

**ALBERTO ANDRADE DE MELLO**

**Análise eletrofisiológica em doentes com esclerose lateral amiotrófica  
que receberam duas infusões de células-tronco mesenquimais no líquido**

**SÃO PAULO**

**2023**

**ALBERTO ANDRADE DE MELLO**

**Análise eletrofisiológica em doentes com esclerose lateral amiotrófica  
que receberam duas infusões de células-tronco mesenquimais no líquido**

**Versão Corrigida**

(Versão original encontra-se na unidade  
que aloja o Programa de Pós-graduação)

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo  
para a obtenção do título de Doutor em  
Ciências

Programa de Neurologia

Orientador: Dr. Gerson Chadi

Coorientador: Dr. Carlos Otto Heise

**SÃO PAULO**

**2023**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Mello, Alberto Andrade de  
Análise eletrofisiológica em doentes com  
esclerose lateral amiotrófica que receberam duas  
infusões de células-tronco mesenquimais no líquido /  
Alberto Andrade de Mello. -- São Paulo, 2023.  
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Neurologia.  
Orientador: Gerson Chadi.  
Coorientador: Carlos Otto Heise.

Descritores: 1.Esclerose lateral amiotrófica  
2.Células-tronco mesenquimais 3.Terapia celular  
4.Biomarcadores 5.Neurofisiologia 6.Eletromiografia  
7.Dinamometria manual

USP/FM/DBD-408/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## DEDICATÓRIA

*A toda a minha família, especialmente, à minha esposa Ana Carolina, à minha filha Manuela e aos meus pais Alex e Regina, pelo apoio incondicional sempre.*

*Aos pacientes portadores de esclerose lateral amiotrófica, que além de nobremente contribuírem com os avanços do conhecimento médico a respeito dessa enfermidade, são um exemplo de luta pela vida e nos ensinam diariamente.*

## AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Gerson Chadi**, sem ele nada disso teria sido possível. Chefe do estudo principal do qual este trabalho fez parte, foi uma inspiração para mim devido ao seu profundo conhecimento técnico e à sua capacidade de gerenciar brilhantemente e simultaneamente todos os aspectos desta pesquisa clínica. Sua forma de lidar com os inúmeros percalços que inevitavelmente ocorrem em um estudo dessa grandeza e a sua inabalável ética com todos da equipe e com os pacientes são pontos de destaque para mim. Será sempre uma pessoa cujos ensinamentos e atos tentarei levar adiante no decorrer da minha carreira e vida.

Ao **Prof. Dr. Carlos Otto Heise**, chefe do setor de eletroneuromiografia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, o qual me ajudou a delinear a condução dos aspectos eletrofisiológicos específicos desta pesquisa. Pessoa com capacidade intelectual incrível e ao mesmo tempo um ser humano simples, acolhedor, sempre disposto e disponível a ensinar e ajudar. Um professor nato que contagia todos ao seu redor.

Ao **Prof. Dr. Dagoberto Calegari**, o qual me selecionou para a vaga de assistente do setor de eletroneuromiografia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com o propósito inicial de realizar exames nos pacientes com suspeita de esclerose lateral amiotrófica. A partir desse ponto, iniciou-se meu estreito caminho junto a esses pacientes.

Agradeço ao **Dr. Marcio Luiz Escorcio Bezerra**, amigo e profundo conhecedor das técnicas utilizadas neste estudo e quem primeiro me ensinou a forma de realizar o MUNIX. Seus trabalhos nesse assunto serviram de importante alicerce para o atual estudo e foi a quem recorri quando necessitei discutir a respeito de pormenores técnicos e interpretação de alguns dados obtidos.

A todos os funcionários, colegas e estagiários do Laboratório de Neurologia Translacional do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM 45), em especial a **Dra. Jéssica Maximino** e a **Prof. Dra. Vania**

**Canterucci Gomide Cakmak**, que muito me ajudaram durante esta jornada e trabalharam arduamente para que o todo o projeto de pesquisa fosse realizado.

Ao **Prof. Dr. Mario Wilson Iervolino Brotto**, ex-chefe do setor de eletroneuromiografia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que foi a pessoa a qual me iniciou no aprendizado da eletroneuromiografia e me ensinou a valorizar e amar essa atividade que exerço diariamente.

Aos professores da minha residência médica de neurologia da Universidade Estadual de Campinas, **Prof. Dra. Anamarli Nucci** e **Prof. Dr. Marcondes Cavalcante França Junior**, cujo vasto conhecimento médico e trato extremamente humano para com os pacientes muito me marcaram durante a minha formação como neurologista e foram preponderantes para que eu direcionasse minha subespecialização rumo às doenças neuromusculares e à eletroneuromiografia.

Aos queridos amigos e colegas de trabalho de tantos anos, **Dr. Marcelo Zini Megale** e **Dra. Roberta Paiva Magalhães**, cuja parceria, momentos de discussão de dúvidas e ideias e compartilhamento de angústias colaboraram demais para efetivação deste trabalho.

Agradeço também a todos os funcionários do setor de eletroneuromiografia e do departamento de neurologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial a **Ruth, Elizete, Reiko, Sueli** e **Thais**, que sempre estiveram disponíveis a ajudar.

A todos os residentes e estagiários que passaram pelo setor de eletroneuromiografia durante a elaboração deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro nesse projeto, processo #401922/2014-6, e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Ao Núcleo de Tecnologia Celular da Pontifícia Universidade Católica do Paraná pela colaboração neste projeto, ao serem responsáveis pela produção das células-tronco mesenquimais.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este estudo fosse concluído.

*“Ao examinar as doenças, ganhamos sabedoria sobre anatomia, fisiologia e biologia.*

*Ao examinar a pessoa com doença, ganhamos sabedoria sobre a vida”*

*Oliver Sacks*

## NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

## SUMÁRIO

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**LISTA DE SÍMBOLOS**

**LISTA DE FIGURAS**

**LISTA DE TABELAS**

**RESUMO**

**ABSTRACT**

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>4</b>
2.1    Objetivo geral .....	5
2.2    Objetivos específicos.....	5
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>6</b>
3.1    Aspectos gerais da esclerose lateral amiotrófica.....	7
3.2    Epidemiologia .....	7
3.3    Características patológicas .....	8
3.4    Patogênese.....	9
3.5    Quadro clínico.....	13
3.6    Diagnóstico.....	14
3.7    Tratamento .....	16
3.8    Células-tronco e a ELA .....	17
3.9    Biomarcadores e a ELA .....	20
3.9.1    Biomarcadores bioquímicos.....	21
3.9.1.1    Proteínas do neurofilamento .....	21
3.9.1.2    Níveis de SOD1 no LCR .....	22
3.9.1.3    Domínio extracelular do receptor de neurotrofina p75 (p75ECD) na urina .....	23
3.9.1.4    Dosagem de DPR no LCR na ELA com mutação no gene C9orf72	23
3.9.2    Biomarcadores de imagem .....	23
3.9.2.1    Imagem de RM ou TC do sistema nervoso central.....	24
3.9.2.2    Ressonância magnética de nervo periférico e músculo .....	25
3.9.3    Biomarcadores eletrofisiológicos.....	26
3.9.3.1    Potencial de ação muscular composto (PAMC) .....	26
3.9.3.2    Índice neurofisiológico (IN) .....	27
3.9.3.3    Estimativa do número de unidades motoras (MUNE).....	27

3.9.3.4	<i>Compound muscle action potential (CMAP) scan</i> MUNE (MScan)	29
3.9.3.5	Índice do número de unidades motoras (MUNIX)	29
3.9.3.6	Índice do tamanho de unidades motoras (MUSIX)	30
3.9.3.7	Miografia por impedância elétrica (MIE)	31
3.9.3.8	Excitabilidade axonal	31
3.9.3.9	Estimulação magnética transcraniana (EMT)	32
3.10	Avaliações clínicas no seguimento de doentes com ELA	32
3.10.1	Escala revisada da graduação funcional da ELA (ALSFRS-R)	32
3.10.2	Capacidade vital forçada (CVF)	33
3.10.3	Dinamometria manual	33
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>35</b>
4.1	Sujeitos da pesquisa	36
4.2	Critérios de inclusão e exclusão	36
4.3	As CMT, dose e administração	37
4.4	Avaliações eletrofisiológicas	38
4.5	Escala revisada da graduação funcional da ELA (ALSFRS-R)	45
4.6	Dinamometria manual	46
4.7	Períodos de avaliações	46
4.8	Análise estatística	47
4.8.1	Dos registos eletrofisiológicos	47
4.8.2	Das correlações de Pearson	49
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>51</b>
5.1	Descrição da amostra	52
5.2	Análise global	53
5.3	Análise individual	54
5.4	Análise da correlação de Pearson	59
5.4.1	Análise da correlação de Pearson entre o MUNIX e ALSFRS-R	59
5.4.2	Análise da correlação de Pearson entre o MUNIX e a dinamometria manual	62
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>65</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>73</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>75</b>
<b>9.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>85</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACP</b>	Músculo abductor curto do polegar
<b>ADM</b>	Músculo abductor do dedo mínimo
<b>ALSAQ-40</b>	Do inglês, <i>Amyotrophic Lateral Sclerosis Assessment Questionnaire</i>
<b>ALSFRS-R</b>	Escala revisada da graduação funcional da ELA
<b>Anvisa</b>	Agência nacional de vigilância sanitária
<b>CAPPesq</b>	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
<b>CMAP</b>	Do inglês, <i>compound muscle action potential</i>
<b>CTM</b>	Células-tronco mesenquimais
<b>CUMCI</b>	Contagem de unidades motoras em condições ideais ( <i>ideal case motor unit count</i> )
<b>CVF</b>	Capacidade vital forçada
<b>DFT</b>	Demência frontotemporal
<b>DM</b>	Dinamometria manual
<b>DPR</b>	Do inglês, <i>dipeptide repeat proteins</i>
<b>DTI</b>	Do inglês, <i>diffusion tensor imaging</i>
<b>ELA</b>	Esclerose lateral amiotrófica
<b>ELAe</b>	Esclerose lateral amiotrófica esporádica
<b>ELAf</b>	Esclerose lateral amiotrófica familiar
<b>ENMG</b>	Eletroneuromiografia
<b>EMT</b>	Estimulação magnética transcraniana
<b>FDA</b>	Do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
<b>FDG</b>	Fluorodesoxiglicose
<b>FUS</b>	Do inglês, <i>RNA-binding protein Fused in sarcoma</i>
<b>GEE</b>	Equações de estimativas generalizadas
<b>HCFMUSP</b>	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
<b>IN</b>	Índice neurofisiológico
<b>LCR</b>	Líquor ou líquido cefalorraquidiano
<b>MIE</b>	Miografia por impedância elétrica
<b>MRC</b>	Do inglês, <i>Medical Research Council scale</i>

<b>MScan</b>	Do inglês, <i>compound muscle action potential scan</i> MUNE
<b>MSCs</b>	Do inglês, mesenchymal stem cells
<b>MUNE</b>	Do inglês, <i>motor unit number estimation</i> (estimativa do número de unidades motoras)
<b>MUNIX</b>	Do inglês, <i>motor unit number index</i> (índice do número de unidades motoras)
<b>MUSIX</b>	Do inglês, <i>motor unit size index</i> (índice do tamanho de unidades motoras)
<b>NfL</b>	Neurofilamentos de cadeia leve
<b>NMI</b>	Neurônios motores inferiores
<b>NMS</b>	Neurônios motores superiores
<b>OPTN</b>	Do inglês, <i>proteins optineurin</i>
<b>PAMC</b>	Potencial de ação muscular composto
<b>PET-FDG</b>	Tomografia por emissão de pósitrons com fluorodeoxiglicose
<b>PIDM</b>	Músculo primeiro interósseo dorsal da mão
<b>PIS</b>	Padrão de interferência de superfície
<b>pNfH</b>	Neurofilamentos de cadeia pesada fosforilados
<b>p75ECD</b>	Domínio extracelular do receptor de neurotrofina p75
<b>p75NTR</b>	Receptor de neurotrofina p75
<b>RM</b>	Ressonância magnética
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>SBNC</b>	Sociedade Brasileira de Neurofisiologia Clínica
<b>SOD1</b>	Superóxido dismutase 1
<b>SQSTM1/p62</b>	Do inglês, <i>sequestosome 1</i>
<b>TA</b>	Músculo tibial anterior
<b>TBK1</b>	Do inglês, <i>TANK-binding kinase 1</i>
<b>TC</b>	Tomografia computadorizada
<b>TLD</b>	Tempo de latência distal
<b>TDP-43</b>	Do inglês, <i>transactive DNA-binding protein 43</i>
<b>TSPO</b>	18 kDa proteína translocadora
<b>VCP</b>	Do inglês, <i>valosin-containing protein</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>Hz</b>	Hertz
<b>kHz</b>	Quilohertz
<b>mA</b>	Miliampere
<b>ms</b>	Milisse segundos
<b>mV</b>	Milivots
<b>mV/ms</b>	Milivots por milisse segundos
<b>μV</b>	Microvolts

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Os três principais processos patogênicos na ELA.....	12
Figura 2 – Mecanismos potenciais da eficácia de células-tronco mesenquimais na neurodegeneração .....	18
Figura 3 – Fluxograma do percurso das CTM desde o aspirado da medula óssea até as infusões destas nos doentes com ELA do projeto .....	37
Figura 4 – Imagem ilustrativa da técnica utilizada para a obtenção do PAMC do ACP à esquerda. O registro do PAMC deste mesmo músculo é mostrado à direita.....	39
Figura 5 – Imagem ilustrativa da técnica utilizada para a obtenção do PAMC do ADM à esquerda. O registro do PAMC deste mesmo músculo é mostrado à direita.....	40
Figura 6 – Imagem ilustrativa da técnica utilizada para a obtenção do PAMC do PIDM à esquerda. O registro do PAMC deste mesmo músculo é mostrado à direita.....	40
Figura 7 – Registro da sequência de 20 estímulos supramáximos no nervo ulnar com captação no músculo ADM com objetivo de calcular a persistência da onda F .....	42
Figura 8 – Imagem ilustrativa da técnica utilizada para obtenção do PAMC do TA .....	43
Figura 9 – Registro do PAMC do músculo ADM direito.....	43
Figura 10 – Registro dos PIS no músculo ADM direito.....	44
Figura 11 – Representação numérica dos valores obtidos dos PIS no músculo ADM direito.....	44
Figura 12 – Representação gráfica dos valores obtidos a partir da coleta de 10 PIS no músculo ADM direito.....	45
Figura 13 – Representação dos doentes da coorte e indicação do número de parâmetros eletrofisiológicos positivamente modificados de acordo com o nível de significância estatística ( $p \leq 0,05$ ou $p \leq 0,1$ ) ao longo do estudo .....	58
Figura 14 – Correlação de Pearson entre os parâmetros MUNIX no músculo ACP e a ALSFRS-R .....	60
Figura 15 – Correlação de Pearson entre os parâmetros MUNIX no músculo ADM e a ALSFRS-R .....	60
Figura 16 – Correlação de Pearson entre os parâmetros MUNIX no músculo PIDM e a ALSFRS-R .....	61
Figura 17 – Correlação de Pearson entre os parâmetros MUNIX no músculo ACP e a dinamometria manual .....	62

Figura 18 – Correlação de Pearson entre os parâmetros MUNIX no músculo ADM e a dinamometria manual .....	63
Figura 19 – Correlação de Pearson entre os parâmetros MUNIX no músculo PIDM e a dinamometria manual .....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Períodos das avaliações .....	46
Tabela 2 – Descrição da amostra .....	52
Tabela 3 – Análise global dos dados eletrofisiológicos.....	54
Tabela 4 – Análise individual de estratificação exploratória com base em critérios numéricos .....	55
Tabela 5 – Análise individual de estratificação exploratória com base em significância estatística $p \leq 0,1$ .....	56
Tabela 6 – Análise individual de estratificação exploratória com base em significância estatística $p \leq 0,05$ .....	57
Tabela 7 – Indicação dos sujeitos responsivos com valor de $p$ com significância estatística .....	59
Tabela 8 – Análise da correlação de Pearson entre os parâmetros do MUNIX e da ALSFRS-R .....	61
Tabela 9 – Análise da correlação de Pearson entre os parâmetros do MUNIX e a dinamometria manual (DM) .....	64

## RESUMO

Mello AA. Análise eletrofisiológica em doentes com esclerose lateral amiotrófica que receberam duas infusões de células-tronco mesenquimais no líquido. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Ensaio clínico fase 1/2 analisou a evolução de parâmetros eletrofisiológicos em 28 sujeitos com esclerose lateral amiotrófica (ELA) em períodos definidos antes e após duas infusões intratecais de células-tronco mesenquimais (CTM). Os objetivos incluíram a análise da pertinência metodológica dos registros eletrofisiológicos no acompanhamento da evolução da doença e de possíveis efeitos da terapia celular. O índice número de unidades motoras (MUNIX) foi correlacionado com os dados da escala revisada da graduação funcional da ELA (ALSFRS-R) e da dinamometria manual (DM). A avaliação comparativa dos registros pré e pós-infusão das CTM utilizou o *slope* desses dados. Os resultados do estudo foram separados em análise global e individual. A análise global utilizou a média dos *slopes* e a análise individual usou o valor dos *slopes* de cada doente. Os dados do período pré-infusão foram comparados com aqueles do período pós-infusão nos momentos 90, 180 e 210 dias após a primeira infusão de CTM em ambas as análises. A análise global dos resultados indicou o início do processo de reinervação no músculo tibial anterior apenas no período pós-infusão por meio dos registros obtidos do índice do tamanho de unidades motoras (MUNIX),  $p \leq 0,05$ . A análise individual identificou doentes responsivos e não responsivos, sendo que três deles apresentaram resposta estatística,  $p \leq 0,05$ , em pelo menos dois parâmetros eletrofisiológicos do mesmo músculo e em dois ou mais momentos consecutivos. Os estudos das correlações de Pearson realizados entre a média do valor do MUNIX e a média do valor da ALSFRS-R e da DM apresentaram correlação linear positiva e estatisticamente significativa no conjunto das 10 visitas,  $p < 0,05$ . As correlações entre os registros do MUNIX nos músculos estudados e da ALSFRS-R individualizados por visita não mostram resultados estatisticamente significativos. Por outro lado, as correlações entre os registros do MUNIX e da DM individualizados por visita mostraram ser lineares positivas em todas, exceto em uma visita, e resultados com significância estatística foram identificados. Conclui-se que a metodologia adotada foi adequada ao seguimento dos doentes com ELA. Registros eletrofisiológicos foram capazes de identificar possíveis efeitos das infusões das CTM.

Palavras-chave: Esclerose lateral amiotrófica. Células-tronco mesenquimais. Terapia celular. Biomarcadores. Neurofisiologia. Eletromiografia. Dinamometria manual.

## ABSTRACT

Mello AA. Electrophysiological analysis of patients with amyotrophic lateral sclerosis who received two infusions of mesenchymal stem cells into the cerebrospinal fluid. [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Phase 1/2 clinical trial analyzed the evolution of electrophysiological parameters in 28 subjects with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in defined periods before and after two intrathecal infusions of mesenchymal stem cells (MSCs). The objectives included analyzing the relevance of electrophysiological records in monitoring the evolution of the disease and possible effects of cell therapy. The motor unit number index (MUNIX) was correlated with data from the revised ALS functional grading scale (ALSFRS-R) and manual dynamometry (MD). The comparative evaluation of pre- and post-infusion MSCs records used the slope of these data. The study results were separated into global and individual analysis. The global analysis used the average of the slopes and the individual analysis used the slope value of each patient. Data from the pre-infusion period were compared with data from the post-infusion period at 90, 180 and 210 days after the first MSCs infusion in both analyses. The global analysis of the data indicated the beginning of the reinnervation process in the tibialis anterior muscle only in the post-infusion period through the records obtained from the motor unit size index (MUSIX),  $p \leq 0.05$ . The individual analysis identified responsive and non-responsive patients, with three patients showing a statistical response,  $p \leq 0.05$ , in at least two electrophysiological parameters of the same muscle and at two or more consecutive moments. Pearson correlation studies carried out between the mean MUNIX value and the mean ALSFRS-R and MD values showed a positive and statistically significant linear correlation in the set of ten visits,  $p < 0.05$ . The correlations between the MUNIX records and the ALSFRS-R individualized per visit do not show statistically significant results. On the other hand, the correlations between MUNIX and MD records individualized by visit proved to be positive linear in all but one visit and results with statistical significance were identified. It is concluded that the methodology adopted was appropriate for monitoring patients with ALS. Electrophysiological recordings were able to identify possible effects of MSCs infusions.

Descriptors: Amyotrophic lateral sclerosis. Mesenchymal stem cells. Cell therapy. Biomarkers. Neurophysiology. Electromyography. Manual dynamometry.

## **1. INTRODUÇÃO**

---

## 1. INTRODUÇÃO

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é a forma mais comum de doença do neurônio motor e acomete os neurônios motores superiores (NMS) e os neurônios motores inferiores (NMI). A insuficiência respiratória é geralmente a causa da morte dos doentes com ELA após cerca de três a quatro anos do início dos sintomas (van Es et al., 2017).

Disfunções genéticas e processos fisiopatológicos variados contribuem para o desenvolvimento da ELA, e o entendimento dessa heterogeneidade é necessário para o surgimento de tratamentos eficazes para a doença (van Es et al., 2017). Nenhum tratamento atualmente é capaz de interromper ou reverter a progressão da doença (Petrou et al., 2016).

Nesse cenário, instituições médicas de pesquisa deflagram ensaios clínicos com células-tronco em doentes com a ELA, examinando possíveis efeitos na sobrevida ou na qualidade de vida dos doentes.

Células-tronco são consideradas para fins terapêuticos em doenças neurodegenerativas como a ELA, doença de Parkinson, doença de Alzheimer e atrofia de múltiplos sistemas, seja com o objetivo de substituir células perdidas ou de melhorar a sobrevivência de células restantes (Baloh et al., 2018). As abordagens atuais na ELA buscam prolongar a sobrevivência e a função neuronal por meio de efeitos parácrinos ou da produção de células da glia, devido aos desafios que envolveriam a reconstrução completa de circuitos neuronais motores em doentes adultos (Mazzini et al., 2012; Petrou et al., 2016; Baloh et al., 2018).

Estudos que visam verificar a segurança e a viabilidade dos tipos de transplante celulares na ELA foram concluídos recentemente ou ainda estão em andamento. Ensaios clínicos atuais mostraram que as células-tronco mesenquimais (CTM) autólogas podem ser injetadas com segurança por via intratecal. Os efeitos das CTM no tratamento da ELA ainda carecem de comprovação (Baloh et al., 2018; Goutman et al., 2019).

Nesse contexto, a identificação de biomarcadores ganhou destaque no desenvolvimento de ensaios clínicos ou terapias para a ELA (Benatar et al., 2016). O uso de biomarcadores confiáveis na ELA pode melhorar a estratificação de doentes,

aumentar o poder estatístico e fornecer desfechos quantitativos de forma a elevar a eficácia dos ensaios clínicos (Chiò e Traynor, 2015).

Métodos eletrofisiológicos podem ser utilizados no seguimento clínico de progressão e na avaliação dos efeitos terapêuticos na ELA (Benatar et al., 2016). Biomarcadores neurofisiológicos possibilitam o diagnóstico precoce e, portanto, a instituição de estratégias de gerenciamento e recrutamento para ensaios terapêuticos, ao fornecerem medidas objetivas de disfunção dos NMS e NMI na ELA. Além disso, os biomarcadores neurofisiológicos podem servir como métodos não invasivos de avaliação em ensaios clínicos terapêuticos e fornecer pistas sobre os mecanismos das doenças que podem levar à descoberta de novos alvos terapêuticos (Vucic e Rutkove, 2018).

Alguns candidatos a biomarcadores eletrofisiológicos na ELA incluem o potencial de ação muscular composto (PAMC), o índice neurofisiológico (IN), o índice do número de unidades motoras (MUNIX) e o índice do tamanho de unidades motoras (MUSIX).

Este estudo é pioneiro na realização dos registros eletrofisiológicos seriados do PAMC, IN, MUNIX E MUSIX no seguimento evolutivo de doentes com ELA submetidos à infusão de duas doses intratecais de CTM autólogas derivadas da medula óssea. A literatura é escassa a respeito desse tema.

**2. OBJETIVOS**

---

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Estudar registros eletrofisiológicos sequencialmente obtidos nos doentes com ELA submetidos à infusão de duas doses intratecais de CTM.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Avaliar a pertinência metodológica dos registros eletrofisiológicos no seguimento dos doentes com ELA submetidos à infusão de duas doses intratecais de CTM.

2. Identificar possíveis efeitos das CTM nos doentes com ELA por meio de registros eletrofisiológicos realizados em sete visitas após a primeira injeção de CTM, comparados com os registros de três visitas anteriores às injeções.

3. Correlacionar o resultado dos registros eletrofisiológicos do MUNIX com os dados obtidos na escala revisada da graduação funcional da ELA (ALSFRS-R) e na dinamometria manual.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

---

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 Aspectos gerais da esclerose lateral amiotrófica**

A ELA é a doença mais frequente do neurônio motor e, caracteristicamente, acomete os NMS e NMI. A descrição original da doença é atribuída ao neurologista francês Jean-Martin Charcot em 1869 (Rowland, 2001). A ELA é conhecida também pelo epônimo doença de Lou Gehrig em referência ao nome do jogador norte-americano de beisebol que foi afetado por esta doença.

A perda dos NMI, os quais se estendem dos núcleos motores do tronco cerebral e do corno anterior da medula espinhal aos músculos esqueléticos, leva a fraqueza muscular, atrofia, câimbras e fasciculações. Já o comprometimento dos NMS, cujo corpo celular se encontra na camada 5 do córtex cerebral motor e seus axônios formam os tratos corticoespinhal e corticobulbar, leva a espasticidade, hiperreflexia, fraqueza e surgimento de reflexos patológicos. As consequências da afecção dos NMI são as principais responsáveis pela mortalidade nesta doença (Oskarsson et al., 2018).

Dados de imagem e neuropatológicos indicam o envolvimento não motor na ELA em estudos recentes (Hardiman et al., 2017). A associação da doença com distúrbios cognitivos, demência, anormalidades sensitivas e autonômicas sugere que a ELA não esteja restrita ao território motor (Cellura, 2011). O reconhecimento do envolvimento não motor na ELA permite, de fato, cuidados clínicos mais acurados e fornece conhecimentos novos a respeito da patogênese da doença (Oskarsson et al., 2018).

#### **3.2 Epidemiologia**

A taxa de incidência da ELA na Europa e na América do Norte varia entre 1,5 e 2,7 por 100.000 pessoas/ano, enquanto a taxa de prevalência varia entre 2,7 e 7,4 por 100.000 pessoas/ano (Worms, 2001; Logroscino et al., 2010; Jordan et al., 2015; Mehta et al., 2018). A doença é mais frequente em homens do que em mulheres, na proporção de 1,3 a 1,5:1, e fica próxima de 1:1 na faixa etária acima dos 70 anos. A incidência da ELA aumenta com a faixa etária e atinge o pico aos 74 anos, a partir do qual passa a diminuir (Mehta et al., 2018). Revisão sistemática importante mostrou pico de

incidência do início da ELA entre 60 e 75 anos na maioria dos estudos (Chiò et al., 2013). Estudos de base populacional mostram a média de sobrevivência do doente com ELA em torno de dois a três anos após o início dos sintomas, sendo a falência respiratória a principal causa de morte (Oskarsson et al., 2018). Adicionalmente, estudos também mostram que a taxa de progressão da doença é mais rápida nos doentes com idade de início mais avançada, na forma bulbar da ELA, nos casos com comprometimento cognitivo e naqueles com certos genótipos específicos (Al-Chalabi e Hardiman, 2013).

A ELA é classificada em formas esporádica (ELAe) e familiar (ELAf), nesta última sendo mais frequente o padrão de herança autossômico dominante. A forma familiar representa de 5 a 10% de todos os casos da doença (Byrne et al., 2011). A expansão repetida do hexanucleotídeo G4C2 no gene *C9orf72* é a causa genética mais comum de ELAf e representa cerca de 30 a 40% desses casos. Esta mesma alteração gênica também é causa de demência frontotemporal (DFT) (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011). As mutações nos genes *C9orf72*, superóxido dismutase 1 (SOD1) e *RNA-binding protein Fused in sarcoma* (FUS) representam mais de 50% dos casos de ELAf. Cerca de outros 30 genes já foram identificados como possíveis causadores da doença, aumentando o seu risco de desenvolvimento ou acelerando sua progressão (Oskarsson et al., 2018).

Os únicos fatores de risco já estabelecidos para o desenvolvimento da ELA são a idade e história familiar. Tabagismo, propensão ou atividade atlética, serviço militar, traumatismo craniano, campos eletromagnéticos, produtos químicos agrícolas, exposição ao chumbo e outros metais pesados carecem de comprovação científica como possíveis fatores de risco para ELA (Oskarsson et al., 2015).

### **3.3 Características patológicas**

O achado patológico principal na ELA é a morte de neurônios motores no córtex motor, no tronco encefálico e na medula espinhal. A degeneração dos axônios corticoespinhais causa afinamento e cicatrização dos aspectos laterais da medula espinhal. A morte dos neurônios motores do tronco encefálico e da medula espinhal torna as raízes ventrais mais finas e acarreta a amiotrofia dos músculos da língua, da orofaringe e dos membros (Brown e Al-Chalabi, 2017).

