomarkers, a CSF panel composed by IL-6, IL-10, granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), IL-2 and IL-15 showed an accuracy of almost 90% in distinguishing patients with ALS from neurologically diseased controls (17). Noteworthy, a recent meta-analysis confirmed that neurofilaments levels are significantly elevated in the CSF of ALS patients in comparison with controls, and are negatively correlated with disease duration (18).

Despite the recent advances in the area of biomarkers for ALS, so far, no biomarker has been routinely used in the clinical practice. Besides providing pathophysiological insights, biomarkers may play a pivotal role in the diagnostic process and in the monitoring of disease progression. The conclusions of the aforementioned studies are limited by their cross-sectional design. Accordingly, longitudinal studies are needed to better clarify the role of inflammatory/immune mediators as ALS biomarkers, especially as makers of ALS progression. In this context, the current study was designed to investigate the potential of inflammation-related molecules as biomarkers of diagnosis and disease progression in ALS using both cross-sectional and longitudinal designs. Our findings might be relevant to the understanding of ALS pathophysiology and to clarify which biomarkers have the potential to be incorporated in future trials and/or clinical practice.

METHODS

Subjects and clinical evaluation

First, we performed a cross-sectional evaluation (baseline group) of 68 patients with probable or defined sporadic ALS diagnosed according to Awaji's criteria (19), and 62 age- and sex-matched healthy controls. A subset of ALS patients enrolled at the baseline was also reassessed (N=24) after 6-12 months (follow-up subgroup). First and second assessments of the follow-up subgroup were named as T1 and T2, respectively. Forty-four patients were not reassessed due to several reasons (9 refused, 2 did not have their blood collected due to

technical problems, 1 had active pneumonia at T2, 24 did not return to medical appointment due to bedridden or death, 8 were first assessed within 6 months of the end of data collection).

Patients with ALS were consecutively recruited from the ALS outpatient clinic, University Hospital [*Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)*, Belo Horizonte, Brazil] and Júlia Kubitschek Hospital, Belo Horizonte, Brazil. Exclusion criteria were: i) if they were under 18 years old; ii) they had chronic or active inflammatory process. Controls were recruited from the local community and were excluded if: i) they were under 18 years old; ii) they had significant symptoms of anxiety and depression; iii) they had cancer or any infectious or autoimmune diseases in activity in the previous three months; iv) they had used corticosteroids, anti-inflammatories or antibiotics in the three months prior to the study.

These groups (baseline, follow-up and controls) were compared regarding clinical features and inflammatory mediators. In order to evaluate whether patients participating in the longitudinal assessment were representative of our ALS sample, the characteristics of the baseline group were compared with the follow-up subgroup at T1. We also investigated predictors of diagnostic and of the rate of ALS progression.

The clinical protocol included questions about sociodemographic data, general clinical features, the ALS Functional Rating Scale Revised (ALSFRS-R) (20) and the Hospital Anxiety and Depression Scale (HAD) (21). A total score on HAD for depression above 8 indicated a probable depression case. The same criterion was applied for anxiety (22). The progression rate of the follow-up subgroup was calculated through the formula proposed by LU *et al.*, 2016 (14):

$$\Delta \text{ Score on ALSFRS-R (T2-T1)} / \text{Interval between clinical assessments (in months)}$$

According to the median of the progression rate, two subgroups of patients were defined (rapid progression and slow progression rate). These subgroups were compared regarding clinical features and inflammatory mediators.

All subjects provided written informed consent prior to the enrollment in the study. The Research Ethics Committees of both hospitals approved this study.

Biomarkers assessment

Ten milliliters of blood were drawn by venipuncture in vacuum tubes containing heparin (BD Vacuteiner) on the same day of the clinical assessment. Plasma was then obtained within 2h of the blood sampling. Samples were centrifuged at 1,700 *g* for 10 min, 4 °C. The plasma was collected and stored at -70 °C until assayed. The samples were thawed and cytokines and chemokines were measured as routinely performed in our laboratory.

Multiple cytokines [IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, tumor necrosis factor (TNF), interferon (IFN)- γ and IL-17] were simultaneously measured by flow cytometry using the Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokines Kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), following the manufacturer's instructions. The chemokines [CXCL10/induced protein 10 (IP-10), CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), CXCL9/monokine induced by interferon gamma (MIG) and CCL5/RANTES] were evaluated by flow cytometry using the Cytometric Bead Array (CBA) Human Chemokine Kit (BD Biosciences), following the manufacturer's instructions.

Acquisition was performed using a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences). The instrument was checked for sensitivity and overall performance with Cytometer Setup & Tracking beads (BD Biosciences) prior to data acquisition. Quantitative results were generated using FCAP Array v3.0 software (Soft Flow Inc., Pecs, Hungary).

Statistical Analysis

Comparisons between dichotomous variables were done using the chi-square test. All continuous variables were tested for Gaussian distribution using the Kolmogorov-Smirnov normality test. Comparisons between groups were performed with the T-Test for variables with a normal distribution and with the Mann-Whitney *U* Test for variables without a normal distribution. For the longitudinal analysis, groups were compared using the paired t-test or the

Wilcoxon test when variables were normally or non-normally distributed, respectively.

Multivariate analyses were conducted in order to evaluate: i) the effects of inflammatory biomarkers levels on the likelihood of ALS diagnosis; and ii) the potential of clinical and biological markers as predictors of disease progression. In the first case, a binary logistic regression was performed using the backward stepwise analysis. The presence or not of the disease (i.e., baseline groups: ALS vs. controls) was used as the dependent variable. The independent variables were age, sex and the levels of inflammatory mediators. The goodness of fit of the logistic regression model was assessed by a Receiver Operating Characteristic (ROC) curve. In the second case, a linear regression using the stepwise approach was performed. The logarithmic transformation of the rate of disease progression was set as the dependent variable and the independent variables included the levels of inflammatory mediators, symptoms of anxiety and depression and age at ALS onset.

All statistical tests were two-tailed and were performed using a significance level of $\alpha=0.05$. Statistical analyses were performed using SPSS software version 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

RESULTS

Among the 68 enrolled patients, 38 (56%) were male. The initial form was spinal in 79% of the cases and bulbar in 21% of the patients. Only 59 patients were able to complete the HAD scale. Probable depression and anxiety were found in 32% and 36% of the cases, respectively. Sociodemographic and clinical data of ALS patients and controls are summarized on Table 1.

Patients with ALS and controls did not differ regarding age and sex distribution (Table 1). When the levels of inflammatory mediators of these groups were compared, patients with ALS presented significantly higher plasma levels of IL-6, IL-10 and IL-17 than controls (Table 2). We did not find any significant difference between patients with spinal versus bulbar onset regarding the levels of inflammatory mediators.

A binary logistic regression was performed to ascertain the effects of age, sex and the inflammatory markers on the likelihood of ALS diagnosis. The final model included age, CCL2/MCP-1, TNF, IL-6, IL-8, IL-10 and IL-17. Older age and higher plasma levels of IL-10 and TNF were associated with increased risk of ALS diagnosis (Table 3). The logistic regression model can be considered fair since the predicted variability resulted in an area under the curve (AUC) of 0.776 in the ROC analysis (Figure 1).

The linear regression analysis showed that the age at onset was a significant predictor of the rate of disease progression [$p=0.006$, coefficient of determination (R^2) = 0.336], indicating that patients who developed the disease earlier had a lower rate of progression. Accordingly, a significant difference in age at onset was found when we compared patients presenting fast progression versus slow progression rate ($p=0.016$), i.e. fast progression patients were significantly older than slow progression patients. No other significant predictor was found in the linear regression analysis.

Twenty-four out of the 68 patients with ALS were submitted to a follow-up assessment within 6-12 months of the baseline visit. The median and range of ALSFRS-R score in the first (T1) and second (T2) assessments were 34 (8-43) and 30 (4-42), respectively. The median and range of interval between assessments were 6.8 months (5.6-11.5) and the progression rate between T1 and T2 were -0.16 points in ALSFRS-R/month (-1.74 to +0.48). The subgroup of ALS patients who was longitudinally followed did not differ from the whole sample regarding age at onset ($p=0.1$), disease duration ($p=0.13$) and years of study ($p=0.83$). As expected, follow-up subgroup had a better functional score than the patients who were not followed ($p=0.044$). Inflammatory parameters of T1 and T2 are summarized on Table 4. Patients with ALS presented a significant decrease in the plasma levels of CCL5/RANTES in the second assessment.

DISCUSSION

The current study investigated whether a set of clinical and inflammatory markers may provide diagnostic and prognostic information regarding ALS. This is one of the very first studies to longitudinally assess a comprehensive set of

peripheral levels of inflammatory markers in ALS (14,23), being the first to do this in a developing country and to include different chemokines.

Our results showed that patients with ALS presented higher plasma levels of IL-6, IL-10 and IL-17 than controls. Corroborating our findings, studies have described an increase in circulating levels of IL-6 (14,15,23), IL-10 (14,15) and IL-17 (15,24) in patients with ALS in comparison with controls. However, the literature is controversial since a range of studies has demonstrated increased, decreased and/or no significant difference between patients and controls regarding CCL2/MCP-1 (15,25,26), IL-2 (15,23), IL-4 (14,23), IL-10 (14,15,23), TNF (14,23,27) and IFN- γ levels (14,15,27). A recent systematic review and meta-analysis indicated that blood levels of TNF, TNF receptor 1, IL-6, IL-1 β , IL-8 and VEGF were significantly elevated in ALS patients compared with controls (28). The limited number of studies and the small sample sizes may have prevented the observation of significant difference for some cytokines such as IL-10 and IL-17 (28).

The assessment of peripheral inflammation in ALS is complex as circulating levels of inflammatory mediators are influenced by several factors other than the disease itself. Hypoxemia, for example, is a common feature in ALS and may lead to an increase in plasma levels of IL-6 (29). There is also evidence that skeletal muscle produces inflammatory mediators (30). The hypothesis of muscle production of inflammatory markers in ALS patients has already been raised since muscle denervation and hyperexcitability may induce an overexpression of inflammatory cytokines (14). Noteworthy, we did not find any significant difference in the levels of cytokines and chemokines when comparing the subgroups bulbar versus spinal onset, suggesting that the involvement of inflammation process is similar in both ALS phenotypes.

