

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Doenças Neurodegenerativas

Uma Visão Gliocêntrica

Ana Catarina Pereira Quintas Guedes Carvalho

**Monografia orientada pela Professora Doutora Dora Maria Tuna de
Oliveira Brites, Investigadora Coordenadora**

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2021

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



Doenças Neurodegenerativas

Uma Visão Gliocêntrica

Ana Catarina Pereira Quintas Guedes Carvalho

Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
apresentado à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia

Monografia orientada pela Professora Doutora Dora Maria Tuna de Oliveira
Brites, Investigadora Coordenadora

2021

Resumo

As Doenças Neurodegenerativas compreendem um conjunto de entidades patológicas de apresentação clínica e fisiopatologia muito diversas, com uma prevalência crescente, sobretudo na população envelhecida da sociedade moderna. Existe urgência no desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras e mais eficazes para enfrentar doenças tão devastadoras, atendendo a que não existe ainda nenhuma terapia capaz de travar o curso natural destas doenças neurodegenerativas.

A acentuada perda neuronal nestas doenças parece refletir os efeitos cumulativos de múltiplos fenómenos patológicos, incluindo a neuroinflamação, agregação de proteínas, stress oxidativo e disfunção mitocondrial. Atualmente, existe evidência suficiente para afirmar que a neurodegeneração ocorre, em parte, na sequência da perturbação do ambiente neuronal e da perda consequente de homeostasia no Sistema Nervoso Central (SNC).

As células da glia, principalmente a microglia e os astrócitos, são reconhecidas como tendo uma contribuição vital para uma pleora de processos fisiológicos, tais como a excitabilidade neuronal, plasticidade sináptica e metabolismo energético, em muito ultrapassando o conceito de serem meros elementos do tecido conjuntivo entre neurónios. Considerando que estas células se encontram fortemente envolvidas no sistema imunitário do sistema nervoso central e que fazem suporte trófico aos neurónios, são tidas como desempenhando um papel crítico no diálogo intercelular e manutenção do equilíbrio entre a neuroproteção e a neurodegeneração. Neste sentido, a microgliose e a astrogliose reativas apresentam-se como características patológicas *major*, contribuindo para um estado exacerbado de inflamação que tende a persistir e a desencadear degeneração neural.

A presente monografia procura consolidar o conhecimento e a investigação científica relativos à biologia glial no contexto de algumas das mais comuns doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer, Doença de Huntington, Doença de Parkinson e Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA). Primeiramente, é realizada uma abordagem centrada na diversidade e funções dos distintos tipos celulares da glia encontrados no SNC e nos principais fenómenos associadas a tais doenças, com foco nos papéis desempenhados pela microglia e pelos astrócitos, a par da complexa relação estabelecida entre ambas as populações. Mais detalhadamente, identificam-se as consequências associadas à disfunção glial nas funções homeostáticas no âmbito das quatro doenças neurodegenerativas supracitadas, com ênfase particular na Doença do Neurónio Motor. Adicionalmente, indicam-se potenciais biomarcadores das células gliais, no contexto da ELA, bem como as perspetivas futuras relativas à investigação de estratégias terapêuticas baseadas na modulação destes tipos celulares.

Palavras-chave: Doenças neurodegenerativas; Glia; Microglia; Astrócitos; Neuroinflamação.

Abstract

Neurodegenerative diseases comprise a set of pathological entities with heterogeneous clinical presentation and pathophysiology, which are rapidly rising in prevalence, particularly in our society's aging population. Indeed, there is an urgent need to develop novel and more effective therapeutic strategies to battle these cruel diseases, considering no therapy has yet emerged to ameliorate the natural course of neurodegenerative disease.

The insidious loss of neurons in these disorders seems to reflect the cumulative effects of numerous pathological features such as neuroinflammation, protein aggregation, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction. There is now also accumulating evidence that suggests neurodegeneration takes place in part because the neuron's environment is affected and brain homeostasis is lost, highlighting a non-cell-autonomous process.

Nowadays glial cells, mainly astrocytes and microglia, are recognized for their crucial contribution to a plethora of physiological processes like neuronal excitability, synaptic plasticity, and energy metabolism, broadening the flawed concept that considered them merely as the connective tissue between neurons. Moreover, as they are intimately involved in the brain immune system and provide neuronal trophic support, they display a central role in managing this intercellular crosstalk in both detrimental and beneficial ways. Accordingly, microgliosis and astrogliosis are now considered major pathological features, contributing to the heightened inflammatory state that persists and may lead to neurodegeneration.

The present literature review consolidates the knowledge and research performed so far regarding the role of glia cells in several of the most encountered neurodegenerative disorders, including Alzheimer's disease, Huntington's disease, Parkinson's disease, and Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). Firstly, it is addressed the diversity and function of glial cell types found in the central nervous system and major processes associated with neurodegenerative diseases, focusing on the contributions of microglia and astrocytes and their complex relationship. In specific, consequences of glial dysfunction on homeostatic functions in four of the major neurodegenerative diseases are identified, with special emphasis on ALS as a motor neuron disease. Additionally, potential biomarkers directed to glia in ALS are discussed, as well as the future and promising directions envisioned for the research of therapies targeting glial cells.

Keywords: Neurodegenerative diseases; Glial cells; Microglia; Astrocytes; Neuroinflammation.

Dedicatória

Para os meus Pais e Irmão

Para o meu eterno Jackie

Abreviaturas

Aldh1L1	Membro da Família L1 da Aldeído Desidrogenase 1
APOE	Apolipoproteína E
ASC	Proteína Adaptadora de Domínio de Recrutamento de Caspase
ATP	Adenosina Trifosfato
βA	Péptido Beta-Amiloide
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo
BHE	Barreira Hematoencefálica
C1q	Proteína C1q do Complemento
CE	Camada Ependimária
CEM	Células Estaminais Mesenquimatosas
CEN	Células Estaminais Neurais
CGD	Carga Global da Doença
MCOE	Microscopia Correlativa Ótica e Eletrónica
CN	Calcineurina
COX	Ciclooxigenase
CREB	Proteína de Ligação aos Elementos de Resposta do cAMP
CSF-1	Fator Estimulador de Colónias 1
CX3CL1	Ligando 1 da Quimiocina de Motivo C-X3-C
Cx43	Conexina-43
DA	Doença de Alzheimer
DALYs	Anos de Vida Ajustados por Incapacidade
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Sinais de Alarme
DG	Dia de Gestação
DH	Doença de Huntington
DN	Doenças Neurodegenerativas
DP	Doença de Parkinson
DPN	Dia Pós-Natal
EAAT2	Proteína Transportadora do Aminoácido Excitatório 2
EAE	Encefalomielite Autoimune Experimental
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
fAD	Doença de Alzheimer Familiar
fALS	Esclerose Lateral Amiotrófica Familiar
FTD	Demência Frontotemporal
FUS	Proteína de Ligação ao DNA/RNA <i>Fused In Sarcoma</i>
G-CSF	Fator Estimulador De Colónias de Granulócitos
GFAP	Proteína Ácida Fibrilar Glial
GLP1R	Recetor do Péptido-1 Semelhante ao Glucagina
GPR17	Recetor 17 Acoplado à Proteína G
GSH	Glutathiona
GSK3β	Cinase da Glicogénio Sintase 3β
HDACs	Desacetilases de Histonas

hGRPs	Células Progenitoras Gliais Humanas
HMGB1	<i>High-Mobility Group Box-1 Protein</i>
HSPCs	Células Hematopoiéticas Estaminais e Progenitoras
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
iNOS	Sintase do Óxido Nítrico Indutível
IL	Interleucina
iPSCs	Células Estaminais Pluripotentes Induzidas
IP₃	Inositol Trifosfato
JAK/STAT3	Janus Cinases/Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição 3
JNK	Cinase de Terminal Amínico da Proteína C-Jun
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LRP1	Recetor de Lipoproteínas de Baixa Densidade 1
LRRK2	Cinase Rica em Repetições de Leucina 2
MAPK	Cinases de Proteínas Ativadas por Agentes Mitogénicos
MCT1	Transportador de Monocarboxilato 1
ME	Medula Espinhal
MHC	Complexo Major de Histocompatibilidade
mHTT	Huntingtina Mutada
MIP1α	Proteína Inflamatória de Macrófagos-1 α
mRNA	RNA mensageiro
mSOD1	Superóxido Dismutase 1 mutada
MV	Microvesícula
MYD88	Proteína de Resposta Primária de Diferenciação Mielóide 88
NF-κB	Fator de Transcrição Nuclear κ B
NGF	Fator de Crescimento Neuronal
NGF-p75R	Recetor 75 das Neurotrofinas
NLR	Recetor do Tipo NOD
NM	Neurónio Motor
NO	Óxido Nítrico
NOD	Domínio de Oligomerização por União de Nucleótidos
NOS	Espécies Reativas de Azoto
NOX2	NADPH Oxidase 2
OMS	Organização Mundial Da Saúde
OPCs	Células Precursoras de Oligodendrócitos
OPTN	Optineurina
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Agentes Patogénicos
PARK	Parkina
PEG2	Prostaglandina E2
PINK1	Proteína Cinase 1 Induzida por PTEN
PPA	Proteína Precursora Amiloide
PRR	Recetor de Reconhecimento de Padrões
PSEN	Presenilina
RNS	Espécies Reativas de Azoto
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio
sAD	Doença de Alzheimer Esporádica

sALS	Esclerose Lateral Amiotrófica Esporádica
SNC	Sistema Nervoso Central
SNpc	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
SOD1	Superóxido Dismutase 1
SPIM	Microscopia de Plano Único de Iluminação
TDP-43	Proteína de Ligação ao TAR DNA 43
TGF-β	Fator de Crescimento Transformador-Beta
TLR	Recetores do Tipo <i>Toll</i>
TREM2	Recetor de “disparo” expresso nas células mielóides 2
UNV	Unidade Neurovascular
VE	Vesículas Extracelulares
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial

Índice Geral

1.	Introdução	14
2.	Objetivos	17
3.	Métodos.....	18
4.	Células Gliais: Papel na Neurodegeneração.....	19
4.1	Astrócitos	20
4.1.1	Astrócitos Reativos.....	21
4.1.2	Astroglíose Reativa e Vias de Sinalização Associadas	22
4.2	Células da Microglia.....	23
4.2.1	Fenótipos Microgliais no Desenvolvimento	26
4.2.2	Fenótipos Microgliais.....	28
4.2.3	Senescência Microglial e Perda de Função	29
4.3	Células Ependimárias	30
4.4	Oligodendrócitos	31
5.	Doenças Neurodegenerativas (DN).....	34
5.1	Neuroinflamação.....	35
5.1.1	Ativação do Sistema de Imunidade Inata no Sistema Nervoso Central (SNC).....	38
5.1.2	Diálogo entre Células Microgliais e Astrócitos.....	39
5.2	Intervenção das Células Gliais no Início e Progressão das DN	42
5.3	Doença de Alzheimer (DA)	43
5.4	Doença de Huntington (DH).....	47
5.5	Doença de Parkinson (PD)	49
6.	Esclerose Lateral Amiotrófica: Uma Visão Gliocêntrica da Neurodegeneração Motora.....	54
6.1	Papel das Células Gliais	58
6.1.1	Ativação Microglial.....	60
6.1.2	Astroglíose Reativa.....	64
6.1.3	Disfunção de Oligodendrócitos.....	67
6.2	Perfil de Comunicação Intercelular Patológica: Exossomas	69
6.3	Microglia e Astrócitos: Diálogo na Neuroinflamação	71
6.4	Perfil de Expressão de microRNAs (miRNAs)	73
6.5	Biomarcadores Gliais.....	75
6.6	Estratégias Terapêuticas Focadas na Recuperação das Células Gliais.....	78
7.	Conclusão e Perspetivas Futuras.....	86
	Referências Bibliográficas.....	89

Índice de Figuras

Figura 1 Papel da microglia no sistema nervoso central.....	24
Figura 2 Modulação astrócito-microglia em contexto de homeostasia e doença.....	25
Figura 3 Maturação da população microglial do sistema nervoso central durante o desenvolvimento.....	27
Figura 4 Sobreposição de genes diferencialmente expressos em doenças neurodegenerativas.....	35
Figura 5 Modelo simplificado da neuroinflamação como componente da neurodegeneração.....	37
Figura 6 Vias paralelas de comunicação entre o sistema imunitário periférico e parênquima cerebral.....	39
Figura 7 Visão esquemática sobre a ativação microglial, ativação de astrócitos e relação entre ambas.....	42
Figura 8 Modelo de neurotoxicidade induzida pela beta-amiloide e resposta glial na Doença de Alzheimer.....	45
Figura 9 Fenômeno de morte neuronal mediado pela microglia e astrócitos na Doença de Huntington.....	49
Figura 10 Neuroinflamação na Doença de Parkinson.....	51
Figura 11 Descoberta de mutações genéticas associadas à Esclerose Lateral Amiotrófica desde 1990.....	56
Figura 12 Fenótipos Microgliais na Esclerose Lateral Amiotrófica.....	61
Figura 13 Descrição esquemática da via de ativação do inflamassoma nas doenças neurodegenerativas.....	64
Figura 14 Impacto da atividade astrocitária na patogénese da Esclerose Lateral Amiotrófica.....	66
Figura 15 Disfunção de oligodendrócitos na Esclerose Lateral Amiotrófica.....	68
Figura 16 Transmissão intercelular da enzima superóxido dismutase “mal dobrada”.....	70
Figura 17 Envolvimento dos diferentes tipos celulares na resposta microglial na Esclerose Lateral Amiotrófica.....	72
Figura 18 MicroRNAs inflamatórios envolvidos na Esclerose Lateral Amiotrófica.....	74

Índice de Tabelas

Tabela 1 | Características clínicas, patológicas e genéticas associadas à Esclerose Lateral Amiotrófica..... 55

1. Introdução

As doenças neurodegenerativas (DN) compreendem um conjunto de entidades patológicas com apresentação clínica e fisiopatologia deveras heterogêneas, constituindo uma causa crescente de mortalidade precoce e morbidade a nível global (1). De acordo com Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2006, as doenças neurológicas, onde se incluem as DN, são um dos mais relevantes desafios no que toca à saúde pública. Mais recentemente, um relatório de 2017, por parte da *Global Burden of Disease Study* (2), estima que tais patologias se tenham estabelecido, em 2015, como uma das causas mais proeminentes associadas à incapacidade, materializando cerca de 11,6% do total de Anos de Vida Ajustados por Incapacidade (DALYs), métrica correspondente à perda de um ano de vida saudável.