A degeneração dos neurônios motores é acompanhada de processos neuroinflamatórios, com proliferação de células da astróglia, micróglia e oligodendróglia (Philips e Rothstein, 2014; Kang et al., 2013). Característica comum nos casos da ELA familiar e esporádica é a agregação de proteínas citoplasmáticas, com destaque, mas não exclusivamente, nos neurônios motores. Isso é exemplificado pela *TAR DNA-binding protein 43* (TDP-43), que em muitos casos de ELA é clivada, hiperfosforilada e acumulada no citoplasma das células (Neumann et al., 2006). Agregados de ubiquitina 2 também são comuns (Deng et al., 2011), assim como os depósitos intracitoplasmáticos do tipo selvagem de SOD1 (Bosco et al., 2010a). Depósitos de proteínas que mostram evidências de ubiquitinação e filamentos de TDP-43 ubiquitinados são proeminentes nos neurônios motores tanto na fase pregressa quanto na fase terminal de atrofia do corpo celular. Descrições patológicas subsidiadas pela alta diversidade da doença ressaltam que determinados agregados são detectados em subtipos específicos da ELA, por exemplo, a presença de agregados de dipeptídeos e de depósitos de RNA intranucleares na ELA causada pela mutação do gene C9orf72 (Brown e Al-Chalabi, 2017).

Ressaltam-se ainda as observações da redução da densidade das fibras sensoriais mielinizadas na ELA em aproximadamente 30% nos nervos periféricos, apesar do envolvimento sensorial não ser clinicamente evidente na doença (Bradley et al., 1983).

### **3.4 Patogênese**

Informações a respeito das características neuropatológicas e mutações genéticas associadas à ELA contribuíram para o conhecimento de sua patogênese (Oskarsson et al., 2018).

O estudo da patogênese da ELA deve incluir suas formas familiares e esporádicas, bem como considerar sua diversidade fenotípica. A presunção geral é que a doença reflita a interação adversa entre fatores genéticos e ambientais. Visão alternativa postula que todos os casos de ELA são consequência principalmente de fatores genéticos complexos (Brown e Al-Chalabi, 2017). Perspectivas sugerem que a patogênese da ELA envolva processo de várias etapas (Al-Chalabi et al., 2014).

A ELAf e a ELAe apresentam semelhanças nas suas características patológicas e clínicas que sugerem convergência de eventos celulares e moleculares que culminam

com a degeneração dos neurônios motores (Brown e Al-Chalabi, 2017). Visão atual dos genes envolvidos na ELA é que eles se agrupam em três categorias, isto é, envolvem a homeostase proteica, a homeostase e o tráfego de RNA e a dinâmica citoesquelética (Peters et al., 2015).

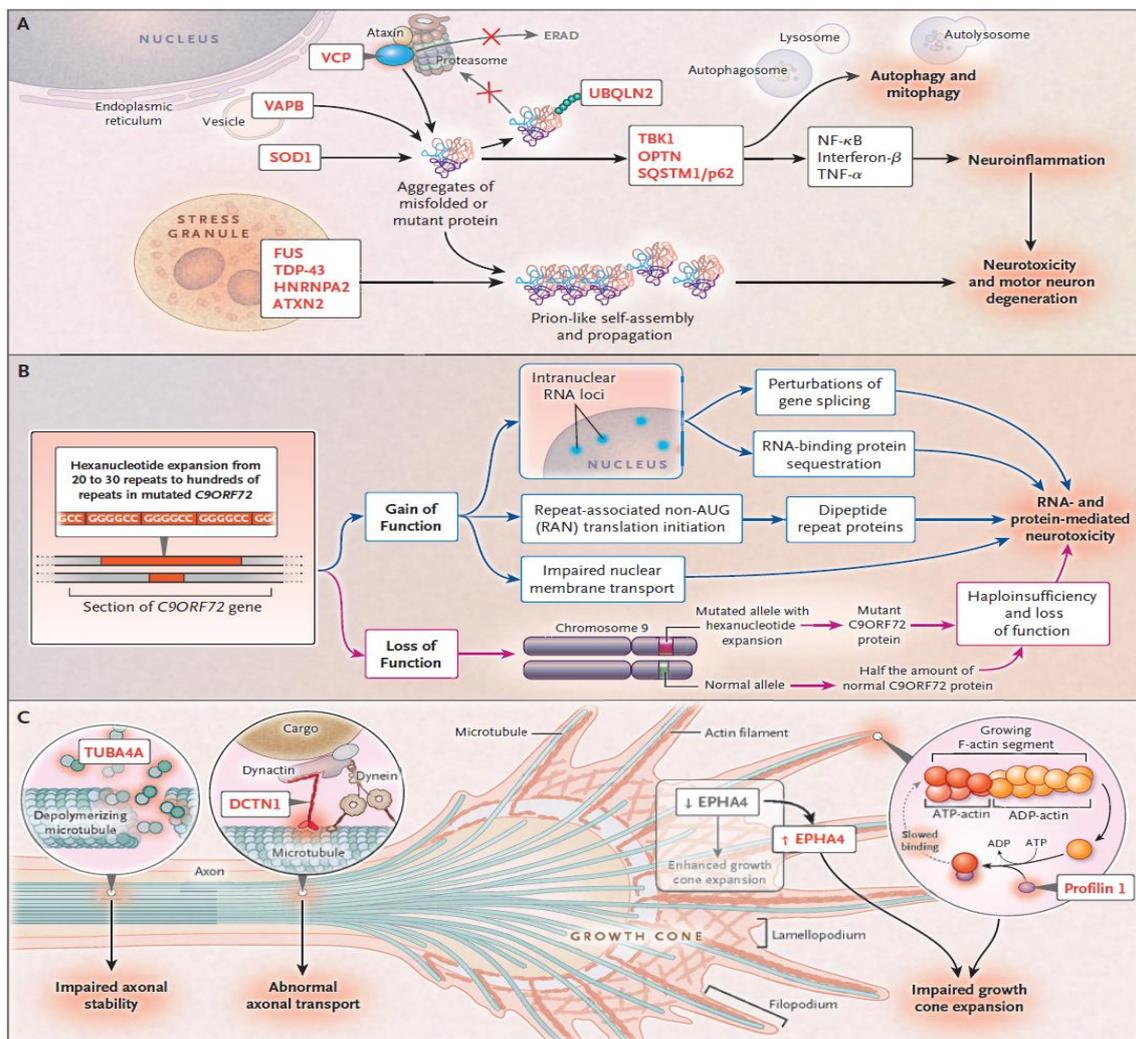
Os genes que influenciam a homeostase proteica formam a primeira categoria. O achado patológico mais investigado na ELA é o acúmulo de proteínas agregadas e defeitos correspondentes nas vias celulares para degradação proteica. A proteína SOD1 mutante induz agregados de proteínas que são potencialmente tóxicos para os neurônios motores (Andersen, 2006). Genes que codificam proteínas adaptadoras envolvidas na manutenção e degradação proteica também estão implicados na ELA, por exemplo, a *valosin-containing protein* (VCP), *proteins optineurin* (OPTN), *TANK-binding kinase 1* (TBK1) e *sequestosome 1* (SQSTM1/p62) (Brown e Al-Chalabi, 2017).

Os genes que influenciam a homeostase e tráfego de RNA formam a categoria que se expande mais rapidamente e codificam proteínas que interagem com o RNA. A primeira proteína a ser descoberta foi a TDP-43 (Neumann et al., 2006), cuja localização incorreta no citosol, clivagem, fosforilação e ubiquitinação foram inicialmente evidenciadas na ELAe e na DFT. No entanto, observou-se que mutações no gene TARDBP, que codifica a proteína TDP-43, podem também causar ELAf (Sreedharan et al., 2008). O gene FUS codifica outra proteína de ligação ao RNA chamada *fused in sarcoma*, homóloga a TDP-43, que na forma mutante também causa ELA (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009). A razão dos genes mutantes que codificam proteínas de ligação ao RNA causarem ELA não está clara. Essas proteínas têm múltiplas funções no *splicing* de genes, na vigilância do material transcrito após o *splicing*, na geração de microRNA e em processos biológicos axonais. A maioria dessas proteínas possui domínios de baixa complexidade que permitem ligações não seletivas ao RNA e a outras proteínas. As mutações relacionadas a ELA aumentam a propensão dessas ligações, levando à automontagem das proteínas e à formação de agregados (Kim et al., 2013). Essa autoagregação é facilitada em grânulos de estresse, que são estruturas não ligadas à membrana, formados sob estresse celular e que contêm complexos de RNA parados na fase de tradução (Bosco et al., 2010b; Li et al., 2013). A automontagem de proteínas mutantes de ligação ao RNA pode induzir conformações tóxicas e autopropagadoras que disseminam doença dentro e entre as células de maneira análoga a das proteínas priônicas (Brown e Al-Chalabi, 2017).

O gene mutado mais comumente na ELA é o C9orf72 (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011). A proteína do gene C9orf72 tem papel no tráfego e na autofagia das membranas nucleares e endossômicas. Um trecho não codificador de seis nucleotídeos é repetido até aproximadamente 30 vezes em pessoas normais. Expansões desse segmento para centenas ou milhares de repetições causam ELAf e DTF, além de também poderem levar a ELAe. Vários mecanismos podem contribuir para a neurotoxicidade da expansão de hexanucleotídeos. O material transcrito do gene danificado é depositado no núcleo celular, formando focos de RNA que sequestram proteínas nucleares. Parte do RNA expandido escapa para o citoplasma, onde gera cinco repetições de dipeptídeos potencialmente tóxicas. Estudos recentes mostraram também defeito no transporte através da membrana nuclear em células com expansões do gene C9orf72 (Freibaum et al., 2015; Zhang et al., 2015). Além disso, a expansão pode levar à expressão reduzida dos níveis de proteína do gene C9orf72, causando doença por mecanismo de perda de função (Ciura et al., 2013).

Três genes relacionados ao desenvolvimento da ELA codificam proteínas importantes na manutenção das dinâmicas normais do citoesqueleto. Dímeros do gene TUBA4A são componentes de microtúbulos cuja integridade é essencial para a estrutura axonal. O gene DCTN1 é implicado no transporte axonal retrógrado e o gene PFN1 participa da conversão de actina globular em filamentososa e em extensão nervosa. Níveis mais baixos de expressão do gene modificador EPHA4 correlacionam-se com maior sobrevivência na ELA, talvez por permitir extensão axonal mais exuberante (Brown e Al-Chalabi, 2017).

Anormalidades celulares diversas surgem como resultado da atuação de cada categoria, incluindo a deposição de proteínas intranucleares e citosólicas, agregados de RNA, distúrbios dos mecanismos de degradação de proteínas, disfunção mitocondrial, estresse do retículo endoplasmático, tráfego nucleocitoplasmático defeituoso, excitabilidade neuronal e transporte axonal alterados. Esses eventos, na maioria dos casos, ativam e recrutam células não neuronais como astrócitos, microglia e oligodendroglia, que exercem influências positivas e negativas na viabilidade do neurônio motor. Essas anormalidades podem afetar de forma mais ou menos seletiva o corpo celular, dendritos, axônios e junções neuromusculares (Brown e Al-Chalabi, 2017).



FONTE: Brown e Al-Chalabi, 2017 (Reproduzido com permissão de Brown e Al-Chalabi, 2017, Copyright Massachusetts Medical Society)

Figura 1 – Os três principais processos patogênicos na ELA

As vias que relacionam as proteínas implicadas, em vermelho, e as estruturas e moléculas celulares-chave, em cinza, são mostradas. Eventos disfuncionais resultante estão apontados pelas setas em preto. O painel A mostra homeostase proteica alterada na ELA. Muitos genes da ELA codificam proteínas adaptadoras que são críticas na degradação de proteínas e agem no nível do retículo endoplasmático, isto é, degradação proteica associada ao retículo endoplasmático e através de vias proteossômicas e autofágicas. As proteínas de ligação ao RNA podem se automontar para formar agregados. O painel B mostra mecanismos da doença relacionados ao gene *C9orf72*. A toxicidade da expansão de repetições de hexanucleotídeos no gene *C9orf72* produz: deposição de RNA intranuclear, que resulta em perturbações no *splicing* de genes e sequestro de proteínas de ligação ao RNA; tradução de polipeptídeos do DNA expandido, que leva à repetição de dipeptídeos tóxicos; distúrbios do transporte núcleo-citoplasmático; e níveis reduzidos da proteína *C9orf72* (haploinsuficiência). O painel C mostra alterações da dinâmica citoesquelética neuronal na ELA. Genes que codificam as proteínas *dynactin subunit 1* (gene *DCTN1*) e a *tubulin alpha-4A chain* (gene *TUBA4A*) são essenciais na manutenção da estrutura do axônio do nervo motor, e mutações nesses genes perturbam tanto a integridade quanto o transporte axonal. A proteína *profilin 1* (gene *PFN1*) é essencial para a montagem de axônios filamentosos e para a formação de cones de crescimento axonais distais. Mutações no *PFN1* e o aumento da expressão da proteína *EPH receptor A4* (gene *EPHA4*) diminuem a expansão do crescimento do axônio distal.

### 3.5 Quadro clínico

A perda dos neurônios motores resulta nos principais sinais e sintomas clínicos da ELA. A doença é comumente classificada levando-se em consideração o seu local de início. A manifestação clínica inicial da ELA pode ocorrer nas regiões craniana, cervical, torácica ou lombossacral e se apresentar como sinais e sintomas do acometimento dos NMS e ou NMI. A ELA de início espinhal representa cerca de 75% dos casos e caracteristicamente se inicia na musculatura inervada por neurônios espinhais, levando a fraqueza tanto proximal quanto distal nos membros superiores e ou inferiores (Worms, 2001). A ELA de início bulbar representa em torno de 25% dos casos, e os sintomas iniciais podem afetar a fala, a mastigação e a deglutição (Chiò et al., 2013).

Os principais sintomas relacionados ao acometimento dos NMS incluem lentidão de movimentos, incoordenação motora, espasticidade, hiperreflexia, fraqueza, disartria e disfagia (Oliveira e Pereira, 2009). Outro sintoma frequente envolve o afeto pseudobulbar, caracterizado por riso, choro ou bocejo inapropriados (Tortelli et al., 2016). A afecção dos NMI resulta principalmente em fraqueza, atrofia, fasciculações, câibras musculares, disartria, disfagia, dificuldade em sustentar a cabeça e em manter postura ereta e dispneia progressiva por fraqueza da musculatura diafragmática e intercostal (Oliveira e Pereira, 2009).

Os principais sintomas não motores relacionados a ELA compreendem alterações cognitivas, sensoriais, dor e disfunção autonômica.

O comprometimento cognitivo pode preceder ou suceder o acometimento dos NMS e NMI em doentes com ELA e é geralmente relacionado à disfunção executiva frontotemporal (Ringholz et al., 2005; Phukan et al., 2007). Aproximadamente 15% dos doentes com ELA atendem aos critérios de DFT (Ringholz et al., 2005).

Cerca de um terço dos doentes com ELA relatam sintomas sensoriais e apresentam amplitudes reduzidas de resposta sensitiva do nervo sural. Evidências de alterações patológicas foram encontradas em 91% dos doentes submetidos à biópsia do nervo sural. Os achados eletrofisiológicos e patológicos indicam padrão de perda axonal que afeta predominantemente fibras mielinizadas de grande calibre (Hammad et al., 2007).

O sintoma de dor é relatado pela maioria dos doentes com ELA. Ocorre em todos os estágios da doença e pode ser sintoma inicial que precede a disfunção motora (Chiò et al., 2017). Dor nociceptiva na ELA pode surgir de mobilidade reduzida, câibras musculares, espasticidade muscular e condições comórbidas (Handy et al., 2011; Chiò et al., 2017). Além disso, doentes com ELA podem apresentar dor com características neuropáticas como parestesia, alodinia, hiperalgesia. Revisão sistemática publicada em 2017 constatou que a prevalência de dor variou de 15 a 85% nesses doentes (Chiò et al., 2017).

Os sintomas autonômicos ocorrem em cerca de 29% dos doentes com ELA e são mais evidentes quando os NMS estão predominantemente envolvidos. Disfunção urinária ou gastrointestinal e intolerância ortostática são comuns (Piccione et al., 2015).

A variabilidade do predomínio do acometimento dos NMS ou NMI ressalta o espectro clínico das doenças do neurônio motor. A esclerose lateral primária compromete de forma isolada os NMS. A atrofia muscular progressiva acomete somente os NMI (Donaghy, 1999). A paralisia bulbar progressiva envolve a degeneração dos NMS e dos NMI restrita ao segmento bulbar. A *flail arm syndrome* caracteriza-se por fraqueza progressiva de predomínio na musculatura proximal dos membros superiores (Couratier et al., 2000). A *flail leg syndrome* caracteriza-se por fraqueza progressiva da musculatura distal dos membros inferiores (Wijesekera et al., 2009). A *flail arm syndrome* e a *flail leg syndrome* apresentam sobrevida melhor que as demais variantes da ELA (Wijesekera et al., 2009).

### **3.6 Diagnóstico**

Os critérios diagnósticos da ELA fundamentam-se em achados clínicos e estudos eletrofisiológicos estabelecidos com base na presença e topografia do envolvimento dos NMS e NMI. Os critérios de El Escorial da Federação Mundial de Neurologia foram desenvolvidos em 1994, inicialmente, para uso em pesquisas clínicas (Brooks, 1994) e revisados em 2000 (Brooks et al., 2000). Os critérios de Awaji da Federação Internacional de Neurofisiologia Clínica foram propostos em 2008 com o objetivo de aumentar a sensibilidade de detecção da doença (de Carvalho et al., 2008). Embora sejam semelhantes, estes últimos incorporaram dados neurofisiológicos no estabelecimento da presença de sinais de acometimento dos NMI e permitiram que a

presença de fasciculações na eletromiografia de agulha fosse usada como evidência de desnervação ativa em músculos com sinais de alterações neurogênicas. Costa et al. (2012) confirmaram que a incorporação dessas mudanças aos critérios de Awaji melhoraram a sensibilidade e não reduziram a especificidade do diagnóstico da ELA.

Os novos critérios diagnósticos de *Gold Coast* da Federação Internacional de Neurofisiologia Clínica simplificaram o diagnóstico da ELA. Eles incluem: comprometimento motor progressivo documentado por história ou avaliação clínica repetida, precedido por função motora normal; presença de disfunção do neurônio motor superior e inferior em pelo menos uma região do corpo ou disfunção do neurônio motor inferior em pelo menos duas regiões; por fim, investigações que excluam outros processos de doença (Shefner et al., 2020). Esses critérios apresentam sensibilidade diagnóstica similar aos critérios de El Escorial e Awaji (Hannaford et al., 2021). Sua precisão diagnóstica manteve-se independentemente da duração, do local de início da doença e do estado funcional do paciente (Vucic et al., 2021). Os critérios de Gold Coast apresentaram maior sensibilidade e especificidade em fenótipos atípicos da ELA em comparação aos outros dois critérios (Hannaford et al., 2021). No entanto, os critérios de El Escorial revisado ainda são os mais utilizados nos estudos clínicos.

Segundo os critérios de El Escorial revisados (Brooks et al., 2000), o diagnóstico da ELA requer: presença de evidência de degeneração dos neurônios motores inferiores por exame clínico, eletrofisiológico ou neuropatológico; evidência de degeneração dos neurônios motores superiores pelo exame clínico; e progressão dos sintomas ou sinais dentro de uma região ou para outras regiões, conforme determinado pela história ou pelo exame clínico. Além disso, exige a ausência de evidências eletrofisiológicas e patológicas de outras doenças que possam explicar os sinais de degeneração dos NMS e NMI e a ausência de evidências de neuroimagem de outros processos relativos aos aspectos clínicos e eletrofisiológicos observados.

O diagnóstico clínico da ELA, sem confirmação patológica, pode ser categorizado em níveis de certeza pela avaliação clínica isolada, dependendo da presença de sinais de acometimento dos NMS e NMI juntos, na mesma região anatômica topográfica no tronco encefálico ou na medula espinhal cervical, torácica ou lombossacral, e são definidos como:

- ELA clinicamente definida: apresenta sinais clínicos de acometimento dos NMS e NMI em três regiões espinhais ou sinais de comprometimento dos NMS e NMI na região bulbar e em pelo menos mais duas regiões espinhais.

- ELA clinicamente provável: apresenta sinais clínicos de acometimento dos NMS e NMI em pelo menos duas regiões com algum comprometimento dos NMS necessariamente rostral aos sinais dos NMI.

- ELA clinicamente provável com suporte laboratorial: apresenta sinais clínicos de acometimento dos NMS e NMI em apenas uma região, ou sinais clínicos de comprometimento apenas dos NMS em uma região e sinais de comprometimento dos NMI definidos pela eletroneuromiografia (ENMG) presentes em pelo menos duas regiões e com exames de neuroimagem e clínico-laboratoriais que excluam outras causas.

- ELA clinicamente possível: apresenta sinais clínicos de acometimento dos NMS e NMI juntos em apenas uma região, ou sinais clínicos de comprometimento apenas dos NMS em duas ou mais regiões ou sinais de comprometimento dos NMI rostralmente aos sinais de NMS, e o diagnóstico de ELA clinicamente provável com suporte laboratorial não pode ser provado por evidências em bases clínicas em conjunto com eletrodiagnósticos, neurofisiológicos, neuroimagem ou estudos laboratoriais clínicos. Outros diagnósticos devem ter sido excluídos para aceitar o diagnóstico de ELA clinicamente possível.

### **3.7 Tratamento**

Os tratamentos atuais para ELA não trazem melhora clínica significativa aos doentes. O riluzol foi aprovado em 1995 para o tratamento da ELA pela agência Food and Drug Administration (FDA). A droga inibe a liberação de glutamato. Geralmente é bem tolerada, mas estudos clínicos mostraram benefício de sobrevida de aproximadamente três meses dos doentes (Bensimon et al., 1994; Lacomblez et al., 1996). A droga edaravone foi aprovada em 2017 pelo FDA para uso na ELA. Possui via de administração intravenosa e age como depurador de radicais livres, reduzindo o estresse oxidativo. O edaravone foi capaz de diminuir a deterioração funcional em subgrupo de doentes com ELA, como demonstrada pela redução no declínio da escala

ALS Functional Rating Scale-Revised (ALSFRRS-R) em 33% durante o período de seis meses do estudo e, também, pela redução no declínio da escala ALS Assessment Questionnaire (ALSAQ-40) (Writing Group, 2017).

Estudo multicêntrico, randomizado e duplo-cego incluiu 137 participantes com diagnóstico de ELA definida e início dos sintomas a menos de 18 meses. O objetivo foi verificar a eficácia e segurança do uso do fenilbutirato de sódio e taurursodiol no tratamento desses pacientes. Os doentes foram aleatoriamente designados na proporção de 2:1 para receber fenilbutirato de sódio-taurursodiol ou placebo. O grupo que utilizou o fenilbutirato de sódio-taurursodiol apresentou declínio funcional mais lento do que o grupo placebo, conforme medido pela pontuação da ALSFRRS-R durante o período de 24 semanas. Os resultados secundários não foram significativamente diferentes entre os dois grupos. Ensaio clínico com maior tempo de seguimento e número de participantes são necessários para avaliar a eficácia e segurança do fenilbutirato de sódio-taurursodiol em doentes com ELA (Paganoni et al., 2020).

Terapias de suporte como a nutrição enteral via sonda ou ostomia, prevenção de aspiração por meio do controle de secreções salivares e do uso de dispositivos para ajudar a tosse, fornecimento de suporte ventilatório geralmente com pressão positiva de duas vias nas vias aéreas são de fato os pilares do tratamento dos doentes com ELA, visto os benefícios clínicos discretos das terapias medicamentosas para a doença (Brown e Al-Chalabi, 2017).

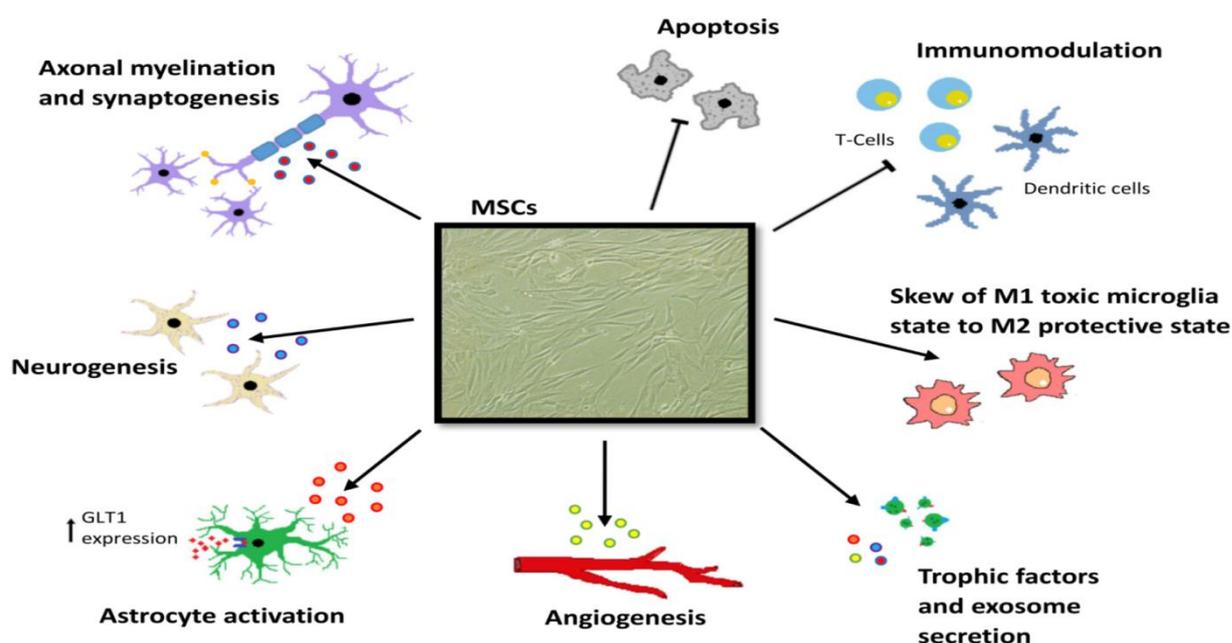
### **3.8 Células-tronco e a ELA**

Os benefícios em potencial dos tratamentos com células-tronco são exaltados em doenças humanas (Giordano et al., 2007). As CTM, em especial, são largamente estudadas inclusive em doenças neurodegenerativas (Abdallah e Kassem, 2008; Kim e de Vellis, 2009; Mazzini et al., 2012; Kim et al., 2013).

As CTM parecem ser o tipo de célula-tronco mais adequado disponível para terapia celular na ELA, pois a sua manipulação *ex vivo* é pequena, não recebem vetores virais e não estão atreladas à formação de teratomas, por serem células derivadas do indivíduo adulto (Lindvall et al., 2012). As CTM derivadas de células estromais da medula óssea foram capazes de aumentar a sobrevivência de roedores modelos da ELA

(Forostyak et al., 2011), e os mecanismos experimentais propostos para as ações destas células são múltiplos (Boucherie et al., 2009).

Os enxertos de células-tronco podem interagir com o tecido em degeneração e responder de modo específico, suprimindo eventos e necessidades locais por meio de mecanismos celulares e moleculares. Destaca-se a capacidade de as células enxertadas modularem os processos inflamatórios, citotóxicos, citoprotetivos e degenerativos, além dos mecanismos de reparo e cicatrização (Deans e Moseley, 2000; O'Connor e Boulis, 2012).



FONTE: Ciervo et al., 2017 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Figura 2 – Mecanismos potenciais da eficácia de células-tronco mesenquimais na neurodegeneração

As CTM transplantadas podem fornecer respostas terapêuticas graças a efeitos parácrinos e contatos célula a célula com células neurais residentes. A capacidade das CTM de secretar citocinas, fatores de crescimento e exossomos pode potencialmente induzir e apoiar processos de regeneração, incluindo angiogênese, sinaptogênese, remielinização axonal e neurogênese. Devido às suas propriedades imunomoduladoras, as CTM podem atenuar as respostas inflamatórias no sistema nervoso central inibindo maturação e migração de células dendríticas, supressão da ativação e proliferação de linfócitos e redução da gliose. Além disso, as CTM possuem propriedades antiapoptóticas e podem limitar a excitotoxicidade, modulando as funções dos astrócitos.

A ciência ainda deverá percorrer longo caminho até que se torne possível a neurosubstituição de neurônios doentes ou mortos pelas terapias com células-tronco, particularmente no caso das características específicas da perda neuronal na ELA (Faravelli et al., 2014; Silani et al., 2010). Neurônios motores podem ser facilmente diferenciados a partir das CTM *in vitro*, no entanto, a terapia celular com as CTM está

longe de impactar a reposição celular. Artíficos experimentais são capazes de aumentar o potencial benefício da reposição neuronal pela terapia com as CTM na ELA (Haidet-Phillips et al., 2011), contudo a recolocação de neurônios motores que restabeleçam a inervação de alvos distantes, como é o caso dos músculos estriados esqueléticos, ainda permeia o campo teórico. Além de suas fibras terem que vencer as barreiras da regeneração no sistema nervoso central (Lindvall et al., 2012), os axônios dos NMI em regeneração teriam o desafio adicional de sair do sistema nervoso central e chegar até a periferia (Boucherie et al., 2009; Forostyak et al., 2011).

Os efeitos das CTM nos mecanismos da ELA discutidos anteriormente podem sofrer influência do compartimento anatômico utilizado na administração das células. Estudos pré-clínicos utilizaram o parênquima cerebral e da medula espinhal, o espaço intratecal, o tecido muscular e o sistema venoso como vias de administração das células, cada um deles desenhado para o objetivo do estudo em questão (Lewis e Suzuki, 2014). A translação desses experimentos à prática clínica, entretanto, esbarra em diversas questões clínicas, metodológicas e éticas.