The complexity of assessing peripheral inflammation in neurological diseases also relies on other factors: I) inflammatory markers have a short half-life; II) they mainly have autocrine or paracrine activity; III) the possibility of binding to other molecules preventing their detection (24). Besides the heterogeneity of ALS patients, all these variables may explain, at least in part, the contradictory findings in studies regarding peripheral inflammatory markers in ALS.

It is also well-known that neuroinflammation is not a specific event of ALS, also occurring in other neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease (31,32,33). Increased levels of IL-6, TNF and IL-1 β have consistently been reported in Alzheimer's disease and Parkinson's disease patients compared with controls (34,35). Accordingly, an inflammation-based biomarker will presumably have a low specificity for ALS diagnosis.

Aiming at increasing sensitivity and specificity, models involving a panel of biomarkers, instead of individual ones, have found good accuracy in the differentiation of ALS patients and controls (14,17). Accordingly, our multivariate model showed that older age and higher plasma levels of IL-10 and TNF were predictors of ALS diagnosis. In future studies, the association of these variables with other potential biomarkers may increase the accuracy of ALS diagnosis.

We found that older age at onset was associated with fast disease progression rate, confirming other studies (11,12,36). In contrast with the concept that inflammation may influence ALS progression (9), the inflammatory markers that we evaluated were not significant predictors of disease progression. Previous studies have found that higher plasma levels of IL-2 predicts poor survival (14), and that higher plasma levels of CCL5/RANTES and IL-10 predicts shorter and longer total disease duration, respectively (16). As aforementioned, inflammation is a complex and dynamic process and other variables may have influenced the levels of the mediators. Moreover, the inflammatory process that influences ALS progression may be only assessed in the CNS (e.g. CSF), since inflammatory markers have a short half-life and have mainly autocrine or paracrine activity (24).

Our longitudinal analysis revealed a significant reduction in the plasma levels of CCL5/RANTES. Nevertheless, this chemokine was not a significant predictor of disease progression in our regression analysis. In a previous study, ALS patients had significantly higher serum and CSF concentrations of CCL5/RANTES than controls with other non-inflammatory neurological diseases ($p=0.02$ and $p=0.007$, respectively), but no association was found with disease duration (37). The role of CCL5/RANTES in ALS pathophysiology should be further explored in longitudinal studies assessing both peripheral blood e CSF samples.

Except for CCL5/RANTES, we did not find any difference in the inflammatory biomarkers when we compared patients' samples obtained from different time-points. While one previous longitudinal study described increase in IL-6 levels with the disease progression, other reported decrease in the levels of the same cytokine (14,23). A significant problem with ALS longitudinal studies is the adherence to the research protocols as patients with a faster progression rarely maintain a regular follow-up due to complications inherent to the disease.

Limitations of the study include relatively small sample size, significant losses on the follow-up, lack of genetic data and concomitant assessment of CSF inflammatory markers. Despite these shortcomings, this is one of the very few studies that assessed a comprehensive panel of inflammatory biomarkers longitudinally in ALS patients.

CONCLUSION

IL-10 and TNF may be considered for a future biomarker panel for ALS diagnosis. None of the inflammatory markers was associated with disease course. Older age of onset predicted a faster rate of disease progression.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by the Brazilian funding agencies, CNPq and Fapemig.

DECLARATION OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

01. Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Lancet*. 2011;377:942-55.
02. Prado Lde G, Bicalho IC, Vidigal-Lopes M, Ferreira CJ, Mageste Barbosa LS, Gomez RS, et al. Amyotrophic lateral sclerosis in Brazil: Case series and review of the Brazilian literature. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2016;17(3-4):282-8.
03. Miller RG, Jackson CE, Kasarskis EJ, England JD, Forshew D, Johnston W, et al. Practice Parameter Update: the care of the patient with amyotrophic lateral sclerosis: drug, nutritional and respiratory therapies (an evidence-based review): report of the quality standards subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2009;73:1218-26.
04. Prado LGR, Bicalho ICS, Vidigal-Lopes M, Prado VGR, Gomez RS, De Souza LC, Antônio Lúcio Teixeira AL. Depression and anxiety in a case series of amyotrophic lateral sclerosis: frequency and association with clinical features. *Einstein*. 2017;15(1):58-60.
05. Chiò A, Logroscino G, Traynor B, Collins J, Simeone J, Goldstein L, et al. Global Epidemiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review of the Published Literature. *Neuroepidemiology*. 2013;41:118–130.
06. Ekester E. Neurotrophic Factors and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurodegenerative Dis*. 2004;1:88–100.
07. Vucic S, Rothstein JD, Kiernan MC. Advances in treating amyotrophic lateral sclerosis: insights from pathophysiological studies. *Trends of Neurosciences*. 2014;37(8):433-442.
08. Zhao W, Beers DR, Appel SH. Immune-mediated Mechanisms in the Pathoprosession of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013; 8(4): 888–899.
09. Malaspina A, Puentes F¹, Amor S. Disease origin and progression in amyotrophic lateral sclerosis: an immunology perspective. *Int Immunol*. 2015;27(3):117-29.
10. Corcia P, Tauber C, Vercoullie J, Arlicot N, Prunier C, Praline J et al. Molecular imaging of microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*. 2012; 7(12):e52941.
11. Chiò A, Logroscino G, Hardiman O, Swingler R, Mitchell D, Beghi E et al. Prognostic factors in ALS: A critical review. *Amyotroph Lateral Scler*. 2009 ; 10(5-6): 310–323.
12. Gordon PH, Salachas F, Lacomblez L, Le FN, Pradat PF, Bruneteau G, Elbaz A, Meininger V. Predicting Survival of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis at Presentation: A 15-Year Experience. *Neurodegener Dis*. 2013;12(2):81-90.
13. Bakkar N, Boehringer A, Bowser R. Use of biomarkers in ALS drug development and clinical trials. *Brain Res*. 2015 May 14;1607:94-107
14. Lu CH, Allen K, Oei F, Leoni E, Kuhle J, Tree T, et al. Systemic inflammatory response and neuromuscular involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2016;3:e244.
15. Guo J, Yang X, Gao L, Zang D. Evaluating the levels of CSF and serum factors in ALS. *Brain and Behavior*. 2017;7:e00637.
16. Su XW, BS; Simmons Z, Mitchell RM, Kong L, Stephens HE, Connor JR. Biomarker-Based Predictive Models for Prognosis in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol*. 2013;70(12):1505-1511.
17. Mitchell RM, Freeman WM, Randazzo WT, Stephens HE, Beard JL, Simmons Z, et al. A CSF biomarker panel for identification of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2009;72:14–19.
18. Xu Z, Henderson RD, David M, McCombe PA. Neurofilaments as Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016;12;11(10):e0164625.
19. Costa J, Swash M, De Carvalho M. Awaji criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. *Arch Neurol*. 2012; 1410-1416.

20. Guedes K, Pereira C, Pavan K, Valerio BCO. Cross-cultural adaptation and validation of ALS Functional Rating Scale-Revised in Portuguese language. *Arq Neuropsiquiatr* 2010; 68(1):44-47.
21. Zigmond AS, Snaith RP. The hospital anxiety and depression scale. *Acta Psychiatr Scand*. 1983;67(6):361-70.
22. Botega NJ, Bio MR, Zomignani MA, Garcia Jr C, Pereira WA. [Mood disorders among medical in-patients: a validation study of the hospital anxiety and depression scale (HAD)]. *Rev Saude Publica*. 1995;29(5):355-63. Portuguese
23. Ehrhart J, Smith AJ, Kuzmin-Nichols N, Zesiewicz TA, Jahan I, Shytle RD, et al. Humoral factors in ALS patients during disease progression. *Journal of Neuroinflammation*. 2015;12:127.
24. Rentzos M, Rombos A, Nikolaou C, et al. Interleukin-17 and interleukin-23 are elevated in serum and cerebrospinal fluid of patients with ALS: a reflection of Th17 cells activation? *Acta Neurologica Scandinavica*. 2010;122(6):425–429.
25. Simpson EP, Henry YK, Henkel JS, Smith RG, Appel SH. Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden. *Neurology*. 2004 May 25;62(10):1758-65.
26. Baron P, Bussini S, Cardin V, Corbo M, Conti G, Galimberti D, et al. Production of monocyte chemoattractant protein-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*. 2005;32: 541–544.
27. Babu GN, Kumar A, Chandra R, Puri SK, Kalita J, Misra UK. Elevated inflammatory markers in a group of amyotrophic lateral sclerosis patients from northern India. *Neurochem Res*. 2008 Jun;33(6):1145-9.
28. Hu Y, Cao C, Qin XY, Yu Y, Yuan J, Zhao Y, et al. Increased peripheral blood inflammatory cytokine levels in amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis study. *Scientific Reports*, 2017 Aug 22;7(1):9094.
29. Moreau C, Devos D, Brunaud-Danel V, Defebvre L, Perez T, Destée A, et al. Elevated IL-6 and TNF-alpha levels in patients with ALS: inflammation or hypoxia? *Neurology*. 2005;65:1958–60
30. Peake JM, Della Gatta P, Suzuki K, Nieman DC. Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. *Exerc Immunol Rev* 2015;21:8–25
31. Hooten KG, Beers DR, Zhao W, Appel SH. Protective and Toxic Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2015;12(2):364-375.
32. Rocha NP, de Miranda AS, Teixeira AL. Insights into Neuroinflammation in Parkinson's Disease: From Biomarkers to Anti-Inflammatory Based Therapies. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:628192.
33. Rocha NP, Teixeira AL, Coelho FM, Caramelli P, Guimarães HC, Barbosa IG, et al. Peripheral blood mono-nuclear cells derived from Alzheimer's disease patients show elevated baseline levels of secreted cytokines but resist stimulation with β -amyloid peptide. *Mol Cell Neurosci*. 2012 Jan;49(1):77-84.
34. Swardfager W, Lanctôt K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*. 2010 Nov 15;68(10):930-41.
35. Qin XY, Zhang SP, Cao C, Loh YP, Cheng Y. Aberrations in Peripheral Inflammatory Cytokine Levels in Parkinson Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurol*. 2016 Nov 1;73(11):1316-1324.
36. Talbot K. Motor neuron disease: the bare essentials. *Pract Neurol* 2009;9:303-09.
37. Rentzos M, Nikolaou C, Rombos A, Boufidou F, Zoga M, Dimitrakopoulos A, et al. RANTES levels are elevated in serum and cerebrospinal fluid in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 2007; 8:283–287.