A título de exemplo, considere-se que, na Europa, aproximadamente 16% da população possui mais de 65 anos de idade e, até 2030, é expectável que tal percentagem cresça até 25%. Com efeito, as demências constituem as DN mais prevalentes, afetando cerca de sete milhões de pessoas, número esse que deverá duplicar até 2040. A exigência de cuidados de saúde especializados e de tratamentos dispendiosos durante uma janela de tempo entre dois a dez anos permite prever uma aplicação de cerca de 130 000 milhões de euros associados a custos de tratamento neste grupo de doentes (3).

O fenómeno da neurodegeneração, por definição, perturba as propriedades do Sistema Nervoso Central (SNC), envolvendo a degeneração de populações neurais distintas que dão origem a quadros sintomatológicos específicos em função da população afetada. Ainda assim, apesar de a degeneração neuronal em regiões cerebrais específicas constituir a principal característica patológica, não é de todo claro que este processo ocorra autonomamente, sem qualquer intervenção de outro tipo celular (4).

A glia no SNC inclui populações de astrócitos, células precursoras de oligodendrócitos (OPCs), oligodendrócitos e microglia. A perspetiva contemporânea sobre estas células não-neuronais ultrapassa hoje largamente a visão redutora do passado que lhes atribuía primariamente funções constitutivas (*housekeeping*) associadas à sobrevivência neuronal. A evidência recente sustenta que as células da glia participam de forma crítica em múltiplos processos fisiológicos, como a aprendizagem, formação de memórias, excitabilidade, homeostasia iónica e metabolismo energético (5).

As células da glia apresentam-se, pois, como elementos fundamentais no sistema imunitário do SNC, na manutenção da homeostasia celular e no suporte estrutural e trófico das populações neuronais (5,6). Nos locais de neurodegeneração, as mesmas tendem a apresentar alterações fenotípicas em função do estado da doença, sendo os astrócitos e a microglia particularmente suscetíveis aos fenómenos de perturbação do SNC, definindo-se tipicamente como “células ativadas”, quando enquadradas no curso da doença (4). De igual modo, e enquanto componentes críticos da unidade neurovascular, as células endoteliais e os pericitos encontram-se também, até certo ponto, implicados em alguns destes fenómenos neurodegenerativos, ao formarem e permitirem a manutenção da barreira hematoencefálica (BHE) (4).

Neste sentido, existe, pois, uma franca necessidade de investigação, desenvolvimento e implementação de medidas preventivas mais robustas, conjuntamente com a disponibilização de estratégias terapêuticas modificadoras do curso clínico das DN. Até ao momento, não obstante de permanecerem ainda por identificar os agentes causais da neurodegeneração, julga-se que a acumulação de agregados de proteínas “mal dobradas” em regiões específicas do SNC desencadeie processos neuroinflamatórios potenciados pela própria neurodegeneração, combinando-se com um ambiente de stress oxidativo aumentado. A desregulação dos mecanismos de depuração de proteínas a nível intracelular (autofagia neuronal) e intercelular (interação entre neurónios, astrócitos, microglia e células T ativadas) afirma-se, pois, como uma potencial causa de degeneração do tecido neural, envolvendo uma importante componente de neuroinflamação crónica e autopetuada (7,8).

A intervenção de uma única população celular como causa da maioria das DN traduz efetivamente uma premissa frágil, assumindo-se que condições complexas em torno de circuitos de *feedback*, que perpetuam mecanismos de disfunção, e tentativas de reparação celular possam estar na base da sua patogénese. Neste contexto, considere-se, pois, o paradigma clássico da Doença de Alzheimer (DA) que implica a ocorrência de múltiplos circuitos de *feedback* positivo que incluem o péptido β -amiloide e espécies reativas de oxigénio (ROS) (4).

Nos últimos vinte anos, um campo emergente de investigação tem-se centrado então no estudo da neuroinflamação como fator crítico da neurodegeneração. As linhas de investigação, apoiadas em dados resultantes da avaliação genómica e epigenética, bem como através do uso de novos modelos experimentais da doença em estudo, centram-se em alterações no ambiente em que os neurónios degeneram,

incluindo aquelas associadas à ativação das células da glia, efeitos no SNC resultantes de estímulos inflamatórios periféricos e degradação da homeostasia subsequente à disrupção da BHE (9).

Em suma, os investigadores têm em mãos a clarificação da questão fundamental relativamente ao papel das células gliais nas DN, nomeadamente a hipótese de constituírem populações com intervenção fundamental no início e progressão da doença ou, em contraste, meros elementos “observadores” no decurso da neurodegeneração. As circunstâncias atuais, em termos científicos e tecnológicos, permitem, pois, de algum modo, abordar esta premissa com otimismo moderado e perspetivar o sucesso no desenvolvimento futuro de estratégias terapêuticas contra tão severas doenças.

2. Objetivos

Não obstante de o principal foco de investigação no âmbito das DN assentar no papel das células neuronais, o estudo dedicado à extensão e natureza do envolvimento das células da glia e outros tipos celulares não neuronais na sua patogénese, assume-se, efetivamente, como uma linha de investigação cada vez mais ativa e robusta, no seio da comunidade científica. De facto, um dos principais pontos críticos que dificultam o estudo de tais patologias prende-se com a sua etiologia multifatorial. Neste sentido, reconhece-se também a existência de uma miríade de fenómenos de *feedback* celular que se perpetuam um contexto de disfunção, o que dificulta a identificação de um único tipo celular e respetivo fenótipo associados à neurodegeneração.

Ainda assim, e atendendo igualmente aos recentes avanços científico-tecnológicos concretizados nos campos da transcriptómica e da genética, a implementação robusta de novas abordagens experimentais em muito têm contribuído para clarificar e identificar a contribuição relativa de cada população celular na mecanística das doenças. Nos últimos anos, a sua intervenção tem sido, pois, considerada no estudo da degeneração neuronal, constituindo o cerne de uma linha de investigação cada vez mais ativa que se dedica aos mecanismos celulares e moleculares associados à disfunção glial nas DN. Desta forma, a presente monografia propõe como objetivo inicial a pesquisa e triagem das evidências mais relevantes em torno desta área emergente de investigação, nomeadamente nas patologias de Alzheimer, Huntington, Parkinson e Esclerose Lateral Amiotrófica. Para efeitos de síntese e enquadramento mais detalhado, reservar-se-á maior ênfase a esta última.

Em função do supracitado, será prestado maior enfoque a esta doença do neurónio motor em capítulo próprio, através de uma revisão das mais recentes evidências em torno dos mecanismos de disfunção astrocitária e microglial, bem como dos fenómenos de interação com outros tipos celulares. Nesta dinâmica de causalidade das células gliais na progressão da ELA, perspetivar-se-á ainda criticamente o potencial para validação de novos alvos terapêuticos e biomarcadores clínicos. De olhos postos no futuro, o presente trabalho monográfico desenha também, e em jeito de conclusão, um retrato das estratégias terapêuticas mais promissoras focadas na recuperação das células gliais.

3. Métodos

O presente trabalho monográfico, intitulado “*Doenças Neurodegenerativas: Uma Visão Gliocêntrica*”, foi executado entre os meses de novembro de 2020 e junho de 2021, com base numa revisão pormenorizada após seleção da evidência bibliográfica mais atual e afim à área do estudo.

Foi realizada uma pesquisa da literatura publicada em Inglês, nomeadamente nas bases de dados científicas *Pubmed/Medline* e *Google Scholar*, com recurso a combinações de palavras chave gerais e específicas, relativas ao tema de cada capítulo e subcapítulo, de entre as quais se relevam: *glial cells, astrocytes, microglia, oligodendrocytes, ependymal cells, oligodendrocyte progenitor cells, neurodegenerative diseases, neuroinflammation, neurodegeneration astroglia, microgliosis, Alzheimer’s Disease, Huntington’s Disease, Parkinson’s Disease, amyotrophic lateral sclerosis, motor neuron disease, exosomes, prion-like properties, extracellular vesicles, microRNA, Beta-amyloid, TDP-43 aggregates, mSOD1, astrocyte cell-based therapy, biomarkers, treatment, therapeutics, clinical trials, ageing, excitotoxicity, glia crosstalk, gene therapy, secretome*.

Objetivando a recolha da informação mais pertinente, credível e com adequação ao atual estado da arte desta temática em expansão, privilegiou-se o acesso a artigos e documentos científicos nacionais/internacionais publicados entre 2015 e 2021. A par de artigos científicos de revisão, com citação pontual noutras publicações, foram também incluídos, no processo de análise e tratamento da informação, artigos científicos experimentais baseados em modelos animais, humanos e estudos *in vitro*. Foi igualmente consultada a base de dados de ensaios clínicos registados no *ClinicalTrials.gov* da National Library of Medicine, sediada nos Estados Unidos da América.

4. Células Gliais: Papel na Neurodegeneração

As células da glia integram um conjunto de tipos celulares não excitáveis do sistema nervoso, sendo desprovidas da capacidade de gerar impulsos elétricos. Não obstante, e através de sinais de cálcio, estas células revelam-se, na verdade, essenciais à comunicação intercelular. A visão atual sobre estas células aponta para uma participação fundamental em diversos processos neuronais, contrariando o paradigma prévio de se tratarem apenas de células responsáveis pelo suporte estrutural dos neurónios, através da formação da matriz extracelular, e de estarem meramente associadas a funções constitutivas (*housekeeping*) (5).

Na verdade, estas células circundam os corpos celulares, dendrites e axónios dos neurónios, apresentando uma diversidade morfológica muito distinta da destes últimos. Com efeito, a elevada heterogeneidade das células da glia, no sistema nervoso dos vertebrados, justifica a sua integração em duas grandes classes: a macroglia e a microglia. A macroglia compreende astrócitos, oligodendrócitos, OPCs e células endoteliais, ao passo que a microglia reúne células pertencentes ao sistema imunitário do SNC, prontamente disponíveis para a apresentação de antígenos, com papel fagocítico, em contexto de lesão, infecção ou de DN (10).

No SNC, as células gliais assumem particular relevância nos fenómenos de regulação da microcirculação, formação e limpeza das sinapses, plasticidade sináptica, bem como nos processos de aprendizagem e memória. Conjuntamente, são essenciais na regulação da BHE, destoxificação metabólica aquando do sono, manutenção da transmissão sináptica através da homeostasia iónica, incluindo a depuração de iões K^+ e a captação de neurotransmissores. Ainda, as células da glia desempenham um papel crítico durante a neuroinflamação, condicionando a severidade do fenómeno e os efeitos gerais de neurotoxicidade (5).

Contrariamente a evidências mais antigas, hoje reconhece-se que as células da glia encontram-se efetivamente em menor número que os neurónios no sistema nervoso, embora numa proporção mais ou menos equivalente (11). Adicionalmente, as células da glia, no SNC, parecem ser as primeiras a responder a estímulos de stress e exibem especial vulnerabilidade aos fenómenos de envelhecimento do SNC (12). Com a idade, as suas funções de homeostasia e de neuroproteção poderão vir a ser comprometidas, existindo ainda evidências de fenómenos de senescência celular (encurtamento de telómeros), a partir de estudos em culturas celulares, que sustentam a sua suscetibilidade ao envelhecimento (13).

Historicamente, uma larga fatia da investigação realizada no âmbito das DN tem-se focado, todavia, em populações particulares de neurónios em estado de degeneração, cuja perda tende a contribuir para uma apresentação clínica distinta (4). Contudo, evidências recentes sugerem que a disfunção glial poderá efetivamente constituir uma peça chave na patogénese de tais doenças (5). Estas encontram-se presentes nas regiões de neurodegeneração e apresentam múltiplas alterações fenotípicas em condições patológicas. Nestes contextos, os astrócitos e a microglia revelam-se francamente sensíveis às alterações do SNC, sendo intitulados de "reativos" ou "ativados". Tais fenótipos moleculares permitiram, por exemplo, validar biomarcadores de astrócitos reativos ou de microglia ativada em diversas DN. De notar, porém, que esta terminologia é, por natureza, algo imprecisa e apontada como discutível, implicando liminarmente que o estado celular decorre de um qualquer fator causal a montante (5).

4.1 Astrócitos

A primeira observação de astrócitos no SNC data de 1871 por Camillo Golgi (12). Estes apresentam-se como células gliais, em forma de estrela, de morfologia irregular e com múltiplos processos, totalizando aproximadamente 20% a 40% da população celular no SNC (13). Estas células apresentam um amplo espectro de funções, compreendendo não só a regulação do fluxo sanguíneo cerebral, modulação da função sináptica e reciclagem de neurotransmissores mas, também, o suporte trófico e metabólico de neurónios (14).

Os astrócitos comunicam entre si sobretudo por intermédio de junções hialinas constituídas por conexina-43, formando uma espécie de "sincício glial" que permite a troca célere de iões, ATP, glucose, aminoácidos, adenosina monofosfato cíclico (cAMP), inositol trifosfato (IP₃) e ainda de neurotransmissores como o GABA e o glutamato (15). É também através de vesículas extracelulares, contendo recetores metabotrópicos do ATP do tipo P2Y e aquaporina-4, que a comunicação com as células da microglia ocorre, possibilitando a transferência de fatores tróficos, aminoácidos e ATP. Ao estabelecerem uma comunicação íntima com a vasculatura cerebral, através dos seus "pés" terminais, os astrócitos desempenham concomitantemente um papel crítico na formação da unidade neurovascular (UNV) responsável pela regulação do fluxo sanguíneo cerebral e da própria BHE (15).