As CTM são extraídas por punção óssea juntamente com as células-tronco hematopoiéticas. As CTM podem ser isoladas e enriquecidas em laboratório, quando o centro de estudo tem as facilidades necessárias para o seu processamento. A maioria dos ensaios clínicos em andamento com células-tronco na ELA utiliza as CTM derivadas da medula óssea. Os enxertos clínicos das CTM no parênquima espinhal trazem preocupações relacionadas ao dano potencial às áreas não comprometidas com a doença ou ao aumento de lesões já estabelecidas (Karussis et al., 2010; Mazzini et al. 2012; Koh et al., 2012; Prabhakar et al., 2012).

Ensaio clínico fase 1/2 exploram a segurança e os indicativos de eficácia das CTM autólogas em certas doenças (Kan et al., 2007; Kebriaei e Robinson, 2011; Gnechi et al., 2012). Pode se concluir desses estudos que a administração intratecal das CTM é, no geral, segura e bem-tolerada. A eficácia do tratamento com as CTM na ELA ainda necessita ser demonstrada, mesmo porque os estudos realizados até o momento não foram apropriadamente desenhados para esse fim (Baloh et al., 2018).

Tratamento com células-tronco surge como candidato promissor para a ELA, pois a seletividade da morte dos neurônios motores está vinculada a mecanismos diversos e multifatoriais, tornando difícil a identificação de alvos terapêuticos

específicos para a doença (Cleveland e Rothstein, 2001; Kim et al., 2013; Thomsen et al., 2014; Alves et al., 2015).

### **3.9 Biomarcadores e a ELA**

Em 1998, os grupos de trabalho dos Institutos Nacionais de Definição de Biomarcadores de Saúde dos EUA definiram biomarcador como “uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos, ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica” (Strimbu e Tavel, 2010).

Biomarcadores clínicos são mais fáceis e baratos que a medição direta do desfecho clínico final e são medidos em período de tempo mais curto. Eles podem ser usados na triagem, no diagnóstico, na caracterização e no monitoramento de doenças, como indicadores prognósticos, para desenvolver intervenções terapêuticas individualizadas, para prever e tratar reações adversas a medicamentos, para identificar tipos de células e para estudos farmacodinâmicos e de resposta à dose. Conhecer a relação fisiopatológica entre o biomarcador e o desfecho clínico relevante é necessário para o entendimento do seu valor. Bons biomarcadores devem ser mensuráveis com pouca ou nenhuma variabilidade, devem ter adequada relação sinal-ruído e mudar rápida e confiavelmente em resposta a alterações na condição estudada ou na terapia instituída (Aronson e Ferner, 2017).

Biomarcadores na ELA são objeto de pesquisas e discussão nos últimos vinte anos. Biomarcadores sensíveis e específicos têm o potencial de ajudar clínicos e pesquisadores a entender melhor a doença, aprimorar o desenho de ensaios clínicos, desenvolver novas terapias e melhorar os resultados dos doentes. Poucos biomarcadores validados foram fornecidos até o momento, apesar de diversas pesquisas nessa área (Verber et al., 2019).

Candidatos a biomarcadores na ELA podem ser categorizados segundo sua função diagnóstica, prognóstica e preditiva, farmacodinâmica e de monitoramento da progressão de doença. Doentes com ELA podem apresentar, inicialmente, sinais e sintomas sutis, e, em média, há intervalo de tempo de 12 meses entre o início dos sintomas e o diagnóstico da doença (Mitchell et al., 2010). Biomarcadores diagnósticos poderão ajudar no diagnóstico precoce da ELA e, dessa forma, permitir o início do

tratamento e a inclusão de doentes em ensaios clínicos quando os sinais e sintomas da doença ainda forem discretos e localizados. Biomarcadores prognósticos poderão ser úteis na estratificação de doentes ao distinguir subgrupos e melhorar o delineamento de estudos. Os preditivos representam a chance de prever resposta a determinado tratamento em vez do curso natural prognóstico da doença; e os farmacodinâmicos mudam de maneira confiável em resposta ao tratamento e garantem a averiguação do efeito desejado de determinado medicamento experimental. Isso poderia identificar e interromper intervenções terapêuticas ineficazes em estágio inicial. Da mesma forma, os marcadores de progressão da doença representam medidas seriadas que mudam conforme a doença piora na ausência de tratamento. Estes poderiam fornecer outra medida objetiva e abordagem de economia de tempo para ensaios clínicos randomizados (Verber et al., 2019).

Os principais candidatos a biomarcadores na ELA podem ser produtos bioquímicos obtidos a partir do líquido (LCR), sangue ou urina, provenientes de imagem do sistema nervoso central, periférico ou músculo e neurofisiológicos.

### **3.9.1 Biomarcadores bioquímicos**

Os principais candidatos a biomarcadores bioquímicos no LCR, sangue ou urina na ELA são as proteínas do neurofilamento, níveis de SOD1 no LCR, domínio extracelular do receptor de neurotrofina p75 (p75ECD) na urina e dosagem de *dipeptide repeat proteins* (DPR) no LCR na ELA com mutação no gene C9orf72.

#### **3.9.1.1 Proteínas do neurofilamento**

Os biomarcadores mais promissores do LCR identificados até o momento são as proteínas do neurofilamento, um componente do citoesqueleto de neurônios que se acumula e pode ser dosado após dano axonal e degeneração neuronal (Rosengren et al., 1996; Brettschneider et al., 2006). Elas consistem em três subunidades, as duas de interesse são os neurofilamentos de cadeia pesada fosforilados (pNfH) e os neurofilamentos de cadeia leve (NfL). Evidências científicas indicam os níveis de neurofilamentos como elemento diagnóstico (Li et al., 2016; Steinacker et al., 2016; Oeckl et al., 2016). Ambas as subunidades foram validadas em estudo multicêntrico

como biomarcadores diagnósticos (Oeckl et al., 2016). A pNfH sozinha foi validada como biomarcador diagnóstico em outro estudo (Lehnert et al., 2014).

Utilidades adicionais desses marcadores ainda precisam ser validadas, embora estudos forneçam evidências nesse sentido (Verber et al., 2019). Estudo longitudinal comparando doentes com ELA e controles saudáveis encontraram níveis mais altos de NfL no LCR dos primeiros, e níveis mais altos foram associados a pior prognóstico (Gaiani et al., 2017).

Lu et al. (2015) mostraram que os níveis de NfL no soro e no LCR são altamente correlacionados. Esse dado é útil, pois as coletas de amostras seriadas de sangue são mais facilmente obtidas do que amostras seriadas de LCR. Nesse estudo, o NfL foi bastante estável ao longo do tempo, particularmente aquele derivado do sangue, e pode ser ferramenta potencial para o monitoramento farmacodinâmico. Além disso, forneceu suporte adicional ao NfL do LCR como marcador prognóstico para estratificação de doentes, mostrou que os níveis sanguíneos de NfL foram significativamente maiores nos doentes com ELA do que em controles saudáveis e que o alto nível inicial de NfL foi forte preditor independente de sobrevida.

Em resumo, o pNfH e NfL são validados como marcadores diagnósticos e apresentam potencial prognóstico e de monitoramento farmacodinâmico no LCR. O NfL no sangue apresenta potencial diagnóstico, prognóstico e de monitoramento farmacodinâmico.

### **3.9.1.2 Níveis de SOD1 no LCR**

A SOD1 tem papel antioxidante na conversão de radicais livres de superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio em indivíduos saudáveis. Mutações no gene SOD1 estão implicadas em casos de ELAe e ELAf por meio de ganho tóxico de função (Rothstein, 2009). A SOD1 dobrada incorretamente pode ser medida no LCR, e essa mensuração tem potencial de biomarcador farmacodinâmico, pois seus níveis são estáveis em doentes individuais ao longo do tempo (Verber et al., 2019).

### 3.9.1.3 Domínio extracelular do receptor de neurotrofina p75 (p75ECD) na urina

O receptor de neurotrofina p75 (p75NTR) é um dos dois receptores de neurotrofinas, uma família de fatores de crescimento que estimulam as células neuronais a sobreviver e se diferenciar. Em humanos e roedores, sua expressão é aumentada nos neurônios motores durante a vida embrionária, mas declina após o nascimento. No entanto, são reexpressados após lesão nervosa (Benatar et al., 2016). Níveis elevados do p75ECD foram encontrados na urina dos doentes com ELA, e seu aumento longitudinal ocorre com a progressão da doença. O p75ECD urinário mostrou-se promissor como biomarcador na ELA, com aplicação prognóstica, farmacodinâmica e na progressão da doença (Shepherd et al., 2017).

### 3.9.1.4 Dosagem de DPR no LCR na ELA com mutação no gene C9orf72

A ELA causada pela mutação no gene C9orf72 cursa com a expansão da repetição de hexanucleotídeos, levando ao acúmulo de focos de RNA associados ao sequestro de proteínas ligadoras de RNA, e resulta na tradução pelo mecanismo *repeat-associated non-ATG* (RAN), formando dipeptídeos C9RAN (DPR). Esses DPRs são mensuráveis no LCR (Verber et al., 2019). Estudo transversal mostrou que um deles, o poly(GP), é detectável no LCR de doentes com ELA e DFT portadores de mutação no gene C9orf72, mas não em doentes controle, e que esses níveis aumentados ocorrem em doentes na fase pré-clínica (Lehmer et al., 2017). Estudo de seguimento longitudinal mostrou que os níveis de DPR são estáveis ao longo do tempo, o que indica seu uso como biomarcador farmacodinâmico (Gendron et al., 2017).

## 3.9.2 Biomarcadores de imagem

Os principais candidatos a biomarcadores de imagem na ELA são a ressonância magnética (RM) ou tomografia computadorizada (TC) do sistema nervoso central, bem como a ressonância magnética de nervo periférico e músculo.

### 3.9.2.1 Imagem de RM ou TC do sistema nervoso central

A ressonância magnética é candidata a biomarcador, pois não é invasiva, é relativamente barata e não envolve radiação ionizante. A natureza multimodal da RM presta-se ao estudo de alterações anatômicas e processos patológicos *in vivo* (Verber et al., 2019).

O papel atual da RM estrutural convencional na prática clínica é principalmente para a exclusão de diagnósticos diferenciais da ELA como parte da rotina do processo diagnóstico (Filippi et al., 2010). Entretanto, atrofia cortical focal foi demonstrada no giro pré-central, bem como em outras áreas motoras e não motoras (Grosskreutz et al., 2006). A redução da área de superfície da medula espinhal cervical demonstrou correlação com medidas clínicas de incapacidade, como na pontuação da ALSFRS-R (de Albuquerque et al., 2017), e a diminuição do volume da medula espinhal cervical ao longo de três meses foi preditivo de disfunção respiratória no ano seguinte (Grolez et al., 2018). A atrofia cervical, portanto, pode ter potencial como biomarcador preditivo e de progressão.

O método de aquisição de imagens por *Diffusion Tensor Imaging* (DTI) explora a diferença na direcionalidade local da difusão das moléculas de água para acessar a arquitetura tecidual e é especialmente utilizado para o estudo da substância branca dos tratos cerebrais (Verber et al., 2019). As alterações longitudinais do DTI no giro pré-central e no trato corticoespinhal foram correlacionadas com a duração da doença e com os escores da ALSFRS-R (Keil et al., 2012). Isso sugere que poderia ser considerado potencial biomarcador de progressão da doença. Deve-se notar, no entanto, que as alterações longitudinais nos parâmetros do DTI são sutis e podem não se traduzir em mais eficiência nos projetos de ensaios clínicos em comparação com as medidas clínicas atualmente disponíveis, como a ALSFRS-R. O DTI pode, todavia, ter benefício adicional se combinado com outras medidas clínicas e de imagem (Benatar et al., 2016).

A tomografia por emissão de pósitrons com fluorodeoxiglicose (PET-FDG) é técnica de imagem que estima o consumo ou metabolismo de energia no cérebro. Pagani et al. (2014) mostraram que as alterações na distribuição de FDG nos doentes com ELA em comparação aos controles apresentam padrão de hipometabolismo no córtex frontal e occipital e hipermetabolismo no mesencéfalo. Este último parece ser relativamente específico para ELA e pode ser potencialmente valioso na investigação

diagnóstica dessa doença. Além disso, o hipometabolismo grave nas regiões frontotemporais foi preditor independente de menor sobrevida em doentes com ELA (van Laere et al., 2014). O PET-FDG, portanto, pode ser potencial biomarcador prognóstico na ELA.

A neuroinflamação é considerada contribuinte importante para a cascata fisiopatológica na ELA. Nesse contexto, a avaliação da microglia ativada *in vivo* por tomografia por emissão de pósitrons pode ser potencialmente usada como biomarcador de resposta terapêutica nessa doença (Verber et al., 2019). A ativação microglial pode ser investigada com o uso de radiomarcadores que têm como alvo a 18 kDa proteína translocadora (TSPO). A TSPO é expressa especificamente pela microglia e pelos astrócitos ativados. Estudos demonstraram ativação microglial aumentada no córtex motor primário, pré-motor, pré-frontal, temporal, tálamo e tronco cerebral em doentes com ELA (Turner et al., 2004; Zürcher et al., 2015). O grau de ligação no giro pré-central correlacionou-se negativamente com o estado funcional e positivamente com os sinais de acometimento dos NMS (Zürcher et al., 2015).

### **3.9.2.2 Ressonância magnética de nervo periférico e músculo**

O estudo do nervo periférico por RM utilizando o método DTI é realizado na ELA e se mostra promissor (Verber et al., 2019). Simon et al. (2017) demonstraram que a fração de anisotropia do nervo tibial e fibular reduziu com a progressão da doença e se correlacionou com a escala ALSFRS-R, o que indica seu potencial como biomarcador de progressão de doença.

A degeneração das células do corno anterior da medula na ELA leva a mudanças de sinal e atrofia nos músculos e nervos que podem ser avaliadas com ressonância magnética e, potencialmente, serem utilizadas como marcadores de progressão da doença. Jenkins et al. (2018), em avaliação longitudinal de corpo inteiro por RM, mostraram alterações semiquantitativas na sequência T2 em múltiplas regiões do corpo de doentes com ELA em comparação aos controles. Nesse estudo, o sinal T2 mais alto foi associado à maior incapacidade geral, fraqueza clínica e menor MUNIX em músculos individuais. O sinal T2 relativo no músculo tibial anterior bilateral aumentou ao longo de quatro meses em doentes com ELA.

### 3.9.3 Biomarcadores eletrofisiológicos

Enquanto o exame de eletroneuromiografia é primordial no diagnóstico da ELA, métodos eletrofisiológicos podem ser utilizados no seguimento clínico da progressão da doença e na análise do desfecho em ensaios clínicos (Benatar et al., 2016). Segundo Benatar et al. (2016), os candidatos a biomarcadores eletrofisiológicos para ELA são o PAMC, IN, estimativa do número de unidades motoras (MUNE), *compound muscle action potential* (CMAP) *scan* MUNE (MScan), MUNIX, miografia por impedância elétrica (MIE), excitabilidade axonal e estimulação magnética transcraniana (EMT).

#### 3.9.3.1 Potencial de ação muscular composto (PAMC)

O PAMC é obtido com a estimulação supramáxima de determinado nervo enquanto se registra a despolarização das fibras musculares por ele inervadas por meio de eletrodo de superfície sobre o músculo de interesse. Redução na amplitude do PAMC geralmente corresponde à perda do axônio motor e é comumente observada na ELA no momento do diagnóstico. Seu uso potencial como marcador de progressão da ELA não foi ainda explorado. No entanto, estudos recentes com foco em outros biomarcadores eletrofisiológicos mostram declínio do PAMC ao longo do tempo nos nervos medianos e ulnares na maioria dos doentes com ELA (Benatar et al., 2016). O desafio de usar o PAMC como biomarcador de progressão da ELA e de efeito de medicamentos é sua reprodutibilidade nos indivíduos. Lewelt et al. (2010) mostraram que a amplitude e a área máxima dos nervos ulnares são medidas de resultado viável, válidas e confiáveis para uso em ensaios clínicos multicêntricos pediátricos na atrofia muscular espinhal. Neuwirth et al. (2011), contudo, atribuíram principalmente à variabilidade nas medidas do PAMC do músculo abductor curto do polegar o baixo coeficiente de correlação intraclassa do MUNIX deste músculo. O PAMC pode ser utilizado de maneira mais eficaz como marcador primário da progressão da doença ao se tentar maximizar seu valor e ser consistente com a colocação do eletrodo e a posição do membro. Estudos adicionais focados especificamente no PAMC como biomarcador devem ser realizados (Benatar et al., 2016).

### 3.9.3.2 Índice neurofisiológico (IN)

O IN é formado a partir de três medidas neurofisiológicas padronizadas, o PAMC, o tempo de latência distal (TLD) e a persistência da onda F. O seu cálculo é realizado por meio da seguinte fórmula no nervo ulnar:  $(\text{amplitude do PAMC} / \text{TLD}) \times \text{persistência da onda F}$ . Representa aspectos dos efeitos da desnervação e reinervação, da degeneração da parte terminal dos axônios motores e da excitabilidade das células do corno anterior (Swash e de Carvalho, 2004). O conceito básico por trás do IN é que, com a progressão da doença, ocorre redução da amplitude do PAMC, prolongamento do TLD e redução da persistência da onda F, o que resulta em redução do IN (Vucic e Rutkove, 2018).

Cheah et al. (2011) concluíram que o IN foi responsivo em curto período de tempo a progressão da ELA, com isso, sugerem que utilizá-lo como resultado final primário em ensaios clínicos fase 2 pode ser útil para encurtar o tempo total de estudos. Além disso, o declínio desse índice ocorreu mais rapidamente num mesmo período de tempo quando comparado a medidas clínicas convencionais de progressão de doença, como a ALSFRS-R. Outro estudo, que seguiu 28 doentes com ELA de forma longitudinal e realizou avaliação imediatamente após o diagnóstico e seis meses depois, mostrou que o IN e o MUNE foram os biomarcadores pesquisados que mais mudaram ao longo desse período. O IN apresentou taxa de declínio de 41,9% ao final de seis meses, a qual foi maior do que na ALSFRS-R, na capacidade vital forçada e na amplitude do PAMC, com declínio de 18,4%, 15,4% e 25,5% respectivamente (de Carvalho e Swash, 2010). Escorcio-Bezerra et al. (2018) mostraram que o IN foi mais sensível do que as medidas clínicas na detecção da perda de NMI em membros pré-sintomáticos de doentes com ELA lentamente progressiva.

### 3.9.3.3 Estimativa do número de unidades motoras (MUNE)

O MUNE visa fornecer medida quantitativa e reprodutível do número de unidades motoras funcionais. O princípio básico em todas as variações desta técnica é, primeiramente, mensurar a amplitude do potencial de ação muscular composto gerado por todo músculo e, em segundo lugar, obter a amplitude média dos potenciais de ação muscular gerados por uma única unidade motora. Dessa forma, o número de unidades

motoras dentro do músculo pode ser determinado pela divisão do primeiro pelo segundo (McComas et al., 1971).

Diferentes métodos de MUNE adotam técnicas distintas para mensurar a amplitude média dos potenciais de unidade motora única (Verber et al., 2019). No MUNE incremental, a intensidade do estímulo sobre o nervo é aumentada gradualmente, e o tamanho dos degraus em amplitude com elevações sucessivas em estimulação é medido. O tamanho médio das etapas é calculado e então dividido pelo PAMC para obter o MUNE (Benatar et al., 2016). Essa técnica apresenta como obstáculo o fenômeno da alternância, no qual estímulos de mesma intensidade podem ativar diferentes axônios motores com limiares de estimulação semelhantes e resultar em alterações não representativas da amplitude dos potenciais de unidade motora única (Gooch et al., 2014).

O método de estimulação de múltiplos pontos e adaptações posteriores tenta contornar o fenômeno da alternância graças ao estímulo em níveis muito baixos em diferentes pontos ao longo do comprimento do nervo, com o esforço de obter e mensurar a amplitude de série de potenciais de unidade motora única. Para se obter o MUNE neste caso, o PAMC é dividido pelo tamanho médio de 10 potenciais de unidade motora única (Benatar et al., 2016).

Já o MUNE incremental multiponto combina métodos das duas técnicas citadas anteriormente. Contém vantagens práticas em relação aos demais métodos por ser mais simples, de execução relativamente rápida e bem-tolerada, pois não são realizados vários estímulos supramáximos e não requer equipamento especializado (Shefner et al., 2011).

O MUNE possui grande valor clínico na avaliação da perda progressiva do axônio motor, apesar da falta de método perfeito para sua realização (Shefner, 2001). Os três métodos de MUNE supracitados foram relatados como ferramentas confiáveis e sensíveis, pois se correlacionam e superam métodos clínicos funcionais na demonstração de progressão da doença (Mitsumoto et al., 2007; de Carvalho e Swash, 2010). O MUNE é conceitualmente atraente, no entanto, a sua utilização é desafiadora, pois requer treinamento e tomada de decisões em tempo real (Benatar et al., 2016).

#### **3.9.3.4 Compound muscle action potential (CMAP) scan MUNE (MScan)**

O *compound muscle action potential* (CMAP) scan MUNE (MScan) é um método eletrofisiológico não invasivo para estimar o número de unidades motoras funcionais do músculo (Jacobsen et al., 2018). A técnica compara a varredura obtida do músculo de interesse com modelos previamente concebidos para estimar o número de unidades motoras presentes (Visser e Blok, 2009). O MScan avalia todas as unidades motoras do músculo e evita o viés inerente a todos os métodos de MUNE, os quais são baseados na extrapolação de pequena amostra de unidades motoras. O método foi testado quanto à reprodutibilidade e ao tempo de registro em 22 pacientes com ELA e 20 controles saudáveis. O MScan mostrou excelente reprodutibilidade intra e inter-examinador, com valor do coeficiente de correlação intraclasse  $> 0,98$  e coeficiente de variação médio de  $12,3 \pm 1,6\%$ . O tempo médio de registro foi em torno de seis minutos. Conclui-se que o MScan é rápido, reprodutível e pode ser útil no diagnóstico e monitoramento da progressão de doenças neuromusculares (Jacobsen et al., 2018).

#### **3.9.3.5 Índice do número de unidades motoras (MUNIX)**

O MUNIX utiliza modelo matemático para acessar o número de unidades motoras, o qual é baseado no potencial de ação muscular composto e no padrão de interferência de superfície (PIS). O procedimento compreende três passos. Primeiramente, é obtido o PAMC do músculo a ser examinado, e sua fase negativa é usada para o cálculo de sua amplitude, área e potência. Em segundo lugar, os PIS são gravados após o doente ser instruído a realizar e manter contração muscular isométrica de intensidades progressivamente maiores. A área e a potência dos PIS são calculadas. No passo final, utilizando a área e a potência do PAMC e dos PIS obtidas, é calculada a contagem de unidades motoras em condições ideais (CUMCI). Gráfico contrapondo a CUMCI e a área dos PIS é construído e regressão de potência entre essas medidas é realizada. Utilizando os parâmetros dessa regressão, o MUNIX é calculado como o valor do CUMCI quando a área do PIS é 20 mV/ms. O MUSIX é calculado dividindo a amplitude do PAMC pelo MUNIX (Nandedkar et al., 2004; Nandedkar et al., 2010).

O MUNIX supre limitações do MUNE, pois sua realização é rápida, com duração inferior a cinco minutos por músculo e fácil de fazer em músculos proximais e

distais, desde que seja possível obter o PAMC supramáximo desses músculos (Neuwirth et al., 2011). Além disso, a técnica apresenta vantagem singular de exigir menos treinamento e prática (Vucic e Rutkove, 2018).

O MUNIX e o MUNE levam vantagem em relação ao PAMC, pois são teoricamente capazes de capturar a progressão da doença cedo durante o seu curso, quando o tamanho do PAMC ainda permanece relativamente estável devido ao processo de reinervação (Felice, 1997).

No entanto, a técnica não pode ser realizada de forma confiável em doentes com limitações graves na ativação muscular voluntária e em modelos animais (Vucic e Rutkove, 2018). Ademais, a amplitude do PAMC deve ser controlada para otimizar a confiabilidade do método (Neuwirth et al., 2011).

Estudos com MUNIX são realizados no seguimento de doente com ELA. Neuwirth et al. (2015) concluíram que o MUNIX é biomarcador eletrofisiológico confiável para rastrear a perda de NMI na ELA. Além disso, a técnica do MUNIX exibiu sensibilidade comparável a diferentes técnicas de MUNE na detecção de perda do NMI (Boekestein et al., 2012; Benmouna et al., 2018).

O MUNIX foi capaz de detectar perda de neurônios motores em músculos pré-sintomáticos em doente com ELA, fato que o torna bom candidato a biomarcador para progressão da doença (Neuwirth et al., 2017). Escorcio-Bezerra et al. (2018) mostraram que o MUNIX médio e o IN foram mais sensíveis do que as medidas clínicas na detecção da perda de NMI em membros pré-sintomáticos de doentes com ELA lentamente progressiva e sugerem que esses dois biomarcadores eletrofisiológicos devem ser incluídos em estudos de fases iniciais como medidas de desfecho.

### **3.9.3.6 Índice do tamanho de unidades motoras (MUSIX)**

O cálculo do MUNIX fornece também o MUSIX, que é derivado da divisão da amplitude do potencial de ação muscular composto pelo valor MUNIX (Nandedkar et al., 2004, 2010). O MUSIX pode detalhar o processo de reinervação em distúrbios neuromusculares graças à determinação do tamanho das unidades motoras e, com isso, trazer informações a respeito do curso natural de tais condições e da resposta a novos tratamentos (Alix et al., 2019).

### 3.9.3.7 Miografia por impedância elétrica (MIE)

A técnica da MIE é não invasiva, indolor e quantitativa para avaliação do músculo. Utiliza corrente elétrica de alta frequência e baixa intensidade aplicada por dois eletrodos posicionados sobre o músculo. As tensões superficiais resultantes são medidas por segundo par de eletrodos, a partir dos quais as propriedades condutoras e capacitivas do tecido subjacente são obtidas. Essa técnica não depende da atividade elétrica inerente ao tecido, mas de como este afeta a corrente aplicada. Assim, ela é sensível a alterações estruturais e composicionais do músculo dos doentes com ELA, incluindo a atrofia das fibras musculares e a presença de aumento de gordura intramuscular (Vucic e Rutkove, 2018).

Estudos demonstraram que a MIE possui alta sensibilidade à progressão da doença, assim como alta confiabilidade (Rutkove et al., 2007; Rutkove et al., 2012).

A técnica é de fácil execução e requer treinamento mínimo. Pode ser aplicada à maioria dos músculos superficiais, incluindo os músculos proximais, truncais e até bulbares (Benatar et al., 2016).

### 3.9.3.8 Excitabilidade axonal

As técnicas de medição da excitabilidade axonal permitem avaliação não invasiva *in vivo* das propriedades biofísicas dos axônios periféricos (Verber et al., 2019). Empregar métodos de rastreamento de limiar permite acessar de forma sensível as alterações no potencial da membrana causadas pela ativação de canais iônicos e bombas de íons eletrogênicos (Bostock et al., 1998).

Estudos de rastreamento de limiar revelaram alterações indicativas de disfunção generalizada na condução axonal dos canais iônicos em doentes com ELA, incluindo aumento persistente da condutância do sódio associado à redução das correntes rápidas e lentas de potássio. Tais alterações predisporiam os axônios desses doentes a geração de fasciculações e câibras (Vucic e Kiernan, 2006).

O aumento persistente da condutância do sódio é preditor independente de menor sobrevida em doentes com ELA. A hiperexcitabilidade da membrana está possivelmente associada à morte neuronal motora, e a modulação de correntes

excessivas de sódio pode ser nova opção terapêutica para esses doentes (Kanai et al., 2012).

### **3.9.3.9 Estimulação magnética transcraniana (EMT)**

A técnica de EMT é ferramenta neurofisiológica não invasiva e relativamente indolor para avaliar a função dos NMS em humanos. Utiliza campo magnético pulsado direcionado a pequena área cortical e induz a despolarização neuronal na região para gerar potencial de ação (Vucic e Rutkove, 2018).

A EMT evoluiu para ser importante ferramenta de diagnóstico na ELA, fornecendo avaliação objetiva da disfunção dos NMS. A técnica de rastreamento de limiar da EMT identificou a hiperexcitabilidade cortical como biomarcador diagnóstico sensível e específico da ELA em estágio inicial da doença, com a redução do intervalo curto de inibição intracortical diferenciando de maneira confiável a ELA de outras desordens similares (Menon et al., 2015). Além disso, dois estudos mostraram a presença de hiperexcitabilidade cortical em doentes com fenótipos atípicos da ELA, o *flail arm* e o *flail leg*, o que possibilitou o diagnóstico definitivo em estágio inicial da doença (Vucic e Kiernan, 2007; Menon et al., 2016). A capacidade da EMT em monitorar a progressão da doença exhibe evidências preliminares e conclusões conflitantes, além de sua aplicação ser limitada em ensaios terapêuticos na ELA (Verber et al., 2019).

## **3.10 Avaliações clínicas no seguimento de doentes com ELA**

### **3.10.1 Escala revisada da graduação funcional da ELA (ALSFRS-R)**

A ALSFRS-R é escala de classificação de uso corriqueiro na ELA. Sua aplicação demora cerca de 10 minutos e é utilizada para determinar a capacidade e independência dos doentes com ELA em 12 atividades funcionais ranqueadas de 0 a 4 e relevantes na doença. A validação original da escala em doentes com ELA foi estabelecida por meio da verificação de que as mudanças na graduação da ALSFRS-R correlacionaram-se com as alterações na força muscular ao longo do tempo, conforme medido pelo teste de força neuromuscular quantitativo, bem como com as mensurações

da qualidade de vida e sobrevida prevista (Cedarbaum et al., 1999; Greenberg e Walsh, 2005a; Greenberg e Walsh, 2005b). A escala foi validada na língua portuguesa e utilizada largamente no Brasil. A ALSFRS-R demonstra valor ao ser capaz de seguir a progressão da doença, apresentar confiabilidade inter e intra-avaliadores, além da sua aplicação fácil (Kaufmann et al., 2007).