Table 1: Clinical parameters of controls and ALS patients at baseline

	CONTROLS (N=62)	BASELINE (N=68)	<i>P</i> value
Age, years	56 (28-84)	58 (30-88)	0.056
Age at onset, years	-	55 (26-86)	
Disease duration, years	-	2.25 (0.5-14)	
ALSFRS-R score	-	27 (0-46)	
Years of study	-	4 (0-20)	
Sex (male/female)	38/24	38/30	0.534

The table contains the median and range of continuous variables and the number of men and women of each group. Comparisons between groups were performed with the T-Test for continuous variables and Chi-square test for categorical variables. ALSFRS_R: Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale Revised.

Table 2: Comparison of Controls and ALS patients at baseline regarding plasma levels of inflammatory mediators

	CONTROL (N=62)	BASELINE (N=68)	P value
IP-10	79 (2-674)	84 (14-405)	0.336
MCP-1	53 (4-311)	54 (8-323)	0.907
MIG	24 (0-638)	31 (0-1202)	0.321
RANTES	3931 (1101-8886)	4046 (888-7486)	0.702
IL-8	10 (0-1816)	10 (0-911)	0.530
IL-2	17 (8-86)	25 (8-314)	0.500
IL-4	7 (5-17)	8 (6-334)	0.080
IL-6	13 (1-230)	19 (5-607)	0.010
IL-10	6 (1-15)	7 (1-502)	0.018
IL-17	609 (50-1284)	661 (0-1028)	0.007
TNF	8 (5-105)	8 (5-375)	0.201
IFN-γ	6 (4-90)	7 (4-512)	0.131

The table contains the median and range of inflammatory mediators levels expressed in pg/mL. Comparisons between groups were performed with the Mann-Whitney *U* Test.

Table 3: Logistic regression model (Step 8) to predict diagnosis of ALS

	B	SE	Wald	df	p Value	Odds Ratio	95% CI for Odds Ratio	
							Lower	Upper
Age	.040	.018	5.065	1	.024	1.041	1.005	1.077
MCP-1	-.006	.003	3.028	1	.082	.994	.987	1.001
IL-8	-.005	.002	4.363	1	.037	.995	.990	1.000
IL-6	-.016	.010	2.498	1	.114	.984	.965	1.004
IL-10	.117	.052	5.069	1	.024	1.124	1.015	1.245
TNF	.036	.018	4.086	1	.043	1.037	1.001	1.074
IL-17	.003	.001	5.396	1	.020	1.003	1.000	1.005

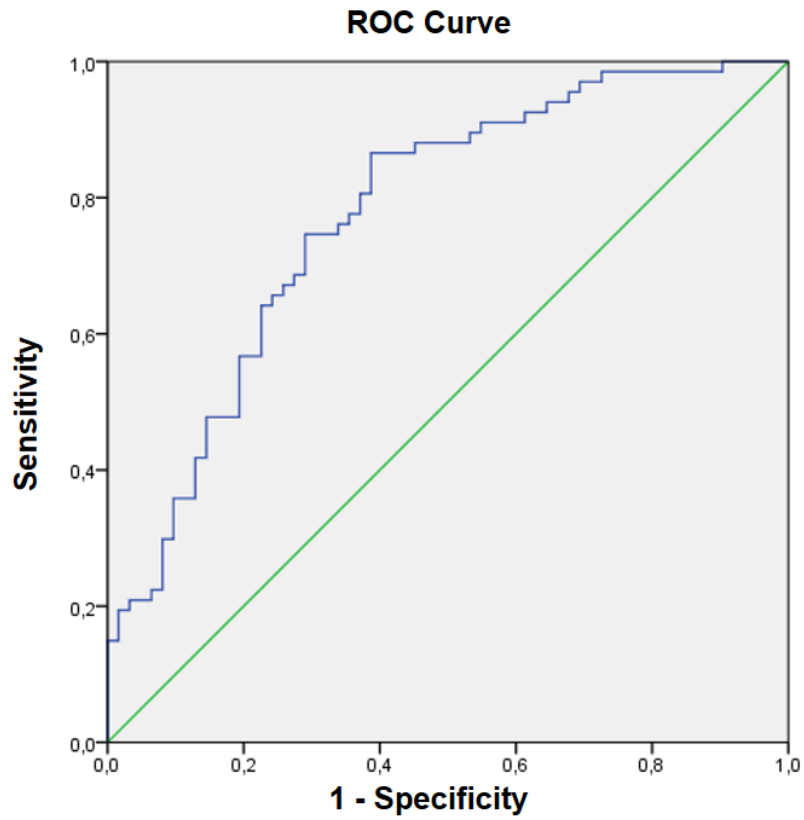
Step 8 was the final model of backward stepwise analysis. Variables marked in bold were found to be significant predictors of ALS diagnosis.

Table 4: Comparison of ALS Follow-up subgroup at first and second assessments regarding plasma levels of inflammatory mediators

	FOLLOW-UP T1 (N=24)	FOLLOW-UP T2 (N=24)	P value
IP-10	91 (14-405)	82 (19-219)	0.253 ^b
MCP-1	62 (8-199)	37 (10-217)	0.092 ^b
MIG	22 (0-614)	15 (0-266)	0.761 ^b
RANTES	4754 (888-7486)	3110 (1040-8148)	0.026^a
IL-8	9 (0-911)	18 (0-770)	0.189 ^b
IL-2	29 (8-86)	14 (9-86)	0.316 ^b
IL-4	8 (6-10)	7 (5-81)	0.761 ^b
IL-6	19 (7-60)	23 (9-492)	0.411 ^b
IL-10	8 (1-13)	7 (2-85)	0.692 ^b
IL-17	694 (478-1028)	683 (69-987)	0.220 ^a
TNF	9 (5-194)	8 (5-146)	0.954 ^b
IFN-γ	6 (5-93)	6 (3-201)	0.758 ^b

The table contains the median and range of inflammatory mediators levels expressed in pg/mL. T1 and T2: first and second assessments of follow-up subgroup, respectively. Comparisons between groups were performed with the Paired T-Test (^a) and the Wilcoxon Test (^b) for variables normally and non-normally distributed, respectively.

Figure 1: ROC curve of the logistic regression model (Step 8) to predict diagnosis of ALS



Step 8 was the final model of backward stepwise analysis. Area under the curve: 0.776

6.4 Resultados Adicionais

Fatores Neurotróficos

Os fatores neurotróficos (BDNF, GDNF, NGF, NT3 e NT4/5) também foram dosados no plasma de pacientes e controles. Os parâmetros clínicos dos participantes do estudo são os mesmos do Manuscrito em revisão (item 6.3). As comparações em relação aos níveis de fatores neurotróficos, entre controles e pacientes e entre pacientes no T1 e T2, estão descritas nas tabelas 1 e 2. Não houve diferença significativa ao comparar pacientes com a forma inicial bulbar *versus* espinal em relação aos fatores neurotróficos, utilizando o teste de Mann-Whitney. Na análise de regressão linear múltipla (*stepwise*), a variável dependente foi a taxa de progressão da doença e as variáveis independentes foram: níveis de fatores neurotróficos, idade de início dos sintomas e pontuação na HAD para depressão e ansiedade. Somente a idade de início foi um preditor da taxa de progressão ($p=0,006$), sendo idade de início avançada associada a uma maior taxa de progressão. No T1 e T2, não houve correlação significativa dos fatores neurotróficos com parâmetros clínicos (idade de início, pontuação na escala funcional, na fluência verbal e pontuação na HAD para sintomas de ansiedade e depressão).

Tabela 1: Comparação entre grupos controle e pacientes com ELA (avaliação transversal) em relação ao nível plasmático de fatores neurotróficos

	CONTROLES (N=62)	PACIENTES (N=68)	Valor de P
BDNF	4410 (1355-20238)	5262 (925-17818)	0.594
GDNF	0 (0-1740)	6 (0-1585)	0.326
NGF	0 (0-767)	0 (0-1544)	0.282
NT3	24 (0-833)	32 (0-1793)	0.307
NT4_5	0 (0-651)	0 (0-4307)	0.378

A tabela contém a mediana e a variação dos níveis plasmáticos de fatores neurotróficos expressos em pg/mL. As comparações entre grupos foram feitas através do Teste de Mann-Whitney *U*.

Tabela 2: Comparação entre a primeira e segunda avaliações de pacientes do subgrupo longitudinal em relação aos níveis plasmáticos de fatores neurotróficos

	LONGITUDINAL T1 (N=24)	LONGITUDINAL T2 (N=24)	Valor de P
BDNF	5193 (2041-9208)	6188 (3667-15634)	0.219
GDNF	38 (0-1205)	34 (0-1705)	0.446
NGF	5 (0-1544)	19 (0-1583)	0.351
NT3	36 (0-1480)	43 (0-3413)	0.587
NT4_5	0 (0-1917)	6 (0-4674)	1.000

A tabela contém a mediana e a variação dos níveis plasmáticos de fatores neurotróficos expressos em pg/mL. T1 e T2: primeira e segunda avaliações do subgrupo longitudinal, respectivamente. As comparações entre grupos foram feitas através do Teste de Wilcoxon.

Avaliação Cognitiva

O teste de fluência verbal com a letra F foi feito por 43 (63%) dos 68 pacientes, sendo a mediana de 10 e a variação de 2 a 22 palavras em 1 minuto. Os demais pacientes não realizaram o teste por recusa ou por incapacidade funcional (disartria moderada a grave ou anartria). Vinte e quatro pacientes (55%) obtiveram pontuação abaixo do esperado. Na análise de correlação da pontuação na fluência verbal com parâmetros laboratoriais (níveis de mediadores inflamatórios e de fatores neurotróficos) e parâmetros clínicos (idade, anos de estudo, pontuação na escala funcional e na HAD para depressão e ansiedade), a pontuação na fluência verbal só se correlacionou significativamente com a escolaridade dos pacientes (Coeficiente de correlação: 0,659 e $p < 0,001$).

Realizamos também o Mini Exame do Estado Mental (MEEM) e a escala cognitiva de Montreal (*Montreal Cognitive Assessment – MoCA*), entretanto, dos 68 pacientes selecionados, somente 24 (35%) e 23 (33%) realizaram o MEEM e a MoCA, respectivamente. Devido à incapacidade funcional secundária à doença, a maioria dos pacientes ou não realizou ou preencheu parcialmente o teste, não sendo possível computar a pontuação total.