Atendendo a que os astrócitos constituem as únicas células do SNC com reservas de glicogénio, há a sublinhar uma ação central no controlo do metabolismo energético neuronal, à luz da hipótese de transporte astrócito-neurónio. Esta propõe que, em resposta a uma atividade neuronal aumentada, ocorre uma captação marcada de glucose por parte dos astrócitos a partir da vasculatura. Esta é então utilizada no fenómeno de glicólise, com libertação subsequente do substrato energético lactato para o meio extracelular, de forma a ser captado e oxidado pelos neurónios metabolicamente mais exigentes (15,16).

Em adição, os processos astrocíticos que tendem a rodear a maioria das sinapses, desempenham um papel fundamental naquilo que se designa por “sinapse tripartida” (15). Este conceito envolve, pois, a participação dos terminais neuronais pré- e pós-sinápticos e respetivo astrócito associado, focando a importância dos transportadores de glutamato nestas células (EAAT1 e EAAT2), encarregues da recaptação do glutamato sináptico e prevenção da excitotoxicidade subsequente, e dos transportadores Kir4.1, envolvidos na depuração de K^+ (15). A expressão diferenciada de recetores de neurotransmissores acoplados a sistemas de segundos mensageiros nestas células assume igualmente particular importância na indução de ondas de cálcio que sustentam a hipótese de uma “excitabilidade intrínseca” (15). No âmbito da regulação da homeostase iónica no espaço sináptico, os astrócitos apresentam elevações de Ca^{2+} aquando da deteção de atividade sináptica, culminando na libertação de gliotransmissores, como o glutamato, a D-serina e o ATP, essenciais à regulação da sinaptogénese neuronal. Adicionalmente, tem-se vindo a destacar a participação da microglia e da matriz extracelular no conceito de “sinapse multipartida” (15). Em paralelo, os astrócitos são também elementos-chave na neuroinflamação, considerando a sua capacidade de secreção de múltiplas moléculas como quimiocinas e citocinas pró- e anti-inflamatórias, incluindo, por exemplo, o Factor de Necrose Tumoral α (TNF- α), a interleucina-6 (IL-6), a IL-10 e a quimiocina 2 (CXCL2) (16).

4.1.1 Astrócitos Reativos

Foi através de Ramon y Cajal que as primeiras evidências a favor da existência de uma população heterogénea de astrócitos adquiriram solidez. Atualmente, as inúmeras funções atribuídas a este tipo glial devem-se à identificação de novas subpopulações de astrócitos e respetiva caracterização fenotípica e funcional, para a

qual as técnicas de sequenciamento de RNA em células individuais, como de *bulk RNA-seq* e *single-cell RNA-seq (scRNA-seq)*, em muito têm vindo a contribuir (14). Efetivamente, trabalhos recentes de fenotipagem molecular, em articulação com uma caracterização baseada na morfologia, têm vindo a estabelecer a diferenciação de diversos grupos funcionais de astrócitos, com distribuição e proporções variadas em função das diferentes regiões cerebrais. No cerebelo, a título de exemplo, identifica-se uma população de astrócitos velados, os quais envolvem um único neurónio na camada das células granulares, e outra de astrócitos de Bergmann, na camada das células de Purkinje (15).

Assumindo-se como o grupo de células gliais mais abundante e heterogéneo do SNC, consideram-se, pois, dois subtipos morfologicamente bem definidos de astrócitos. Por um lado, reconhecem-se astrócitos protoplasmáticos, situados na matéria cinzenta, com processos curtos e ramificados, envolvidos na constituição da UNV. Por seu turno, os astrócitos fibrosos preenchem a matéria branca e exibem longos e finos processos, contendo feixes compactos de filamentos intermediários positivos para a Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP). Ambos os subtipos possuem na sua constituição dilatações terminais que contactam e rodeiam, sem sobreposição, os capilares e arteríolas nas diferentes regiões do SNC (10).

Em resposta a qualquer forma de insulto no SNC, toma lugar o fenómeno de astrogliose reativa, no qual os astrócitos sofrem, segundo um gradiente contínuo, alterações ao nível da sua morfologia, função e perfil molecular (16). Neste contexto, sucede-se então a sobrerregulação de filamentos intermediários, vimentina e nestina, a par de uma hipertrofia celular, originando astrócitos reativos com capacidade fagocítica aumentada (16). Uma astrogliose severa tende a pautar-se por fenómenos de proliferação, disrupção dos domínios espaciais, causando inflamação e formação de uma cicatriz glial, sendo que as funções dos astrócitos perspetivadas como benéficas, num quadro de doença, poderão assumir efeitos altamente deletérios (16).

4.1.2 Astrogliose Reativa e Vias de Sinalização Associadas

Atualmente encontram-se descritas múltiplas vias de sinalização intracelular vinculadas aos processos de iniciação e modulação da astrogliose reativa, nomeadamente a via JAK/STAT3 (do inglês *Janus Kinase/ Signal transducer and activator of transcription 3*), a via NF- κ B (do inglês *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), a via da Calcineurina (CN) e a via MAPK (*Mitogen-*

activated protein kinase). A estas três últimas são atribuídos fenómenos mais significativos no âmbito da modulação da astrogliose, ao passo que a via JAK/STAT3 é apontada como a principal via associada à iniciação do processo de astrogliose reativa (14).

A via JAK/STAT3, num estudo com recurso a um modelo de ratinho transgénico para a DA e a modelos de ratinho e de primata modificados com vetor lentiviral para a DH, mostrou sofrer uma ativação consistente em astrócitos reativos, afirmando-se como um dos principais alvos da investigação focada nestas células no contexto de DN (14,17).

É de realçar, contudo, que existe efetivamente um diálogo subtil entre as diversas vias de sinalização e o microambiente local, o que acaba por produzir diferentes fenótipos finais de astrócitos, relevando-se, a título de exemplo, a interação sinérgica entre as vias STAT3 e da NF-κB no controlo de genes alvo (14).

Outros alvos emergentes na regulação da astrogliose reativa têm vindo a ser explorados nos últimos anos, designadamente as enzimas de desubiquitinação (DUB). Num modelo de ratinho *Gfap-Cre A20^{fl/fl}*, por exemplo, a deleção da enzima A20 mostrou promover a ativação exacerbada da via NF-κB, desencadeando um agravamento do modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE), utilizada comumente no estudo da Esclerose Múltipla (14).

4.2 Células da Microglia

A microglia abrange um grupo heterogéneo de células derivadas de monócitos associadas primordialmente a propriedades imunitárias semelhantes às dos macrófagos, no SNC, relevantes no desenvolvimento, manutenção do ambiente neural, lesão e reparação. Estão implicadas especificamente na modulação de eventos relacionados com a proliferação e diferenciação neuronal durante o desenvolvimento, contribuindo, em paralelo, para processos de remoção de agentes patogénicos, células em morte ou lesão neuronal e respetivo detrito celular, bem como para a reorganização dos contactos sinápticos e estabelecimento da citoarquitetura final (ver Figura 1) (18).

Neste âmbito, Weinhard et al. (19), com recurso à Microscopia Correlativa Ótica e Eletrónica (MCOE) e Microscopia de Único Plano de Iluminação (SPIM), em culturas organotípicas de hipocampo, reportou um processo de fagocitose parcial seletiva de

estruturas pré-sinápticas e de indução de espinhas pós-sinápticas pela filipodia da microglia. O fenómeno é classificado de trogocitose e permite elucidar mecanisticamente a atividade destas células na remodelação e maturação dos circuitos neuronais.

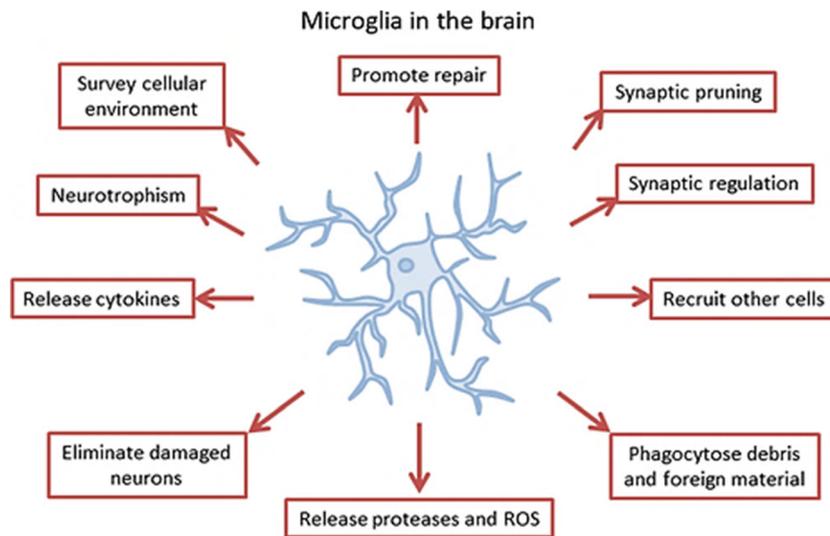


Figura 1 | Papel da microglia no sistema nervoso central. As células da microglia desempenham uma miríade de funções de suporte em fenómenos de proliferação e diferenciação neuronal, comunicação intercelular, promoção da inflamação, degradação e reparação. Imagem originalmente publicada em *Angelova e Brown (20)*. Para mais informação, consultar texto principal e nota de rodapé ¹.

Apresentam-se assim como células do sistema imunitário com capacidade fagocítica altamente eficiente, prevenindo a difusão de produtos de degradação potencialmente tóxicos para as células, através dos seus múltiplos e ramificados processos que se estendem em todas as direções (20). Estas permanecem num estado fisiológico de vigilância (*surveillance*), exibindo uma morfologia ramificada, até serem ativadas em resposta a potenciais sinais de perigo para os neurónios. Reconhece-se um padrão de alteração morfológica e funcional que inclui a aquisição de uma forma mais ameboide, capacidade aumentada de fagocitose e quimiotaxia e, a par, a diminuição da expressão de recetores purinérgicos P2Y12 associados às funções de motilidade e migração microgliais, tipicamente desempenhadas num contexto de homeostasia fisiológica no SNC (ver Figura 2) (20).

¹ ROS, *Reactive oxygen species*.

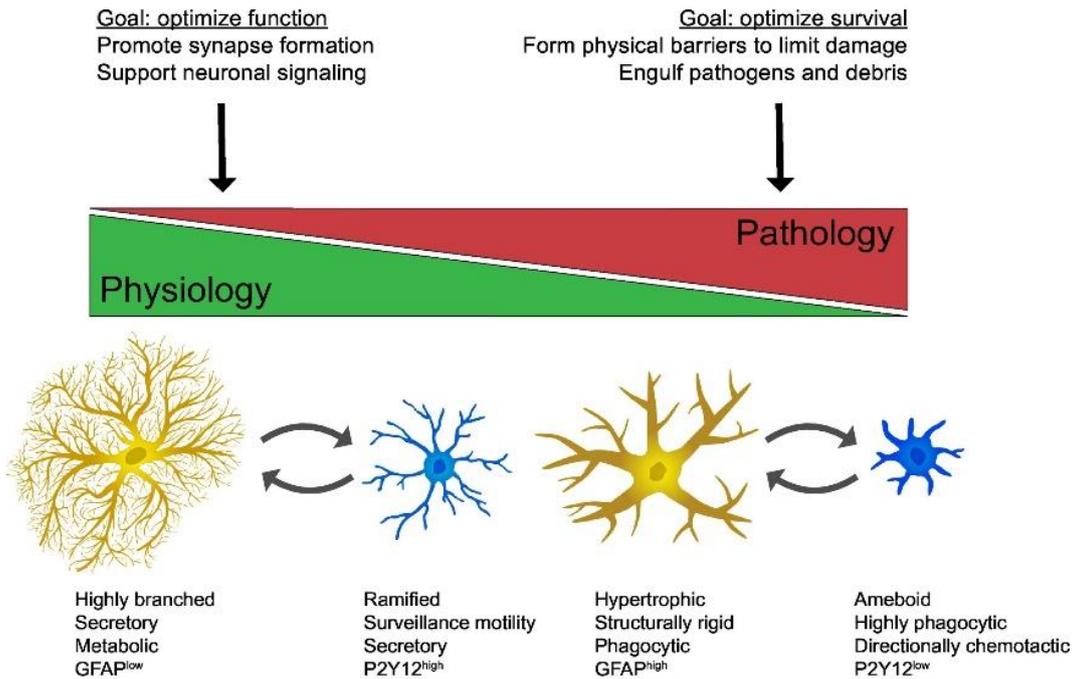


Figura 2 | Modulação astrócito-microglia em contexto de homeostasia e doença. Em condições patológicas, os astrócitos (amarelo) encontram-se desprovidos das funções típicas de suporte de forma a otimizar a sobrevivência, pautando-se por alterações morfológicas, do secretoma, aumento de marcadores reativos e da fagocitose, tal como a microglia (azul). Imagem originalmente publicada em *Vainchtein e Molofsky* (21). Para mais informação, consultar texto principal e nota de rodapé ¹.

A comunicação entre microglia e neurónios é crucial para a regulação ótima do comportamento e fisiologia do SNC. Uma das vias de comunicação envolve o ligando 1 da quimiocina CX3C (CX3CL1 ou *Fractalcina*), que é secretado por neurónios, e o recetor alvo na microglia (CX3CR1) (7). A ativação dos sete domínios transmembranares acoplados à *G_{αi}* do recetor modula diversas vias de sinalização intracelular (PLC, PI3K e ERK), bem como o recrutamento de fatores de transcrição [NF-κB e *Proteína de ligação aos elementos de resposta do cAMP* (CREB)] que ativam, por sua vez, a expressão de genes específicos (7). A disrupção da via de sinalização CX3CL1, que modula a ativação microglial nos fenómenos de migração, vigilância, maturação e plasticidade sináptica, encontra-se associada à produção aumentada de moléculas pró-inflamatórias, como IL-1β e ROS que despoletam, no limite, a morte celular (7).