### **3.10.2 Capacidade vital forçada (CVF)**

Os indivíduos com ELA apresentam restrições pulmonares caracterizadas pela redução da capacidade vital e do volume corrente ao terem os músculos ventilatórios comprometidos, levando a consequente insuficiência respiratória crônica (Kelly et al., 1991). A CVF é parte da bateria de testes utilizados na avaliação da fraqueza do músculo diafragma e no monitoramento da progressão da ELA por meio da espirometria, procedimento empregado na avaliação do comprometimento respiratório de doentes com ELA (Berry e Cudkowicz, 2011). A CVF pode ser medida de forma rápida e eficaz no ambiente ambulatorial (Miller et al., 2009). Deve ser ressaltado que há métodos novos sendo desenvolvidos para a verificação da função pulmonar (Berry e Cudkowicz, 2011).

### **3.10.3 Dinamometria manual**

A avaliação da força muscular é importante em doentes portadores de doenças neurológicas, musculares e esqueléticas (Stark et al., 2011). Stark et al. (2011) relatam que avaliações seriadas da força muscular, ao serem comparadas com a mensuração basal da força em doentes, permitem a quantificação de eficácia de determinado tratamento.

A dinamometria manual é uma das opções para mensurar objetivamente a força muscular (Stark et al., 2011). Foi descrita pela primeira vez por Lovett e Martin em 1916 (Bohannon, 2006). Stark et al. (2011) consideram-na instrumento confiável na avaliação da força muscular em ambiente clínico quando comparada a dispositivos isocinéticos. Os autores destacam o fácil manuseio, a portabilidade, o baixo custo e o tamanho compacto desse instrumento.

Confiabilidade relativa alta e confiabilidade absoluta moderada foram observadas em todos os grupamentos musculares estudados, exceto no tornozelo, tornando o dinamômetro da força da mão ferramenta potencial nas pesquisas em população idosa, desde que sejam utilizados protocolos e instruções padronizadas para os doentes (Buckinx et al., 2017).

A dinamometria manual forneceu dados de força muscular com precisão semelhante à contração isométrica voluntária máxima, esta que é ferramenta padrão de avaliação da força muscular em ensaios clínicos da ELA, especialmente na faixa de força até 20 kg. Considera-se a dinamometria manual alternativa prática e disponível à contração isométrica voluntária máxima no acompanhamento da disfunção motora de doentes portadores de doenças neuromusculares em ensaios clínicos (Beck et al., 1999). Shefner et al. (2016) concluíram que a avaliação quantitativa da força usando a dinamometria manual é medida confiável e reprodutível de declínio na ELA.

#### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Sujeitos da pesquisa**

Este subprojeto fez parte do protocolo de pesquisa aprovado pela CAPPesq número 2.825.756, que envolveu a infusão de duas doses intratecais de CTM autólogas obtidas do aspirado da medula óssea do mesmo doente, no espaço subaracnoideo da região lombar da coluna vertebral.

Esse ensaio clínico não controlado foi realizado durante o período de agosto/2016 a novembro/2018. O estudo obteve o registro NCT02917681 no [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) e incluiu 28 doentes com diagnóstico clínico de ELA esporádica e familiar segundo os critérios de El Escorial (Brooks et al., 2000) para ELA provável com suporte laboratorial, ELA provável e ELA definida. O estudo foi aberto aos doentes de todo o território nacional. Todos os participantes foram informados dos detalhes da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A). Os participantes foram acompanhados clinicamente pelos períodos de 20 semanas da triagem até primeira infusão das CTM, de quatro semanas entre a primeira e a segunda infusão e de 28 semanas da segunda infusão até a última visita.

### **4.2 Critérios de inclusão e exclusão**

Os sujeitos elegíveis possuíam, na visita de triagem, idades que variavam entre 18 e 70 anos, capacidade vital forçada (CVF) ortostática  $\geq 65\%$  do previsto para a idade, altura e sexo,  $\leq 24$  meses do início dos sintomas da ELA, apresentavam a ALSFRS-R  $\geq 30$ , estavam recebendo dose estável de Riluzol por pelo menos 30 dias antes do tratamento ou não faziam uso de Riluzol. Os doentes foram submetidos à ENMG para o suporte diagnóstico. Os doentes, a critério do neurologista, foram submetidos ao exame de ressonância nuclear magnética para o diagnóstico diferencial quando necessário.

Os participantes em potencial foram excluídos quando eram incapazes de permanecer deitados durante os procedimentos necessários do estudo ou quando apresentaram história de doença autoimune, mielodisplasia, doença mieloproliferativa, leucemia, linfoma, irradiação de corpo inteiro, fratura de quadril, escoliose grave ou

ainda na eventualidade da incapacidade de tolerar procedimentos do estudo por qualquer outro motivo. Todos os exames e procedimentos foram realizados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e custeados pelo projeto aprovado pelo Ministério da Saúde e pelo CNPq, segundo o processo #401922/2014-6.

### 4.3 As CMT, dose e administração

O procedimento de aspirado da medula óssea ocorreu em unidade hospitalar específica do HCFMUSP. O material coletado foi devidamente acondicionado segundo as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e enviado ao Núcleo de Tecnologia Celular da PUC-Paraná, pertencente à Rede Nacional de Terapia Celular do Ministério da Saúde. As CTM autólogas foram cultivadas e expandidas (Rebelatto et al., 2008; Borgonovo et al., 2014), enviadas para o HCFMUSP e transplantadas no mesmo doente por via intratecal na região lombar da coluna vertebral nas doses de  $1 \times 10^6$  CTM/Kg em cada uma das duas aplicações, estas separadas por intervalo de 30 dias. As infusões foram realizadas em regime de internação hospitalar e feitas por neurocirurgião capacitado para esse tipo de procedimento.

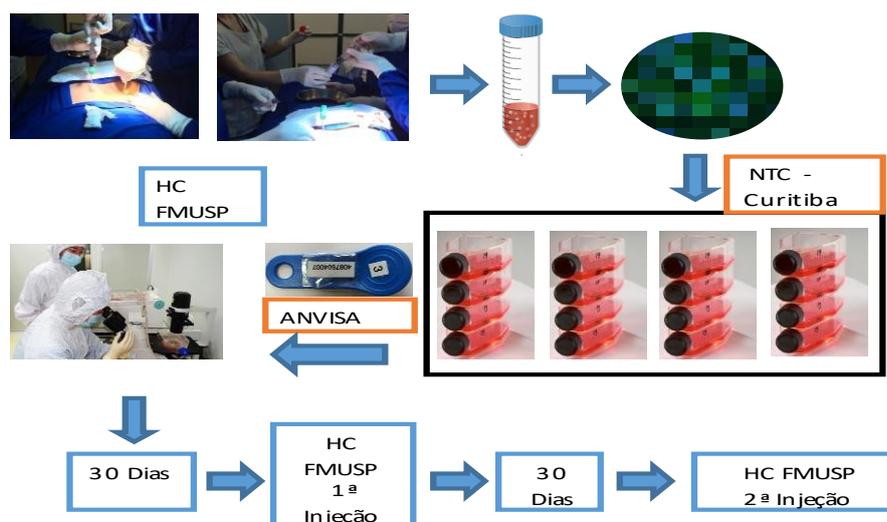


Figura 3 – Fluxograma do percurso das CTM desde o aspirado da medula óssea até as infusões destas nos doentes com ELA do projeto

#### 4.4 Avaliações eletrofisiológicas

Os doentes foram submetidos, na primeira visita, ao estudo eletroneuromiográfico de rotina nos quatro membros, para processo de confirmação diagnóstica e classificação eletrofisiológica da ELA. Essa avaliação foi composta do estudo da condução nervosa motora, estudo da condução nervosa sensitiva, respostas tardias e eletromiografia das regiões craniana, cervical, torácica e lombossacral. O PAMC dos músculos abductor curto do polegar (ACP), primeiro interósseo dorsal da mão (PIDM), abductor do dedo mínimo (ADM), o cálculo do IN, e o MUNIX e MUSIX dos músculos ACP, PIDM, ADM e tibial anterior (TA) também foram registrados nessa primeira avaliação.

Apenas os procedimentos para obtenção do PAMC dos músculos ACP, PIDM e ADM, para o cálculo do IN e para a aquisição do MUNIX e MUSIX dos músculos ACP, PIDM, ADM e TA foram realizados nas visitas subsequentes.

O equipamento de ENMG *Viking Quest – electrodiagnostic software* (Natus, EUA), versão 20.1.13, foi utilizado na realização do exame de rotina inicial e, subsequentemente, nas avaliações relativas à obtenção do PAMC dos músculos citados e no cálculo do IN. O programa de computador *Synergy Research V21-1* foi utilizado na realização do MUNIX e do MUSIX. Os eletrodos de captação utilizados foram os de superfície Neuroline 71505 K/C (Ambu, Dinamarca). As avaliações foram realizadas pelo mesmo examinador, titulado pela Sociedade Brasileira de Neurofisiologia Clínica (SBNC).

Os doentes permaneceram em decúbito dorsal durante a realização dos procedimentos. O exame clínico de força muscular foi realizado pelo examinador nos músculos ACP, PIDM, ADM e TA bilateralmente. O lado que apresentou os músculos com melhor desempenho na avaliação da força muscular foi o escolhido para a tomada dos registros eletrofisiológicos desde a primeira até a última avaliação. O lado esquerdo ficou padronizado nesse estudo como o de escolha, caso não houvesse diferença de força muscular entre os músculos testados de ambos os lados. A temperatura cutânea medida no dorso da mão foi mantida acima de 32°C e, no dorso do pé, acima de 30°C durante todo o período dos registros, aferição esta realizada com termômetro infravermelho MT 350 (Minipa, Brasil). A temperatura das mãos e ou dos pés foi

elevada pelo uso de bolsas térmicas contendo água quente e ou com dispositivo de jato de ar quente quando necessário.

O PAMC do ACP foi obtido com o posicionamento do eletrodo ativo sobre a região tenar, do eletrodo referência sobre a base da falange proximal do primeiro dedo e do eletrodo terra na palma da mão. O estímulo elétrico foi aplicado na região anatômica do nervo mediano no punho, entre o tendão dos músculos flexor radial do carpo e palmar longo, utilizando distância fixa de 7 cm do eletrodo ativo.

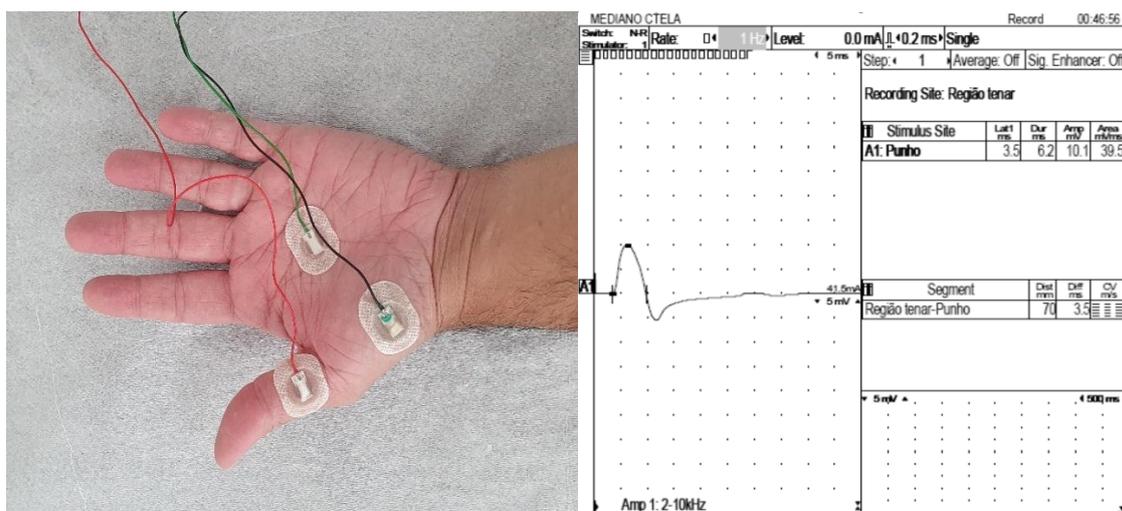


Figura 4 – Imagem ilustrativa da técnica utilizada para a obtenção do PAMC do ACP à esquerda. O registro do PAMC deste mesmo músculo é mostrado à direita

O PAMC do ADM foi obtido com o posicionamento do eletrodo ativo sobre a região hipotenar, do eletrodo referência sobre a base da falange proximal do quinto dedo e do eletrodo terra na palma da mão. O estímulo elétrico foi aplicado na região anatômica do nervo ulnar no punho, adjacente ao tendão do flexor ulnar do carpo, utilizando distância fixa de 7 cm do eletrodo ativo.

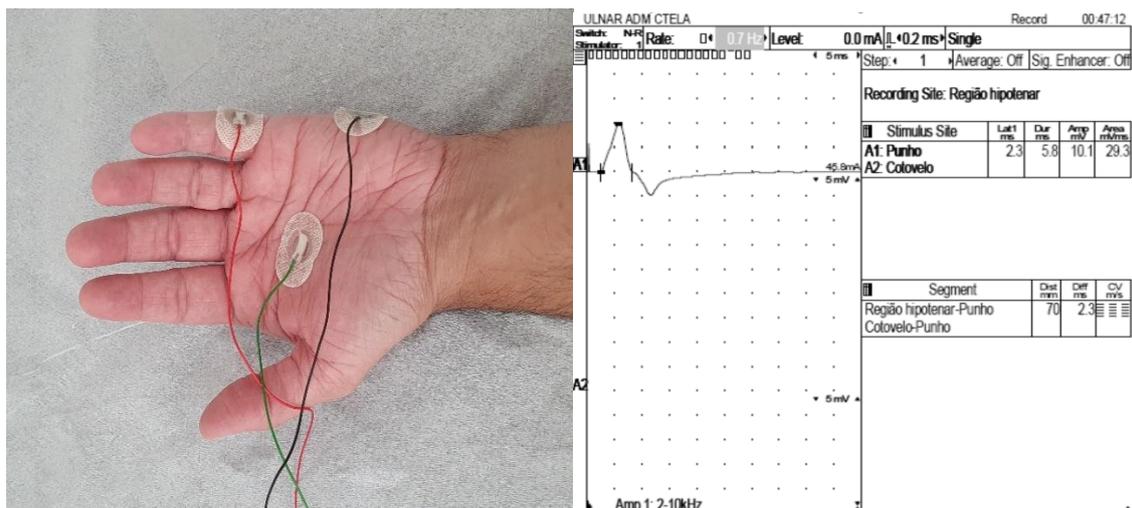


Figura 5 – Imagem ilustrativa da técnica utilizada para a obtenção do PAMC do ADM à esquerda. O registro do PAMC deste mesmo músculo é mostrado à direita

O PAMC do PIDM foi obtido com o posicionamento do eletrodo ativo sobre este músculo na região lateral do dorso da mão, do eletrodo referência sobre a base da falange proximal do primeiro dedo e do eletrodo terra na palma da mão. O estímulo elétrico foi aplicado na região anatômica do nervo ulnar no punho, adjacente ao tendão do flexor ulnar do carpo, sem distância fixa do eletrodo ativo.

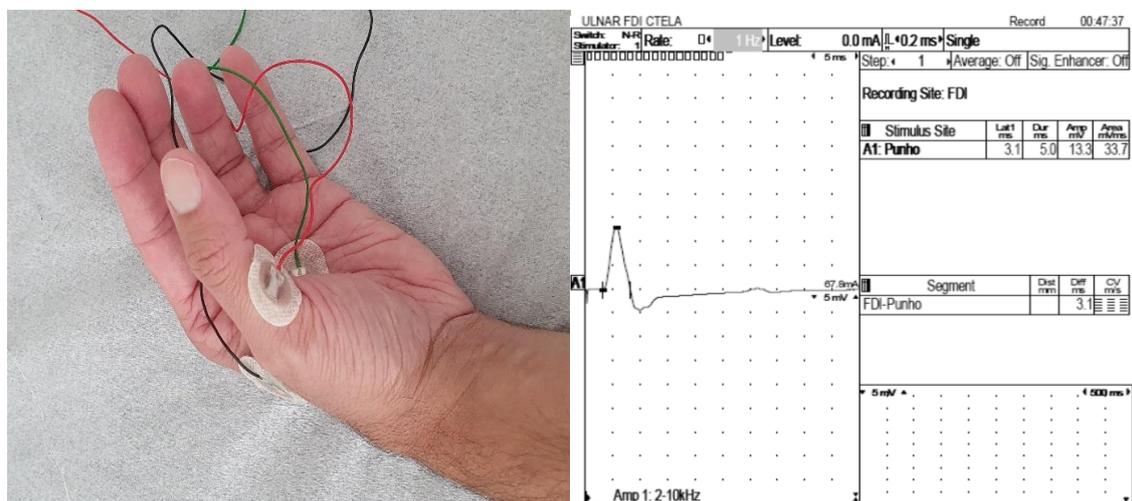


Figura 6 – Imagem ilustrativa da técnica utilizada para a obtenção do PAMC do PIDM à esquerda. O registro do PAMC deste mesmo músculo é mostrado à direita

O PAMC selecionado para cada músculo foi aquele com melhor amplitude, menor *rise time* e sem deflexão positiva inicial. Essas características foram ativamente buscadas por meio de ajustes no posicionamento do eletrodo ativo. A medida da

amplitude dos PAMC foi realizada da base da onda ao pico da deflexão negativa. Os filtros utilizados para obtenção do PAMC foram de 10 kHz para o de alta frequência e de 2 Hz para o de baixa frequência. A estimulação elétrica foi feita com pulso quadrado, duração de 0,2 milissegundos (ms) e intensidade ajustável de 0 a 100 miliamperes (mA).

O IN foi calculado por meio da multiplicação do valor da amplitude do PAMC do músculo ADM pela persistência da onda F com captação nesse músculo. Esse produto foi dividido pelo tempo de latência distal em milissegundos (de Carvalho e Swash, 2000).

$$IN_{ADM} = (PAMC \text{ (mV)} \times \text{Persistência da onda F}) / \text{Latência distal motora (ms)}$$

O PAMC do ADM foi obtido utilizando a técnica descrita acima. A persistência da onda F foi calculada pela realização da sequência de 20 estímulos supramáximos, disparados automaticamente na frequência de 0,7 Hz e duração de 0,2 ms. O valor da persistência foi obtido pelo número de traçados nos quais foi identificada onda F dividida pelo número de estímulos. A análise dessas ondas foi realizada com ganho de 200 microvolts ( $\mu\text{V}$ ) e varredura de 5 ms. Respostas de amplitudes menores que  $40\mu\text{V}$  foram desconsideradas. Respostas de mesma morfologia, duração, amplitude, latência e que apresentaram cinco ou mais repetições durante a sequência dos 20 estímulos foram excluídas da análise, pois foram consideradas ondas A ou *repeaters*. O tempo de latência distal foi medido com ganho de  $500\mu\text{V}$  e varredura de 2 ms. Os filtros utilizados nessa análise foram de 10 kHz para o de alta frequência e de 2 Hz para o de baixa frequência.

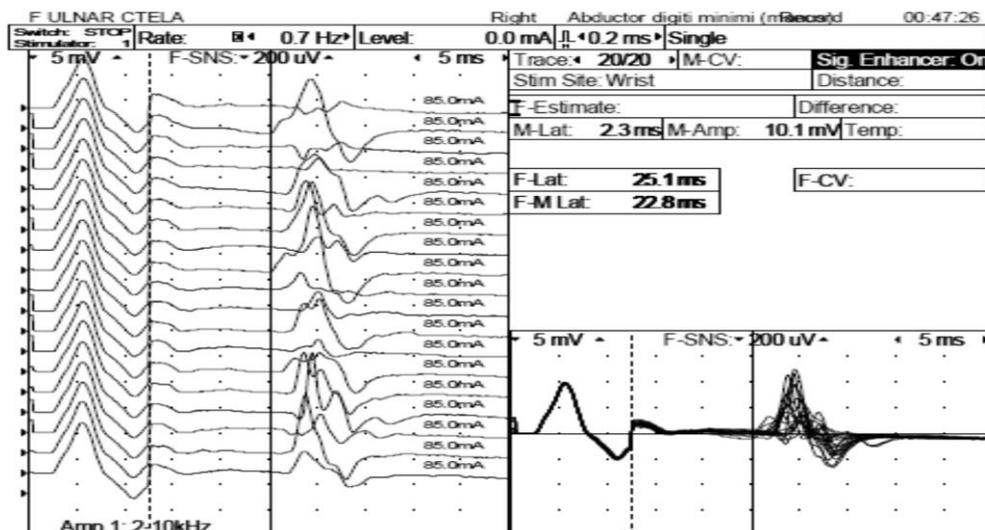


Figura 7 – Registro da sequência de 20 estímulos supramáximos no nervo ulnar com captação no músculo ADM com objetivo de calcular a persistência da onda F

O MUNIX foi realizado em sequência nos músculos ACP, ADM, PIDM e TA. A utilização do MUNIX médio resultou em aumento da precisão e da sensibilidade da técnica no acompanhamento da perda de unidades motoras em doentes com ELA (Escorcio-Bezerra et al., 2017). Sendo assim, repetiu-se esse ciclo três vezes e obteve-se a mediana do valor do MUNIX e do MUSIX. O PAMC dos músculos ACP, ADM e PIDM foi registrado utilizando as técnicas descritas acima. O PAMC do TA foi obtido com o posicionamento do eletrodo ativo sobre este músculo na região anterior da perna, do eletrodo referência na região anterior do tornozelo e do eletrodo terra na região anterior proximal da tibia. O estímulo elétrico foi aplicado na região anatômica do nervo fibular na cabeça da fíbula, sem distância fixa do eletrodo ativo.

A avaliação do padrão de interferência de superfície (PIS) foi realizada após a obtenção do PAMC de cada músculo citado, sem que houvesse nenhuma movimentação dos eletrodos de superfície. O doente realizou cinco níveis de contração muscular isométrica contrária à resistência oferecida pelo examinador, com duração aproximada de cinco segundos por nível e intensidade crescente de força, do mínimo para o máximo. Esse procedimento foi repetido duas vezes, totalizando 10 PIS. O examinador contou com *feedback* acústico e visual provido pelo equipamento para auxiliar na graduação dos níveis de força muscular. Os filtros utilizados foram de 3 kHz para o de alta frequência e de 3 Hz para o de baixa frequência. Músculos com PAMC menor do que  $500\mu\text{V}$  foram excluídos da avaliação. Os critérios de aceitação do PIS foram índice

de qualidade  $> 1,0$ , área do PIS  $> 20$  mV/ms e ICMUC  $< 100$ . Traçados com interferências e tremores foram rejeitados (Nandedkar et al., 2010). A duração de cada PIS foi de 500 ms (Nandedkar et al., 2018).

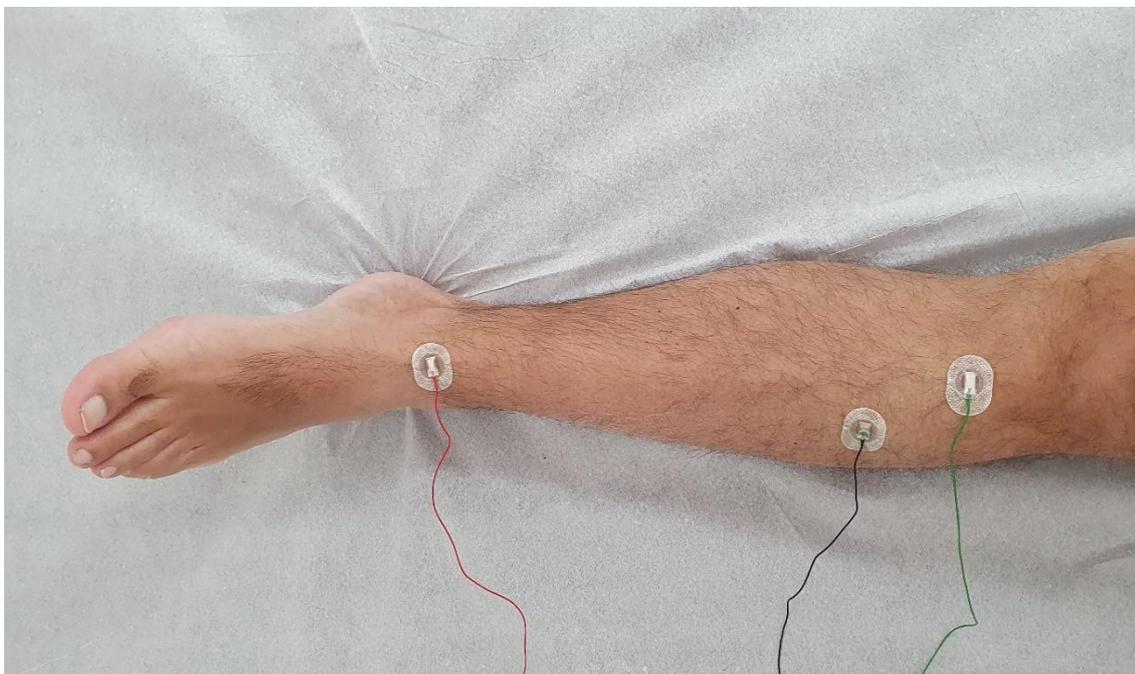


Figura 8 – Imagem ilustrativa da técnica utilizada para obtenção do PAMC do TA

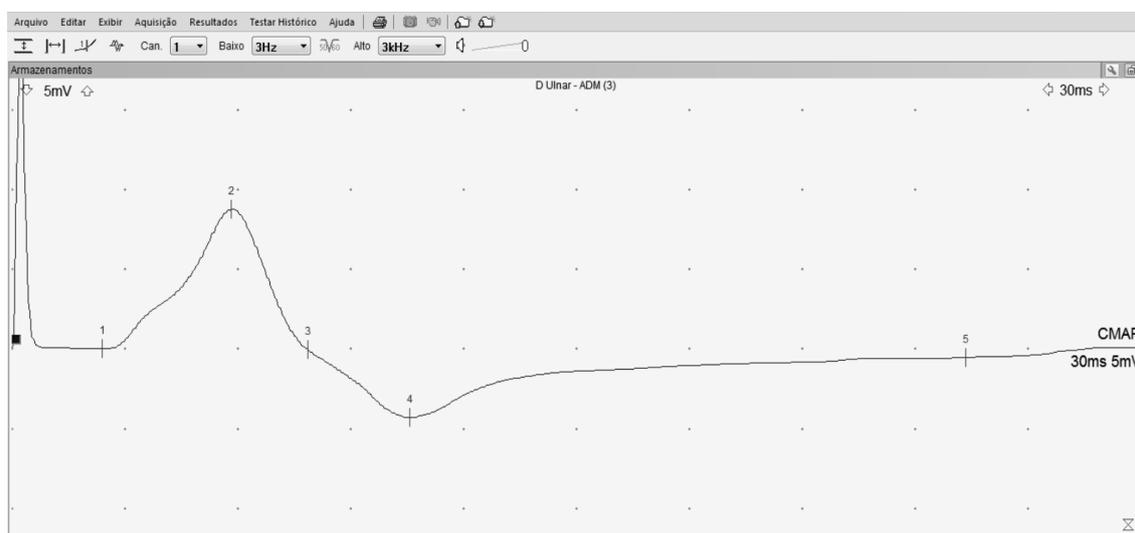


Figura 9 – Registro do PAMC do músculo ADM direito

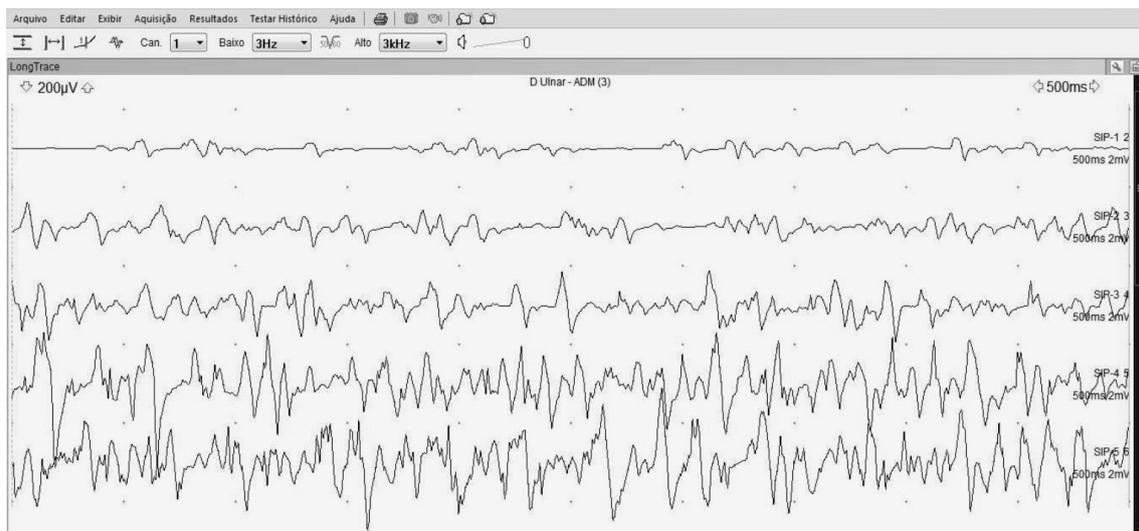


Figura 10 – Registro dos PIS no músculo ADM direito

Doente realizou cinco níveis de força muscular com aumento progressivo da intensidade de força, do mínimo (traço superior) para o máximo (traço inferior). Os PIS coletados mostram esforço gradual e áreas progressivamente maiores.