Dos 24 pacientes que completaram o MEEM, 10 (41%) apresentaram pontuação total abaixo do esperado. Os domínios acometidos foram: atenção e cálculo (8 pacientes), evocação (8 pacientes), desenho (4 pacientes), frase (3

pacientes), orientação temporal (3 pacientes) e espacial (1 paciente), ler/executar (1 paciente) e registro (1 paciente). Dos 23 pacientes que completaram a MoCA, 19 (82%) apresentaram pontuação abaixo do esperado (<26 pontos), sendo que quatro deles apresentavam escolaridade <4 anos. Todos os domínios apresentaram resultados alterados por pelo menos um dos pacientes. Se excluirmos os pacientes com escolaridade <4 anos e considerarmos o ponto de corte de Martinelli et al., 2014 (<25 pontos), seriam 19 testes completos, sendo 16 (84%) com pontuação abaixo do esperado.

7 DISCUSSÃO

Os estudos apresentados abordaram a ELA de forma ampla, passando por aspectos fisiopatológicos da doença, perfil clínico dos pacientes, comorbidades psiquiátricas associadas e, principalmente, investigando possíveis fatores preditivos de diagnóstico e prognóstico, que certamente teriam impacto na condução dos pacientes e dos estudos futuros.

Inicialmente, é importante enfatizar a escassez de estudos de âmbito nacional, além dos dados incertos de incidência e prevalência da ELA no Brasil. Considerando sua dimensão e sua diversidade socioeconômica e cultural, os estudos regionais e, posteriormente, os de âmbito nacional seriam de extrema relevância para um melhor entendimento do perfil clínico-epidemiológico da doença no nosso meio e, conseqüentemente, poderiam auxiliar na definição de prioridades assistenciais e na elaboração de medidas de saúde pública para aperfeiçoar a qualidade de atendimento dos pacientes.

O perfil clínico da nossa amostra se assemelha ao de outros estudos, exceto pelo menor número de casos de ELA bulbar. Entretanto, ao longo da prática clínica, observamos que os pacientes classificados como ELA generalizada apresentavam, na verdade, um fenótipo inicial bulbar ou apendicular. Por esse motivo, nos demais trabalhos, optamos por não incluir a forma generalizada na estratificação dos pacientes, o que já é feito por outros autores (PIZZIMENTI *et al.*, 2013; BENSIMON *et al.*, 1994; ABE *et al.*, 2014). No manuscrito, em que foi utilizada somente a divisão em relação à forma bulbar ou apendicular, 79% dos pacientes se enquadravam na forma apendicular e 21% na forma bulbar o que está em conformidade com os dados descritos na literatura (KIERNAN *et al.*, 2011; VUCIC *et al.*, 2014).

Investigamos também a frequência de sintomas de ansiedade e depressão na nossa amostra e detectamos que cerca de um terço dos pacientes apresentam ansiedade ou depressão provável. Além disso, observamos que esses sintomas se correlacionam positivamente e que não houve correlação com idade de início, duração da doença, sexo, forma inicial ou pontuação na escala funcional. Portanto, todos os pacientes com ELA nos diferentes estágios e formas iniciais estão susceptíveis a desenvolver ansiedade e depressão ao longo da doença. A frequência dessas comorbidades psiquiátricas em pacientes

com ELA é variável entre os estudos (KURT *et al.*, 2007) e a metodologia utilizada, uso de antidepressivos para outros fins, entre outros fatores, podem interferir no resultado final e justificar essa variabilidade de resultados (FERENTINOS *et al.*, 2011). Considerando a evidência de piora da qualidade de vida associada à presença de depressão nos pacientes com ELA (RABKIN *et al.*, 2015; PIZZIMENTI *et al.*, 2013), a investigação, tratamento e acompanhamento adequado dessas comorbidades deve ser prioridade para melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

O teste de fluência verbal foi escolhido por ser considerado um sensível marcador de déficit cognitivo na ELA (GOLDSTEIN *et al.*, 2013). De fato, mais da metade dos pacientes apresentaram pontuação abaixo do esperado. A escolaridade foi levada em consideração na pontuação de corte e nosso achado de correlação positiva da fluência verbal com a escolaridade corroborou os resultados de outros autores (BRUCKI *et al.*, 2004). A avaliação cognitiva na ELA é dificultada pela interferência da incapacidade funcional na realização dos testes cognitivos. Dessa forma, o ideal é que os testes sejam feitos no início dos sintomas e reavaliados periodicamente para se ter um dado mais preciso em relação à evolução da função cognitiva ao longo do curso da doença.

Não foi evidenciada diferença significativa em relação aos fatores neurotróficos na comparação entre as formas iniciais bulbar e espinhal, sugerindo que esses fatores atuam de forma semelhante nos dois fenótipos da doença. Da mesma forma, não foi encontrada diferença significativa em relação aos fatores neurotróficos na comparação entre os grupos controle e pacientes do estudo transversal. Resultado semelhante em relação ao BDNF foi encontrado em estudo prévio (TREMOLIZZO *et al.*, 2016). Entretanto, estudos que analisaram o líquido e o músculo de pacientes com ELA demonstraram níveis elevados de GDNF comparados aos controles (LIE *et al.*, 1998; YAMAMOTO *et al.*, 1999; GRUNDSTROM *et al.*, 1999; GRUNDSTROM *et al.*, 2000). Níveis elevados de NGF também estavam aumentados na coluna lateral da medula espinhal de pacientes com ELA *versus* controles (ANAND *et al.*, 1995). Dessa forma, podemos concluir que o aumento de fatores neurotróficos na ELA provavelmente ocorre a nível local e não sistêmico. Essa hipótese explicaria a ausência de diferença significativa desses fatores no sangue e a ausência de correlações com parâmetros clínicos.

Uma questão a ser discutida é a necessidade de reposição de fatores neurotróficos como adjuvante no tratamento da ELA, que já foi testada previamente com o BDNF, porém sem eficácia comprovada (The BDNF Study Group, 1999; OCHS *et al.*, 2000). Como já relatado anteriormente, o efeito neuroprotetor dos fatores neurotróficos é dose-dependente, mas declina ao exceder a sua concentração ótima (EKESTERN, 2004). Considerando o resultado do nosso estudo e o fato de que estudos *post-mortem* e/ou de líquido encontraram ausência de diferença (DUBERLEY *et al.*, 1997) ou aumento significativo dos níveis de fatores neurotróficos nos pacientes ao compará-los com controles (KUST *et al.*, 2002; LIE *et al.*, 1998; YAMAMOTO *et al.*, 1999; GRUNDSTROM *et al.*, 1999; GRUNDSTROM *et al.*, 2000), é possível que a reposição dessas substâncias não seja eficaz num organismo sem déficit significativo.

Em relação à investigação de possíveis preditores de diagnóstico, idade avançada e níveis plasmáticos elevados de IL-10 e TNF foram preditores razoáveis do diagnóstico de ELA (área sob a curva ROC de 0,776). A associação de biomarcadores já foi feita em outros trabalhos (MITCHELL *et al.*, 2009; LU *et al.*, 2016) e têm como objetivo aumentar a sensibilidade e especificidade do modelo. Dessa forma, IL-10 e TNF podem ser estudados como biomarcadores de diagnóstico e sua associação com outros potenciais biomarcadores pode aumentar a acurácia do diagnóstico de ELA.

Já em relação à investigação de possíveis variáveis preditivas de prognóstico, a idade de início dos sintomas foi a única que exerceu influência positiva na taxa de progressão da doença, o que já foi evidenciado em outros trabalhos (TALBOT, 2009; GORDON *et al.*, 2013; CHIO *et al.*, 2009), aumentando assim a confiabilidade do resultado. Em oposição à hipótese de que a neuroinflamação influenciaria no curso da doença, nenhum marcador inflamatório dosado na periferia foi preditor da taxa de progressão da ELA. Como já mencionado, a avaliação de mediadores inflamatórios na periferia é dificultada por questões intrínsecas (meia-vida curta, possibilidade de ligação a proteínas e consequente redução de sua concentração livre, entre outros) (RENTZOS *et al.*, 2010) e extrínsecas, visto que os humanos são organismos dinâmicos e a inflamação nesses casos pode ser influenciada por diversos fatores externos e de difícil controle. Dados que corroboram essa dificuldade são os diversos

resultados contraditórios encontrados entre estudos que avaliaram marcadores inflamatórios na periferia (ver tabela 1 - Artigo 1) (SIMPSON et al., 2004; BARON et al., 2005; GUO et al., 2017; EHRHART et al., 2015; LU et al., 2016; BABU et al., 2008; HU et al., 2017). Uma hipótese é a de que talvez a melhor forma de avaliar o papel da neuroinflamação na ELA seja através da análise do líquido, considerando, como já dito anteriormente, as características intrínsecas dos marcadores inflamatórios e a redução da influência externa nos resultados.

Ainda assim, o encontro de um biomarcador que possa ser dosado na periferia seria de extrema relevância para o melhor entendimento da fisiopatologia da ELA, bem como na melhora do design dos ensaios clínicos, o que reforça a necessidade de mais estudos longitudinais e com maior amostragem.

É importante ressaltar a dificuldade de avaliação longitudinal dos pacientes com ELA, em especial dos pacientes com rápida progressão. Esses pacientes apresentam complicações e/ou incapacidade funcional significativa, ficando restritos ao leito, ou infelizmente, falecem antes da segunda avaliação. No nosso estudo encontramos uma leve, mas significativa diferença em relação à pontuação na escala funcional e sem diferença em relação à duração da doença ao comparar os pacientes do estudo transversal (*Baseline*) e longitudinal na primeira avaliação (*Follow-up T1*). Esse dado mostra que perdemos o acompanhamento de pacientes com rápida progressão, sendo essa uma das limitações do estudo, que, por sua vez, é inerente à pesquisa com humanos, especialmente em se tratando de ELA. Outras limitações incluem a amostra pequena, ausência de dados genéticos e a ausência de marcadores dosados simultaneamente no líquido e plasma.

Apesar das limitações, este é um dos poucos trabalhos que avaliaram o perfil clínico e de marcadores inflamatórios longitudinalmente na ELA, sendo o único estudo que avaliou fatores neurotróficos, IL-17 e quimiocinas de forma longitudinal, além de ser o primeiro estudo brasileiro nessa área.