¹ GFAP, *Glial fibrillary acidic protein*; P2Y12, *Purinergic P2Y12 receptor*.

O recetor da glicoproteína CD200 (CD200R) na microglia tem também sido alvo de intenso estudo, interagindo com a glicoproteína CD200 existente nas membranas celulares de neurónios e astrócitos. Esta interação permite que a microglia permaneça no estado fisiológico de vigilância (7). Um outro complexo molecular inibitório tem merecido destaque, nomeadamente a integrina CD47, que subregula o fenómeno de fagocitose durante a limpeza sináptica, ao interagir com o componente microglial C172a (7).

São reconhecidas outras células do sistema imunitário no SNC, designadamente macrófagos e linfócitos, cuja renovação contínua através da linhagem de células progenitoras mieloides contrasta com a capacidade limitada da microglia, proliferando por meio da divisão celular (20). A população microglial é definida pois nas fases mais precoces do desenvolvimento, sendo francamente vulnerável aos fenómenos de envelhecimento fisiológico e patológico, no contexto de DN e psiquiátricas (20).

Nos últimos anos, a determinação do padrão de expressão de RNA da microglia tem sido crescentemente privilegiada, permitindo uma distinção mais eficaz entre estas células e macrófagos, sobretudo em condições patológicas (22).

A expressão genética da microglia, enquanto macrófagos residentes do SNC, envolve diversos genes associadas à linhagem mielóide, incluindo recetores de Padrões Moleculares Associados a Agentes Patogénicos (PAMPs) e de Padrões Moleculares Associados a Sinais de Alarme (DAMPs), outros genes relacionados com a fagocitose e apresentação de antígenos (22).

4.2.1 Fenótipos Microgliais no Desenvolvimento

No SNC humano, a colonização pela microglia coincide temporalmente não só com a vascularização do mesmo, mas também com a formação da glia radial, migração neuronal e mielinização. Aquando do final do primeiro trimestre de gestação, verifica-se a presença de um número limitado de células da microglia com fenótipo imaturo, de morfologia ameboide e processos curtos (18).

A microglia tende somente a assumir a morfologia tipicamente mais ramificada, aquando do desenvolvimento característico das populações neuronais, especulando-se que tal associação entre os dois tipos celulares durante o desenvolvimento possa

estar relacionada com a própria maturação dos neurónios e a expressão de fatores promotores da diferenciação dos mesmos (18).

A aquisição subsequente de uma forma mais arredondada e de processos cada vez mais longos e finos, durante o crescimento e maturação do SNC, irá então aumentar a sua capacidade de migração até outras regiões. Apenas a partir das 35 semanas de gestação, é possível observar a microglia na fase de maturação final (18).

Em ratinho, o padrão de colonização segue identicamente, sendo que entre o dia de gestação (DG) 10 e 15, as células mononucleares derivadas da medula óssea atravessam a BHE e instalam-se no parênquima cerebral, apresentando um citoplasma residual e escassos processos (CD45^{hi}) (18). Nas fases mais precoces, entre o DG 18 e 19, tais células surgem na região da substância branca, exibindo uma morfologia ameboide/fagocítica e, simultaneamente, uma outra dotada já de processos longos e ramificados (18).

Por volta do dia 5 pós-natal (DPN), ambos os fenótipos são já identificáveis nas regiões de substância branca e cinzenta. Ocorre então no período pós-natal (DPN 5-15) um incremento substancial do número de células microgliais, sobretudo do fenótipo ramificado com aumento do material citoplasmático, que se distribuem por quase todo o parênquima cerebral garantindo a sua vigilância (18). Esta população é mais heterogénea, revela menor capacidade de diferenciação e expressa um número crescente de marcadores à superfície.

Ao DPN 20 a microglia adulta encontra-se já bem estabelecida, expressando o marcador perivascular ED2⁻ (CD163) e CD45^{lo} (ver Figura 3) (18).

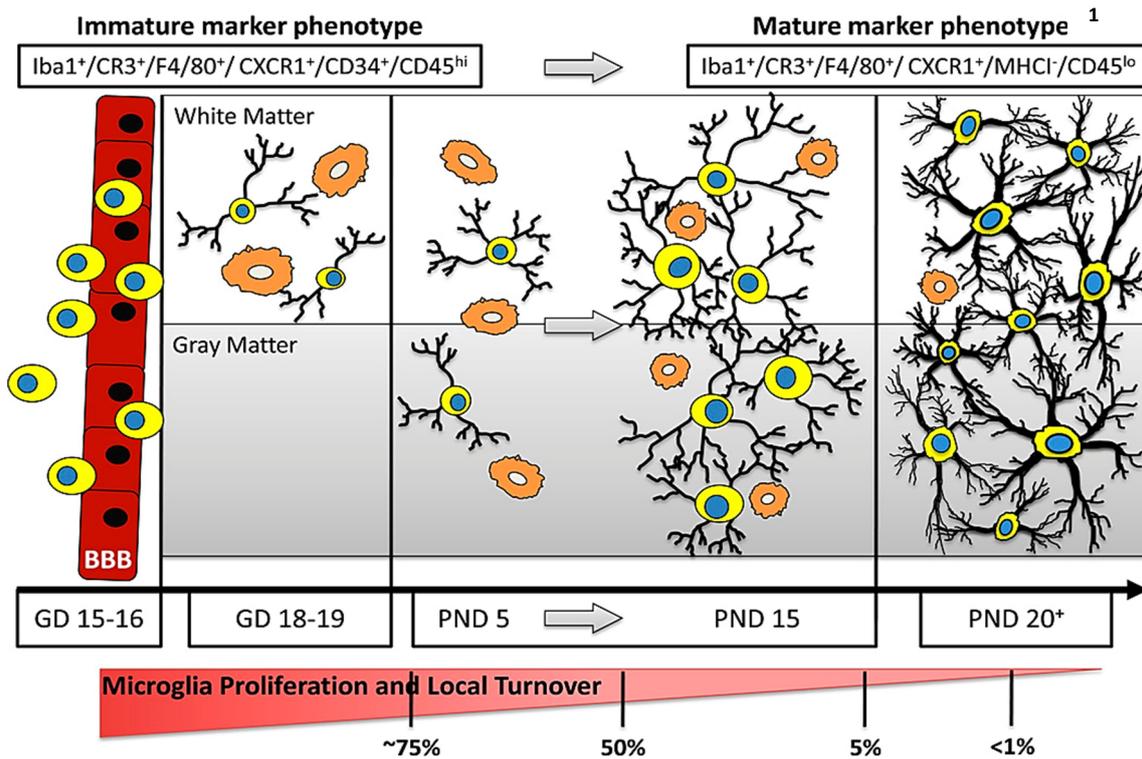


Figura 3 | Maturação da população microglial do sistema nervoso central durante o desenvolvimento. Imagem originalmente publicada em Harry e Kraft (18). Para mais informação, consultar texto principal e notas de rodapé ^{1,2}.

4.2.2 Fenótipos Microgliais

As células da microglia no estado “steady-state” (ou de vigilância) são capazes de detetar possíveis sinais de perigo, motivando a sua migração para a região da lesão e conversão para um estado de maior ativação ou reatividade, que se reflete em alterações morfológicas. A microglia reativa não fagocítica, por exemplo em contexto de neurodegeneração ligeira, exhibe então uma morfologia em forma de bastonete, com espessamento dos seus processos, sobreexpressão do complexo principal de histocompatibilidade de classe I e II (MHC I/II), secreção de citocinas pró-inflamatórias

¹ ED2; MHCII* in white matter.

² BBB, Blood-brain-barrier; CD34, Cluster of Differentiation 34; CD45, Cluster of Differentiation 45; CR3, Complement receptor 3; CXCR1, C-X-C Motif Chemokine Receptor 1; ED2, Marker of Perivascular Macrophages in the rat; F4/80, Macrophage-specific plasma membrane glycoprotein; GD, Gestation Day; Iba1, Ionized calcium-binding adaptor protein-1; MHC, Major histocompatibility complex; PND, Postnatal Day.

e ROS. Em estados mais avançados de ativação, adquirem um fenótipo mais ameboide e hipertrófico (sobreativação), com capacidade adicional de fagocitose de material e posterior apresentação de antígenos às células T (20).

A ativação microglial ocorre após perturbações à homeostasia do SNC, geralmente sob a forma de eventos traumáticos agudos, isquêmicos ou associados ao início de doença. Corresponde então ao primeiro passo da resposta neuroinflamatória por parte das células endógenas do SNC à lesão, no espaço de dias ou semanas. O fenómeno de neuroinflamação endógena é apelidado de gliose reativa, referindo-se à mobilização conjunta de astrócitos e microglia (23).

No plano atual de investigação da influência do microambiente na microglia, a caracterização funcional dos seus distintos fenótipos, em contextos particulares de desenvolvimento fisiológico/aberrante e neurodegeneração, tem-se baseado nos recentes progressos das tecnologias de sequenciação com resolução celular nas áreas da transcriptómica e epigenómica (22). A determinação do perfil de expressão genómica *ex vivo* da microglia, a partir de diferentes modelos de doença em ratinhos, não tem permitido sustentar a teoria da polarização M1/M2. A microglia tende a exibir um fenótipo de expressão altamente dinâmica de genes pró- e anti-inflamatórios em simultâneo, sendo influenciada pelo ambiente local e distintos estímulos (24). A polarização da microglia tem vindo a ser perspectivada tal qual um *continuum* entre os estados pró- e anti-inflamatórios, sendo que estas células poderão apresentar fenótipos com características sobreponíveis de M1 e M2 (25). Tal terminologia, à luz dos achados mais recentes, parece necessitar de ser revista e de ser baseada em perfis transcriptómicos e proteómicos da microglia obtidos *ex vivo* a partir de elementos saudáveis e em estados distintos de doença, associados a trauma, infeção, durante o desenvolvimento e envelhecimento (24).

4.2.3 Senescência Microglial e Perda de Função

No âmbito do envelhecimento, em biópsias do encéfalo de indivíduos idosos, foram identificadas as primeiras evidências sugestivas do fenómeno de senescência microglial (20). Estas células revelam uma morfologia distrófica, compreendendo encurtamento e arredondamento dos processos, com formação de vesículas esféricas e fragmentação citoplasmática. Interessantemente, registam-se níveis elevados de ferritina nestas populações, pressupondo-se que o ferro possa assumir um papel chave no processo de senescência (20,26). Em termos funcionais, constata-se uma

alteração do fenótipo de vigilância, que se reflete numa menor ramificação e reduzida motilidade dos processos, que justificam as taxas inferiores de migração e uma resposta inflamatória de baixo grau mais sustentada (20,26). A assinatura de secreção de citocinas assume uma natureza predominantemente pró-inflamatória (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8), a par da redução da capacidade fagocítica e da produção aumentada de ROS, quimiocinas e proteases. Desta forma, atribui-se também um putativo efeito major deste fenómeno de senescência no âmbito das DN (20,26).

4.3 Células Ependimárias

As células ependimárias constituem um tipo de célula epitelial ciliada simples com origem na glia radial, que reveste toda a superfície ventricular do SNC e o canal central da medula espinhal (ME) (27). Este tipo glial assume-se tal qual uma interface entre o líquido cefalorraquidiano (LCR) e o parênquima do encéfalo e ME, facultando uma barreira de natureza imunológica que ajuda também a regular o transporte bidirecional de moléculas entre o LCR ventricular e o fluido intersticial (27,28).

Entre as principais funções desempenhadas, constam a depuração de metabolitos tóxicos, a regulação metabólica a nível cerebral e a deteção de nutrientes (do inglês, *nutrient sensing*). Estas relacionam-se estruturalmente com a presença de um cílio primário que deteta moléculas circulantes, tufo de cílios móveis que permitem a manutenção do fluxo laminar do LCR nas cavidades ventriculares e de junções intercelulares aderentes, comunicantes, a par de transportadores seletivos (27).

A camada ependimária (CE) é composta por três principais tipos celulares, nomeadamente tanicitos, ependimócitos e neurónios que contactam diretamente com o LCR, sendo que a evidência mais recente atribui-lhe um papel importante no contexto de doenças da medula espinhal, lesões traumáticas, e ainda em DN (27). A proliferação de células da CE tem sido estudada, embora em menor grau, em modelos de DN, como na ELA. Num modelo de ratinho SOD1^{G93A}, Marcuzzo et al. (29) determinou que estas células mantinham efetivamente a multipotência em cultura celular, sendo que a linhagem progenitora (epSPCs, *ependymal stem progenitor cells*) apresentou uma maior proporção de diferenciação neuronal, em comparação com os controlos, correlacionando-se com alterações na expressão de microRNAs (miRNAs) (29).

Outro mecanismo proposto prende-se com a possível disfunção da homeostasia metabólica estabelecida pelo modelo do sistema glinfático, associando-a à patogénese de diversas DN (30). Durante o envelhecimento normal, a CE sofre uma redução ao nível da densidade dos cílios móveis na superfície apical das células, acumulando gotículas lipídicas no seu interior (30). Na DA, observa-se a ocorrência seletiva deste fenómeno nas células endimárias, resultando, em última análise, na deterioração do nicho neurogénico da Zona Subventricular com conseqüente agravamento do processo neurodegenerativo (31).