# SIP	A	Alpha	MUNIX	MUSIX	Beta	AIMUNIX	AIMUSIX
10	2255	-0,93	139	63	0,4	308	28,6

#	Localis	Amp µV	Area mVms	Duration ms	Power mV/mVms	ICMUC	Quality	Include
1	CMAP	8811	21,2	5,5	126,2			
2	SIP-1	609	58,7	500,0	7,1	48,9	2,76	<input checked="" type="checkbox"/>
3	SIP-2	1205	131,3	500,0	31,0	25,2	6,18	<input checked="" type="checkbox"/>
4	SIP-3	1815	170,9	500,0	63,9	15,9	8,05	<input checked="" type="checkbox"/>
5	SIP-4	3469	334,1	500,0	208,5	9,5	15,73	<input checked="" type="checkbox"/>
6	SIP-5	3652	399,9	500,0	266,4	8,9	18,83	<input checked="" type="checkbox"/>
7	SIP-6	950	89,5	500,0	14,0	38,1	4,21	<input checked="" type="checkbox"/>
8	SIP-7	2002	196,2	500,0	66,7	17,5	9,24	<input checked="" type="checkbox"/>
9	SIP-8	3059	276,6	500,0	138,4	11,9	13,03	<input checked="" type="checkbox"/>
10	SIP-9	3467	356,4	500,0	209,0	10,1	16,78	<input checked="" type="checkbox"/>
11	SIP-10	4251	458,8	500,0	365,4	7,5	21,61	<input checked="" type="checkbox"/>
12	SIP-11							

Figura 11 – Representação numérica dos valores obtidos dos PIS no músculo ADM direito

Doente realizou cinco níveis de força muscular com aumento progressivo da intensidade de força, do mínimo para o máximo. Esse procedimento foi repetido duas vezes, totalizando 10 PIS. O MUNIX calculado nesse caso foi de 139 e o MUSIX de 63.

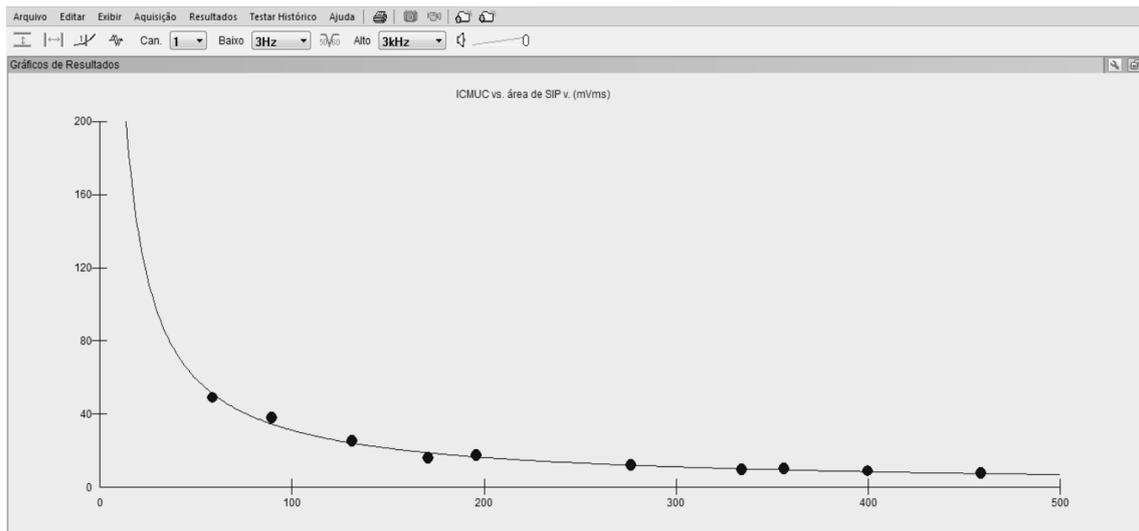


Figura 12 – Representação gráfica dos valores obtidos a partir da coleta de 10 PIS no músculo ADM direito

#### 4.5 Escala revisada da graduação funcional da ELA (ALSFRS-R)

A escala ALSFRS-R foi aplicada nos doentes do estudo de acordo com o cronograma apresentado na Tabela 1. Essa escala é composta por 12 itens, cujo objetivo é graduar o desempenho dos sujeitos em atividades da vida diária, como fala, salivação, deglutição, escrita, manipulação de alimentos e utensílios, vestuário e higiene, virar na cama e ajustar a roupa de cama, andar, subir escadas, dispneia, ortopneia e insuficiência respiratória. Cada item contém cinco respostas possíveis, com a pontuação variando de 0, quando o doente foi incapaz de realizar determinada tarefa, até 4, quando a realização da atividade pesquisada foi normal. A pontuação mínima da escala é 0 e a máxima é 48 (Lee e McCambridge, 2018).

Ressalta-se que este é um projeto temático que envolveu a participação acadêmica de diversos integrantes. Como tal, a aplicação da escala e sua apresentação estão na responsabilidade e são de autoria principal de outros integrantes do grupo. Os dados brutos da escala não são apresentados aqui, mas utilizados nas correlações estatísticas de alguns parâmetros eletrofisiológicos desta tese.

#### 4.6 Dinamometria manual

A dinamometria manual foi realizada com o doente sentado na cadeira com os braços desapoitados da superfície, ombros curvados de maneira neutra e os cotovelos dobrados em ângulo de 90 graus em relação ao braço. O doente foi instruído a segurar o dinamômetro, e ajustes de sua posição foram realizados quando necessário. O indivíduo foi solicitado a apertar o aparelho com toda força, porém de forma gradual e sem movimentar o punho. Três registros intercaladamente em cada mão foram realizados, isto é, três na mão direita e três na mão esquerda. Os testes iniciaram-se sempre pela mão direita.

A análise das correlações entre os dados da dinamometria e do parâmetro eletrofisiológico do MUNIX nos músculos ACP, ADM e PIDM utilizou os registros obtidos do mesmo lado.

Como dito anteriormente, por se tratar de projeto temático envolvendo equipe acadêmica multidisciplinar, os dados brutos da dinamometria não são também apresentados aqui, mas utilizados nas correlações estatísticas de alguns parâmetros eletrofisiológicos desta tese.

#### 4.7 Períodos de avaliações

Os sujeitos do estudo seguiram o cronograma identificado na Tabela 1 para a realização das visitas multidisciplinares, dos transplantes das CTM, dos registros eletrofisiológicos e dos demais parâmetros avaliados no projeto.

Tabela 1 – Períodos das avaliações

Período do estudo	Triagem (T)	Período pré-transplante (P)			Transplante de células (T1)		Transplante de células (T2)	Seguimentos (S) Acompanhamento pós-transplante						
		V2	V3	V4	V5	V6		V7	V8	V9	V10	V11	V12	V13
Visita (V)	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	V13	V14
Procedimento	T	P1	P2	M O	I1	Ii	I2	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
Intervalo da visita (dias)	---	±30	±30	±7	±24-30	±15	±15	±15	±15	±15	±30	±30	±30	±30
Neurofisiologia	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	X
ALSFRS-R	X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X
Dinamometria	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

NOTA: O X se refere às visitas agendadas para a avaliação específica.

## 4.8 Análise estatística

### 4.8.1 Dos registros eletrofisiológicos

Os desvios das curvas de decurso temporal dos parâmetros eletrofisiológicos estudados no período pré-infusão das CTM, que foi da triagem até o dia da primeira infusão, foram analisados em relação a aqueles no período pós-infusão, que foi a partir da primeira infusão até o final do estudo. Os procedimentos estatísticos incluíram estatísticas descritivas clássicas, usadas para variáveis quantitativas, como média ou desvio-padrão, e para variáveis categóricas, como contagens e percentuais.

As comparações das variáveis quantitativas entre os grupos foram realizadas explorando os efeitos do tempo, do momento das intervenções, dos grupos identificados e das interações, quando relevantes, e utilizaram o modelo de medidas repetidas por meio da técnica de equações de estimativas generalizadas (GEE), que determinou o *slope* ( $\beta$ ), isto é, a inclinação da curva representativa desses dados. Os dados categóricos foram comparados pelo teste de qui-quadrado de *likelihood ratio*. Ajustes para multiplicidade não foram feitos, devido à natureza exploratória do estudo. O nível de significância adotado foi de  $p \leq 0,1$  e  $p \leq 0,05$ . Os dados foram analisados com os programas SPSS versão 22.0, R versão 3.6 e SigmaPlot versão 11.0.

As seguintes análises foram realizadas:

1. Análise global. Verificou a avaliação da evolução temporal dos parâmetros eletrofisiológicos estudados nos períodos pré-infusão e pós-infusão, sendo que este último foi dividido em três momentos distintos que são 90, 180 e 210 dias após a primeira infusão, correspondentes a 60, 150 e 180 dias após a segunda infusão. A análise foi feita por meio do cálculo da inclinação pelo GEE de *slopes* individuais que resultou para cada doente no *slope* pré-infusão e no *slope* pós-infusão em cada um dos três momentos mencionados. Em seguida, foi calculada e comparada a média dos *slopes* pré-infusão com a média dos *slopes* pós-infusão nos momentos 90, 180 e 210 dias após a primeira infusão para cada parâmetro estudado. Os valores de  $p$  foram apresentados para cada período analisado na Tabela 3.

2. Análise individual. Realizada para identificar doentes responsivos e não responsivos na evolução temporal de cada parâmetro eletrofisiológico estudado,

comparando os *slopes* individuais de cada doente nos períodos pré-infusão e pós-infusão, sendo que este último foi dividido em três momentos distintos que são 90, 180 e 210 dias após a primeira infusão, correspondentes a 60, 150 e 180 dias após a segunda infusão.

Os resultados das alterações acumuladas ao longo do tempo nos parâmetros eletrofisiológicos analisados permitiram a detecção de possíveis efeitos individuais das infusões das CTM, possibilitando a estratificação de doentes em responsivos e não responsivos, de acordo com três abordagens, conforme descrito a seguir.

a. Estratificação exploratória com base em critérios numéricos. Os sujeitos considerados responsivos foram aqueles em que os *slopes* dos parâmetros analisados antes das CTM foram numérica e positivamente alterados pelos transplantes celulares, independentemente do resultado estatístico. Os dados foram analisados segundo o acumulado no período pré-infusão e nos acumulados em 90, 180 e 210 dias após as infusões das CTM, conforme demonstrado na Tabela 4.

b. Estratificação exploratória com base em significância estatística ( $p \leq 0,1$ ). Os sujeitos considerados responsivos foram aqueles em que os *slopes* dos parâmetros analisados pós-infusão das CTM mostraram diferença estatística menor ou igual a 10%, isto é,  $p \leq 0,1$ , em relação ao período pré-infusão. Desse modo, esta análise exploratória incluiu a identificação de sujeitos responsivos que tiveram os valores da inclinação da curva de progressão dos parâmetros da doença amenizados após os transplantes das CTM. Os dados foram analisados segundo o acumulado no período pré-infusão e nos acumulados em 90, 180 e 210 dias após as infusões das CTM, como demonstrado na Tabela 5.

c. Estratificação exploratória com base em significância estatística ( $p \leq 0,05$ ). Neste caso, os sujeitos considerados responsivos foram aqueles em que os *slopes* dos parâmetros analisados pós-infusão das CTM mostraram diferença estatística menor ou igual a 5%, isto é,  $p \leq 0,05$ , em relação ao período pré-infusão. Desse modo, esta análise exploratória incluiu a identificação de sujeitos responsivos que tiveram os valores da inclinação da curva de progressão dos parâmetros da doença melhorados após os transplantes das CTM. Os dados foram analisados segundo o acumulado no período pré-infusão e nos acumulados em 90, 180 e 210 dias após as infusões das CTM, conforme demonstrado na Tabela 6.

Para o cálculo do  $p$  individual ser realizado, foi necessária a presença mínima de três valores do parâmetro eletrofisiológico em estudo no período pré-infusão e pós-infusão, e o respectivo valor do dado estudado especificamente nos momentos 90, 180 e 210 dias pós-infusão.

Determinados doentes do estudo apresentaram-se responsivos nos parâmetros eletrofisiológicos do IN, MUNIX e PAMC, tanto na estratificação exploratória com base em critérios numéricos quanto naquela com base em significância estatística, devido à irreal melhora ou estabilidade do *slope* em um ou mais momentos do período pós-infusão em comparação ao período pré-infusão. Isso ocorreu devido ao chamado efeito chão, no qual músculos consumidos pela doença apresentaram registros eletrofisiológicos seriados persistentemente nulos ou reduzidos com valores inferiores a 30% em relação ao registro de base inicial. Tais resultados positivos de responsividade desses doentes foram desconsiderados. A ocorrência desse tipo de efeito não ficou evidente durante o estudo em relação ao parâmetro do MUSIX e, nesse caso, nada foi desconsiderado.

Os doentes considerados responsivos na análise individual do MUSIX em determinado momento do período pós-infusão em relação ao período pré-infusão foram aqueles com o *slope* menos positivo ou igual na estratificação exploratória com base em critérios numéricos ou com *slope* menos positivo e  $p \leq 0,1$  ou  $p \leq 0,05$  na estratificação exploratória com base em significância estatística.

Para os demais parâmetros avaliados, diferentemente da análise do MUSIX, os doentes responsivos foram aqueles em que, em determinado momento do período pós-infusão em relação ao período pré-infusão, o *slope* foi menos negativo ou igual na estratificação exploratória com base em critérios numéricos ou com *slope* menos negativo e  $p \leq 0,1$  ou  $p \leq 0,05$  na estratificação exploratória com base em significância estatística.

#### **4.8.2 Das correlações de Pearson**

A análise da correlação de Pearson foi utilizada na verificação da correlação dos dados eletrofisiológicos do MUNIX nos músculos ACP, ADM e PIDM com os dados obtidos na escala ALSFRS-R ou na dinamometria manual, após a constatação da

distribuição normal desses valores. Ressalta-se que os dados pareados do MUNIX e da dinamometria foram obtidos na mesma mão.

Os dados coletados foram tabulados e analisados por meio do programa GraphPad Prism v.8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). As correlações foram avaliadas de duas formas. Em primeiro lugar, as médias dos valores dos parâmetros de interesse foram correlacionadas a cada visita, para análise deles à luz da evolução da doença. Em segundo lugar, os valores dos parâmetros de interesse obtidos de todos os doentes foram correlacionados a cada visita. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado na significância estatística.

## **5. RESULTADOS**

---

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Descrição da amostra

Vinte e oito doentes com ELA foram estudados. Destes, 11 eram do sexo feminino, com média de idade de  $52 \pm 11,3$  anos e apresentavam evolução média de doença na primeira visita de  $16,8 \pm 6,2$  meses. Os demais registros relativos ao estado de origem dos sujeitos, local de início da doença e análises genéticas realizadas estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Descrição da amostra

Sujeitos	Estado	Gênero	Idade na triagem (Anos)	Evolução na visita 1 (Meses)	Local de início da doença	Análise Genética
1	SC	M	65	11	MI	Sem mutação
2	SP	M	42	17	MI	Sem mutação
3	SP	F	51	8	MS	ATXN2 (28 CAG) SOD1 Exon 5 (c.423T>A) rs143100660
4	SP	M	67	23	MS	Sem mutação
5	SP	M	54	23	MI	Expansão G <sub>4</sub> C <sub>2</sub>
6	RN	F	51	15	Bulbar	Sem mutação
7	RJ	F	61	24	MS	Sem mutação
8	GO	M	50	6	MS	Sem mutação
9★	RJ	M	46	24	MI	Sem mutação
10	SP	F	60	17	Bulbar	ATXN2 (28 CAG)
11	CE	F	58	12	Bulbar	Sem mutação
12	RS	M	44	22	MI	Sem mutação
13	BA	M	53	19	MS	Sem mutação
14	SP	F	45	18	MS	ATXN2 (33 CAG) SNP (A/A)
15†	SP	M	67	24	MI	Sem mutação
16•	SP	M	42	6	MI	Sem mutação
17	PR	M	59	6	MS	Expansão G <sub>4</sub> C <sub>2</sub>
18	GO	M	35	24	MS	Sem mutação
19	SP	M	59	18	MI	Sem mutação
20	RJ	F	52	24	MS	Sem mutação
21	RJ	F	45	14	MI	VAPB c.166 C>T Rs74315431
22	SP	F	66	24	Bulbar	Sem mutação
23♦	RJ	M	49	19	MS	Sem mutação
24	SP	F	33	20	MI	Sem mutação
25	SP	M	65	11	Bulbar	Sem mutação
26	SP	F	23	17	MI	Sem mutação
27	SP	M	67	15	Bulbar	SNP (A/A)
28	SP	M	47	8	MI	SNP (A/A)
Média ± DP			52±11,25	16,75 ± 6,23		

NOTA: Características demográficas, tempo de evolução, local de início da doença apresentados como média ± desvio padrão e análises genéticas. Santa Catarina (SC), São Paulo (SP), Rio Grande do Norte (RN), Rio de Janeiro (RJ), Ceará (CE), Rio Grande do Sul (RG), Bahia (BA), Paraná (PR), Goiás (GO), masculino (M), feminino (F), membro superior (MS), membro inferior (MI). ★doente 9 foi excluído após aspirado da medula óssea devido ao não crescimento das CTM, †doente 15 teve óbito por motivos pertinentes a problemas respiratórios não relacionados ao tratamento celular e permaneceu no estudo até o seguimento 3, • doente 16 foi excluído do estudo por iniciar, à revelia do projeto, outra terapia incompatível com a pesquisa e permaneceu no estudo até o seguimento 4, ♦ doente 23 não compareceu na última visita, seguimento 7, devido a entorse no pé.

## 5.2 Análise global

A análise global de cada parâmetro eletrofisiológico estudado abrangeu o cálculo e a comparação da média dos *slopes* ( $\beta$ ) do período pré-infusão com a média dos *slopes* ( $\beta$ ) do período pós-infusão nos momentos 90, 180 e 210 dias após a primeira infusão das CTM. Os valores de  $p$  estão apresentados para cada período analisado na Tabela 3.

Nessa análise, o parâmetro MUSIX do músculo TA apresentou significância estatística,  $p \leq 0,05$ , ao se comparar o  $\beta$  pré-infusão com o  $\beta$  pós-infusão nos momentos 90, 180 e 210 dias.

Não foi encontrada diferença estatística na comparação entre o  $\beta$  pré-infusão e o  $\beta$  pós-infusão nos demais parâmetros em nenhum dos três momentos estudados.

Tabela 3 – Análise global dos dados eletrofisiológicos

Parâmetros	Momentos	<i>n</i>	$\beta$ pré-infusão (Média $\pm$ DP)	$\beta$ pós-infusão (Média $\pm$ DP)	<i>p</i>
Índice Neurofisiológico	90	24	-0.11 $\pm$ 0.05	-0.14 $\pm$ 0.04	0.64
	180	23	-0.12 $\pm$ 0.05	-0.10 $\pm$ 0.02	0.65
	210	23	-0.12 $\pm$ 0.05	-0.10 $\pm$ 0.02	0.71
MUNIX ACP	90	21	-5.26 $\pm$ 1.85	-6.73 $\pm$ 1.51	0.47
	180	19	-4.71 $\pm$ 1.96	-5.16 $\pm$ 0.86	0.81
	210	19	-4.71 $\pm$ 1.96	-4.95 $\pm$ 0.86	0.90
MUNIX ADM	90	21	-4.21 $\pm$ 2.04	-4.02 $\pm$ 1.03	0.94
	180	20	-4.50 $\pm$ 2.13	-3.64 $\pm$ 0.72	0.70
	210	20	-4.50 $\pm$ 2.13	-3.57 $\pm$ 0.59	0.68
MUNIX PIDM	90	20	-0.88 $\pm$ 3.61	-2.34 $\pm$ 1.15	0.69
	180	16	-0.13 $\pm$ 4.43	-5.10 $\pm$ 1.32	0.27
	210	15	-1.40 $\pm$ 4.54	-4.99 $\pm$ 1.31	0.44
MUNIX TA	90	21	-1.59 $\pm$ 2.89	-5.79 $\pm$ 1.39	0.12
	180	21	-1.60 $\pm$ 2.89	-4.13 $\pm$ 1.00	0.35
	210	21	-1.60 $\pm$ 2.89	-3.89 $\pm$ 0.94	0.40
MUSIX ACP	90	21	11.33 $\pm$ 7.74	2.10 $\pm$ 3.86	0.37
	180	19	11.61 $\pm$ 8.54	7.19 $\pm$ 4.62	0.43
	210	19	11.61 $\pm$ 8.54	7.31 $\pm$ 3.86	0.46
MUSIX ADM	90	21	16.19 $\pm$ 10.22	-0.08 $\pm$ 6.67	0.30
	180	20	16.90 $\pm$ 10.71	1.50 $\pm$ 3.98	0.25
	210	20	16.90 $\pm$ 10.71	0.51 $\pm$ 3.04	0.20
MUSIX PIDM	90	20	1.18 $\pm$ 2.90	-2.20 $\pm$ 2.72	0.46
	180	16	-0.69 $\pm$ 2.29	1.04 $\pm$ 1.23	0.44
	210	15	0.73 $\pm$ 1.95	1.64 $\pm$ 1.20	0.66
MUSIX TA	90	21	-1.29 $\pm$ 0.89	0.58 $\pm$ 0.39	<b>0.05*</b>
	180	21	-1.29 $\pm$ 0.89	0.79 $\pm$ 0.48	<b>0.02*</b>
	210	21	-1.29 $\pm$ 0.89	0.74 $\pm$ 0.48	<b>0.02*</b>
PAMC ACP	90	26	0.26 $\pm$ 0.08	-0.36 $\pm$ 0.06	0.21
	180	25	-0.25 $\pm$ 0.08	-0.28 $\pm$ 0.04	0.67
	210	24	-0.25 $\pm$ 0.08	-0.27 $\pm$ 0.04	0.77
PAMC ADM	90	26	-0.23 $\pm$ 0.09	-0.23 $\pm$ 0.05	0.98
	180	25	-0.26 $\pm$ 0.09	-0.21 $\pm$ 0.03	0.58
	210	24	-0.26 $\pm$ 0.09	-0.22 $\pm$ 0.03	0.65
PAMC PIDM	90	26	-0.29 $\pm$ 0.14	-0.33 $\pm$ 0.08	0.82
	180	25	-0.26 $\pm$ 0.15	-0.30 $\pm$ 0.06	0.78
	210	24	-0.26 $\pm$ 0.15	-0.30 $\pm$ 0.06	0.81

NOTA: Análise da média e do desvio padrão dos *slopes* ( $\beta$ ) na evolução temporal dos parâmetros eletrofisiológicos no período pré-infusão comparada com o período pós-infusão nos momentos 90, 180, 210 dias após a primeira infusão. Os valores de *n* apresentados na tabela equivalem ao número de doentes que efetivamente fizeram as avaliações, isto é, descontados aqueles que deixaram o programa ou que não realizaram o exame na data específica por impossibilidade pontual. Os valores de *p* estão apresentados para cada período analisado. \*  $p \leq 0,05$ .

### 5.3 Análise individual

A análise individual foi realizada com o objetivo de identificar doentes responsivos e não responsivos na evolução temporal de cada parâmetro eletrofisiológico estudado. Foram comparados os *slopes* ( $\beta$ ) individuais no acumulado do período pré-infusão com os *slopes* ( $\beta$ ) no acumulado do período pós-infusão nos momentos 90, 180

e 210 dias após a primeira infusão das CTM para cada parâmetro eletrofisiológico avaliado.

Três abordagens foram utilizadas na análise exploratória desses dados. A primeira foi a estratificação exploratória com base em critérios numéricos, na qual os sujeitos considerados responsivos foram aqueles em que os *slopes* dos parâmetros analisados no período pós-infusão das CTM nos momentos 90, 180 ou 210 dias foram numérica e positivamente alterados pelas infusões celulares, independentemente do resultado estatístico, conforme mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 – Análise individual de estratificação exploratória com base em critérios numéricos

Parâmetros	Quantidade de sujeitos (s) com <i>slopes</i> pós-infusão numérica e positivamente alterados em comparação aos <i>slopes</i> pré-infusão								
	90 dias			180 dias			210 dias		
	Momentos	s	n	%	s	n	%	s	n
Índice Neurofisiológico	7	26	26,9	9	25	36	9	24	37,5
MUNIX ACP	10	21	47,6	7	19	36,8	7	19	36,8
MUNIX ADM	7	21	33,3	7	20	35,0	8	20	40,0
MUNIX PIDM	12	21	57,1	7	16	43,8	7	15	46,7
MUNIX TA	6	21	28,6	6	21	28,6	8	21	38,0
MUSIX ACP	7	21	33,3	7	19	36,8	6	19	31,5
MUSIX ADM	11	21	52,4	8	20	40	11	20	55,0
MUSIX PIDM	12	20	60,0	9	16	56,3	9	15	60,0
MUSIX TA	8	21	38,1	7	21	33,3	8	21	38,1
PAMC ACP	9	26	34,6	13	25	52,0	12	24	50,0
PAMC ADM	13	26	50,0	10	25	40,0	10	24	41,6
PAMC PIDM	14	26	53,8	10	25	40,0	10	24	41,6

NOTA: A tabela mostra o número de sujeitos responsivos (s) segundo o critério de estratificação exploratória com base em critérios numéricos. Foram responsivos por valores absolutos os sujeitos que apresentaram *slopes* do período pós-infusão das CTM numérica e positivamente alterados em comparação aos *slopes* do período pré-infusão em cada parâmetro eletrofisiológico e momento avaliado. Estão demonstrados também o número total dos sujeitos avaliados em cada parâmetro (*n*) e a porcentagem de sujeitos responsivos. O número total de sujeitos em cada parâmetro avaliado pode ter sido menor que a coorte (*n* = 27) em função da impossibilidade do sujeito em realizar a avaliação devido às suas condições clínicas.

A segunda abordagem foi a estratificação exploratória com base em significância estatística  $p \leq 0,1$ , na qual os sujeitos considerados responsivos foram aqueles em que os *slopes* dos parâmetros analisados no período pós-infusão das CTM nos momentos 90, 180 ou 210 dias foram numérica e positivamente alterados e mostraram diferença estatística menor ou igual 10 % em relação aos *slopes* do período pré-infusão,  $p \leq 0,1$ , como demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5 – Análise individual de estratificação exploratória com base em significância estatística  $p \leq 0,1$ 

Parâmetros	Quantidade de sujeitos (s) com <i>slopes</i> pós-infusão numérica e positivamente alterados em comparação aos <i>slopes</i> pré-infusão e $p \leq 0,1$									
	Momentos	90 dias			180 dias			210 dias		
		s	n	%	s	n	%	s	n	%
Índice Neurofisiológico	1	23	4,3	0	23	0	0	23	0	
MUNIX ACP	0	19	0	1	17	5,8	1	17	5,8	
MUNIX ADM	0	18	0	2	17	11,7	2	17	11,7	
MUNIX PIDM	4	18	22,2	4	14	28,6	4	14	28,6	
MUNIX TA	1	18	5,6	1	19	5,3	2	19	10,5	
MUSIX ACP	1	19	5,3	1	17	5,9	1	17	5,9	
MUSIX ADM	0	18	0	1	17	5,9	2	17	11,8	
MUSIX PIDM	3	18	16,7	2	14	14,3	2	14	14,3	
MUSIX TA	0	18	0	2	19	10,5	2	19	10,5	
PAMC ACP	1	24	4,2	1	24	4,2	2	24	8,3	
PAMC ADM	2	25	8,0	4	25	16,0	4	24	16,6	
PAMC PIDM	2	21	9,5	4	21	19,0	4	21	19,0	

NOTA: A tabela mostra o número de sujeitos responsivos (s) segundo o critério de estratificação exploratória com base em significância estatística  $p \leq 0,1$ , na qual os sujeitos considerados responsivos foram aqueles em que os *slopes* dos parâmetros analisados no período pós-infusão das CTM foram numérica e positivamente alterados e mostraram diferença estatística menor ou igual a 10% em relação aos *slopes* do período pré-infusão,  $p \leq 0,1$ . Estão demonstrados também o número total dos sujeitos avaliados em cada parâmetro (n) e a porcentagem de sujeitos responsivos. O número total de sujeito em cada parâmetro avaliado pode ter sido menor que a coorte ( $n = 27$ ) em função da impossibilidade do sujeito em realizar a avaliação devido às suas condições clínicas.

A terceira abordagem foi a estratificação exploratória com base em significância estatística  $p \leq 0,05$ , na qual os sujeitos considerados responsivos foram aqueles em que os *slopes* dos parâmetros analisados no período pós-infusão das CTM nos momentos 90, 180 ou 210 dias foram numérica e positivamente alterados e mostraram diferença estatística menor ou igual 5% em relação aos *slopes* do período pré-infusão,  $p \leq 0,05$ , conforme mostrado na Tabela 6.