8 CONCLUSÃO

De forma geral, o perfil clínico dos pacientes se assemelha aos dados da literatura. Sintomas de ansiedade e depressão foram frequentes e se correlacionaram positivamente. Os biomarcadores não foram preditores do curso da doença. Avançada idade de início dos sintomas foi um preditor de rápida taxa de progressão. A dosagem de IL-10 e TNF pode ser considerada em futuros estudos de biomarcadores do diagnóstico de ELA.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe K, Aoki M, Tsuji S, Itoyama Y, Sobue G, Togo M, et al. Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* 2017;16(7):505-12

Abe k, Itoyama Y, Sobue G, Tsuji S, Aoki M, Doyu M, et al. Confirmatory double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of efficacy and safety of edaravone (MCI-186) in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 2014; 15: 610–17.

Abrahams S, Leigh PN, Harvey A, Vythelingum GN, Gris  D, Goldstein LH. Verbal fluency and executive dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Neuropsychologia* 2000; 38: 734–47.

Anand P, Parrett A, Martin J, Zeman S, Foley P, Swash M, et al. Regional changes of ciliary neurotrophic factor and nerve growth factor levels in post mortem spinal cord and cerebral cortex from patients with motor disease. *Nat Med.* 1995;1(2):168-72.

Babu GN, Kumar A, Chandra R, Puri SK, Kalita J, Misra UK. Elevated inflammatory markers in a group of amyotrophic lateral sclerosis patients from northern India. *Neurochem Res.* 2008;33(6):1145-9.

Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. The IFN  Receptor: A Paradigm for Cytokine Receptor Signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 1997;15:563–91.

Baron P, Bussini S, Cardin V, Corbo M, Conti G, Galimberti D, et al. Production of monocyte chemoattractant protein-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 2005;32: 541–544.

Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med.* 1994 Mar 3;330(9):585-91

Boill e S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, et al. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 2006; 312, 1389–1392

Botega NJ, Bio MR, Zomignani MA, Garcia Jr C, Pereira WAB. Transtornos do humor em enfermaria de clínica médica e validação de escala de medida (HAD) de ansiedade e depressão. Rev. Saúde Pública. 1995; 29(5):359-363

Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord. 2000; 1:293.

Brooks BR. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. J Neurol Sci. 1994;124 Suppl:96-107.

Brucki SMD, Malheiros SMF, Okamoto IH & Bertolucci PHF. Dados normativos para o uso do teste de fluência verbal em nosso meio. Arquivos de Neuropsiquiatria, 1997; 55: 56-61.

Brucki SMD, Nitrini R, Caramelli C, Bertolucci PHF, Okamoto IH. [Suggestions for utilization of the mini-mental state examination in Brazil]. Arq Neuropsiquiatr. 2003; 61(3B):777-81.

Brucki SMD, Rocha M SG. Category fluency test: Effects of age, gender and education on total scores, clustering, in Brazilian Portuguese-speaking subjects. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2004; 37(12), 1771-1777.

Byrne S, Elamin M, Bede P, Shatunov A, Walsh C, Corr B, et al. Cognitive and clinical characteristics of patients with amyotrophic lateral sclerosis carrying a C9ORF72 repeat expansion: a population-based cohort study. Lancet Neurology 2012;11:232-40.

Chao MV. Neurotrophins and their receptors:a convergence point for many signalling pathways. Nat Rev Neurosci. 2003;4(4):299-309.

Chiò A, Logroscino G, Hardiman O, Swingler R, Mitchell D, Beghi E et al. Prognostic factors in ALS: A critical review. Amyotroph Lateral Scler. 2009 ; 10(5-6): 310–323.

Chiò A, Logroscino G, Traynor B, Collins J, Simeone J, Goldstein L, *et al.* Global Epidemiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review of the Published Literature. *Neuroepidemiology*. 2013;41:118–130.

Corcia P, Tauber C, Vercoullie J, Arlicot N, Prunier C, Praline J *et al.* Molecular imaging of microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*. 2012; 7(12):e52941.

Costa J, Swash M, De Carvalho M. Awaji criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. *Arch Neurol*. 2012; 1410-1416.

Da Silva C. Fatores Neurotróficos: estrutura, funções e aplicações clínicas. *Atual. Neuroc*. 1995; 1:1-19.

De Carvalho M, Dengler R, Eisen A, England JD, Kaji R, Kimura J, *et al.* Eletrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. Review. *Clinical Neurophysiology*. 2008; 497-503.

De Carvalho M, Pinto S, Costa J, Evangelista T, Ohana B, Pinto A. A randomized, placebo-controlled trial of memantine for functional disability in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*. 2010 Oct;11(5):456-60.

De Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Citocinas e Dor. *Rev Bras Anesthesiol*. 2011;61(2):255-265.

De Souza AWS, Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Cruvinel WM, Andrade LEC, *et al.* Sistema Imunitário – Parte III. O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os polos de tolerância e autoimunidade. *Rev Bras Reumatol* 2010;50(6):665-94.

De Souza LC, Caramelli P, Prado LGR, Bicalho IC, Guimarães HC, Mioshi, E, *et al.* Cognitive continuum across amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal dementia (FTD): an investigation on social cognition. *Journal: Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration* 16 Supp 1:120 (P95).

Duberley RM, Johnson IP, Anand P, Leigh PN, Cairns NJ. Immunocytochemical studies of neurotrophins in cerebral motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res.* 1997;763:259–263.

Duberley RM, Johnson IP, Anand P, Leigh PN, Cairns NJ. Neurotrophin-3-like immunoreactivity and Trk C expression in human spinal motoneurons in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1997;148:33–40.

Ehrhart J, Smith AJ, Kuzmin-Nichols N, Zesiewicz TA, Jahan I, Shytle RD, et al. Humoral factors in ALS patients during disease progression. *Journal of Neuroinflammation.* 2015;12:127.

Eisen A, Schulzer M, MacNeil M, Pant B, Mak E. Duration of amyotrophic lateral sclerosis is age dependent. *Muscle Nerve.* 1993;16:27-32

Ekester E. Neurotrophic Factors and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurodegenerative Dis.* 2004;1:88–100.

Ferentinos P, Paparrigopoulos T, Rentzos M, Zouvelou V, Alexakis T, Evdokimidis L. Prevalence of major depression in ALS: Comparison of a semi-structured interview and four self-report measures. *Amyotrophic Lateral Sclerosis.* 2011; 12: 297–302

Goldstein LH, Abrahams S. Changes in cognition and behaviour in amyotrophic lateral sclerosis: nature of impairment and implications for assessment. *Lancet Neurol* 2013; 12:368–80.

Gordon PH, Salachas F, Lacomblez L, Le FN, Pradat PF, Bruneteau G, Elbaz A, Meininger V. Predicting Survival of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis at Presentation: A 15-Year Experience. *Neurodegener Dis* 2013;12(2):81-90.

Grundstrom E, Askmark H, Lindeberg J, Nygren I, Ebendal T, Aquilonius SM. Increased expression of glial cell line-derived neurotrophic factor mRNA in muscle biopsies from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences.* 1999;162(2):169-173.

Grundstrom E, Lindholm D, Johansson A, Blennow K, Askmark H. GDNF but not BDNF is increased in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport*. 2000;11(8):1781-3.

Guedes K, Pereira C, Pavan K, Valerio BCO. Cross-cultural adaptation and validation of ALS Functional Rating Scale-Revised in Portuguese language. *Arq Neuropsiquiatr* 2010; 68(1):44-47

Guo J, Yang X, Gao L, Zang D. Evaluating the levels of CSF and serum factors in ALS. *Brain and Behavior*. 2017;7:e00637

Haase G, Dessaud E, Garcès A, de Bovis B, Birling M, Filippi P, et al. GDNF acts through PEA3 to regulate cell body positioning and muscle innervation of specific motor neuron pools. *Neuron*. 2002;35(5):893-905.

Hardiman O, van den Berg LH. Edaravone: a new treatment for ALS on the horizon? *Lancet Neurol*. 2017 Jul;16(7):490-491

He YY, Zhang XY, Yung WH, Zhu JN, Wang JJ. Role of BDNF in central motor structures and motor diseases. *Mol Neurobiol*. 2013;48(3):783-93.

Henkel JS, Enghelhardt JI, Siklos L, Simpson EP, Kim SH, Pan T, et al. Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann Neurol*. 2004;55:221–35.

Henkel JS, Beers DR, Zhao W, Appel SH. Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting. *J NeuroimmunePharmacol*. 2009; 4:389–398.

Hensley K, Fedynyshyn J, Ferrell S, Floyd RA, Gordon B, Grammas P, et al. Message and protein-level elevation of tumor necrosis factor- α (TNF α) and TNF α -modulating cytokines in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*. 2003;14(1):74–80.

Hooten KG, Beers DR, Zhao W, Appel SH. Protective and Toxic Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2015;12:364–375.

Hsieh S, Caga J, Leslie FVC, Shibata M, Daveson N, Foxe D, et al. Cognitive and Behavioral Symptoms in ALSFTD: Detection, Differentiation, and Progression. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2016 Jan;29(1):3-10.

Hu Y, Cao C, Qin XY, Yu Y, Yuan J, Zhao Y, et al. Increased peripheral blood inflammatory cytokine levels in amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis study. *Scientific Reports,* 2017; 22;7(1):9094.

Hugon J. Riluzole and ALS therapy. *Wien Med Wochenschr.* 1996;146(9-10):185-7.

Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Lancet.* 2011;377:942-55.

Kurt A, Nijboer F, Matuz T, Kubler A. Depression and anxiety in individuals with amyotrophic lateral sclerosis: epidemiology and management. *CNS Drugs.* 2007; 21(4):279-91.

Kust BM, Copray JC, Brouwer N, Troost D, Boddeke HW. Elevated levels of neurotrophins in human biceps brachii tissue of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol.* 2002;177(2):419-27.

Lie DC, Weis J. GDNF expression is increased in denervated human skeletal muscle. *Neurosci Lett.* 1998;250:87–90.

Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chiò A, Mitchell D, Swingler RJ, et al. Incidence of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2010;81(4):385–390.

Lu CH, Allen K, Oei F, Leoni E, Kuhle J, Tree T, et al. Systemic inflammatory response and neuromuscular involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2016;3:e244.

Malaspina A, Puentes F¹, Amor S. Disease origin and progression in amyotrophic lateral sclerosis: an immunology perspective. *Int Immunol.* 2015;27(3):117-29.