4.4 Oligodendrócitos

Os oligodendrócitos são consideradas as células responsáveis pela produção de mielina ao nível do SNC, constituindo este um processo metabolicamente exigente que as torna particularmente vulneráveis a fatores citotóxicos, como ROS e peróxido de hidrogénio, e a outros fatores de excitotoxicidade, tais como níveis elevados de glutamato e concentrações aumentadas de ATP (32). Diferenciam-se então a partir da reserva de OPCs (ou células NG2⁺), amplamente distribuída por todo o SNC, que origina células progenitoras adultas com capacidade de migração e diferenciação (32).

Estudos recentes têm também contribuído para a descrição de uma função eminentemente imunomoduladora, em que as OPCs revelam a capacidade de expressar recetores de citocinas e de detetar alterações do microambiente através de extensões dos filipodia (32). Encontra-se, pois, descrito um fenótipo pró-inflamatório de OPC que promove a lesão tecidual e inibe a remielinização, nomeadamente a partir de um estudo *in vitro*, em que, por apresentação cruzada de antigénio às células T CD8⁺, subsequente à exposição de interferão γ (IFN γ), são desencadeados fenómenos de citotoxicidade que culminam em morte celular (32).

Por outro lado, existem estudos que destacam um papel crítico dos oligodendrócitos no suporte trófico dos axónios, garantindo a sua integridade e sobrevivência, independentemente da presença da própria mielina (33). O mecanismo proposto baseia-se na atividade glicolítica destas células, gerando-se produtos como o piruvato ou lactato que são transferidos por difusão para os axónios mielinizados, essenciais ao processo de respiração mitocondrial (33). A difusão de metabolitos ocorre por meio de um sistema de canais citosólicos coalescentes denominados “canais mielínicos” que permitem tal suporte trófico dos axónios aos quais os

oligodendrócitos se encontram vinculados, que, por sua vez, compensa a privação do compartimento neuronal a um rápido acesso a metabolitos extracelulares como a glucose (33). Num modelo animal de ELA, estudos moleculares sugeriram alterações ao nível da expressão do transportador de infusão de lactato MCT1 em oligodendrócitos como um achado fundamental. Apesar da extensa gliose que potencia o aumento da proliferação das OPC, tende-se a verificar, nestes novos oligodendrócitos, a sobreexpressão anormal do recetor 17 acoplado à proteína G (GPR17), que contribui para a inibição da maturação terminal, juntamente com a subregulação do transportador do monocarboxilato (MCT1), comprometendo o efluxo de lactato e nutrientes até aos NMs. Estes oligodendrócitos, imaturos e distróficos, não são então capazes de remielinizar os axónios e de exercer o suporte trófico dos neurónios motores (NMs), contribuindo para a sua degenerescência e morte (34).

Este processo, em muito semelhante ao transporte de lactato dos astrócitos nas sinapses corticais, tem sido contextualizado no âmbito de outras DN, sugerindo-se como mecanismo neuropatológico uma possível disfunção do acoplamento metabólico entre axónio e oligodendrócito associada à característica desmielinização (33). Na verdade, as interações entre a linhagem de oligodendrócitos e os seus neurónios alvo reveste-se de tamanha complexidade, envolvendo fenómenos adicionais de morte das células progenitoras e degeneração neuroaxonal por lesão da mielina, neuroinflamação, desregulação das vias de sinalização e alteração do ambiente mitogénico (34).

Curiosamente, na DA, apesar de os achados neuropatológicos da matéria branca serem considerados característicos, crê-se, contudo, que a morte dos oligodendrócitos e o próprio fenómeno de desmielinização ocorram secundariamente à neurodegeneração, sendo a toxicidade pelo péptido beta-amiloide (βA) um potencial fator causal (34). Em contraste, num estudo de Fischer et al. (35), sugere-se porém que a patologia destas células possa antecipar de algum modo os típicos eventos neurodegenerativos. Mais especificamente, a libertação de ferro a partir de oligodendrócitos em morte celular poderá promover a formação dos oligómeros de βA e potenciar a toxicidade do péptido βA (34).

Outra linha de investigação postula que, sendo os oligodendrócitos as células dotadas da maior reserva de ferro no SNC e capazes da expressão de elevados níveis de ferritina, estas possam estar implicadas na elevação dos níveis de ROS (36). Atendendo a que os oligodendrócitos dispõem de níveis reduzidos de glutathione (GSH) (36), prevê-se que, em conjunto com o ambiente de stress oxidativo, tais

elevadas concentrações intracelulares do ião possam estar por detrás de um novo tipo de morte celular designado ferroptose. A estimulação deste fenómeno poderá estar então diretamente associada à neurodegeneração secundária à perda de oligodendrócitos (34).

5. Doenças Neurodegenerativas (DN)

As Doenças Neurodegenerativas compreendem um espectro amplo de patologias fundamentalmente pautadas por fenómenos de perda neuronal, sináptica e axonal progressiva (33). Em termos de apresentação clínica, tendem a envolver um quadro neurológico de demência associada a um intenso declínio das capacidades cognitivas globais (linguagem, resolução de problemas e memória) e/ou défices motores (33).

Atendendo a que a prevalência das DN tende a incrementar com a idade, nas sociedades envelhecidas dos países desenvolvidos, a carga global da doença (CGD) é cada vez mais significativa (1) O envelhecimento apresenta-se, pois, como um reconhecido fator de risco, sobretudo em doenças associadas a uma larga proporção de casos esporádicos de doença, como na DA e na ELA (33).

DN comuns como a DA, DH, DP e ELA partilham muitos fatores de risco ambientais, como a exposição química, sendo expectável algum grau de sobreposição entre as várias doenças (37). A recente investigação tem-se focado no estudo dos mecanismos e interações entre as várias, não só no que concerne a possíveis fatores de risco individuais (herança genética vs. ambiente), mas também potenciais assinaturas genéticas, vias e circuitos envolvidos que fundamentem a existência de vias moleculares partilhadas na neurodegeneração (37).

Uma das meta-análises mais robustas centradas no estudo de assinaturas genéticas entre doenças neurodegenerativas reuniu 1270 biópsias cerebrais *post mortem*, a partir de 13 coortes de doentes com DA, DH, DP e ELA, em diferentes regiões anatómicas. As coortes de descoberta incluíram 10 coortes de doentes contendo 285 amostras, ao passo que as coortes de validação compreenderam 3 coortes de doentes com 985 amostras a partir de doentes com DA e DH. As coortes foram selecionadas através do repositório de armazenamento de dados de expressão génica, *ArrayExpress Archive of Functional Genomics Data*, a partir de uma pesquisa dirigida para estas DN. A respetiva análise permitiu identificar uma assinatura transcricional partilhada de 243 genes (38). A metodologia transcriptómica utilizada na referida meta-análise foi posteriormente validada num outro conjunto de 205 amostras, tendo sido identificados 322 genes conservados entre várias combinações de três das DN supracitadas (ver Figura 4) (37). A assinatura genética partilhada reuniu, de forma consistente, genes associados a défices bioenergéticos, ativação microglial e gliose. Muitos destes vinculam-se e sobrepõem-se às principais vias de

doença descritas na literatura para as DN, envolvendo processos de inflamação, transmissão sináptica alterada, disfunção mitocondrial e stress oxidativo (37).

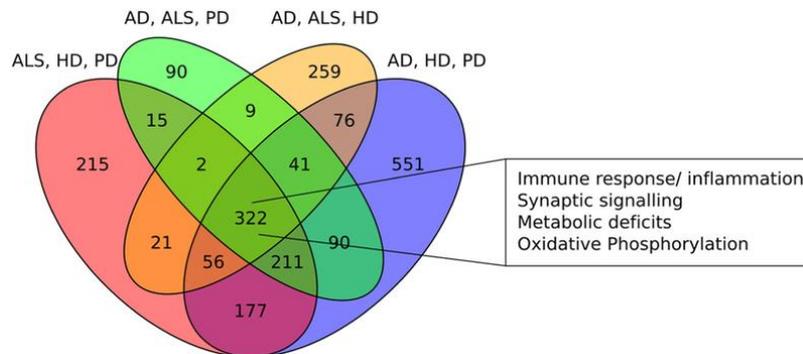


Figura 4 | Sobreposição de genes diferencialmente expressos em doenças neurodegenerativas. A análise de quatro meta-análises permitiu identificar 322 genes conservados entre todas as combinações possíveis de três das seguintes doenças neurodegenerativas Doença de Alzheimer, Doença de Huntington, Doença de Parkinson e Esclerose Lateral Amiotrófica. Os respectivos mecanismos de doença associados incluem fenômenos de inflamação, disfunção da sinalização sináptica, défices metabólicos e alterações no processo de fosforilação oxidativa. Imagem originalmente publicada em *Arneson et al* (37). Para mais informação, consultar texto principal e nota de rodapé ¹.

5.1 Neuroinflamação

Uma das potenciais formas de lesão do tecido cerebral, para além de uma possível lesão mecânica ou de uma infeção por agentes patogénicos capazes de atravessar a BHE, baseia-se na própria atividade do sistema imunitário do indivíduo (39,40). A inflamação sistémica é reconhecida como um importante promotor da disrupção dos circuitos neurais, envolvendo défices energéticos e stress oxidativo que, em simultâneo, reduzem a conectividade do SNC. Efetivamente, este fenómeno neuroinflamatório induz alterações idênticas aos achados característicos do envelhecimento, como diminuição da expressão de genes relacionados com plasticidade sináptica e expressão aumentada de genes associados a stress, e de DN, num ambiente de stress oxidativo e dano mitocondrial (39,40).

É através de um controlo fino dos fenómenos de tolerância a agentes patogénicos, manutenção de um meio extracelular anti-inflamatório e da resolução da neuroinflamação que a defesa dos tecidos se estabelece, num diálogo coordenado

¹ AD, Alzheimer's disease; PD, Parkinson's disease; ALS, Amyotrophic lateral sclerosis; HD, Huntington's disease.

entre astrócitos, microglia e neurónios (39). Estes mecanismos que previnem a lesão irreversível do tecido cerebral em resposta, por exemplo, à erradicação completa de alguns destes agentes infecciosos, podem, no limite, levar à ativação aberrante do sistema imunitário (39). Esta tende então a associar-se a um desequilíbrio homeostático da inflamação sistémica, a qual poderá estar na base da neurodegeneração (39).

A componente neuroinflamatória é considerada no fenómeno neurodegenerativo, onde as respostas imunitárias inata, como primeira linha de defesa contra PAMPs (LPS, ácidos nucleicos virais e bacterianos) e DAMPs (ATP, NO, proteína de ligação ao cálcio S100 β – presente em neurónios e astrócitos em degeneração -, ácidos gordos ou alarminas, como a HMGB1), e adaptativa, através das populações de linfócitos B e T, desempenham um papel crucial (ver Figura 5) (5).

Evidência robusta aponta que, na presença de moléculas associadas a lesão (DAMs) ou infeção, uma das primeiras linhas de defesa passa então pela ativação de recetores de reconhecimento de padrões (PRRs) nas células da microglia, como *Toll-like receptors* (TLRs) e recetores da lectina tipo C (CLRs), à superfície da membrana, ou componentes do inflamassoma como NOD-like receptors (NLRs) e *RING 1-like receptors*, localizados no citoplasma. Estes reconhecem PAMPs e DAMPs, desencadeando a ativação de vias de sinalização a jusante que resultam na produção de citocinas pró-inflamatórias (41). A microglia ativada consegue também induzir diretamente a morte neuronal, através da secreção de fatores neurotóxicos e ativação das vias da cicloxigenase/prostaglandina E2 (COX/PEG2) (42).

No âmbito do sistema de imunidade inata, a microglia e macrófagos periféricos podem secretar mediadores inflamatórios (caspase-1, IL-1 β ou IL-18) em microvesículas (MV) que, em paralelo com indutores inflamatórios extravésiculares (como ATP dos astrócitos), se revelam suficientes para induzir neurotoxicidade (39). Estas MV são então encaradas como potenciais biomarcadores para estados de neuroinflamação, representando um elo de comunicação entre esta última e a neurodegeneração (39).

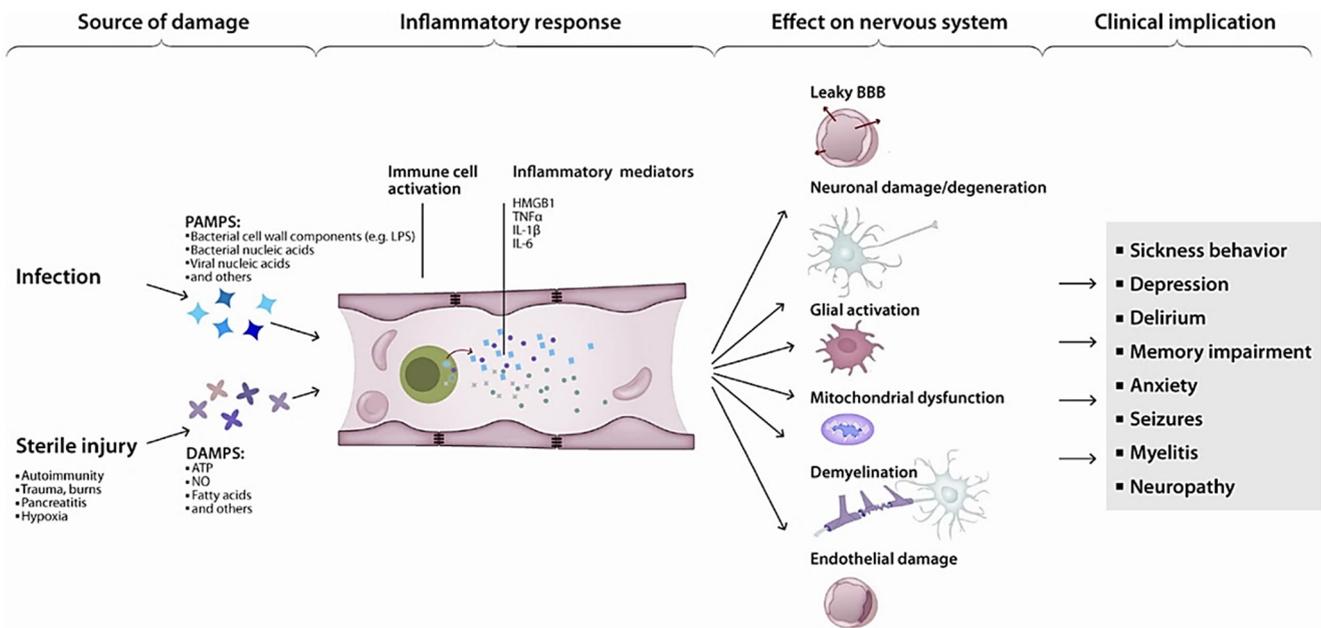


Figura 5 | Modelo simplificado da neuroinflamação como componente da neurodegeneração. A libertação intensa de antígenos derivados de agentes patogênicos ou resultantes de lesão desencadeia inflamação sistêmica, com recrutamento de células imunitárias periféricas (monócitos) e centrais (microglia). Estas aumentam a produção e libertação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, induzindo disfunção neuronal. O padrão de inflamação é heterogêneo (local e transiente vs. difuso e persistente). Imagem originalmente publicada em Sankowski *et al* (39). Para mais informação, consultar texto principal e nota de rodapé ¹.