Tabela 6 – Análise individual de estratificação exploratória com base em significância estatística  $p \leq 0,05$ 

Parâmetros	Quantidade de sujeitos (s) com <i>slopes</i> pós-infusão numérica e positivamente alterados em comparação aos <i>slopes</i> pré-infusão e $p \leq 0,05$									
	Momentos	90 dias			180 dias			210 dias		
		s	n	%	s	n	%	s	n	%
Índice Neurofisiológico	0	23	0	0	23	0	0	23	0	
MUNIX ACP	0	19	0	1	17	5,8	1	17	5,8	
MUNIX ADM	0	18	0	1	17	5,8	2	17	11,7	
MUNIX PIDM	2	18	11,1	4	14	28,6	4	14	28,6	
MUNIX TA	1	18	5,6	0	19	0	0	19	0	
MUSIX ACP	0	19	0	1	17	5,9	1	17	5,9	
MUSIX ADM	0	18	0	0	17	0	1	17	5,9	
MUSIX PIDM	1	18	5,6	2	14	14,3	1	14	7,1	
MUSIX TA	0	18	0	1	19	5,3	0	19	0	
PAMC ACP	0	24	0	0	24	0	1	24	4,1	
PAMC ADM	2	25	8,0	4	25	16,0	4	24	16,6	
PAMC PIDM	0	21	0	2	21	9,5	2	21	9,5	

NOTA: A tabela mostra o número de sujeitos responsivos (s) segundo o critério de estratificação exploratória com base em significância estatística  $p \leq 0,05$ , na qual os sujeitos considerados responsivos foram aqueles em que os *slopes* dos parâmetros analisados no período pós-infusão das CTM foram numérica e positivamente alterados e mostraram diferença estatística menor ou igual a 5% em relação aos *slopes* do período pré-infusão,  $p \leq 0,05$ . Estão demonstrados também o número total dos sujeitos avaliados em cada parâmetro (n) e a porcentagem de sujeitos responsivos. O número total de sujeito em cada parâmetro avaliado pode ter sido menor que a coorte ( $n = 27$ ) em função da impossibilidade do sujeito em realizar a avaliação devido às suas condições clínicas.

Os dados mostram a existência de doentes responsivos e não responsivos pelos critérios aplicados. Ao se identificar quem foram os doentes responsivos que apresentaram o valor de  $p$  com significância estatística,  $p \leq 0,1$  ou  $p \leq 0,05$ , alguns se sobressaíram em relação a outros na quantidade de parâmetros nos quais foram responsivos. Houve doentes que foram responsivos em apenas um parâmetro, como o doente 2, enquanto outros, como os doentes 7 e 11, foram responsivos em pelo menos 3 dos 12 parâmetros analisados. Os doentes 1, 4, 6, 8, 12, 15, 17, 18, 23 e 27 não obtiveram responsividade estatisticamente significativa em nenhum dos parâmetros estudados, conforme mostrado na Figura 13.

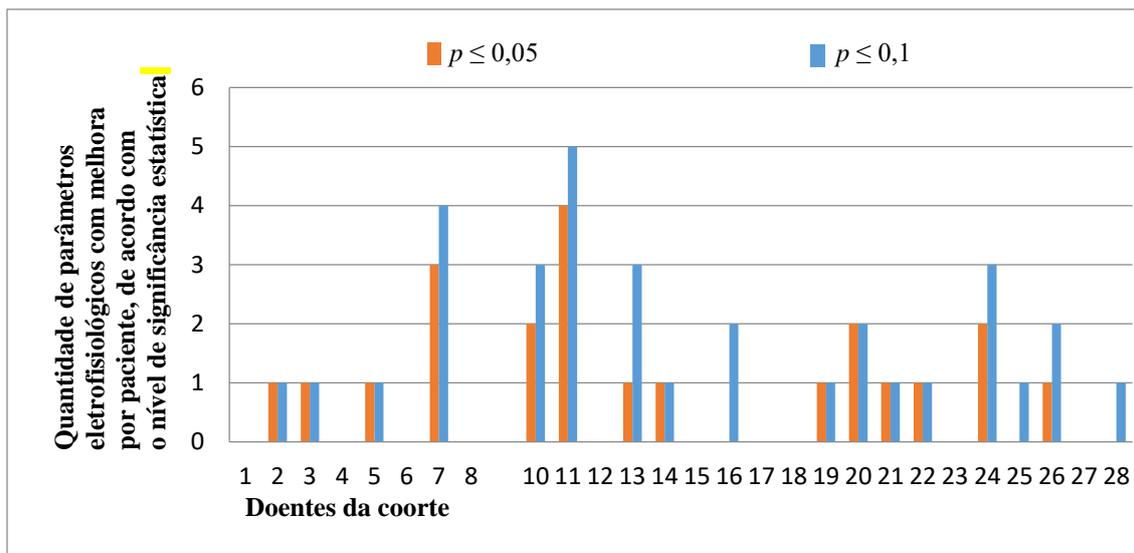


Figura 13 – Representação dos doentes da coorte e indicação do número de parâmetros eletrofisiológicos positivamente modificados de acordo com o nível de significância estatística ( $p \leq 0,05$  ou  $p \leq 0,1$ ) ao longo do estudo

Em laranja, a quantidade de parâmetros eletrofisiológicos distribuídos por doente com  $p \leq 0,05$ . Em azul, a quantidade de parâmetros eletrofisiológicos distribuídos por doente com  $p \leq 0,1$ .

A análise dos sujeitos responsivos que apresentam o valor de  $p$  com significância estatística,  $p \leq 0,1$  ou  $p \leq 0,05$ , distribuídos por parâmetro eletrofisiológico e momentos analisados, nota-se que a responsividade individual foi pontual, pois nenhum doente foi responsivo em todos os parâmetros e momentos avaliados, conforme mostrado na Tabela 7. Os doentes 7, 11 e 20, correspondentes a 10,7% da amostra, destacaram-se ao apresentarem resposta estatisticamente significativa,  $p \leq 0,05$ , em pelo menos dois parâmetros eletrofisiológicos do mesmo músculo e em dois ou mais momentos consecutivos.

O conjunto dos dados da Figura 13 e Tabela 7 pode ser útil para identificar as possíveis características clínicas dos doentes com melhor resposta à terapia celular com as CTM.

Tabela 7 – Indicação dos sujeitos responsivos com valor de  $p$  com significância estatística

Parâmetros Momentos	$p \leq 0,1$			$p \leq 0,05$		
	90 dias	180 dias	210 dias	90 dias	180 dias	210 dias
IN	24					
MUNIX ADM		13, 24	13, 24		13	13, 24
MUSIX ADM		5	5, 13			5
PAMC ADM	2, 7	3, 7, 10, 26	3, 7, 10, 26	2, 7	3, 7, 10, 26	3, 7, 10, 26
MUNIX ACP		21	21		21	21
MUSIX ACP	11	11	11		11	11
PAMC ACP	10	24	10, 24			24
MUNIX PIDM	7, 11, 16, 20	7, 11, 19, 20	7, 11, 19, 20	11, 20	7, 11, 19, 20	7, 11, 19, 20
MUSIX PIDM	16, 20, 28	11, 20	11, 20	20	11, 20	11
PAMC PIDM	13, 26	7, 10, 14, 25	7, 10, 14, 25		7, 14	7, 10
MUNIX TA	11	7	7, 11	11		
MUSIX TA		11, 22	11, 22		22	

NOTA: A tabela mostra quem são os sujeitos responsivos que apresentam o valor de  $p$  com significância estatística,  $p \leq 0,1$  ou  $p \leq 0,05$ , distribuídos por parâmetro eletrofisiológico estudado e momentos analisados.

#### 5.4 Análise da correlação de Pearson

A análise da correlação de Pearson foi realizada entre os dados eletrofisiológicos do MUNIX nos músculos ACP, ADM e PIDM e os dados da escala ALSFRS-R, bem como entre dados do MUNIX nesses mesmos músculos e os dados da dinamometria manual. O MUNIX foi o parâmetro eletrofisiológico estudado que melhor representou a perda de unidades motoras, portanto foi o dado selecionado para a realização das correlações com os parâmetros clínicos da ALSFRS-R e da dinamometria manual, cujas evoluções são bem conhecidas na ELA.

##### 5.4.1 Análise da correlação de Pearson entre o MUNIX e ALSFRS-R

A análise da correlação de Pearson foi realizada entre os dados eletrofisiológicos do MUNIX nos músculos ACP, ADM e PIDM e os dados da escala ALSFRS-R.

As figuras abaixo representam as médias dos valores do MUNIX nos músculos ACP, ADM e PIDM correlacionadas com as médias dos valores da ALSFRS-R a cada visita, para a avaliação deles à luz da evolução da doença. Os dados indicam que esses parâmetros apresentam correlação linear positiva com  $p < 0,05$ .

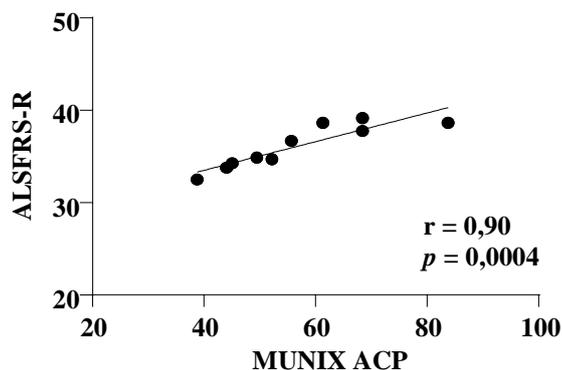


Figura 14 – Correlação de Pearson entre os parâmetros MUNIX no músculo ACP e a ALSFRS-R

A figura é a reta representativa da correlação entre os dois parâmetros avaliados utilizando a média de seus registros em cada uma das 10 visitas realizadas pelos doentes participantes do estudo. No canto inferior direito está representada a análise estatística desta correlação. Os dados indicam que os parâmetros do MUNIX no músculo ACP e a ALSFRS-R apresentam correlação linear positiva com  $p < 0,05$ .

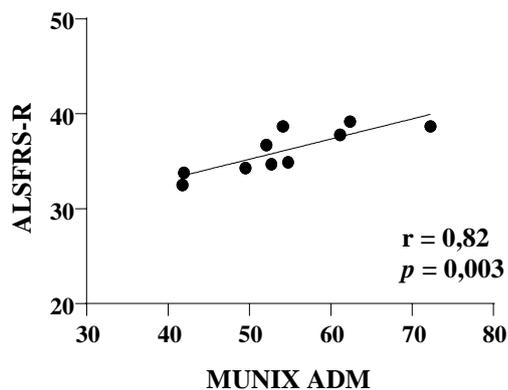


Figura 15 – Correlação de Pearson entre os parâmetros MUNIX no músculo ADM e a ALSFRS-R

A figura é a reta representativa da correlação entre os dois parâmetros avaliados utilizando a média de seus registros em cada uma das 10 visitas realizadas pelos doentes participantes do estudo. No canto inferior está representada a análise estatística desta correlação. Os dados indicam que os parâmetros do MUNIX no músculo ADM e a ALSFRS-R apresentam correlação linear positiva com  $p < 0,05$ .

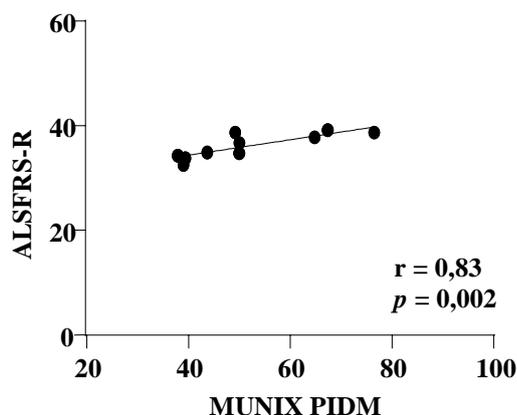


Figura 16 – Correlação de Pearson entre os parâmetros MUNIX no músculo PIDM e a ALSFRS-R

A figura é a reta representativa da correlação entre os dois parâmetros avaliados utilizando a média de seus registros em cada uma das 10 visitas realizadas pelos doentes participantes do estudo. No canto inferior está representada a análise estatística desta correlação. Os dados indicam que os parâmetros do MUNIX no músculo PIDM e a ALSFRS-R apresentam correlação linear positiva com  $p < 0,05$ .

A Tabela 8 mostra os resultados das correlações realizadas entre os valores do MUNIX nos músculos ACP, ADM e PIDM e os valores da escala ALSFRS-R obtidos dos doentes participantes do estudo e individualizados por visita. A correlação entre esses dados não foi estatisticamente significativa em nenhuma das 10 visitas avaliadas.

Tabela 8 – Análise da correlação de Pearson entre os parâmetros do MUNIX e da ALSFRS-R

Correlações	Pearson	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10
MUNIX	r	0,19	0,34	0,23	-0,14	0,30	0,17	-0,07	-0,13	-0,11	-0,004
ACP X	n	22	25	25	17	24	21	20	19	19	19
ALSFRS-R	p	0,39	0,08	0,25	0,58	0,14	0,45	0,76	0,58	0,65	0,98
MUNIX	r	0,11	0,37	0,24	-0,07	0,38	0,08	0,22	0,04	-0,12	0,15
ADM X	n	23	26	26	17	25	21	21	20	20	20
ALSFRS-R	p	0,60	0,05	0,23	0,78	0,05	0,71	0,32	0,85	0,60	0,50
MUNIX	r	-0,05	0,11	0,14	-0,22	0,16	-0,01	0,01	0,12	-0,03	0,06
PIDM X	n	21	24	24	16	22	20	19	18	16	15
ALSFRS-R	p	0,82	0,60	0,48	0,40	0,45	0,93	0,95	0,63	0,89	0,80

NOTA: Dados da análise da correlação de Pearson (r) realizada entre os registros eletrofisiológicos do MUNIX nos músculos ACP, ADM e PIDM e os dados da escala ALSFRS-R. O número (n) de doentes com ELA submetidos aos registros nas visitas (V) é apresentado, assim como o valor estatístico (p) das análises de cada visita. Não houve significância estatística entre os dados correlacionados em nenhuma das 10 visitas avaliadas.

### 5.4.2 Análise da correlação de Pearson entre o MUNIX e a dinamometria manual

A análise da correlação de Pearson foi realizada entre os dados eletrofisiológicos do MUNIX nos músculos ACP, ADM e PIDM e os dados da dinamometria obtidos da mão do mesmo lado.

As figuras a seguir representam as médias dos valores do MUNIX nos músculos ACP, ADM e PIDM correlacionadas com as médias dos valores da dinamometria a cada visita, para a avaliação deles à luz da evolução da doença. Os dados indicam que esses parâmetros apresentam correlação linear positiva com  $p < 0,05$ .

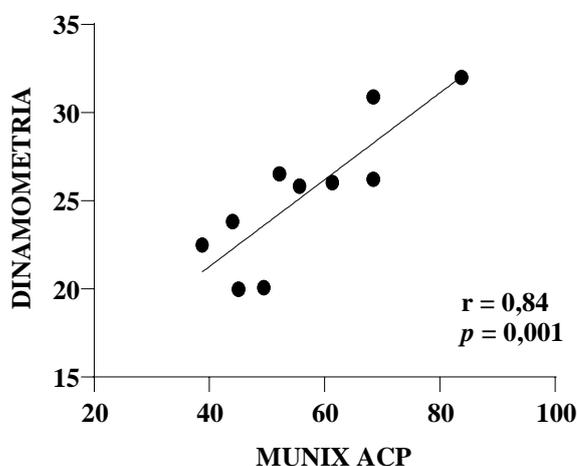


Figura 17 – Correlação de Pearson entre os parâmetros MUNIX no músculo ACP e a dinamometria manual

A figura é a reta representativa da correlação entre os dois parâmetros avaliados utilizando a média de seus registros em cada uma das 10 visitas realizadas pelos doentes participantes do estudo. No canto inferior está representada a análise estatística desta correlação. Os dados indicam que os parâmetros do MUNIX no músculo ACP e a dinamometria manual, ambos obtidos do mesmo lado, apresentam correlação linear positiva com  $p < 0,05$ .

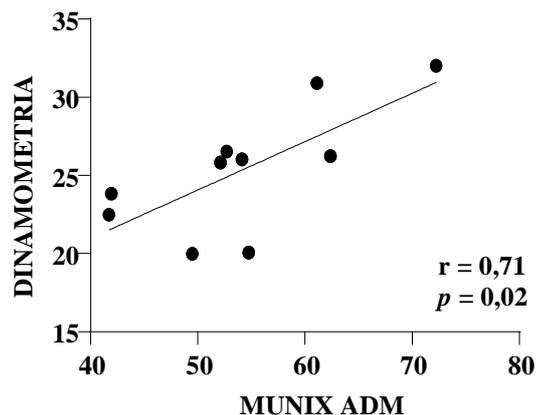


Figura 18 – Correlação de Pearson entre os parâmetros MUNIX no músculo ADM e a dinamometria manual

A figura é a reta representativa da correlação entre os dois parâmetros avaliados utilizando a média de seus registros em cada uma das 10 visitas realizadas pelos doentes participantes do estudo. No canto inferior está representada a análise estatística desta correlação. Os dados indicam que os parâmetros do MUNIX no músculo ADM e a dinamometria manual, ambos obtidos do mesmo lado, apresentam correlação linear positiva com  $p < 0,05$ .

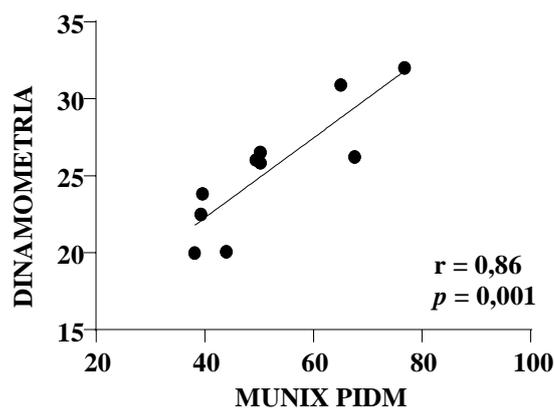


Figura 19 – Correlação de Pearson entre os parâmetros MUNIX no músculo PIDM e a dinamometria manual

A figura é a reta representativa da correlação entre os dois parâmetros avaliados utilizando a média de seus registros em cada uma das 10 visitas realizadas pelos doentes participantes do estudo. No canto inferior está representada a análise estatística desta correlação. Os dados indicam que os parâmetros do MUNIX no músculo PIDM e a dinamometria manual, ambos obtidos do mesmo lado, apresentam correlação linear positiva com  $p < 0,05$ .

A Tabela 9 mostra os resultados das correlações realizadas entre os valores do MUNIX nos músculos ACP, ADM e PIDM e os valores da dinamometria manual, ambos obtidos da mão do mesmo lado e individualizados por visita. Os dados indicam correlação positiva e com valor de  $p$  estatisticamente significativo nas visitas V3, V4 e V6 na correlação entre dinamometria e o MUNIX do músculo ACP; em todas as visitas

na correlação entre dinamometria e o MUNIX do músculo ADM; e nas visitas V6 e V7 na correlação entre dinamometria e o MUNIX do músculo PIDM.

Tabela 9 – Análise da correlação de Pearson entre os parâmetros do MUNIX e a dinamometria manual (DM)

Correlações	Pearson	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10
MUNIX ACP X DM	r	0,40	0,38	0,48	0,48	0,34	0,45	0,21	0,11	0,31	0,35
	n	21	25	25	25	24	21	19	19	19	19
	p	0,07	0,05	<b>0,01*</b>	<b>0,01*</b>	0,10	<b>0,03*</b>	0,37	0,62	0,19	0,13
MUNIX ADM X DM	r	0,50	0,53	0,39	0,39	0,45	0,53	0,59	0,53	0,58	0,53
	n	22	26	26	26	25	21	20	20	20	20
	p	<b>0,01*</b>	<b>0,004*</b>	<b>0,04*</b>	<b>0,04*</b>	<b>0,02*</b>	<b>0,01*</b>	<b>0,006*</b>	<b>0,01*</b>	<b>0,006*</b>	<b>0,01*</b>
MUNIX PIDM X DM	r	-0,03	0,24	0,04	0,19	0,28	0,56	0,49	0,35	0,24	0,26
	n	20	24	24	24	22	20	18	18	16	15
	p	0,88	0,25	0,83	0,36	0,19	<b>0,009*</b>	<b>0,03*</b>	0,14	0,36	0,33

NOTA: Dados da análise da correlação de Pearson (r) realizada entre os registros eletrofisiológicos do MUNIX nos músculos ACP, ADM e PIDM e os dados da dinamometria manual, ambos obtidos da mão do mesmo lado. O número (n) de doentes com ELA submetidos aos registros nas visitas (V) é apresentado, assim como o valor estatístico (p) das análises de cada visita. \* indica as visitas com valor de  $p < 0,05$ .

## **6. DISCUSSÃO**

---

## 6. DISCUSSÃO

Este ensaio clínico avaliou o seguimento de biomarcadores eletrofisiológicos como o IN, MUNIX, MUSIX e PAMC em doentes com ELA que foram submetidos a duas infusões de CTM no líquido. A literatura a respeito do uso dos variados tipos de células-tronco em doentes com ELA que apresentam como desfecho o seguimento de algum desses parâmetros eletrofisiológicos é escassa (Goutman et al., 2019).

A metodologia adotada para a aquisição e análise dos dados eletrofisiológicos no presente estudo foi capaz de acompanhar a evolução da doença e de detectar possíveis efeitos da atuação das CTM tanto do ponto de vista global da amostra quanto individual entre os sujeitos da pesquisa. Estudos realizados a respeito desse tema utilizaram metodologias diversas para a análise dos dados, como o estudo que comparou o declínio da ALSFRS e da amplitude do PAMC no trimestre pré-infusão com o trimestre pós-infusão de células-tronco (Zhang et al., 2009). Nefussy et al. (2010), de forma similar ao presente estudo, utilizaram as alterações no *slope* dos parâmetros estudados para a análise de seus dados. Os resultados dos achados eletrofisiológicos relatados na literatura comparando o período pré-infusão e pós-infusão de células-tronco foram variáveis (Mazzini et al., 2010; Chen et al., 2012; Petrou et al., 2016). Manzini et al. (2010) não observaram modificação significativa no declínio de todos os aspectos clínicos e medidas instrumentais, incluindo o MUNE e o IN, entre os períodos pré e pós-tratamento, diferentemente de determinados resultados obtidos neste estudo. No entanto, outras pesquisas relataram melhora de parâmetros neurofisiológicos em doentes com ELA após infusão de células-tronco (Chen et al., 2012; Petrou et al., 2016). Vale ressaltar que essas possíveis discrepâncias parciais relatadas nos resultados dos estudos citados podem ser devidas às diferenças no tamanho amostral, tipo celular, dose, via de administração, padrão de seguimento e desfechos utilizados.

Três obstáculos principais foram identificados durante a realização deste trabalho. Primeiramente, a dificuldade de ativação muscular voluntária durante a realização da técnica do MUNIX devida ao comprometimento dos NMS. Doentes com ELA cursando com importante disfunção dos NMS podem apresentar sinal do MUNIX com picos isolados de alta amplitude devidos à presença de unidades motoras disparando lenta e irregularmente durante a tentativa de contração muscular em baixa

intensidade. Sinais com essas características reduzem o valor do MUNIX e devem ser excluídos da análise (Nandedkar et al., 2018).

Em segundo lugar, o efeito chão em músculos estudados nas avaliações. Os músculos ACP, ADM, PIDM e TA do lado com melhor desempenho nos testes de força muscular foram escolhidos para a aquisição dos registros eletrofisiológicos desde a primeira até a última avaliação. Houve benefício de estimar o número de unidades motoras em múltiplos músculos ao invés de usar a medida em apenas um músculo, pois dessa forma o efeito chão não ocorreu (Neuwirth et al., 2010). Além disso, a realização do MUNIX em músculos atrofiados apresenta o risco do efeito chão precoce, uma vez que mudanças no conjunto de neurônios motores não podem ser detectadas nessa condição (Neuwirth et al., 2015). Neuwirth et al. (2015) indicam a seleção de músculos do lado clinicamente mais forte para a realização do MUNIX a fim de evitar medições em músculos consumidos. Músculos com PAMC menor que 0.5 mV foram excluídos da avaliação pela técnica do MUNIX na presente pesquisa. Nandedkar et al. (2018) não realiza o estudo do MUNIX em músculos com amplitudes do PAMC inferiores a 0.5 mV, visto seu valor depender da amplitude do PAMC do músculo estudado. A máxima otimização da amplitude do PAMC é condição necessária para a correta interpretação de valores do MUNIX, quando estes estão reduzidos (Nandedkar et al., 2018).

Em terceiro, a ausência precoce ou presença de fatores confundidores, como ondas A e/ou *repeaters*, durante obtenção da persistência da onda F no músculo ADM para o cálculo do IN. Ondas de amplitudes menores que 40 $\mu$ V foram desconsideradas e respostas de mesma morfologia, duração, amplitude, latência e que apresentaram cinco ou mais repetições durante a sequência dos 20 estímulos foram consideradas ondas A ou *repeaters* e excluídas da análise neste estudo. O IN pode atingir efeito chão e assumir valor zero devido à ausência completa de ondas F antes do desejado. Isso ocorre caso a persistência da onda F basal seja baixa, entre 10 e 40%, e a depender da taxa de progressão da doença. Tal situação pode impedir o acompanhamento do doente por período de tempo suficiente. O estudo de ambas as mãos e a seleção daquela com o maior valor inicial do IN pode evitar a ocorrência desse cenário (Cheah et al., 2011).

Os resultados desta pesquisa foram divididos em análise global e individual. A interpretação desses resultados considerou as relações do MUNIX, MUSIX, PAMC e IN no decurso temporal da doença. Boekestein et al. (2012) ressaltaram que os valores

de MUNIX e MUSIX, juntamente com a amplitude do PAMC, mostraram-se informativos sobre o processo fisiopatológico subjacente.

A análise global dos dados indica que houve redução progressiva do número de unidades motoras em todos os músculos estudados, tanto no período pré-infusão quanto no período pós-infusão, comprovada pelo *slope* predominantemente negativo do MUNIX em ambos os períodos. A queda observada do MUNIX em doentes com ELA está de acordo com a literatura (Neuwirth et al., 2010; Boekestein et al., 2012; Escorcio-Bezerra et al., 2018).

Neste estudo também se verificou processo de reinervação compensatória tanto no período pré-infusão quanto no período pós-infusão nos músculos ACP, ADM e PIDM e no período pós-infusão no músculo TA, comprovada pelo *slope* predominantemente positivo do MUSIX nesses músculos e períodos. Estudo prévio mostrou aumento médio em mais de 50% do MUSIX nos doentes com ELA após acompanhamento de oito meses, dado indicativo de reinervação compensatória (Boekestein et al., 2012).

Outro achado desta pesquisa foi perda progressiva de unidades motoras nos músculos ACP, ADM e PIDM apenas parcialmente compensada pelo processo de reinervação, comprovada pelo *slope* predominantemente negativo dos PAMC desses músculos ao longo do período pré-infusão e pós-infusão. Boekestein et al. (2012) encontraram declínio relativo menor que 30% na amplitude do PAMC, queda entre 41 e 67% do MUNIX e incremento entre 39 e 145% do MUSIX em quatro doentes com ELA. Os autores interpretaram que ocorreu adequado mecanismo compensatório de reinervação colateral que preveniu deterioração clínica rápida nesses quatro doentes.

Por fim, neste trabalho, o IN também apresentou *slope* negativo, indicando progressão da doença ao longo do período estudado. Estudos pgressos relataram o IN ser parâmetro sensível em avaliar a progressão de doentes com ELA (de Carvalho et al., 2005; Cheah et al., 2011).

O MUSIX do músculo TA mostrou que o processo de reinervação se iniciou apenas no período pós-infusão, dado com significância estatística,  $p \leq 0,05$ , para os momentos 90, 180 e 210 dias após a primeira infusão das CTM. Vale ressaltar que o *slope* do MUNIX do TA nesse período pós-infusão apresentou piora, portanto, o início do processo de reinervação observado não foi acompanhado de redução da perda de

unidades motoras. Não se encontrou dados na literatura que indiquem a ação das células tronco no início do processo de reinervação no músculo TA. MUSIX é método rápido e não invasivo para acessar reinervação (Alix et al., 2019). Dados da literatura descrevem relação inversa entre o MUNIX e MUSIX em condições como a ELA (Nandedkar et al., 2010; Escorcio-Bezerra et al., 2016), assim como observado no presente estudo. Petrou et al. (2016) consideraram que a melhora no declínio do PAMC no período pós-transplante das CTM secretoras de fatores neurotróficos, especialmente no músculo bíceps braquial do lado que recebeu a via de infusão intramuscular, deveu-se a efeitos neurotróficos localizados no sítio do transplante celular. Os autores não citam especificamente a reinervação como possível contribuidor dessa melhora.

A análise de sujeitos respondedores deve ser incluída segundo as diretrizes atualizadas para o desenvolvimento de ensaios clínicos na ELA, pois tem o potencial de demonstrar efeitos benéficos de determinado tratamento em subgrupo de pacientes com mesmo fenótipo (van den Berg et al., 2019). A análise individual dos dados desse estudo mostrou responsividade pontual identificada em determinados sujeitos, no entanto, outros doentes não apresentaram nenhuma resposta à terapia celular do ponto de vista eletrofisiológico.

Os achados eletrofisiológicos estatisticamente significativos dos sujeitos respondedores do presente estudo foram correlacionados com os objetivos de compreender os processos fisiopatológicos subjacentes (Boekestein et al., 2012), fortalecer o significado das respostas individuais e identificar os sujeitos com melhor resposta à terapia celular. Dessa forma, destacaram-se três doentes (10,7% da amostra), os quais apresentaram resposta estatisticamente significante,  $p \leq 0,05$ , em pelo menos dois parâmetros eletrofisiológicos do mesmo músculo e em dois ou mais momentos consecutivos.

O doente 7 apresentou redução da perda de unidades motoras no músculo PIDM nos momentos 180 e 210 dias do período pós-infusão das CTM, quando comparados com o período pré-infusão,  $p \leq 0,05$  para o MUNIX e PAMC. Esses achados não foram acompanhados de alterações significativas no processo de reinervação aferido pelo MUSIX.

O doente 11 apresentou redução da perda de unidades motoras acompanhada de redução do processo de reinervação secundário no músculo PIDM nos momentos 180 e

210 dias do período pós-infusão das CTM, quando comparados com o período pré-infusão,  $p \leq 0,05$  para o MUNIX e MUSIX do PIDM. Não houve alteração significativa no PAMC deste mesmo músculo.