Martinelli JE, Cecato JF, Bartholomeu D, Montiel JM. Comparison of the Diagnostic Accuracy of Neuropsychological Tests in Differentiating Alzheimer's Disease from Mild

Cognitive Impairment: Can the Montreal Cognitive Assessment Be Better than the Cambridge Cognitive Examination? *Dement Geriatr Cogn Disord Extra* 2014;4:113–121.

Mccluskey *et al.* Familial amyotrophic lateral sclerosis. UptoDate. Last updated: Dez 18, 2012

Memória CM, Yassuda MS, Nakano EY, Forlenza OV. Brief screening for mild cognitive impairment: validation of brazilian version of the Montreal Cognitive Assessment. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2013; 28(1):34-40.

Miller RG, Jackson CE, Kasarskis EJ, England JD, Forshew D, Johnston W, *et al.* Practice Parameter Update: the care of the patient with amyotrophic lateral sclerosis: drug, nutritional and respiratory therapies (an evidence-based review): report of the quality standards subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2009;73:1218-26.

Miller RG, Petajan JH, Bryan WW, Armon C, Barohn RJ, Goodpasture JC, *et al.* A placebo controlled trial of recombinant human ciliary neurotrophic (rhCNTF) factor in amyotrophic lateral sclerosis. rhCNTF ALS Study Group. *Ann Neurol*. 1996;39:256–260.

Mitchell RM, Freeman WM, Randazzo WT, Stephens HE, Beard JL, Simmons Z, *et al.* A CSF biomarker panel for identification of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2009;72:14–19.

Mitsumoto H, Brooks BR, Silani V. Clinical trials in amyotrophic lateral sclerosis: why so many negative trials and how can trials be improved? *Lancet Neurol*. 2014;13(11):1127-38.

Mitsumoto H, Chad DA, Piro EP. Amyotrophic lateral sclerosis. In: *Contemporary Neurology Series*, F.A. Davis Company, Philadelphia 1998; 47-64

No authors listed. A controlled trial of recombinant methionyl human BDNF in ALS: The BDNF Study Group (Phase III). *Neurology*. 1999; 52(7):1427-33.

No authors listed. Professional Jobs Linked with ALS and Parkinson Disease Deaths. *JAMA*. 2017 Aug 22;318(8):691.

Normanton M, Marti LC. Current data on IL-17 and Th17 cells and implications for graft versus host disease. *Einstein*. 2013;11(2):237-46.

Ochs G, Penn RD, York M, Giess R, Beck M, Tonn J, et al. A phase I/II trial of recombinant methionyl human brain derived neurotrophic factor administered by intrathecal infusion to patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 2000;1:201–6.

Oliveira AS *et al*. Esclerose Lateral Amiotrófica: sua manifestação no Brasil. *Revista Neurociências*. 2006; 14(Supl 2)

Oliveira AS, Pereira RD. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) - three letters that change the people's life for ever. *Arq.Neuropsiquiatr*. 2009;67(3-A):750-782

Palomino DCT, Marti LC. Quimiocinas e imunidade (Chemokines and immunity). *Einstein*. 2015;13(3):469-73.

Picher-Martel V, Valdmanis PN, Gould PV, Julien JP, Dupré N. From animal models to human disease: a genetic approach for personalized medicine in ALS. *Acta Neuropathologica Communications*. 2016;4:70.

Pizzimenti A, Aragona M, Onesti E, Inghilleri M. Depression, pain and quality of life in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a cross-sectional study. *Functional Neurology* 2013; 28(2):115-119.

Poloni M, Facchetti D, Mai R, Micheli A, Agnoletti L, Francolini G, et al. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha and its soluble receptors are increased in the blood of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*. 2000;287(3):211-4.

Prado Lde G, Bicalho IC, Vidigal-Lopes M, Ferreira CJ, Mageste Barbosa LS, Gomez RS, et al. Amyotrophic lateral sclerosis in Brazil: Case series and review of the Brazilian literature. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2016;17(3-4):282-8.

Prado LGR, Bicalho ICS, Magalhães D, Caramelli P, Teixeira AL, De Souza LC. C9ORF72 and the FTD-ALS spectrum: a systematic review of neuroimaging studies. *Dement Neuropsychol* 2015 December;9(4):413-421.

Prado LGR. Perfil clínico de pacientes portadores de esclerose lateral amiotrófica acompanhados em centros de referência de Belo Horizonte, MG. 2015. 93f.. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

Petrou P, Gothelf Y, Argov Z, Gotkine M, Levy YS, Kassis I, et al. Safety and Clinical Effects of Mesenchymal Stem Cells Secreting Neurotrophic Factor Transplantation in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: Results of Phase 1/2 and 2a Clinical Trials. *JAMA Neurol.* 2016 Mar;73(3):337-44.

Raaphorst J, Visser M, Linssen WHJP, Haan RJ, Schmand B. The cognitive profile of amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis. *Amyotroph Lateral Scler* 2010; 11:27–37.

Rabkin JG, Goetz R, Factor-Litvak P, Hupf J, McElhiney M, Singleton J, et al. Depression and wish to die in a multicenter cohort of ALS patients. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2015; 16(0): 265–273.

Ransohoff RM. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nature Neuroscience.* 2016; 19, 987–991.

Rentzos M, Nikolaou C, Rombos A, Boufidou F, Zoga M, Dimitrakopoulos A, et al. RANTES levels are elevated in serum and cerebrospinal fluid in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis.* 2007; 8:283–287

Rentzos M, Rombos A, Nikolaou C, et al. Interleukin-17 and interleukin-23 are elevated in serum and cerebrospinal fluid of patients with ALS: a reflection of Th17 cells activation? *Acta Neurologica Scandinavica.* 2010;122(6):425–429.

Richardson PM. Neurotrophic factors in regeneration. *Curr. Op. Neurob.* 1991; 1:401-406.

Ringholz GM, Appel SH, Bradshaw M, Cooke NA, Mosnik DM, Schulz PE. Prevalence and patterns of cognitive impairment in sporadic ALS. *Neurology*. 2005; 65(4):586-90.

Rollins BJ. Chemokines. *Blood*. 1997;90(3):909-28. Review.

Seelaar H, Rohrer JD, Pijnenburg YA, Fox NC, van Swieten JC. Clinical, genetic and pathological heterogeneity of frontotemporal dementia: a review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011; 82:476-486.

Shoesmith CL, Findlater K, Rowe A, Strong MJ. Prognosis of amyotrophic lateral sclerosis with respiratory onset. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007; 629-631

Simpson EP, Henry YK, Henkel JS, Smith RG, Appel SH. Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden. *Neurology*. 2004 May 25;62(10):1758-65.

Talbot K. Motor neuron disease: the bare essentials. *Pract Neurol* 2009;9:303-09.

Tovar-y-Romo LB, Ramírez-Jarquín UN, Lazo-Gómez R, Tapia R. Trophic factors as modulators of motor neuron physiology and survival: implications for ALS therapy. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2014;8:61.

Tremolizzo L, Pellegrini A, Conti E, Arosio A, Gerardi F, Lunetta C, et al. BDNF Serum Levels with Respect to Multidimensional Assessment in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurodegener Dis*. 2016;16(3-4):192-8.

Trotti D, Rolfs A, Danbolt NC, Brown RH Jr, Hediger MA. SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nat. Neurosci*. 1999;2(9), 848.

Vucic S, Rothstein JD, Kiernan MC. Advances in treating amyotrophic lateral sclerosis: insights from pathophysiological studies. *Trends of Neurosciences*. 2014;37(8):433-442.

Wilbourn AJ. Clinical neurophysiology in the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: the Lambert and the El Escorial criteria. *J Neurol Sci*. 1998;160 Suppl 1:S25-9.

Yamamoto M, Mitsuma N, Inukai A, Ito Y, Li M, Mitsuma T, Sobue G. Expression of GDNF and GDNFR- α mRNAs in muscles of patients with motor neuron diseases. *Neurochem Res.* 1999;24:785–790.

Zhang JM, An J. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45(2):27–37.

Zhao W, Beers DR, Appel SH. Immune-mediated Mechanisms in the Pathoprogession of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013; 8(4): 888–899.

Zufiria M, Gil-Bea FJ, Fernández-Torrón R, Poza JJ, Muñoz-Blanco JL, Rojas-García R, et al. ALS: A bucket of genes, environment, metabolism and unknown ingredients. *Progress in Neurobiology.* 2016;142:104–129.

ANEXOS

ANEXO 1

CARTAS DE APROVAÇÃO DO COEP DO HC/UFMG E DO HJK/FHEMIG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE –19599813.0.0000.5149

Interessado(a): Prof. Antônio Lucio Teixeira Junior
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 11 de dezembro de 2013, o projeto de pesquisa intitulado "**Estudo longitudinal de parâmetros clínicos e moleculares na esclerose lateral amiotrófica**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

PARECER Nº.002B/2014

Data: 31/03/2014

Registro CEP/FHEMIG: 002B/2014 (este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).

Instituição Proponente

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

CAAE: 19599813.0.0000.5149

Pesquisador responsável:
Antônio Lúcio Teixeira Júnior.

Instituição Coparticipante

Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais – FHEMIG.

Hospital Júlia Kubitscheck – HJK.

DECISÃO:

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/FHEMIG) aprovou em 31 de março de 2014 o projeto de pesquisa intitulado: “Estudo longitudinal de parâmetros clínicos e moleculares na Esclerose Lateral Amiotrófica” e novo TCLE com todas as correções solicitadas.



Vanderson Assis Romualdo

Coordenador

Comitê de Ética em Pesquisa / FHEMIG

Vanderson Assis Romualdo

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

SIPRO: 777512014-5

ANEXO 2

PROTOCOLO

PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO

Data: ____/____/____

Nome: _____

Registro: _____ Tel contato: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____

Sexo: Masc FemCor da pele: Branca Negra Parda/mulata Amarela

Naturalidade (cidade e estado onde nasceu): _____

Procedência (cidade onde mora): _____

Grau de escolaridade:

Analfabeto 1º Grau Incompleto 1º Grau Completo 2º Grau Incompleto 2º Grau Completo 3º Grau Incompleto 3º Grau Completo Pós-graduação

Quantos anos completos de estudos? _____

Ocupação atual: Trabalhando Afastado/Aposentado

Profissão (atual ou prévia): _____

Nível sócio-econômico (pelos critérios da ABIPEME)

Circule o número da coluna que indica o que você possui. Exemplo: se possui 1 carro, circule o número 4 na linha que corresponde a automóvel.