O reconhecimento de PAMPs e DAMPs pelos PRRs despoleta, em particular, a formação de um complexo proteico multimérico, denominado inflamassoma (8). Este é constituído por um PRR (TLRs, CLRs ou NLRs), pela proteína *speck-like* associada à apoptose (ASC) contendo um domínio recrutador de caspase e pela pro-caspase-1. A oligomerização do inflamassoma resulta na autoclivagem da pro-caspase-1, gerando a sua forma ativada, caspase-1, fundamental para a maturação da IL-1 β e IL-18 (8). Existem diversos inflamassomas do SNC implicados na progressão das DN como o NLRP1 e o NLRP2, sendo que um dos mais estudados, e fulcral na deteção de potenciais sinais de perigo, constitui o NLRP3 (do inglês, *nucleotide-binding oligomerization domain, leucine-rich repeat, and pyrin domain-containing 3*). Estes complexos encontram-se principalmente envolvidos na resposta de imunidade inata,

¹ ATP, Adenosine triphosphate; BBB, blood-brain barrier; DAMPs, Damage-associated molecular patterns; HMGB1, High Mobility Group Box 1 protein; IL, Interleukin; LPS, Lipopolysaccharide; NO, Nitric oxide; PAMPs, Pathogen-associated molecular patterns; TNF α , Tumour necrosis factor alpha.

favorecendo a ocorrência da lesão associada à neuroinflamação, ao mediar a secreção de citocinas pró-inflamatórias que perpetuam os eventos inflamatórios (8).

5.1.1 Ativação do Sistema de Imunidade Inata no Sistema Nervoso Central (SNC)

Em indivíduos de idade mais avançada, a ativação do sistema imunitário periférico tende a desencadear uma resposta inflamatória mais acentuada no SNC (central), comparativamente com populações mais jovens (26,43). Na base de tal fenómeno crê-se estar a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias pela microglia que se ligam a recetores presentes em regiões cerebrais específicas como o hipocampo, associando-se a potenciais défices comportamentais, tais como anorexia, hipersónia, letargia, défices cognitivos e motores, num contexto de neurotoxicidade (26,43).

Postula-se então que o envelhecimento possa por si só constituir um estímulo de pré-ativação (*priming*) para a microglia que, por sua vez, é cumulativo com a estimulação secundária a um estímulo primário, originando assim uma resposta de maior magnitude (43). Nos mais velhos, considera-se que esta reorganização de prioridades do organismo se materialize num fenómeno não adaptativo, agravando e prolongando a duração do chamado “*sickness behavior syndrome*”. Nesta sequência, atente-se que a infeção constitui um reconhecido fator de risco para demência em doentes com DA (43).

O SNC é então responsável pela deteção, processamento e coordenação dos sinais periféricos, integrando-os de forma a garantir a homeostasia durante a infeção (26,43). Contudo, considerando que se trata de um local imunoprivilegiado, em virtude da existência da BHE, foram já descritos quatro mecanismos redundantes através dos quais o sistema imunitário comunica com este (ver Figura 6) (43).

A via neural envolve a comunicação célere de citocinas produzidas periféricamente até aos nervos aferentes primários, como os vagais no tecido hepático, promovendo de seguida uma resposta central. Por seu turno, as citocinas podem ainda atravessar a BHE por difusão, nas regiões descontínuas (*leaky*), incluindo os órgãos circumventriculares. A terceira envolve o transporte de citocinas periféricas mediado por transportadores integrais na BHE, num processo dependente de energia e de cinética saturável (43).

A última via descreve as células endoteliais que constituem a BHE, julgando-se que as citocinas em circulação tenham a capacidade de ligação a recetores endoteliais, com promoção da secreção de mediadores inflamatórios (incluindo NO, prostaglandinas, IL-1 β , IL-1 e IL-6) diretamente para a região cerebral (43).

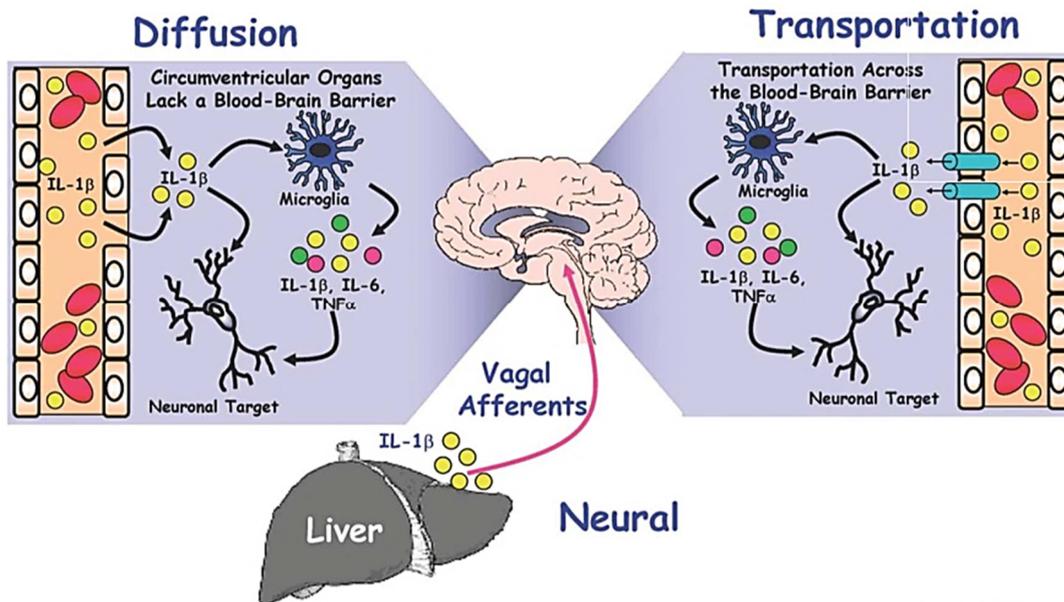


Figura 6 | Vias paralelas de comunicação entre o sistema imunitário periférico e parênquima cerebral. Descrevem-se quatro vias redundantes de comunicação entre sistema nervoso central e os componentes do sistema imunitário periférico, nomeadamente a via neural, a via da difusão, transporte ativo através de transportadores integrais da barreira hematoencefálica e, por último, uma via que envolve as células endoteliais constituintes da barreira hematoencefálica. Imagem originalmente publicada em *Dilger e Johnson* (43). Para mais informação, consultar texto principal e nota de rodapé ¹.

5.1.2 Diálogo entre Células Microgliais e Astrócitos

Os astrócitos distribuem-se por diversas áreas do SNC, incluindo encéfalo e medula espinhal, permitindo a conexão, através de junções de hiato, de múltiplos circuitos neurais. É também por intermédio dos seus longos processos que estes estabelecem a comunicação com a vasculatura sanguínea (44). A microglia, enquanto células extremamente dinâmicas e sensíveis ao ambiente cerebral, constitui o primeiro tipo celular a facultar a resposta mais imediata a qualquer estímulo pró-inflamatório (7,45). Aquando da sua resolução, estimula a produção de IL-10 pelos astrócitos, contrariando o ambiente de inflamação. Esta citocina promove a produção da molécula protetora Fator de crescimento transformador-beta (TGF- β) que restringe

¹ IL-1 β , Interleukin 1 β ; IL-6, Interleukin 6; TNF α , Tumour necrosis factor alpha.

igualmente o fenómeno inflamatório e estimula o fenótipo microglial não inflamatório, em paralelo (7).

Em parte, o diálogo entre astrócitos e microglia é então essencialmente travado por meio da secreção de mediadores, incluindo fatores de crescimento, neurotransmissores e gliotransmissores, citocinas, quimiocinas, mediadores da imunidade inata, DAMPs, fatores mitogénicos, NO, ROS e mediadores metabólicos, como o glutamato (44). Num cenário de inflamação crónica, ocorre, pois, o fenómeno de microgliose, ocorrendo um aumento do número de células da microglia com fenótipo ativado e libertação subsequente de moléculas pró-inflamatórias, tais como a proteína componente do complemento 1q (C1q), TNF- α , e IL-1 β no SNC (44). Estas, por seu lado, irão ser detetadas por astrócitos, sucedendo-se a astrogliose, em que o número crescente de astrócitos reativos implica a produção de estímulos pró-inflamatórios, numa ansa de *feedback* positivo. Curiosamente, este fenótipo astrocitário encontra-se ubiquamente distribuído no tecido do SNC nas DN (7).

Um das moléculas pró-inflamatórias produzidas por estas células da glia, dotada de efeitos marcadamente mais deletérios, é o TNF- α , que estimula fenómenos de desmielinização (comprometendo a função dos oligodendrócitos) e aumenta a produção de recetores AMPA, acabando por potenciar uma atividade neural extrema (7). Em adição, a prostaglandina D₂, produzida pela microglia ativada, ativa os respetivos recetores DP1 e DP2 na membrana astrocitária, impelindo a conversão para o fenótipo pró-inflamatório, aumento da expressão de GFAP e libertação de fatores quimioatrativos (7). Adicionalmente, a produção de ROS e NO por astrócitos que integram a BHE, estimula fenómenos de vasodilatação. Em resposta à produção astrocitária de NO, ocorre ainda a produção aumentada de IL-1 β pela microglia que irá reforçar o fenótipo pró-inflamatório dos astrócitos (ver Figura 7) (7).

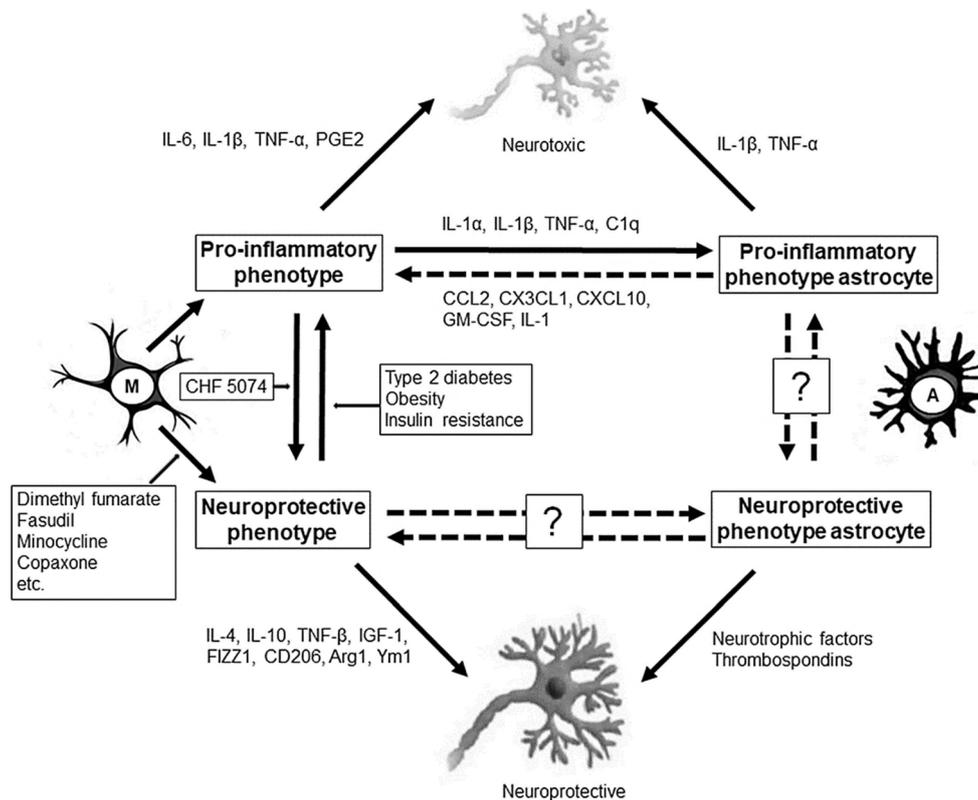


Figura 7 | Visão esquemática sobre a ativação microglial, ativação de astrócitos e relação entre ambas. Os fenótipos pró-inflamatórios são neurotóxicos, contrastando com os fenótipos neuroprotetores. A microglia pró-inflamatória secreta mediadores pró-inflamatórios que induzem a aquisição de um fenótipo pró-inflamatório nos astrócitos. Os astrócitos pró-inflamatórios secretam, por sua vez, um outro conjunto de mediadores inflamatórios, como a interleucina-1, que potencializam o fenômeno de polarização microglial. O fenótipo de transição dos astrócitos permanece por elucidar. As setas a tracejado traduzem relações possíveis, não existindo ainda evidência suficiente para se reconhecer em conclusivo uma relação direta. Imagem originalmente publicada em *Kwon e Koh* (41). Para mais informação, consultar texto principal e nota de rodapé ¹.