O doente 20 apresentou redução da perda de unidades motoras acompanhada de redução do processo de reinervação secundário no músculo PIDM nos momentos 90 e 180 dias do período pós-infusão das CTM, quando comparados com o período pré-infusão,  $p \leq 0,05$  para o MUNIX e MUSIX do PIDM. Como nota, o momento 210 dias do período pós-infusão das CTM também se mostrou significativo para esses dados quando considerado o  $p \leq 0,1$ . Não houve alteração significativa no PAMC deste músculo.

A avaliação de respostas individuais à terapia celular em doentes com ELA está descrita na literatura. Estudos identificaram doentes pontuais que apresentaram, no período pós-transplante de células-tronco, tendência a desaceleração da deteriorização da CVF e da escala MRC (Mazzini et al., 2010), lentificação da progressão da doença e aumento de sobrevida (Mazzini et al., 2012), bem como estabilização dos valores da ALSFRS (Oh et al., 2015) e descrição de alguma melhora clínica subjetiva temporária (Staff et al., 2016).

Os três doentes deste estudo com melhor resposta a terapia celular sob o ponto de vista dos parâmetros eletrofisiológicos avaliados apresentavam idade entre 52 e 61 anos e não configuravam entre os mais jovens participantes da pesquisa. Os três eram do sexo feminino, dois apresentavam ELA de início apendicular no membro superior e um com ELA de início bulbar. Os valores da escala ALSFRS e da CVF inicial desses doentes não se destacavam entre os mais elevados ou reduzidos. Nenhum deles era portador de mutações genéticas relacionadas a ELA. Não há dados a respeito do predomínio do acometimento dos NMS ou NMI nesses doentes. A literatura aponta os fatores idade de início mais precoce e predominância do acometimento dos NMI como conhecidamente associados à progressão mais lenta da doença (Chiò et al., 2009; Wijesekera e Leigh, 2009). A seleção dos doentes com ELA a ser submetidos à terapia celular, considerando a localização, gravidade e forma clínica da doença, representa questão-chave a ser respondida (Mazzini et al., 2010).

Os resultados das avaliações eletrofisiológicas realizadas neste estudo sugerem possíveis efeitos globais e individuais da atuação das CTM. Evidências atuais indicam

que a terapia com células-tronco pode ter efeito positivo transitório na progressão da ELA, exceto na função pulmonar (Morata-Tarifa et al., 2021).

A análise da correlação de Pearson realizada neste estudo entre a média do valor do MUNIX nos músculos ACP, ADM e PIDM e a média do valor da ALSFRS-R e da dinamometria manual a cada visita apresentou correlação linear positiva e estatisticamente significativa (figuras 14, 15, 16, 17, 18 e 19). Os valores numéricos desses dados foram reduzidos ao longo do tempo do estudo, indicando declínio do número de unidades motoras nos músculos examinados associado à piora da função clínica global e à redução da força da mão. Esses dados estão em acordo com literatura (Gawel e Kuzma-Kozakiewicz, 2016). Em estudo de Gawel e Kuzma-Kozakiewicz (2016), MUNIX refletiu a disfunção motora e a progressão da doença. A ALSFRS-R é medida de desfecho primário mais comumente usada em ensaios clínicos de doentes com ELA, porque avalia a função global, é de fácil aplicação e se correlaciona com a sobrevida dos doentes (Pinto e de Carvalho, 2017). No entanto, os diferentes métodos de MUNE são mais sensíveis do que a ALSFRS-R no monitoramento da progressão da ELA (van Dijk et al., 2010; Boekestein et al., 2012; Neuwirth et al., 2015). Os métodos de MUNE obtiveram melhor sensibilidade em detectar a progressão da doença em comparação a outras medidas clínicas e eletrofisiológicas, como a amplitude do PAMC, a força de preensão, o grau de fraqueza medida pela MRC e a capacidade vital forçada (Felice, 1995; de Carvalho e Swash, 2009).

Vale ressaltar, que declínio do MUNIX médio e do IN foram detectados em músculos clinicamente não afetados e com estabilidade dos subescores da escala ALSFRS-R e das medidas da dinamometria manual (Escorcio-Bezerra et al., 2018). Mudanças nos valores do MUNE podem ser vistas antes da redução da força e da atrofia clinicamente detectáveis (Ahn et al., 2010; Neuwirth et al., 2017).

Nesta pesquisa, a análise da correlação de Pearson realizada entre os valores do MUNIX nos músculos ACP, ADM e PIDM e os valores da escala ALSFRS-R e da dinamometria manual individualizados por visita mostrou resultados mais robustos na relação entre o MUNIX e a dinamometria. Os registros do MUNIX nos músculos analisados, quando correlacionados com os dados da ALSFRS-R, não obtiveram resultado estatisticamente significativo em nenhuma das 10 visitas. No entanto, na maioria delas, houve relação linear positiva entre as variáveis.

A análise entre os valores do MUNIX nos músculos ACP, ADM e PIDM e os valores da dinamometria manual mostrou correlação linear positiva em todas as visitas, exceto na correlação com o MUNIX do músculo PIDM na visita 1. Além disso, diferentemente do ocorrido nas correlações entre o MUNIX e a ALSFRS-R, resultados estatisticamente significativos foram encontrados em diversas visitas nas correlações entre a dinamometria e o MUNIX dos três músculos analisados (Tabela 9). Tais diferenças podem ser explicadas pelo fato da ALSFRS-R ser medida de disfunção global, enquanto os testes eletrofisiológicos representam disfunção localizada (Jacobsen et al., 2018), assim como a dinamometria manual.

Gawel e Kuzma-Kozakiewicz (2016) encontraram correlação com significância estatística,  $p < 0,05$ , entre os valores do MUNIX e MRC individuais nos músculos abductor curto do polegar, abductor do dedo mínimo, tibial anterior, extensor curto dos dedos e abductor do hálux. Além disso, o MUNIX global se correlacionou com significância estatística,  $p < 0,05$ , com a MRC global e com o quadro de disfunção clínica medida pela escala ALSFRS-R. Testes eletrofisiológicos realizados por Jacobsen et al. (2018) mostram correlação significativa entre a ALSFRS-R e o MScanFit MUNE, contudo não foi encontrada correlação significativa entre a ALSFRS-R e MUNIX ou MUNE por estimulação em múltiplos pontos.

Este trabalho faz parte do protocolo de pesquisa fase 1/2 cujo objetivo foi acessar segurança e indícios de eficácia da infusão de duas doses de CTM intratecais em doentes com ELA. Estudo futuro fase 3, com número maior de doentes, randomizado, duplo-cego, placebo-controlado, que inclua indivíduos com características clínicas mais homogêneas e com apropriado poder de suplantar a variabilidade característica da própria doença em estudo, poderá trazer resultados mais robustos (Syková et al., 2017; Goutman et al., 2019).

É válido mencionar que os doentes com ELA formam grupo ávido pelo desenvolvimento de novas terapias para a doença. O efeito placebo, combinado com altas expectativas e circunstâncias psicossociais diversas, que afetam a resposta do sistema psiconeuroimunológico, pode modificar o resultado de qualquer terapia em doentes com ELA (Syková et al., 2017).

## **7. CONCLUSÕES**

---

## 7. CONCLUSÕES

O estudo dos registros eletrofisiológicos seriados em doentes com ELA que receberam duas infusões de células-tronco mesenquimais no líquido mostrou:

- A metodologia adotada para aquisição e estudo dos dados eletrofisiológicos foi adequada à análise do seguimento dos doentes participantes da pesquisa.
- Registros eletrofisiológicos foram capazes de identificar possíveis efeitos das infusões das CTM nos sujeitos do estudo, tanto do ponto de vista global quanto individual.
- Os registros eletrofisiológicos do MUNIX se correlacionaram com dados clínicos obtidos por meio da ALSFRS-R e da dinamometria manual no decorrer do estudo, especialmente quando comparados à média dos valores desses parâmetros.
- Registros eletrofisiológicos mostram-se instrumentos promissores para as análises dos desfechos primário ou secundário de futuros ensaios clínicos com doentes portadores de ELA, especialmente naqueles de fase 3 com tamanho amostral maior.



**Anexo A. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido****FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:.....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO: M  F   
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....  
BAIRRO: ..... CIDADE .....  
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....).....
2. RESPONSÁVEL LEGAL.....  
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE .....  
SEXO: M  F  DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....  
BAIRRO: ..... CIDADE: .....  
CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

**DADOS SOBRE A PESQUISA**

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Estudo fase 1/2 da segurança e eficácia de duas doses intratecais de células-tronco mesenquimais autólogas (CTM), obtidas de células estromais da medula óssea, em pacientes com Esclerose Lateral Amiotrófica.

PESQUISADOR: Prof. Dr. Gerson Chadi

CARGO/FUNÇÃO: Professor Titular

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 53368

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Neurologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO  RISCO MÉDIO   
RISCO BAIXO  RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses

**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa que causa fraqueza e paralisia dos músculos. A doença pode começar em qualquer músculo do braço, mão, perna, pé, da fala, ou da respiração, mas evolui rapidamente para os outros músculos. A doença não tem cura

ou tratamento e o paciente morre entre 2 anos e meio e 5 anos por paralisia dos músculos respiratórios e complicações associadas a esta paralisia. Como todos os tratamentos com drogas testados até então não surtiram efeitos, os centros de pesquisa médica iniciam agora estudos com células tronco. Este estudo visa a injeção de 2 doses de células-tronco obtidas em laboratório a partir do sangue coletado da medula óssea de pacientes diagnosticados com ELA que atenderem os critérios de inclusão. As duas injeções de células-tronco serão feitas no liquor da sua coluna vertebral na região das costas acima das nádegas. Haverá o intervalo de 1 mês entre as duas injeções. O objetivo do estudo é a avaliação da segurança do procedimento e dos efeitos benéficos das células tronco na evolução da sua doença.

Você, paciente portador da ELA, será avaliado e se for selecionado para o estudo, será acompanhado no Ambulatório de Pesquisa em ELA do HC-FMUSP pelo período aproximado de 41 semanas, tempo que durará todo o estudo. Neste período você sempre receberá o agendamento da próxima visita. No período, de seleção (**visita 1**), você será avaliado pelo neurologista para a avaliação clínica geral do seu estado e a confirmação do diagnóstico de ELA pelo estadiamento da sua doença, e também para a realização de eletrocardiograma e de provas de função pulmonar. Estes exames são simples e rápidos e serão feitos no próprio ambulatório e você não sentirá dor ou desconforto. O eletrocardiograma registrará o funcionamento do seu coração e as provas de função pulmonar servirão para a análise das suas funções respiratórias após você respirar no interior de um tubo conectado a uma pequena máquina; também será solicitado para você respirar pelo nariz com força, além de realizar algumas respirações forçadas para avaliação do seu pulmão e músculos da respiração. Não haverá dor ou desconforto na realização dos dois exames. Nesta visita, será coletada a sua urina, para exames de rotina e 10 ml de sangue de uma veia superficial do seu braço, para exames de sangue de rotina, procedimentos estes que serão feitos no Laboratório Central do HCFMUSP. Você poderá ter pequeno hematoma e sentir pequeno desconforto (dor) no local da coleta do sangue, o que poderá durar 1 ou dois dias e desaparecerão sozinhos. No exame de urina, você será orientado a coletar a sua urina num frasco, frasco este que já ficará no próprio Laboratório para exame laboratorial. **Na visita 1**, você também poderá ser submetido ao exame de eletroneuromiografia (ENMG), caso não tenha feito anteriormente e a critério do neurologista que acompanhará você no estudo. O exame será feito no Centro de ENMG do HC-FMUSP por neurofisiologista clínico especializado. A ENMG é sempre necessária para a confirmação do diagnóstico da ELA e consiste na introdução de agulhas em diversos músculos do seu corpo, uma por vez, e registro do funcionamento destes músculos. As agulhas serão colocadas em determinados músculos da palma da mão, braço, pé, perna, costas, e na língua, dos dois lados do corpo, e ficarão nestes músculos por alguns segundos para o registro. Dor será sentida nestes locais durante a introdução das agulhas, tempo do registro e no dia do exame, que deverá ir desaparecendo nos próximos 2 ou 3 dias. Você será orientado a tomar medicação para dor, caso

sinta desconforto maior. Pequeno sangramento poderá ocorrer apenas após a retirada das agulhas. A critério do neurologista, caso seja necessário, você será submetido ao exame de tomografia computadorizada de tórax para a exclusão de possíveis doenças que não permitirão você entrar no estudo.

Você será submetido ao exame de Ressonância Nuclear Magnética (RNM) nesta e em outras visitas para confirmar o diagnóstico e também para avaliar o efeito do seu tratamento. Você será levado à Divisão de Radiologia onde você entrará numa máquina que coletará as imagens do seu cérebro e medula espinal. À critério do neurologista, este exame poderá ser realizado na visita seguinte. O exame não causa dor e não libera radiação em você. Você também não deverá sentir nenhum desconforto após a realização deste exame. Você também será solicitado para apertar um aparelho chamado dinamômetro e fazer força como se fosse chutar ou puxar um aparelho para avaliarmos a sua força muscular. Esse procedimento não causa dor e é rápido. Você realizará o exame de bioimpedância, que é um procedimento não-invasivo, indolor, com duração de cinco minutos. Esse exame servirá para avaliar as alterações nos seus músculos e será realizado com a colocação de eletrodos na superfície da sua pele em contato com alguns músculos. Os eletrodos não perfuram a pele e durante a realização do exame você não levará choques nem sentirá qualquer desconforto devido ao exame. O exame será realizado por um aparelho portátil, no mesmo lugar onde serão realizadas as consultas com os neurologistas.

Você terá consulta com uma psicóloga, em que serão realizadas perguntas para avaliação de sua memória, seu humor, estado psicológico e sobre como está lidando com a sua doença. Você será solicitado a realizar algumas tarefas simples como desenhar, escrever ou lembrar algo que lhe foi falado. Os testes levarão cerca de 30 minutos.

Se você for selecionado para o estudo, você será chamado para a visita 2. **Na visita 2**, os procedimentos feitos na visita 1, COM EXCEÇÃO da ENMG, poderão ser realizados novamente. Se você for mulher, a você será explicado que não poderá engravidar durante todo o período do estudo e deverá concordar em utilizar dois métodos contraceptivos que serão explicados e indicados a você pelo clínico que lhe acompanhará. **Na visita 3**, os mesmos procedimentos feitos na visita 2 serão feitos novamente, sendo que o sangue coletado para o exame de sangue incluirá o teste laboratorial de gravidez, se você for do sexo feminino. Estando grávida, você sairá automaticamente do estudo. **Na visita 4**, você será internado no HC-FMUSP, momento em que você será submetido à avaliação clínica geral e neurológica e de você será colhido sangue da veia superficial do braço e urina, para exames laboratoriais, da mesma maneira como feito nas visitas 1, 2 e 3 mas agora você estará internado. Após os exames, você será levado ao Centro Cirúrgico do HC-FMUSP para a coleta da medula óssea, procedimento feito sob sedação e anestesia geral de curta duração por especialista do HC-FMUSP especificamente contratado para a realização do procedimento. O procedimento consiste na aplicação do anestésico geral através de gás

respiratório e pela sua veia. Para realização do procedimento, o anestesista colocará um tubo na sua garganta para ajudá-lo a respirar. Esse tubo será retirado após o fim do procedimento. Em seguida, na introdução de uma agulha no osso do seu quadril dos dois lados e aspiração de 100 ml de sangue daquele local. Você não sentirá dor e não estará acordado durante o procedimento. Após o procedimento você será acompanhado na sala de recuperação pós-anestésica até ser liberado pelo anestesista. Em seguida, você será levado ao leito de internação. Estando tudo bem, você receberá alta hospitalar 24 horas após o procedimento de aspiração da medula óssea. Você poderá ter dor e vermelhidão local por 2 a 4 dias após o procedimento, então você receberá analgésicos para utilização em casa naquele período. Este sangue coletado da sua medula-óssea irá para o Laboratório na PUC do Paraná para a produção das suas células-tronco. Se as suas células-tronco forem adequadas para o estudo, você será chamado de volta ao Hospital das Clínicas para o tratamento na visita 5. Se as células não mostrarem-se apropriadas para o estudo, então você sairá do estudo neste momento. **Na visita 5**, você será internado novamente no HC-FMUSP e o tratamento será feito pela injeção das suas próprias células-tronco, obtidas da sua medula-óssea, no liquor da sua coluna vertebral na região das suas costas logo acima das nádegas. Neste dia, você será avaliado pelo neurologista, fará a prova de função pulmonar, bioimpedância e de você será colhido 10 ml de sangue da sua veia superficial do braço e colhido urina para exames laboratoriais. O procedimento da injeção de células-tronco no liquor da sua coluna vertebral (costas) é muito parecido com a raquianestesia e será feito no interior do centro cirúrgico do HC-FMUSP. Você receberá uma anestesia local e, em seguida, uma agulha será introduzida na sua coluna vertebral (na região lombar das suas costas), e por ali será coletado 6 ml do seu liquor, que será submetido a exames. Apesar da anestesia local, você poderá sentir algum desconforto ou dor na introdução da agulha. Em seguida, um tubo fino será colocado no interior da agulha para a inoculação das suas células-tronco naquele local. O procedimento de injeção das células-tronco é lento e demorará alguns minutos, momento em que você ficará deitado. Após a injeção das células-tronco, você ficará internado por 48 horas no HCFMUSP sob os cuidados e monitorização por médicos neurologistas clínicos e enfermeiras especificamente designados para o estudo, que farão avaliações constantes em você. Tratamento semelhante em estudo similar foi feito em 26 pacientes em Israel e mostrou ausência de efeitos colaterais severos nos doentes ELA. Você poderá sentir dor nas costas e na cabeça, febre, dor nas pernas, tontura e náuseas que deverão regredir rapidamente durante o período de internação. Se houver dor ou desconforto ou qualquer outro sinal e sintoma, você será tratado. Ao término deste período, estando tudo bem com você, você receberá alta hospitalar. **Na visita 6**, você será novamente submetido à coleta de sangue da veia superficial do braço e à coleta de urina, no Laboratório Central do HC FMUSP para os exames laboratoriais de rotina, e ao exame neurológico no Ambulatório de Pesquisa em ELA do HC-FMUSP. Nesta visita você será levado até o Instituto de Radiologia e será submetido ao exame de RNM de crânio e medula cervical. **Na visita 7**, exatamente 30 dias após o primeiro tratamento

com as suas células-tronco, você será novamente internado no HC-FMUSP e passará pelos mesmos procedimentos da **visita 5** para receber o segundo tratamento com as suas células-tronco. **Na visita 8**, você será novamente submetido à coleta de sangue da veia superficial do braço e à coleta de urina, no Laboratório Central do HC-FMUSP para os exames laboratoriais de rotina, e ao exame de neurológico no Ambulatório de Pesquisa em ELA do HC-FMUSP exatamente como foi feito na sua visita 6. **Nas visitas 9, 10, 11, 12, 13 e 14**, separadas por intervalos de 30 dias, você passará novamente pelos procedimentos feitos nas visitas.

Os dados obtidos de todos os pacientes serão avaliados no término do estudo, quando saberemos se houve benefícios da terapia com as células-tronco para os pacientes com ELA.

Você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas em qualquer etapa do estudo. O principal investigador é o Prof. Dr Gerson Chadi que pode ser encontrado no endereço Av Dr Arnaldo 455, sala 219, 2º. Andar; Telefone(s) 3061-7460. Email: [gerchadi@usp.br](mailto:gerchadi@usp.br). No mesmo telefone, você poderá encontrar também outros médicos, os Drs. Dagoberto Callegaro e Frederico Menucci Haidar de Jorge que participarão das avaliações clínicas a serem feitas em você. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP). **Rua Ovídio Pires de Campos 225, 5º. Andar. Prédio da Administração. CEP:05403-001 Cerqueira César - São Paulo – SP. Tel: 2661-7585 Email:cappesq@hc.fm.usp.br.**

É garantida a você, a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

Você será protegido pelo sigilo da pesquisa. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, e não será divulgada a identificação de nenhum paciente.

A você será garantido o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais do estudo, quando os pesquisadores os tiverem.

Você não terá despesas pessoais em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

O pesquisador principal da pesquisa compromete-se a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado e esclarecido a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Estudo da segurança e eficácia de duas doses intratecais de células-tronco mesenquimais autólogas secretoras de fatores neurotróficos

(MSCNTF), obtidas de células estromais da medula óssea, em pacientes com Esclerose Lateral Amiotrófica”.

Eu discuti com o Prof. Dr. Gerson Chadi sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

-----  
Assinatura do paciente/representante legal Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

-----  
Assinatura da testemunha Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

para casos de pacientes, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

*(Somente para o responsável do projeto)*

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

-----  
Assinatura do responsável pelo estudo Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

## Anexo B. Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Estudo fase 1/2 da segurança e eficácia de duas doses intratecais de células-tronco mesenquimais autólogas (CTM), obtidas de células estromais da medula óssea, em pacientes com Esclerose Lateral Amiotrófica

**Pesquisador:** Gerson Chadi

**Área Temática:**

**Versão:** 5

**CAAE:** 37772414.0.0000.0068

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

**Patrocinador Principal:** Ministério da Saúde

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.825.756

#### Apresentação do Projeto:

Emenda relativa a submissão de 04 sub-projetos.

#### Objetivo da Pesquisa:

Tratam-se de 4 emendas, desdobrando a pesquisa em 4 projetos de pós graduação: I- Título: Identificação de possíveis biomarcadores no líquido de pacientes portadores de Esclerose Lateral Amiotrófica. Nível: doutorado. Aluno: Felipe Delatorre Busser. Orientador: Prof. Dr. Gerson Chadi - II- Título do Projeto: "Análise proteômica por espectrometria de massa no líquido de pacientes portadores de Esclerose Lateral Amiotrófica que receberam 2 infusões de células-tronco mesenquimais". Nível: doutorado. Aluno: Felipe Alves Pereira. Orientador: Prof. Dr. Gerson Chadi.

Co-orientador: Prof. Dr. Giuseppe Palmisano. - III - Título: "Análise eletrofisiológica em pacientes com Esclerose Lateral Amiotrófica que receberam

duas infusões de células tronco mesenquimais no líquido". Nível: doutorado. Aluno: Alberto Andrade de Mello. Orientador: Prof. Dr. Gerson Chadi - IV- Título do Projeto: "Avaliação da presença de fatores neurotróficos nas células-tronco mensequimais

de pacientes com Esclerose Lateral Amiotrófica selecionados no protocolo clínico #NCT02917681. Nível: Mestrado. Aluna: Caroline Christina Guerino. Orientador: Prof. Dr. Gerson Chadi

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem alterações

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

**Bairro:** Cerqueira Cesar

**CEP:** 05.403-010

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2661-7585

**Fax:** (11)2661-7585

**E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.825.756

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Os projetos são compatíveis e a proposta é válida

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Não será necessário novo TCLE, pois os dados foram coletados com TCLE prévio

**Recomendações:**

Não há

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1196438_E4.pdf	08/08/2018 13:06:08		Aceito
Brochura Pesquisa	ProjetoFelipeDelatorre.pdf	08/08/2018 12:51:33	Gerson Chadi	Aceito
Brochura Pesquisa	ProjetoFelipeAlves.pdf	08/08/2018 12:51:24	Gerson Chadi	Aceito
Brochura Pesquisa	ProjetoCarolineGuerino.pdf	08/08/2018 12:51:16	Gerson Chadi	Aceito
Brochura Pesquisa	ProjetoAlbertoMello.pdf	08/08/2018 12:50:47	Gerson Chadi	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencias_Emendas_Pos.pdf	08/08/2018 12:49:37	Gerson Chadi	Aceito
Outros	Carta_Emendas_Pos.pdf	08/08/2018 12:47:37	Gerson Chadi	Aceito
Outros	FORM_EMENDA3.pdf	04/08/2016 15:01:28	Gerson Chadi	Aceito
Projeto Detalhado	Projeto_modificado_3.pdf	22/07/2016	Gerson Chadi	Aceito

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

**Bairro:** Cerqueira Cesar

**CEP:** 05.403-010

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2661-7585

**Fax:** (11)2661-7585

**E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.825.756

/ Brochura Investigador	Projeto_modificado_3.pdf	14:22:11	Gerson Chadi	Aceito
Outros	Carta_Emenda_3.pdf	22/07/2016 14:20:17	Gerson Chadi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_EMENDA_3.pdf	22/07/2016 14:16:54	Gerson Chadi	Aceito
Outros	EMENDA.pdf	27/06/2016 13:03:14	Gerson Chadi	Aceito
Outros	Anuencia_Associados.pdf	27/06/2016 12:43:26	Gerson Chadi	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_2016.pdf	12/02/2016 11:17:35	Gerson Chadi	Aceito
Outros	Delaração Acary Souza Bulle Oliveira.pdf	23/10/2014 20:08:06		Aceito
Outros	Declaracao Paulo S Brofman.pdf	23/10/2014 20:07:03		Aceito
Outros	Declaração Frederico MH Jorge.pdf	23/10/2014 20:06:30		Aceito
Outros	Declaração Dagoberto Callegaro.pdf	23/10/2014 20:05:59		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 16 de Agosto de 2018

Assinado por:  
**ALFREDO JOSE MANSUR**  
(Coordenador)

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

**Bairro:** Cerqueira Cesar

**CEP:** 05.403-010

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2661-7585

**Fax:** (11)2661-7585

**E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

## **9. REFERÊNCIAS**

---

## 9. REFERÊNCIAS

- Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther.* 2008 Jan;15(2):109-16.
- Ahn SW, Kim SH, Kim JE, Kim SM, Kim SH, Park KS, et al. Reproducibility of the motor unit number index (MUNIX) in normal controls and amyotrophic lateral sclerosis patients. *Muscle Nerve* 2010;42:808-13.
- Al-Chalabi A, Hardiman O. The epidemiology of ELA: a conspiracy of genes, environment and time. *Nat Rev Neurol.* 2013; 9(11): 617-28.
- Al-Chalabi A, Calvo A, Chio A, Colville S, Ellis CM, Hardiman O, et al. Analysis of amyotrophic lateral sclerosis as a multistep process: a population-based modelling study. *Lancet Neurol.* 2014 Nov;13(11):1108-13.
- Alix JJP, Neuwirth C, Gelder L, Burkhardt C, Castro J, de Carvalho M, et al. Assessment of the reliability of the motor unit size index (MUSIX) in single subject "round-robin" and multi-centre settings. *Clin Neurophysiol.* 2019 May;130(5):666-74.
- Alves CJ, Maximino JR, Chadi G. Dysregulated expression of death, stress and mitochondrion related genes in the sciatic nerve of presymptomatic SOD1(G93A) mouse model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:332.
- Andersen PM. Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2006 Jan;6(1):37-46.
- Aronson JK, Ferner RE. Biomarkers-A General Review. *Curr Protoc Pharmacol.* 2017 Mar 17;76:9.23.1-9.23.17.
- Baloh RH, Glass JD, Svendsen CN. Stem cell transplantation for amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 2018 Oct;31(5):655-661.
- Beck M, Giess R, Würffel W, Magnus T, Ochs G, Toyka KV. Comparison of maximal voluntary isometric contraction and Drachman's hand-held dynamometry in evaluating patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 1999 Sep;22(9):1265-70.
- Benatar M, Boylan K, Jeromin A, Rutkove SB, Berry J, Atassi N, et al. ALS biomarkers for therapy development: State of the field and future directions. *Muscle Nerve.* 2016 Feb;53(2):169-82.
- Benmouna K, Milants C, Wang FC. Correlations between MUNIX and adapted multiple point stimulation MUNE methods. *Clin Neurophysiol.* 2018 Feb;129(2):341-4.
- 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.
- Berry JD, Cudkovicz ME. New considerations in the design of clinical trials for amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Investig (Lond).* 2011 Oct;1(10):1375-89.

Boekestein WA, Schelhaas HJ, van Putten MJ, Stegeman DF, Zwarts MJ, van Dijk JP. Motor unit number index (MUNIX) versus motor unit number estimation (MUNE): a direct comparison in a longitudinal study of ALS patients. *Clin Neurophysiol*. 2012 Aug;123(8):1644-9.

Bohannon RW. Hand-held dynamometry: adoption 1900-2005. *Percept Mot Skills*. 2006 Aug;103(1):3-4.

Borgonovo T, Vaz IM, Senegaglia AC, Rebelatto CL, Brofman PR. Genetic evaluation of mesenchymal stem cells by G-banded karyotyping in a Cell Technology Center. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2014 May-Jun;36(3):202-7.

Bosco DA, Morfini G, Karabacak NM, Song Y, Gros-Louis F, Pasinelli P, et al. Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ELA. *Nat Neurosci*. 2010a Nov; 13(11):1396-403.

Bosco DA, Lemay N, Ko HK, Zhou H, Burke C, Kwiatkowski TJ Jr, et al. Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules. *Hum Mol Genet*. 2010b Nov 1;19(21):4160-75.

Bostock H, Cikurel K, Burke D. Threshold tracking techniques in the study of human peripheral nerve. *Muscle Nerve*. 1998 Feb;21(2):137-58.

Boucherie C, Schäfer S, Lavand'homme P, Maloteaux JM, Hermans E. Chimerization of astroglial population in the lumbar spinal cord after mesenchymal stem cell transplantation prolongs survival in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res*. 2009 Jul;87(9):2034-46.

Bradley WG, Good P, Rasool CG, Adelman LS. Morphometric and biochemical studies of peripheral nerves in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 1983 Sep; 14 (3):267-77.

Brettschneider J, Petzold A, Süßmuth SD, Ludolph AC, Tumani H. Axonal damage markers in cerebrospinal fluid are increased in ALS. *Neurology*. 2006 Mar 28;66(6):852-6.