Itens de posse	Não tem	Quantidade possuída					
		1	2	3	4	5	6 e+
Automóvel	<input type="checkbox"/>	4	9	13	18	22	26
Televisor em cores	<input type="checkbox"/>	4	7	11	14	18	22
Banheiro	<input type="checkbox"/>	2	5	7	10	12	15
Empregada mensalista	<input type="checkbox"/>	5	11	16	21	26	32
Rádio (excluindo o do carro)	<input type="checkbox"/>	2	3	5	6	8	9
Máquina de lavar roupa	<input type="checkbox"/>	8	8	8	8	8	8
Vídeo cassete	<input type="checkbox"/>	10	10	10	10	10	10
Aspirador de pó	<input type="checkbox"/>	6	6	6	6	6	6
Geladeira comum ou com freezer	<input type="checkbox"/>	7	7	7	7	7	7

Circule o grau de instrução do chefe da família, ou seja, da pessoa que traz renda para a família do paciente.

a) Instrução do chefe da família	ABIPEME
----------------------------------	---------

Analfabeto primário incompleto	0
primário completo ginasial incompleto	5
ginasial completo colegial incompleto	10
colegial completo superior incompleto	15
superior completo	21

Os limites de classificação ficaram assim definidos:

(ESSE CAMPO DEVE SER PREENCHIDO PELO MÉDICO)

Classes	critério ABIPEME
A -	89 e +
B -	59/88
C -	35/58
D -	20/34
E -	0/19

Praticava esporte? Não Sim

Se sim, qual esporte? _____ Por quantos anos? _____

Quantas horas por semana dedicava ao esporte? _____ horas

Prestou serviço militar? Não Sim Se sim, por quantos anos? _____

Contato com herbicida, produtos tóxicos? Não Sim Qual? _____

Traumas / choque elétrico prévios? Não Sim

Fuma/ já fumou? Não Sim

Se sim, por quantos anos? _____ Quantos cigarros por dia? _____

Ingere ou já ingeriu bebida alcoólica frequentemente? Não Sim

Se sim, por quantos anos? _____ Quantas doses por dia? _____

História familiar de ELA? Não Sim

Se sim, quem? Mãe Pai Irmãos Outro: _____

Possui outras doenças? Não Sim

Se sim, quais: _____

Usa medicamentos? Não Sim

Se sim, quais? _____

Data (ano) do início dos sintomas: _____

Idade ao início dos sintomas: _____

Idade ao diagnóstico: _____

O primeiro sintoma iniciou em:

membro superior (braço) membro inferior (perna)
 dificuldade para falar dificuldade para engolir
 falta de ar Outro: _____

O segundo sintoma iniciou em:

membro superior (braço) membro inferior (perna)
 dificuldade de fala dificuldade para engolir
 falta de ar Outro: _____

Espirometria:

Data: _____ CV: _____ CIM: _____ Peak Flow E: _____ A: _____

Usa Ambu? Sim Não

Usa ventilação não invasiva (BIPAP)? Sim Não

Se Sim: Noturna (8h) de 8 – 20h mais de 20h

Possui Traqueostomia (TQT) ? Sim Não

Se Sim, ela foi realizada: Durante internação hospitalar
 Eletiva/programada

Se Sim, há quanto tempo possui TQT? _____

Gastrostomia presente? Sim Não

Se Sim, ela foi realizada: Durante internação hospitalar
 Eletiva/programada

Se Sim, há quanto tempo possui gastrostomia? _____

Em uso de Riluzol? Sim Não

Se sim, há quanto tempo? _____

ANEXO

Escala de Ansiedade e Depressão para Hospital Geral (HAD)

d
o
b
r
a
r

ESCALA DE ANSIEDADE E DEPRESSÃO - HAD*

Este questionário ajudará o seu médico a saber como você está se sentindo. Leia todas as frases. Marque com um "X" a resposta que melhor corresponder a como você tem se sentido na *última semana*. Não é preciso ficar pensando muito em cada questão. Neste questionário as respostas espontâneas têm mais valor do que aquelas em que se pensa muito.

Marque apenas uma resposta para cada pergunta.

- A Eu me sinto tenso ou contraído:
3 () A maior parte do tempo
2 () Boa parte do tempo
1 () De vez em quando
0 () Nunca
-
- D Eu ainda sinto gosto pelas mesmas coisas de antes:
0 () Sim, do mesmo jeito que antes
1 () Não tanto quanto antes
2 () Só um pouco
3 () Já não sinto mais prazer em nada
- A Eu sinto uma espécie de medo, como se alguma coisa ruim fosse acontecer:
3 () Sim, e de um jeito muito forte
2 () Sim, mas não tão forte
1 () Um pouco, mas isso não me preocupa
0 () Não sinto nada disso
-
- D Dou risada e me divirto quando vejo coisas engraçadas:
0 () Do mesmo jeito que antes
1 () Atualmente um pouco menos
2 () Atualmente bem menos
3 () Não consigo mais
- A Estou com a cabeça cheia de preocupações:
3 () A maior parte do tempo
2 () Boa parte do tempo
1 () De vez em quando
0 () Raramente
- D Eu me sinto alegre:
3 () Nunca
2 () Poucas vezes
1 () Muitas vezes
0 () A maior parte do tempo
-
- A Consigo ficar sentado à vontade e me sentir relaxado:
0 () Sim, quase sempre
1 () Muitas vezes
2 () Poucas vezes
3 () Nunca
- D Eu estou lento para pensar e fazer as coisas:
3 () Quase sempre
2 () Muitas vezes
1 () De vez em quando
0 () Nunca
-
- A Eu tenho uma sensação ruim de medo, como um frio na barriga ou um aperto no estômago:
0 () Nunca
1 () De vez em quando
2 () Muitas vezes
3 () Quase sempre

- D Eu perdi o interesse em cuidar da minha aparência:
 3 () Completamente
 2 () Não estou mais me cuidando como eu deveria
 1 () Talvez não tanto quanto antes
 0 () Me cuido do mesmo jeito que antes
- A Eu me sinto inquieto, como se eu não pudesse ficar parado em lugar nenhum:
 3 () Sim, demais
 2 () Bastante
 1 () Um pouco
 0 () Não me sinto assim
- D Fico esperando animado as coisas boas que estão por vir:
 0 () Do mesmo jeito que antes
 1 () Um pouco menos do que antes
 2 () Bem menos do que antes
 3 () Quase nunca
- A De repente, tenho a sensação de entrar em pânico:
 3 () A quase todo momento
 2 () Várias vezes
 1 () De vez em quando
 0 () Não sinto isso
- D Consigo sentir prazer quando assisto um bom programa de televisão, de rádio, ou quando leio alguma coisa:
 0 () Quase sempre
 1 () Várias vezes
 2 () Poucas vezes
 3 () Quase nunca
- A — D—

ESCALA FUNCIONAL (ALS Functional Rating Scale – Revised/ALSFRS-R)

OBS: Deve ser preenchido pelo médico

1 - Fala

Processo da fala normal	4
Distúrbio da fala detectável	3
Compreensível com repetição	2
Fala combinada com comunicação não-vocal	1
Perda da utilidade da fala	0

2 - Salivação

Normal	4
Insignificante, mas notável o excesso de saliva na boca podendo ter babas noturnas	3
Excesso de saliva moderada, podendo ter mínimas babas	2
Excesso acentuado de saliva com alguma baba	1
Baba acentuada exigindo constante uso de babador ou lenço para boca	0

3 - Deglutição

Normal	4
Problemas precoces para comer, engasgos ocasionais	3
Alteração na consistência da dieta	2
Necessidade de suplemento alimentar pastoso	1
Nada pela boca, exclusivamente parenteral ou enteral	0

4 - Escrita

Normal	4
Lentificada ou descuidada, todas as palavras são legíveis	3
Nem todas as palavras são legíveis	2
Capaz de segurar a caneta, mas incapaz de escrever	1
Não é capaz de segurar a caneta	0

5 - Manipulação de alimentos e utensílios (Indivíduos sem gastrostomia)

Normal	4
Um pouco lento e desajeitado, mas não necessita de ajuda	3
Pode cortar o alimento embora lento e desajeitado; necessita de alguma ajuda	2
Alimentos cortados por outra pessoa, mas alimenta-se sozinho lentamente	1
Precisa ser alimentado	0

(Indivíduos com gastrostomia)

Normal	4
Desajeitado, mas capaz de desempenhar todas as manipulações	3
Alguma ajuda necessária com tampas e fechos	2
Oferece assistência mínima ao cuidador	1
Incapaz de executar qualquer aspecto da tarefa	0

6 - Vestuário e Higiene

Normal	4
Independente de auto-cuidado com diminuição do rendimento do esforço	3
Assistência intermitente ou substituição dos métodos	2
Necessita do cuidador para auto-cuidado	1
Dependência total	0

7 - Virar na cama e ajustar a roupa de cama

Normal	4
Um pouco lento ou desajeitado, não necessita de ajuda	3
Pode virar sozinho ou ajustar o lençol com grande dificuldade	2
Tem iniciativa, não consegue virar ou ajustar o lençol sozinho	1
Incapaz	0

8 - Andar

Normal	4
Deambulação precoce dificultada	3
Passeios com assistência	2
Movimento funcional não-deambulatório somente	1
Não apresenta movimentação voluntária das pernas	0

9 - Subir escadas

Normal	4
Lentidão	3
Ligeiro desequilíbrio ou fadiga	2
Necessita de assistência	1
Não realiza	0

10 - Dispneia

Nenhuma	4
Ocorre quando caminha	3
Ocorre quando come, toma banho e se veste	2
Ocorre no repouso, ou sentado ou deitado	1
Dificuldade significativa, considerando suporte mecânico	0

11 - Ortopnéia

Nenhuma	4
Alguma dificuldade de dormir, falta de ar, não se utiliza rotineiramente mais que 2 travesseiros	3
Necessita de travesseiros extras para dormir (mais que 2)	2
Pode dormir somente sentado	1
Não consegue dormir	0


12 - Insuficiência respiratória

Nenhuma	4
Uso intermitente do BIPAP	3
Uso contínuo do BIPAP à noite	2
Uso contínuo do BIPAP durante o dia e a noite	1
Ventilação mecânica invasiva por intubação	0