As células da glia regulam entre si as funções de migração e as suas respostas inflamatórias, num notável diálogo bidirecional que é particularmente relevante em DN, dado que condiciona o espectro de fenótipos moleculares e funcionais assumidos por cada tipo celular durante a doença (44). Os fenômenos descritos de estados de inflamação extrema concorrem, por conseguinte, para os processos de astrogliose e microgliose, cuja sobre-regulação de citocinas pró-inflamatórias e de ROS cria um ambiente altamente neurotóxico, potenciando a perda sináptica e morte neuronal (44). Estes apresentam igualmente consequências nefastas ao nível das células endoteliais

¹ M, *Steady-state Microglia*; A, *Astrocytes*; Arg1, *Arginase1*; CCL, *C-C-motif chemokine ligand*; CD, *Cluster of differentiation*; CXCL, *C-X-C motif chemokine ligand*; FIZZ1, *Found in Inflammatory Zone 1 Protein*; GM-CSF, *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*; IFN-γ, *Interferon γ*; IGF-1, *Insulin-like Growth Factor-1 IL, Interleukin*; LPS, *Lipopolysaccharide*; NO, *Nitric oxide*; STAT, *Signal transducers and activators of transcription*; TNF, *Tumour necrosis factor*; Ym1, *Chitinase 3-like 3*.

da BHE, ao promoverem a subexpressão de junções aderentes e a sobreexpressão de moléculas específicas da superfície celular (como a VCAM-1 - *Vascular cell adhesion protein 1*, ALCAM - *Activated leukocyte cell adhesion molecule*), permitindo a infiltração de células da resposta imunitária adaptativa, como linfócitos T ativados (7).

As células endoteliais secretam também quimiocinas como a CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL19/CCL21 e MCP-1 (Proteína cofator de membrana ou CD46) que atuam como potentes quimioatratadores de células T CD4⁺ através da BHE, em DN (7). Esta infiltração de células inflamatórias T autorreativas no parênquima do SNC resulta na produção intensa de citocinas inflamatórias que irão estimular direta e indiretamente as células da microglia e macrófagos infiltrados, acabando por disseminar e perpetuar os processos neuroinflamatórios envolvidos nas DN (7).

Os astrócitos, microglia e os próprios neurónios, parecem comunicar igualmente através da libertação e reconhecimento de vesículas extracelulares que viajam longas distâncias, contendo biomoléculas, como RNA mensageiro (mRNA) e miRNA, capazes de modular a expressão genética das células (44). Estas vesículas poderão participar no processo de patogénese das DN, ao transportarem agregados tóxicos de proteínas, como a Tau e a A β (44). A sinalização purinérgica através dos recetores metabotrópicos P2Y, expressos em astrócitos e microglia, é identicamente considerada crítica para a comunicação intercelular durante a neuroinflamação, associando-se a correntes contínuas de cálcio intracelular (44).

5.2 Intervenção das Células Gliais no Início e Progressão das DN

Na maioria das DN, não é possível identificar uma causa única por detrás da doença, sendo que a hipótese de causalidade mais provável tem que ver com uma complexa dinâmica de múltiplos fenómenos de *feedback* que tendem a perpetuar a disfunção ou a própria tentativa de reparação celular (4). Deste modo, a terminologia geralmente utilizada no contexto de células da glia “reativas” ou ativadas” é apontada como algo imprecisa, implicando, em algum grau, que o estado celular desencadeado resulte de uma qualquer alteração causal em específico (4).

Contudo, os recentes avanços tecnológicos no campo da transcriptómica e da análise genómica de grande escala têm possibilitado compreender a contribuição relativa de cada tipo celular no processo de doença (4). O recente desenvolvimento

de linhagens específicas de células gliais CRE, nomeadamente através da criação de linhagens de ratinhos transgênicos para a expressão específica em astrócitos da recombinase Cre (46). A manipulação das funções dos genes e da atividade astrocitária é então executada com recurso ao sistema Cre-LoxP (46).

Múltiplas linhagens de ratinhos transgênicos CreER^{T2} específicas de astrócitos, como Gfap (hGfap)-CreER^{T2}, transportador de glutamato-aspartato (*Glast*)-CreERT², conexina-30 (*Cx30*)-CreER^{T2}, recetor do fator de crescimento de fibroblastos 3 (*Fgfr3*)-iCreER^T e o membro da família L1 da aldeído desidrogenase 1 (*Aldh1L1*)-CreER^{T2} são utilizadas para elucidação do papel dos astrócitos *in vivo* em estudos funcionais (46).

Hu et al. (2019) desenvolveram uma nova linhagem de ratinho *knock-in* (com tecnologia CRISPR-Cas9) para *Aldh1L1*-CreER^{T2} específica de astrócitos, comparando o padrão de expressão relativamente às de outras linhas transgênicas amplamente utilizadas (46). A *Aldh1L1* é primariamente expressa por astrócitos e pelas células ependimárias ventriculares, constituindo um marcador de expressão mais ampla que o tradicional marcador GFAP. O facto de este ainda não ter sido detetado em oligodendrócitos, OPCs ou neurónios, à luz de dados transcriptómicos, sugere que tal possa ser um *locus* genético especialmente útil, em virtude da elevada precisão espaciotemporal associada à sua expressão controlada em astrócitos (46).

O estabelecimento de protocolos avançados de isolamento de determinadas populações celulares, protocolos de desenvolvimento de células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs) da glia, desenvolvimento de organoides corticais ou esferoides como modelos experimentais de doença no SNC humano em muito têm também permitido explorar detalhadamente o papel da glia na neurodegeneração (4). De facto, uma das premissas que mais tem permeado os estudos realizados nesta área baseia-se na integração dos dados relativos à interação glia-glia e entre as diferentes subpopulações gliais, tanto num contexto de saúde, como de doença no SNC (4).

5.3 Doença de Alzheimer (DA)

A Doença de Alzheimer (DA), enquanto forma mais prevalente de demência a nível mundial, constitui uma doença neurodegenerativa progressiva caracterizada pela deposição aberrante de placas de β -amiloide (β A), emaranhados neurofibrilares intracelulares (NFTs) com proteína tau hiperfosforilada e células gliais ativadas em

torno das placas senis (5,47). A sintomatologia clínica predominante engloba declínio progressivo da memória, função executiva alterada e perda de faculdades sociais (48). Consideram-se dois subtipos: DA Familiar (fAD), de início mais precoce (idade inferior a 65 anos), e DA Esporádica (sAD), com um início tipicamente mais tardio, afetando indivíduos com idade superior a 65 anos (49). A primeira associa-se a menos de 5% dos casos de DA e é causada por uma ou mais mutações autossômicas dominantes nos genes codificantes para a proteína precursora da amiloide (PPA) e presenilina-1 ou 2 (PSEN1 ou PSEN2) (49).

Os depósitos de β A e os NFTs com tau hiperfosforilada derivam primariamente de neurónios, sendo que os genes associados ao desenvolvimento em idade tardia de DA, incluindo a apolipoproteína E (APOE), apolipoproteína J (APOJ) e SORL (do inglês, *sortilin-related-receptor-1*) são expressos fundamentalmente pelas células gliais (5).

A placa de β -amiloide é produzida na sequência da clivagem da PPA, primeiramente pela secretase- γ e de seguida pela BACE1 (em inglês, *β -site APP Cleaving Enzyme 1*). As formas oligoméricas e fibrilares dos agregados de β A constituem DAMPs que ativam o inflamassoma NLRP3 na microglia e nos astrócitos que, por ativação da caspase 1, aumenta a libertação da isoforma processada da IL-1 β , no contexto da via de sinalização canónica (7). Para além do fenómeno de inflamação sistémica, o próprio envelhecimento favorece um estado inflamatório no SNC, associando-se à alteração do perfil de expressão genética dos astrócitos para um fenótipo pró-inflamatório e senescente com produção diminuída da citocina com efeito neuroprotetor e anti-inflamatório, IL-10 (7).

Pressupõe-se que a deposição de β A e de proteínas plasmáticas, como o fibrinogénio, possa estar, pois, na base do fenómeno de astrogliose, sendo que os astrócitos tendem a assumir um fenótipo hipertrófico nas fases mais tardias da doença, pautadas por perda sináptica e alteração da memória (7). Também a deposição de fibrinogénio e da fibrina, como o respetivo subproduto de clivagem, parece promover a ativação da microglia, despoletando uma cascata de neuroinflamação (4).

Curiosamente, nas fases mais precoces, julga-se que a microglia possa exercer um potencial efeito benéfico ao promover a fagocitose das placas de β A, através dos recetores CD36, do recetor de lipoproteínas de baixa densidade 1 (LRP1) e do recetor de “disparo” expresso nas células mielóides 2 (TREM2), necessitando da participação da apolipoproteína E (APOE) que, por sua vez, é produzida pelos astrócitos (7). O

compromisso da depuração da βA em virtude da descontinuidade da BHE tem emergido assim como hipótese central de patogênese associada à DA, num fenómeno com a participação ativa de múltiplos tipos gliais. A depuração deficiente da βA no SNC tem sido então associada à capacidade diminuída de captação dos astrócitos e da microglia, por produção diminuída de APOE em astrócitos (ver Figura 8) (4).

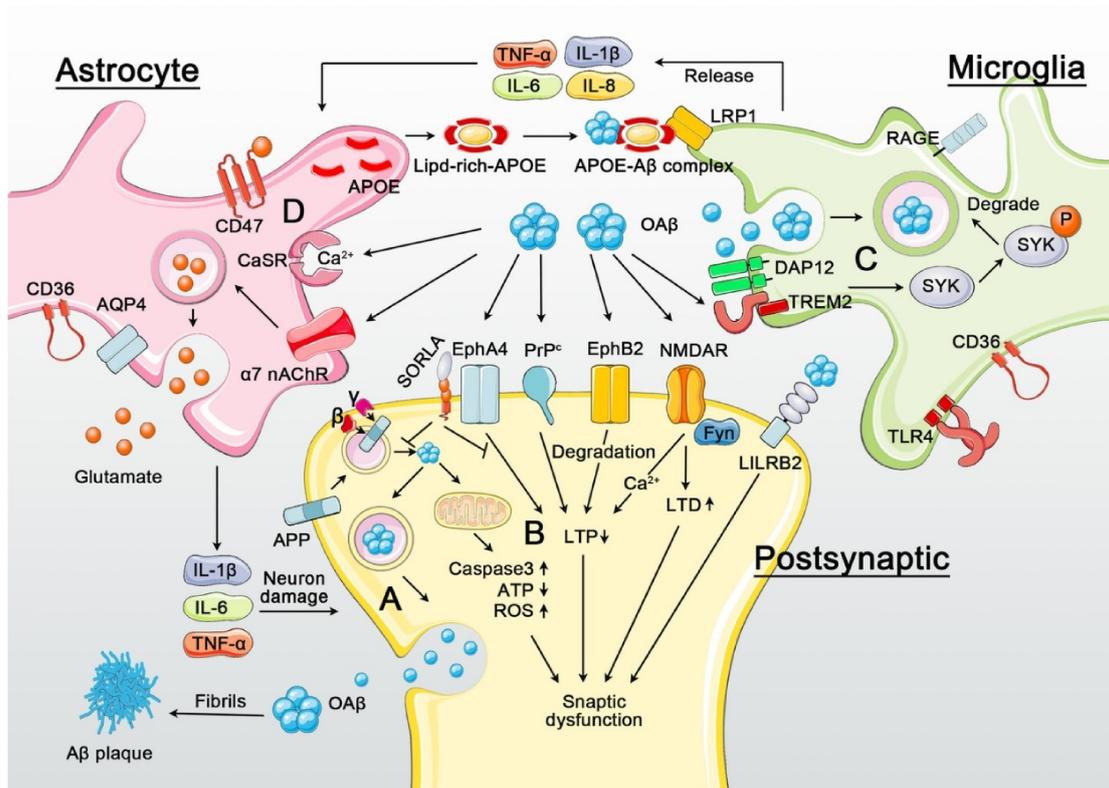


Figura 8 | Modelo de neurotoxicidade induzida pela beta-amiloide e resposta glial na Doença de Alzheimer. A) Processamento da proteína precursora da amiloide e formação da beta-amiloide (βA). B) Disfunção neuronal mediada pela βA . Disrupção da função sináptica através da perturbação da potenciação de longa duração e incremento da depressão de longa duração. C) Efeitos da βA na microglia. A βA é passível de ativar a microglia através da ligação a um conjunto de receptores putativos como o recetor de “disparo” expresso nas células mieloides 2 (TREM2), que irá desencadear a degradação da βA . D) Interação microglia/astrócito dependente da βA e disfunção astrocitária mediada pela βA . A apolipoproteína E (APOE) libertada pelos astrócitos liga-se à βA , promovendo a interação do complexo βA /APOE com o recetor de lipoproteínas de baixa densidade 1. A microglia ativada é responsável pela libertação de vários fatores pró-inflamatórios que seguidamente ativam astrócitos. Estes últimos podem ainda ser ativados pela βA através de receptores nicotínicos, despoletando o fenómeno de excitotoxicidade relacionada com o glutamato extracelular. Imagem originalmente publicada em *Guo et al* (48). Para mais informação, consultar texto principal e nota de rodapé ¹.