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 Jul;124 Suppl:96-107.

Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 2000 Dec;1(5):293-9.

Brown RH, Al-Chalabi A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med*. 2017 Jul 13; 377(2):162-72.

- Buckinx F, Croisier JL, Reginster JY, Dardenne N, Beaudart C, Slomian J, et al. Reliability of muscle strength measures obtained with a hand-held dynamometer in an elderly population. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2017 May;37(3):332-40.
- Byrne S, Walsh C, Lynch C, Bede P, Elamin M, Kenna K, et al. Rate of familial amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011 Jun; 82(6):623-7.
- Cedarbaum JM, Stambler N, Malta E, Fuller C, Hilt D, Thurmond B, et al. The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. BDNF ALS Study Group (Phase III). *J Neurol Sci*. 1999 Oct 31;169(1-2):13-21.
- Cellura E. Extramotor disorders in amyotrophic lateral sclerosis: multisystem disease? *Clin Ter*. 2011;162(5):457-9.
- Cheah BC, Vucic S, Krishnan AV, Boland RA, Kiernan MC. Neurophysiological index as a biomarker for ALS progression: validity of mixed effects models. *Amyotroph Lateral Scler*. 2011 Jan;12(1):33-8.
- Chen L, Chen D, Xi H, Wang Q, Liu Y, Zhang F, et al. Olfactory ensheathing cell neurorestoration for amyotrophic lateral sclerosis patients: benefits from multiple transplantations. *Cell Transplant*. 2012;21 Suppl 1:S65-77.
- 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 Oct-Dec;10(5-6):310-23.
- Chiò A, Logroscino G, Traynor BJ, Collins J, Simeone JC, Goldstein LA, et al. Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology*. 2013; 41(2):118-30.
- Chiò A, Traynor BJ. Motor neuron disease in 2014. Biomarkers for ALS--in search of the Promised Land. *Nat Rev Neurol*. 2015 Feb;11(2):72-4.
- Chiò A, Mora G, Lauria G. Pain in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol*. 2017 Feb;16(2):144-57.
- Ciervo Y, Ning K, Jun X, Shaw PJ, Mead RJ. Advances, challenges and future directions for stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurodegener*. 2017 Nov 13;12(1):85.
- Ciura S, Lattante S, Le Ber I, Latouche M, Tostivint H, Brice A, et al. Loss of function of C9orf72 causes motor deficits in a zebrafish model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2013 Aug; 74(2):180-7.
- Cleveland DW, Rothstein JD. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci*. 2001 Nov;2(11):806-19.

- Costa J, Swash M, de Carvalho M. Awaji criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. *Arch Neurol*. 2012 Nov;69(11):1410-6.
- Couratier P, Truong C, Khalil M, Devière F, Vallat JM. Clinical features of flail arm syndrome. *Muscle Nerve*. 2000 Apr;23(4):646-8.
- de Albuquerque M, Branco LM, Rezende TJ, de Andrade HM, Nucci A, França MC Jr. Longitudinal evaluation of cerebral and spinal cord damage in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuroimage Clin*. 2017;14:269-76.
- de Carvalho M, Swash M. Nerve conduction studies in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 2000;23(3):344-52.
- de Carvalho M, Chio A, Dengler R, Hecht M, Weber M, Swash M. Neurophysiological measures in amyotrophic lateral sclerosis: markers of progression in clinical trials. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 2005 Mar;6(1):17-28.
- de Carvalho M, Dengler R, Eisen A, England JD, Kaji R, Kimura J, Mills K, Mitsumoto H, Nodera H, Shefner J, Swash M. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clin Neurophysiol*. 2008 Mar;119(3):497-503.
- de Carvalho M, Swash M. Awaji diagnostic algorithm increases sensitivity of El Escorial criteria for ALS diagnosis. *Amyotrophic Lateral Scler*. 2009;10:53-7.
- de Carvalho M, Swash M. Sensitivity of electrophysiological tests for upper and lower motor neuron dysfunction in ALS: a six-month longitudinal study. *Muscle Nerve*. 2010 Feb;41(2):208-11.
- Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 2000 Aug;28(8):875-84.
- DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ELA. *Neuron*. 2011 Oct 20; 72(2):245-56.
- Deng HX, Chen W, Hong ST, Boycott KM, Gorrie GH, Siddique N, et al. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ELA and ELA/dementia. *Nature*. 2011 Aug 21; 477(7363):211-5.
- Donaghy M. Classification and clinical features of motor neurone diseases and motor neuropathies in adults. *J Neurol*. 1999 May; 246(5):331-3.
- Escorcio-Bezerra ML, Abrahao A, de Castro I, Chieia MAT, de Azevedo LA, Pinheiro DS, et al. MUNIX: Reproducibility and clinical correlations in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Clin Neurophysiol*. 2016 Sep;127(9):2979-84.

Escorcio-Bezerra ML, Abrahao A, Santos-Neto D, de Oliveira Braga NI, Oliveira ASB, Manzano GM. Why averaging multiple MUNIX measures in the longitudinal assessment of patients with ALS?. *Clin Neurophysiol.* 2017 Dec;128(12):2392-6.

Escorcio-Bezerra ML, Abrahao A, Nunes KF, De Oliveira Braga NI, Oliveira ASB, Zinman L, et al. Motor unit number index and neurophysiological index as candidate biomarkers of presymptomatic motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 2018 Aug;58(2):204-12.

Faravelli I, Riboldi G, Nizzardo M, Simone C, Zanetta C, Bresolin N, et al. Stem cell transplantation for amyotrophic lateral sclerosis: therapeutic potential and perspectives on clinical translation. *Cell Mol Life Sci.* 2014 Sep;71(17):3257-68.

Felice KJ. Thenar motor unit number estimates using the multiple point stimulation technique: Reproducibility studies in ALS patients and normal subjects. *Muscle Nerve* 1995;18:1412-6.

Felice KJ. A longitudinal study comparing thenar motor unit number estimates to other quantitative tests in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 1997 Feb;20(2):179-85.

Filippi M, Agosta F, Abrahams S, Fazekas F, Grosskreutz J, Kalra S, et al. EFNS guidelines on the use of neuroimaging in the management of motor neuron diseases. *Eur J Neurol.* 2010 Apr;17(4):526-e20.

Frostyjak S, Jendelova P, Kapcalova M, Arboleda D, Sykova E. Mesenchymal stromal cells prolong the lifespan in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cytotherapy.* 2011 Oct;13(9):1036-46.

Freibaum BD, Lu Y, Lopez-Gonzalez R, Kim NC, Almeida S, Lee KH, et AL. GGGGCC repeat expansion in C9orf72 compromises nucleocytoplasmic transport. *Nature.* 2015 Sep 3;525(7567):129-33.

Gaiani A, Martinelli I, Bello L, Querin G, Puthenparampil M, Ruggero S, et al. Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Neurofilament Light Chain Levels in Definite Subtypes of Disease. *JAMA Neurol.* 2017 May 1;74(5):525-32.

Gawel M, Kuzma-Kozakiewicz M. Does the MUNIX Method Reflect Clinical Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Practical Experience. *Medicine (Baltimore).* 2016 May;95(19):e3647.

Gendron TF, Chew J, Stankowski JN, Hayes LR, Zhang YJ, Prudencio M, et al. Poly(GP) proteins are a useful pharmacodynamic marker for C9ORF72-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Transl Med.* 2017 Mar 29;9(383).

Giordano A, Galderisi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* 2007;211(1):27-35.

Gnecchi M, Danieli P, Cervio E. Mesenchymal stem cell therapy for heart disease. *Vascul Pharmacol*. 2012 Aug 19;57(1):48-55.

Gooch CL, Doherty TJ, Chan KM, Bromberg MB, Lewis RA, Stashuk DW, Berger MJ, Andary MT, Daube JR. Motor unit number estimation: a technology and literature review. *Muscle Nerve*. 2014 Dec;50(6):884-93.

Goutman SA, Savelieff MG, Sakowski SA, Feldman EL. Stem cell treatments for amyotrophic lateral sclerosis: a critical overview of early phase trials. *Expert Opin Investig Drugs*. 2019 Jun;28(6):525-43.

Greenberg SA, Walsh RJ. Molecular diagnosis of inheritable neuromuscular disorders. Part I: Genetic determinants of inherited disease and their laboratory detection. *Muscle Nerve*. 2005a Apr;31(4):418-30.

Greenberg SA, Walsh RJ. Molecular diagnosis of inheritable neuromuscular disorders. Part II: Application of genetic testing in neuromuscular disease. *Muscle Nerve*. 2005b Apr;31(4):431-51.

Grolez G, Kyheng M, Lopes R, Moreau C, Timmerman K, Auger F, et al. MRI of the cervical spinal cord predicts respiratory dysfunction in ALS. *Sci Rep*. 2018 Jan 29;8(1):1828.

Grosskreutz J, Kaufmann J, Frädrieh J, Dengler R, Heinze HJ, Peschel T. Widespread sensorimotor and frontal cortical atrophy in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *BMC Neurol*. 2006 Apr 25;6:17.

Haidet-Phillips AM, Hester ME, Miranda CJ, Meyer K, Braun L, Frakes A, et al. Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat Biotechnol*. 2011 Aug 10;29(9):824-8.

Hammad M, Silva A, Glass J, Sladky JT, Benatar M. Clinical, electrophysiologic, and pathologic evidence for sensory abnormalities in ALS. *Neurology*. 2007 Dec 11;69(24):2236-42.

Handy CR, Krudy C, Boulis N, Federici T. Pain in amyotrophic lateral sclerosis: a neglected aspect of disease. *Neurol Res Int*. 2011; 2011:403808.

Hannaford A, Pavey N, van den Bos M, Geevasinga N, Menon P, Shefner JM, et al. Diagnostic Utility of Gold Coast Criteria in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann Neurol*. 2021 May;89(5):979-86.

Hardiman O, Al-Chalabi A, Chio A, Corr EM, Logroscino G, Robberecht W, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Oct 5;3:17071.

Jacobsen AB, Kristensen RS, Witt A, Kristensen AG, Duez L, Beniczky S, et al. The utility of motor unit number estimation methods versus quantitative motor unit potential analysis in diagnosis of ALS. *Clin Neurophysiol*. 2018 Mar;129(3):646-53.

Jacobsen AB, Bostock H, Tankisi H. CMAP Scan MUNE (MScan) – A Novel Motor Unit Number Estimation (MUNE) Method. *J Vis Exp*. 2018 Jun 7;(136).

Jenkins TM, Alix JJP, David C, Pearson E, Rao DG, Hoggard N, et al. Imaging muscle as a potential biomarker of denervation in motor neuron disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018 Mar;89(3):248-55.

Jordan H, Rechtman L, Wagner L, Kaye WE. Amyotrophic lateral sclerosis surveillance in Baltimore and Philadelphia. *Muscle Nerve* 2015;51:815.

Kan I, Melamed E, Offen D. Autotransplantation of bone marrow-derived stem cells as a therapy for neurodegenerative diseases. *Handb Exp Pharmacol*. 2007;(180):219-42.

Kanai K, Shibuya K, Sato Y, Misawa S, Nasu S, Sekiguchi Y, et al. Motor axonal excitability properties are strong predictors for survival in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012 Jul;83(7):734-8.

Kang SH, Li Y, Fukaya M, Lorenzini I, Cleveland DW, Ostrow LW, et al. *Nat Neurosci*. 2013 May;16(5):571-9.

Karussis D, Karageorgiou C, Vaknin-Dembinsky A, Gowda-Kurkalli B, Gomori JM, Kassis I, et al. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol*. 2010 Oct;67(10):1187-94.

Kaufmann P, Levy G, Montes J, Buchsbaum R, Barsdorf AI, Battista, V, et al. Excellent inter-rater, intra-rater, and telephone-administered reliability of the ALSFRS-R in a multicenter clinical trial. *Amyotroph Lateral Scler* 2007;8:42-6.

Kebriaei P, Robinson S. Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of acute and chronic graft versus host disease. *Front Oncol*. 2011;1:16.

Keil C, Prell T, Peschel T, Hartung V, Dengler R, Grosskreutz J. Longitudinal diffusion tensor imaging in amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Neurosci*. 2012 Nov 8;13:141.

Kelly BJ, Luce JM. The diagnosis and management of neuromuscular diseases causing respiratory failure. *Chest*. 1991 Jun;99(6):1485-94.

Kim HJ, Kim NC, Wang YD, Scarborough EA, Moore J, Diaz Z, et al. Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature*. 2013 Mar 28;495(7442):467-73.

Kim SU, de Vellis J. Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: a review. *J Neurosci Res*. 2009 Aug 1;87(10):2183-200.

Kim SU, Lee HJ, Kim YB. Neural stem cell-based treatment for neurodegenerative diseases. *Neuropathology*. 2013 Oct;33(5):491-504.

Koh SH, Baik W, Noh MY, Cho GW, Kim HY, Kim KS, et al. The functional deficiency of bone marrow mesenchymal stromal cells in ALS patients is proportional to disease progression rate. *Exp Neurol*. 2012 Jan;233(1):472-80.

Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2009 Feb 27;323(5918):1205-8.

Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Meininger V. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. *Lancet*. 1996 May 25;347(9013):1425-31.

Lee M, McCambridge A. Clinimetrics: Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale-revised (ALSFRS-R). *J Physiother*. 2018 Oct;64(4):269-70.

Lehmer C, Oeckl P, Weishaupt JH, Volk AE, Diehl-Schmid J, Schroeter ML, et al. Poly-GP in cerebrospinal fluid links *C9orf72*-associated dipeptide repeat expression to the asymptomatic phase of ALS/FTD. *EMBO Mol Med*. 2017 Jul;9(7):859-68.

Lehnert S, Costa J, de Carvalho M, Kirby J, Kuzma-Kozakiewicz M, Morelli C, et al. Multicentre quality control evaluation of different biomarker candidates for amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2014 Sep;15(5-6):344-50.

Lewelt A, Krosschell KJ, Scott C, Sakonju A, Kissel JT, Crawford TO, et al. Compound muscle action potential and motor function in children with spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve*. 2010 Nov;42(5):703-8.

Lewis CM, Suzuki M. Therapeutic applications of mesenchymal stem cells for amyotrophic lateral sclerosis. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(2):32.

Li D, Shen D, Tai H, Cui L. Neurofilaments in CSF As Diagnostic Biomarkers in Motor Neuron Disease: A Meta-Analysis. *Front Aging Neurosci*. 2016;8:290.

Li YR, King OD, Shorter J, Gitler AD. Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *J Cell Biol*. 2013 Apr 29; 201(3):361-72.

Lindvall O, Barker RA, Brüstle O, Isacson O, Svendsen CN. Clinical translation of stem cells in neurodegenerative disorders. *Cell Stem Cell*. 2012 Feb 3;10(2):151-5.

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 Apr; 81(4):385-90.

Lu CH, Macdonald-Wallis C, Gray E, Pearce N, Petzold A, Norgren N, et al. Neurofilament light chain: A prognostic biomarker in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2015 Jun 2;84(22):2247-57.

- Mazzini L, Ferrero I, Luparello V, Rustichelli D, Gunetti M, Mareschi K, et al. Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial. *Exp Neurol*. 2010 May;223(1):229-37.
- Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, Miglioretti M, Stecco A, Servo S, et al. Mesenchymal stromal cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: a long-term safety study. *Cytotherapy*. 2012 Jan;14(1):56-60
- McComas AJ, Fawcett PR, Campbell MJ, Sica RE. Electrophysiological estimation of the number of motor units within a human muscle. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1971 Apr;34(2):121-31.
- Mehta P, Kaye W, Raymond J, Wu R, Larson T, Punjani R, et al. Prevalence of Amyotrophic Lateral Sclerosis - United States, 2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2018 Feb 23;67(7):216-8.
- Menon P, Geevasinga N, Yiannikas C, Howells J, Kiernan MC, Vucic S. Sensitivity and specificity of threshold tracking transcranial magnetic stimulation for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: a prospective study. *Lancet Neurol*. 2015 May;14(5):478-84.
- Menon P, Geevasinga N, Yiannikas C, Kiernan MC, Vucic S. Cortical contributions to the flail leg syndrome: Pathophysiological insights. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2016 Jul-Aug;17(5-6):389-96.
- Miller RG, Jackson CE, Kasarskis EJ, England JD, Forshe 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 Oct 13;73(15):1218-26.
- Mitchell JD, Callagher P, Gardham J, Mitchell C, Dixon M, Addison-Jones R, Bennett W, O'Brien MR. Timelines in the diagnostic evaluation of people with suspected amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND) – a 20-year review: can we do better? *Amyotroph Lateral Scler*. 2010 Dec;11(6):537-41.
- Mitsumoto H, Ulug AM, Pullman SL, Gooch CL, Chan S, Tang MX, et al. Quantitative objective markers for upper and lower motor neuron dysfunction in ALS. *Neurology*. 2007 Apr 24;68(17):1402-10.
- Morata-Tarifa C, Azkona G, Glass J, Mazzini L, Sanchez-Pernaute R. Looking backward to move forward: a meta-analysis of stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis. *NPJ Regen Med*. 2021 Apr 1;6(1):20.
- Nandedkar SD, Nandedkar DS, Barkhaus PE, Stalberg EV. Motor unit number index (MUNIX). *IEEE Trans Biomed Eng*. 2004 Dec;51(12):2209-11.

- Nandedkar SD, Barkhaus PE, Stålberg EV. Motor unit number index (MUNIX): principle, method, and findings in healthy subjects and in patients with motor neuron disease. *Muscle Nerve*. 2010 Nov;42(5):798-807.
- Nandedkar SD, Barkhaus PE, Stålberg EV, Neuwirth C, Weber M. Motor unit number index: Guidelines for recording signals and their analysis. *Muscle Nerve*. 2018 Sep;58(3):374-80.
- Nefussy B, Artamonov I, Deutsch V, Naparstek E, Nagler A, Drory VE. Recombinant human granulocyte-colony stimulating factor administration for treating amyotrophic lateral sclerosis: A pilot study. *Amyotroph Lateral Scler*. 2010;11(1-2):187-93.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2006 Oct 6;314(5796):130-3.
- Neuwirth C, Nandedkar S, Stålberg E, Weber M. Motor unit number index (MUNIX): a novel neurophysiological technique to follow disease progression in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*. 2010 Sep;42(3):379-84.
- Neuwirth C, Nandedkar S, Stålberg E, Barkhaus PE, Carvalho Md, Furtula J, et al. Motor Unit Number Index (MUNIX): a novel neurophysiological marker for neuromuscular disorders; test-retest reliability in healthy volunteers. *Clin Neurophysiol*. 2011 Sep;122(9):1867-72.
- Neuwirth C, Barkhaus PE, Burkhardt C, Castro J, Czell D, de Carvalho M, et al. Tracking motor neuron loss in a set of six muscles in amyotrophic lateral sclerosis using the Motor Unit Number Index (MUNIX): a 15-month longitudinal multicentre trial. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015 Nov;86(11):1172-9.
- Neuwirth C, Barkhaus PE, Burkhardt C, Castro J, Czell D, de Carvalho M, et al. Motor Unit Number Index (MUNIX) detects motor neuron loss in pre-symptomatic muscles in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Clin Neurophysiol*. 2017 Mar;128(3):495-500.
- O'Connor DM, Boulis NM. Cellular and molecular approaches to motor neuron therapy in amyotrophic lateral sclerosis and spinal muscular atrophy. *Neurosci Lett*. 2012 Oct 11;527(2):78-84.
- Oeckl P, Jardel C, Salachas F, Lamari F, Andersen PM, Bowser R, et al. Multicenter validation of CSF neurofilaments as diagnostic biomarkers for ALS. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2016 Jul-Aug;17(5-6):404-13.
- Oh KW, Moon C, Kim HY, Oh SI, Park J, Lee JH, Chang IY, Kim KS, Kim SH. Phase I trial of repeated intrathecal autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Stem Cells Transl Med*. 2015 Jun;4(6):590-7.
- Oliveira AS, Pereira RD. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS): three letters that change the people's life. For ever. *Arq Neuropsiquiatr*. 2009 Sep;67(3A):750-82.

Oskarsson B, Horton DK, Mitsumoto H. Potential environmental factors in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Clin.* 2015; 33(4):877-88.

Oskarsson B, Gendron TF, Staff NP. Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Update for 2018. *Mayo Clin Proc.* 2018 Nov;93(11): 1617-28.

Pagani M, Chiò A, Valentini MC, Öberg J, Nobili F, Calvo A, et al. Functional pattern of brain FDG-PET in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology.* 2014 Sep 16;83(12):1067-74.

Paganoni S, Macklin EA, Hendrix S, Berry JD, Elliott MA, Maiser S, et al. Trial of Sodium Phenylbutyrate-Taurursodiol for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med.* 2020 Sep 3;383(10):919-30.

Peters OM, Ghasemi M, Brown RH Jr. Emerging mechanisms of molecular pathology in ELA. *J Clin Invest.* 2015 Jun;125(6):2548.

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.

Philips T, Rothstein JD. Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol.* 2014 Dec;262 Pt B:111-20.

Phukan J, Pender NP, Hardiman O. Cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* 2007 Nov;6(11):994-1003.

Piccione EA, Sletten DM, Staff NP, Low PA. Autonomic system and amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 2015 May;51(5):676-9.

Pinto S, de Carvalho M. Comparison of slow and forced vital capacities on ability to predict survival in ALS. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2017 Nov;18(7-8):528-33.

Prabhakar S, Marwaha N, Lal V, Sharma RR, Rajan R, Khandelwal N. Autologous bone marrow-derived stem cells in amyotrophic lateral sclerosis: a pilot study. *Neurol India.* 2012 Sep-Oct;60(5):465-9.

Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretão MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F, et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med (Maywood).* 2008 Jul;233(7):901-13.

Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ELA-FTD. *Neuron.* 2011 Oct 20;72(2):257-68.

Ringholz GM, Appel SH, Bradshaw M, Cooke NA, Mosnik DM, Schulz PE. Prevalence and patterns of cognitive impairment in sporadic ALS. *Neurology*. 2005 Aug 23;65(4):586-90.

Rosengren LE, Karlsson JE, Karlsson JO, Persson LI, Wikkelso C. Patients with amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases have increased levels of neurofilament protein in CSF. *J Neurochem*. 1996 Nov;67(5):2013-8.

Rothstein JD. Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2009 Jan;65 Suppl 1:S3-9.

Rowland LP. How amyotrophic lateral sclerosis got its name: the clinical-pathologic genius of Jean-Martin Charcot. *Arch Neurol* 2001;58:512.

Rutkove SB, Zhang H, Schoenfeld DA, Raynor EM, Shefner JM, Cudkovicz ME, et al. Electrical impedance myography to assess outcome in amyotrophic lateral sclerosis clinical trials. *Clin Neurophysiol*. 2007 Nov;118(11):2413-8.

Rutkove SB, Caress JB, Cartwright MS, Burns TM, Warder J, David WS, et al. Electrical impedance myography as a biomarker to assess ALS progression. *Amyotroph Lateral Scler*. 2012 Sep;13(5):439-45.

Shefner JM. Motor unit number estimation in human neurological diseases and animal models. *Clin Neurophysiol*. 2001 Jun;112(6):955-64.

Shefner JM, Watson ML, Simionescu L, Caress JB, Burns TM, Maragakis NJ, et al. Multipoint incremental motor unit number estimation as an outcome measure in ALS. *Neurology*. 2011 Jul 19;77(3):235-41.

Shefner JM, Liu D, Leitner ML, Schoenfeld D, Johns DR, Ferguson T, et al. Quantitative strength testing in ALS clinical trials. *Neurology*. 2016 Aug 9;87(6):617-24.

Shefner JM, Al-Chalabi A, Baker MR, Cui LY, de Carvalho M, Eisen A, et al. A proposal for new diagnostic criteria for ALS. *Clin Neurophysiol*. 2020 Aug;131(8):1975-8.

Shepherd SR, Wu J, Cardoso M, Wiklendt L, Dinning PG, Chataway T, et al. Urinary p75<sup>ECD</sup>: A prognostic, disease progression, and pharmacodynamic biomarker in ALS. *Neurology*. 2017 Mar 21;88(12):1137-43.

Silani V, Calzarossa C, Cova L, Ticozzi N. Stem cells in amyotrophic lateral sclerosis: motor neuron protection or replacement?. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2010 Jul;9(3):314-24.

Simon NG, Lagopoulos J, Paling S, Pfluger C, Park SB, Howells J, et al. Peripheral nerve diffusion tensor imaging as a measure of disease progression in ALS. *J Neurol*. 2017 May;264(5):882-90.

Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2008 Mar 21;319(5870):1668-72.

Staff NP, Madigan NN, Morris J, Jentoft M, Sorenson EJ, Butler G, Gastineau D, Dietz A, Windebank AJ. Safety of intrathecal autologous adipose-derived mesenchymal stromal cells in patients with ALS. *Neurology*. 2016 Nov 22;87(21):2230-4.

Stark T, Walker B, Phillips JK, Fejer R, Beck R. Hand-held dynamometry correlation with the gold standard isokinetic dynamometry: a systematic review. *PM R*. 2011 May;3(5):472-9.

Steinacker P, Feneberg E, Weishaupt J, Brettschneider J, Tumani H, Andersen PM, et al. Neurofilaments in the diagnosis of motoneuron diseases: a prospective study on 455 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016 Jan;87(1):12-20.

Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*. 2010 Nov;5(6):463-6.

Swash M, de Carvalho M. The Neurophysiological Index in ALS. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 2004 Sep;5 Suppl 1:108-10.

Syková E, Rychmach P, Drahorádová I, Konrádová Š, Růžičková K, Voříšek I, et al. Transplantation of Mesenchymal Stromal Cells in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: Results of Phase I/IIa Clinical Trial. *Cell Transplant*. 2017 Apr 13;26(4):647-58.

Thomsen GM, Gowing G, Svendsen S, Svendsen CN. The past, present and future of stem cell clinical trials for ALS. *Exp Neurol*. 2014 Dec;262 Pt B:127-37.

Tortelli R, Copetti M, Arcuti S, Tursi M, Iurillo A, Barulli MR, et al. Pseudobulbar affect (PBA) in an incident ALS cohort: results from the Apulia registry (SLAP). *J Neurol*. 2016 Feb; 263(2):316-21.

Turner MR, Cagnin A, Turkheimer FE, Miller CC, Shaw CE, Brooks DJ, et al. Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis*. 2004 Apr;15(3):601-9.

van den Berg LH, Sorenson E, Gronseth G, Macklin EA, Andrews J, Baloh RH, et al. Airlie House ALS Clinical Trials Guidelines Group. Revised Airlie House consensus guidelines for design and implementation of ALS clinical trials. *Neurology*. 2019 Apr 2;92(14):e1610-e1623.

van Dijk JP, Schelhaas HJ, Van Schaik IN, Janssen HM, Stegeman DF, Zwartz MJ. Monitoring disease progression using high-density motor unit number estimation in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 2010;42:239-44.

- van Es MA, Hardiman O, Chio A, Al-Chalabi A, Pasterkamp RJ, Veldink JH, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*. 2017 Nov 4;390(10107):2084-98.
- van Laere K, Vanhee A, Verschueren J, De Coster L, Driesen A, Dupont P, et al. Value of 18fluorodeoxyglucose-positron-emission tomography in amyotrophic lateral sclerosis: a prospective study. *JAMA Neurol*. 2014 May;71(5):553-61.
- Vance C, Rogelj B, Hortobágyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, et al. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science*. 2009 Feb 27;323(5918):1208-11.
- Verber NS, Shephard SR, Sassani M, McDonough HE, Moore SA, Alix JJP, Wilkinson ID, Jenkins TM, Shaw PJ. Biomarkers in Motor Neuron Disease: A State of the Art Review. *Front Neurol*. 2019;10:291.
- Visser GH, Blok JH. The CMAP scan. *Suppl Clin Neurophysiol*. 2009;60:65-77.
- Vucic S, Kiernan MC. Axonal excitability properties in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurophysiol*. 2006 Jul;117(7):1458-66.
- Vucic S, Kiernan MC. Abnormalities in cortical and peripheral excitability in flail arm variant amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007 Aug;78(8):849-52.
- Vucic S, Rutkove SB. Neurophysiological biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2018 Oct;31(5):640-7.
- Vucic S, Ferguson TA, Cummings C, Hotchkin MT, Genge A, Glanzman R, et al. Gold Coast diagnostic criteria: Implications for ALS diagnosis and clinical trial enrollment. *Muscle Nerve*. 2021 Nov;64(5):532-7.
- Wijesekera LC, Leigh PN. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis*. 2009 Feb 3;4:3.
- Wijesekera LC, Mathers S, Talman P, Galtrey C, Parkinson MH, Ganesalingam J, et al. Natural history and clinical features of the flail arm and flail leg ALS variants. *Neurology*. 2009 Mar 24;72(12):1087-94.
- Worms PM. The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies. *J Neurol Sci* 2001;191:3.
- Writing Group, Edaravone (MCI-186) ALS 19 Study Group. Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*. 2017 Jul;16(7):505-12.
- Zhang Y, Wang L, Fu Y, Song H, Zhao H, Deng M, et al. Preliminary investigation of effect of granulocyte colony stimulating factor on amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*. 2009 Oct-Dec;10(5-6):430-1.

Zhang K, Donnelly CJ, Haeusler AR, Grima JC, Machamer JB, Steinwald P, et al. The C9orf72 repeat expansion disrupts nucleocytoplasmic transport. *Nature*. 2015 Sep 3;525(7567):56-61.

Zürcher NR, Loggia ML, Lawson R, Chonde DB, Izquierdo-Garcia D, Yasek JE, et al. Increased in vivo glial activation in patients with amyotrophic lateral sclerosis: assessed with [(11)C]-PBR28. *Neuroimage Clin*. 2015;7:409-14.