TOTAL: _____/48

MINI EXAME DO ESTADO MENTAL


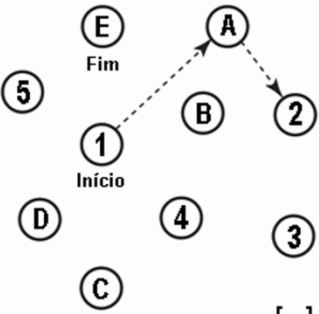

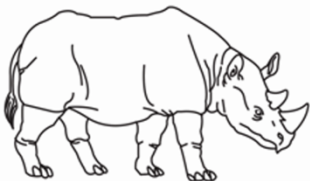
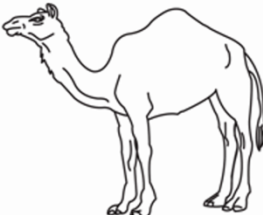
Quadro 1 – Miniexame do estado mental (MEEM)

Orientação temporal (5 pontos)	Qual a hora aproximada?
	Em que dia da semana estamos?
	Que dia do mês é hoje?
	Em que mês estamos?
	Em que ano estamos?
Orientação espacial (5 pontos)	Em que local estamos?
	Que local é este aqui?
	Em que bairro nós estamos ou qual é o endereço daqui?
	Em que cidade nós estamos?
Registro (3 pontos)	Repetir: CARRO, VASO, TIJOLO
Atenção e cálculo (5 pontos)	Subtrair: $100-7 = 93-7 = 86-7 = 79-7 = 72-7 = 65$
Memória de evocação (3 pontos)	Quais os três objetos perguntados anteriormente?
Nomear 2 objetos (2 pontos)	Relógio e caneta
REPETIR (1 ponto)	“Nem aqui, nem ali, nem lá”
Comando de estágios (3 pontos)	Apanhe esta folha de papel com a mão direita, dobre-a ao meio e coloque-a no chão
Escrever uma frase completa (1 ponto)	Escrever uma frase que tenha sentido
Ler e executar (1 ponto)	Feche seus olhos
Copiar diagrama (1 ponto)	Copiar dois pentágonos com interseção
	

Fonte: Brucki SMD, Nitrini R, Caramelli P, Bertolucci PHF, Okamoto JH. Sugestões para o uso do mini-exame do estado mental no Brasil. Arq Neuropsiquiatr. 2003; 61(3B):777-81.

ESCALA COGNITIVA DE MONTREAL (MOCA)

MONTREAL COGNITIVE ASSESSMENT (MOCA) Versão Experimental Brasileira
 Nome: _____ Data de nascimento: ____/____/____
 Escolaridade: _____ Data de avaliação: ____/____/____
 Sexo: _____ Idade: _____

VISUOESPACIAL / EXECUTIVA		 Copiar o cubo	Desenhar um RELÓGIO (onze horas e dez minutos) (3 pontos)	Pontos																		
 []	[]	[]	[] Contorno [] Números [] Ponteiros	_ / 5																		
NOMEAÇÃO																						
 []	 []	 []	_ / 3																			
MEMÓRIA	Leia a lista de palavras, O sujeito de repeti-la, faça duas tentativas Evocar após 5 minutos	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">Rosto</td> <td style="text-align: center;">Veludo</td> <td style="text-align: center;">Igreja</td> <td style="text-align: center;">Margarida</td> <td style="text-align: center;">Vermelho</td> </tr> <tr> <td style="font-size: x-small;">1ª tentativa</td> <td style="text-align: center;">[]</td> <td style="text-align: center;">[]</td> <td style="text-align: center;">[]</td> <td style="text-align: center;">[]</td> <td style="text-align: center;">[]</td> </tr> <tr> <td style="font-size: x-small;">2ª tentativa</td> <td style="text-align: center;">[]</td> <td style="text-align: center;">[]</td> <td style="text-align: center;">[]</td> <td style="text-align: center;">[]</td> <td style="text-align: center;">[]</td> </tr> </table>		Rosto	Veludo	Igreja	Margarida	Vermelho	1ª tentativa	[]	[]	[]	[]	[]	2ª tentativa	[]	[]	[]	[]	[]	Sem Pontuação	
	Rosto	Veludo	Igreja	Margarida	Vermelho																	
1ª tentativa	[]	[]	[]	[]	[]																	
2ª tentativa	[]	[]	[]	[]	[]																	
ATENÇÃO	Leia a sequência de números (1 número por segundo)	O sujeito deve repetir a sequência em ordem direta [] 2 1 8 5 4 O sujeito deve repetir a sequência em ordem indireta [] 7 4 2	_ / 2																			
Leia a série de letras. O sujeito deve bater com a mão (na mesa) cada vez que ouvir a letra "A". Não se atribuem pontos se ≥ 2 erros. [] F B A C M N A A J K L B A F A K D E A A A J A M O F A A B																						
Subtração de 7 começando pelo 100 [] 93 [] 86 [] 79 [] 72 [] 65 4 ou 5 subtrações corretas: 3 pontos; 2 ou 3 corretas 2 pontos; 1 correta 1 ponto; 0 correta 0 ponto																						
LINGUAGEM	Repetir: Eu somente sei que é João quem será ajudado hoje. []	O gato sempre se esconde embaixo do Sofá quando o cachorro está na sala. []	_ / 2																			
Fluência verbal: dizer o maior número possível de palavras que comecem pela letra F (1 minuto). [] _____ (N ≥ 11 palavras)																						
ABSTRAÇÃO	Semelhança p. ex. entre banana e laranja = fruta [] trem - bicicleta [] relógio - régua	_ / 2																				
EVOCAÇÃO TARDIA	Deve recordar as palavras SEM PISTAS	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">Rosto</td> <td style="text-align: center;">Veludo</td> <td style="text-align: center;">Igreja</td> <td style="text-align: center;">Margarida</td> <td style="text-align: center;">Vermelho</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">[]</td> <td style="text-align: center;">[]</td> <td style="text-align: center;">[]</td> <td style="text-align: center;">[]</td> <td style="text-align: center;">[]</td> </tr> </table>	Rosto	Veludo	Igreja	Margarida	Vermelho	[]	[]	[]	[]	[]	Pontuação apenas para evocação SEM PISTAS	_ / 5								
Rosto	Veludo	Igreja	Margarida	Vermelho																		
[]	[]	[]	[]	[]																		
OPCIONAL	Pista de categoria Pista de múltipla escolha																					
ORIENTAÇÃO	[] Dia do mês [] Mês [] Ano [] Dia da semana [] Lugar [] Cidade	_ / 6																				
© Z. Nasreddine MD www.mocatest.org Versão experimental Brasileira: Ana Luisa Rosas Sarmiento Paulo Henrique Ferreira Bertolucci - José Roberto Wajman				TOTAL Adicionar 1 pt se ≤ 12 anos de escolaridade																		

APÊNDICES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma doença neurológica degenerativa que acomete os neurônios motores, responsáveis pela inervação dos músculos do corpo. A morte gradual destes neurônios promove um quadro de fraqueza da musculatura afetada, levando aos sintomas característicos da doença.

O objetivo da pesquisa é conhecer o perfil dos pacientes com ELA no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC/UFMG) e no Hospital Júlia Kubitscheck (HJK/FHEMIG) e comparar os dados obtidos com outros estudos nacionais e internacionais. Além disso, pretende-se analisar a evolução clínica da doença por meio de exames clínicos e questionários específicos, além de investigar a evolução das variáveis moleculares (polimorfismos genéticos e biomarcadores) por meio da coleta de sangue.

A justificativa para realização da pesquisa é avaliar possíveis associações causais na busca pela causa da doença, além de buscar melhorar a abordagem e tratamento dos pacientes.

Os pacientes serão acompanhados em etapas ao longo de 24 meses (2 anos): mês 0 (primeira avaliação), mês 6 (após seis meses de acompanhamento) e mês 12 (após 01 ano) e mês 24 (após 02 anos) com objetivo de avaliar os parâmetros clínicos e moleculares da doença.

As informações serão adquiridas através da leitura dos prontuários, exame clínico de rotina e por meio de protocolos específicos que tem como objetivo avaliar a cognição, capacidade funcional, qualidade de vida e sintomas ansiosos e depressivos associados à doença.

A coleta de sangue (amostra de cerca de 5ml) será realizada por um profissional experiente e sua análise será realizada no Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica (LIIM) localizado na Faculdade de Medicina da UFMG.

Os protocolos que serão aplicados não trazem riscos para o paciente. A desvantagem é que podem ser demorados e exigir paciência e concentração.

A coleta de sangue pode gerar dor e hematoma transitórios locais. Esse risco será minimizado por cuidados na punção, a qual será feita por um coletor experiente.

A participação é voluntária, sendo possível desistir em qualquer momento, sem qualquer mudança ou prejuízo no atendimento realizado de rotina no ambulatório. Não haverá remuneração para os participantes.

Os dados coletados são sigilosos e serão utilizados somente para o projeto de pesquisa. Somente os pesquisadores terão acesso aos mesmos. Em caso de publicação científica e atividades didáticas, os nomes dos pacientes não serão divulgados.

Eu, _____

compreendo as informações fornecidas acima, os objetivos e métodos a serem utilizados nesse projeto de pesquisa. Entendo que a participação é voluntária e desejo participar.

Estou ciente de que posso desistir a qualquer momento sem consequências ou prejuízo ao meu atendimento neste ambulatório.

Em caso de dúvidas posso entrar em contato com:

Antônio Lúcio Teixeira Jr. Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica (LIIM), sala 281, Faculdade de Medicina, UFMG. Avenida Professor Alfredo Balena, 190 - Santa Efigênia, Belo Horizonte. Tel: (31) 3409-8073. Correio eletrônico: altexr@gmail.com

Laura de Godoy Rousseff Prado Tel.: (31)88918764

A Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG poderá ser contatada pelo telefone (31) 3409-4592 ou no endereço Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II – 2º andar – Sala 2005 – Campus Pampulha – Belo Horizonte, MG, Brasil – CEP 31270-901.

PACIENTE	PESQUISADOR
IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE E/OU RESPONSÁVEL LEGAL	
Nome do paciente: _____	
Registro: _____	Identidade: _____ Data nascimento: ____/____/____
Sexo: <input type="checkbox"/> Masc <input type="checkbox"/> Fem	Tel: (____) _____
Endereço: _____	
Nome do responsável legal: _____	
Identidade: _____	Data nascimento: ____/____/____
Sexo: <input type="checkbox"/> Masc <input type="checkbox"/> Fem	Tel: (____) _____
Endereço: _____	