¹ AD, Alzheimer's disease; APOE, Apolipoprotein E; A β , β -Amyloid; APP, Amyloid precursor protein; LRP1, Low-density lipoprotein receptor-related protein 1; SorLA, Sortilin-Related Receptor Containing LDLR A Repeats; LTP, Long-term potentiation; LTD, Long-term depression; ROS, Reactive oxygen species; NMDAR, N-methyl-D-aspartic acid receptor; EphB2, Ephrin type-B receptor 2 B2, EphA4, Ephrin type-A receptor 4; PrPc, Cellular prion protein; LILRB2, Leukocyte immunoglobulin-like receptor B2; CDK5, Cyclin dependent kinase 5; GSK3 β , Glycogen synthase kinase 3 β ; PKA, Protein kinase A; TRAF6, TNF receptor-associated factor 6; PSD95, Postsynaptic density-95; TREM2, Triggering receptor expressed on myeloid cells-2; IL-1 β , Interleukin-1 β ; TNF α , Tumour necrosis factor- α ; LPS, Lipopolysaccharide; TLR, Toll-like receptor; RAGE, Advanced glycation end product receptor; nAChRs, Nicotinic acetylcholine receptor; $\alpha 7$ nAChRs, $\alpha 7$ subtype of nAChR; CaSR, Calcium-sensing amiloide; AQP4, Aquaporin-4; CX3CR1, Chemokine CX3C receptor1; BBB, Blood-brain barrier; oA β , oligomeric A β ; SV, Synaptic vesicle.

Um estudo recente dedicou-se à interação entre os diferentes alelos da APOE e a tauopatia, através modelos de ratinhos com alelos que modificam o risco para a DA (2, 3 e 4) e ainda de ratinhos *knockout* para a mesma. Estes últimos exibiram os níveis mais elevados de sobrevivência neuronal, contrastando com os de culturas gliais com o alelo APOE4 que revelaram os níveis mais significativos de morte neuronal. Estes dados estão em linha com a hipótese de neurotoxicidade associada à reatividade em astrócitos e perda da respetiva função protetora (4).

No caso de insuficiente depuração, o perfil de pró-inflamação tende então a persistir e a promover a conversão da microglia e astrócitos para um perfil aberrante, caracterizado sobretudo pela produção de iões superóxido, IL-1 β e TNF α (7). Este último favorece a fosforilação da proteína Tau, ativando a via de sinalização NF-kB que resulta na libertação crescente de iNOS (Sintase do Óxido Nítrico Indutível) e S100 β , definindo-se uma tauopatia (7).

Por seu lado, as citocinas produzidas, IL-6, TNF- α e IL-18, causam a morte das células progenitoras neurais, acelerando a neurodegeneração. Sucedem-se alterações metabólicas e a secreção aumentada de espécies ROS e NOS que estão implicadas na lesão sináptica e axonal, nitração da β A e apoptose neuronal que culminam em défice cognitivo (7). A microglia hipertrófica também é implicada na disfunção sináptica ao estimular cronicamente a limpeza sináptica por fagocitose (48).

Em particular, prevê-se que a proteína TREM2 possa influenciar em parte a aquisição do fenótipo de doença na microglia, sendo que uma variante associada à perda de função da TREM2, a R47H, mostrou diminuir a agregação da microglia em torno das placas de β A, tanto em doentes humanos, como em modelos animais (4).

Coletivamente, supõe-se que os genes codificantes para os dois mais comuns fatores de risco na DA, APOE e TREM2, possam afetar este fenómeno de reunião da microglia em redor das placas, num mecanismo de patogénese ainda não detalhadamente elucidado, mas, porventura, associado à proteção de neurónios na proximidade (4).

Por último, é atribuído também um papel fundamental às MV produzidas por macrófagos periféricos e células da microglia ativadas, crendo-se que estejam por detrás da produção de formas solúveis e altamente neurotóxicas de β A (39). Os astrócitos, integrados neste ciclo de *feedback* positivo de estimulação, são assim responsáveis pela disrupção da sinapse tripartida, desregulando o ambiente sináptico.

Existe evidência recente que assinala algum grau de disfunção da comunicação glutamatérgica entre neurónios e astrócitos associada à progressão da DA, sendo que a β A promove o aumento da libertação de glutamato a partir destas populações (5). O decréscimo do fluxo sanguíneo irá conjuntamente promover a alteração da unidade vascular neuronal, comprometendo o suprimento neuronal de oxigénio. De igual modo, os neurónios lesados e em morte celular libertam citocinas, miRNAs e corpos apoptóticos que irão perpetuar este ciclo vicioso de estimulação entre astrócitos e microglia (48).

Considerando que a idade constitui o fator de risco primário para o desenvolvimento da DA, o envolvimento da astrócitos e microglia em senescência tem sido igualmente debatido, reforçando a ideia de participação de múltiplas subpopulações gliais na sua patogénese (4). Num estudo recente, com um modelo de tauopatia neuronal em ratinho, verificou-se a acumulação destas células senescentes em específico durante a progressão da doença, desencadeando degeneração neuronal acentuada (4).

Um dos alvos terapêuticos que tem alcançado maior destaque nos últimos tempos é a proteína GSK3 β (Cinase da glicogénio sintase 3 β) que participa nos processos de migração da microglia e de neurotoxicidade induzida pela inflamação associada aos astrócitos (7). O foco de interesse reside no desenvolvimento de inibidores da GSK3 β , como a molécula NP12, ou *tideglusib*, que revelou eficácia na diminuição da deposição de A β e da patologia Tau em modelos animais de DA, mas, ainda assim, um limitado efeito neuroprotetor em ensaios clínicos (7).

5.4 Doença de Huntington (DH)

A Doença de Huntington (DH) apresenta-se como uma patologia neurodegenerativa pautada pela perda progressiva de determinadas populações neuronais no circuito corticoestriado e disfunção glial (5,50). Uma multiplicidade de sintomas tem sido identificada no âmbito da DH, incluindo disfunção motora, sob a forma de movimentos coreicos, défices cognitivos, alterações do humor e perturbações psiquiátricas (24).

Em contraste com as demais DN sob revisão na presente monografia, o envolvimento de células gliais na DH não tem sido amplamente associado aos

fenómenos clássicos de reatividade em astrócitos (4). Na verdade, a sobreexpressão combinada em astrócitos e neurónios de huntingtina mutada (mHTT) parece recapitular algumas das características do fenótipo de doença. A diminuída expressão astrocitária de transportadores de glutamato (EAAT2/GLT1) e de canais de potássio Kir4.1, num fenómeno mediado pela mHTT, pode efetivamente estar por detrás da alteração da excitabilidade neuronal (4). A diminuição em astrócitos da captação de glutamato extracelular e da depuração de K⁺, nas regiões do estriado e do córtex cerebral, parecem deste modo contribuir para a fisiopatologia da DH (5).

Inclusivamente, num estudo em que se procedeu à deleção seletiva desta proteína em astrócitos de ratinhos com DH, registou-se a recuperação do fenótipo comportamental, sugerindo um provável impacto destas células na patogénese associado à hiperexcitabilidade neuronal, ao nível do estriado (4).

Mais recentemente, Garcia et al. (2019) recorreram a astrócitos fisiologicamente maduros, derivados de iPSCs de doentes com DH, para demonstração das consequências da disfunção em astrócitos (51). Reportou-se, nomeadamente em co-cultura com neurónios (também eles derivados de iPSCs), um menor suporte metabólico por parte destes astrócitos, essencial para a maturação neuronal, e ainda uma menor proteção contra a estimulação crónica pelo glutamato. Os autores relevam a importância destes achados na elucidação da suscetibilidade à doença e identificação de potenciais alvos terapêuticos em astrócitos (51).

A evidência relativa à participação de outras células gliais na DH ainda é escassa, sendo que a microglia em doentes com DH e em modelos de ratinho pareceu estar fundamentalmente associada à expressão exacerbada de fatores pró-inflamatórios. Esta tende então a adquirir uma morfologia mais amebóide, num mecanismo de modulação da patogénese da doença, com perpetuação de um estado inflamatório crónico (ver Figura 9) (4,52).

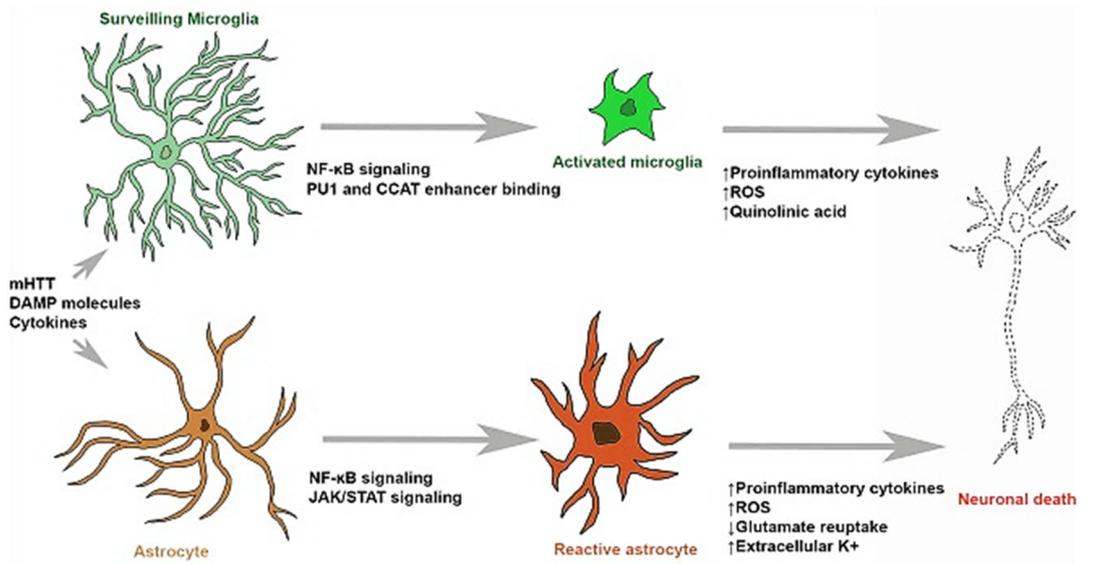


Figura 9 | Fenômeno de morte neuronal mediado pela microglia e astrócitos na Doença de Huntington. A microglia no estado de vigilância é ativada por moléculas, como a huntingtina mutada e outros padrões moleculares associados a sinais de alarme, essencialmente através da via de sinalização do fator de transcrição nuclear κB . De seguida, as células da microglia ativadas e astrócitos reativos produzem ROS e fatores neurotóxicos (como o ácido quinolínico) que induzem processos moleculares relacionados com a morte neuronal. Ocorre igualmente indução de astrogliose reativa que desencadeia a sobreexpressão de citocinas pró-inflamatórias, excitotoxicidade por glutamato e hiperexcitabilidade neuronal. Imagem originalmente publicada em *Palpagama et al* (24). Para mais informação, consultar texto principal e nota de rodapé ¹.

5.5 Doença de Parkinson (DP)

A Doença de Parkinson figura como a segunda DN mais comum, apresentando uma sintomatologia clínica típica que inclui bradicinesia, tremor em repouso, rigidez e instabilidade postural (53). De todos os casos com diagnóstico confirmado de DP, cerca de 15% apresentam um historial familiar, encontrando-se maioritariamente associados a mutações nos genes codificantes para a cinase rica em repetições de leucina 2 (LRRK2) e parkina (PARK) (53).

À semelhança da DA, a DP constitui um proteinopatia, caracterizada sobretudo pela acumulação e agregação de α-sinucleína “mal dobrada”, sendo um dos genes de expressão alterada e patológica mais prevalentes na DP familiar (7). As formas oxidadas e nitradas agregam-se e formam os corpos de Lewy, o achado neuropatológico privilegiado para diagnóstico da doença. A acumulação de α-

¹ DAMP, Damage-associated molecular pattern; HD, Huntington's disease; JAK/STAT, Janus kinase/signal transducers and activators of transcription signalling pathway; NF-κB, Nuclear Factor kappa light-chain-enhancer of activated B cells; ROS, Reactive oxygen species.

sinucleína nestas estruturas está por detrás da perda de neurónios dopaminérgicos, predominantemente ao nível da *substantia nigra pars compacta* (SNpc) no mesencéfalo (7).

Os oligómeros de α -sinucleína extracelulares atuam como DAMPs, ativando recetores na superfície da microglia, incluindo o TLR2, associado à resposta clássica de imunidade inata (54). O stress oxidativo induzido pela microglia é perspetivado então como o elo de ligação entre a alteração patológica associada à α -sinucleína e a componente de neuroinflamação. A libertação destes agregados de α -sinucleína, após morte neuronal, parece induzir, mais especificamente, a ativação da microglia (fenótipo pró-inflamatório), por intermédio do heterodímero TLR1/2, através da via dependente da proteína de resposta primária de diferenciação mielóide 88 (MyD88), que conduz à ativação a jusante de vias de sinalização intracelulares como a das MAPKs e à translocação nuclear de NF- κ B, p38 e JNK (Cinase do terminal amínico da proteína c-Jun) (7).

Estes agregados são também capazes de estabelecer ligação com o recetor Fc γ RIIB (do inglês, *Fc gamma receptor IIB* ou CD32), diminuindo a fagocitose microglial, o que comprometerá a depuração destas mesmas espécies e dos detritos do parênquima (54). Ocorre assim a produção e libertação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6) que vão ativar a COX-2, iNOS e a NADPH oxidase. Desta forma, são produzidas espécies reativas, como ROS, NO, espécies reativas de azoto (RNS), induzindo-se a reatividade astrocitária (7).

Nesta sequência, ocorre igualmente a ativação do inflamassoma NLRP3, que promove, por seu turno, a libertação de IL-1 β (46). Atente-se, ainda, a um estudo recente de Liddel et al. (2017) que evidencia a capacidade de indução do fenótipo A1 neurotóxico em astrócitos por parte da microglia ativada, através da secreção de IL-1 α , TNF- α e C1q (ver Figura 10) (54).

A maioria das estratégias terapêuticas em estudo centram-se, por conseguinte, na modulação da resposta inflamatória por parte da microglia. Alguns exemplos constituem os inibidores de TLRs, como candesartan, cilexetil e rifampicina, e inibidores da via de sinalização JAK/STAK, como a α -asarona (7). Num ensaio clínico aleatorizado com dupla ocultação, um fármaco da classe das tetraciclina, a minociclina, revelou potencial no alívio de alguns sinais clínicos nas fases mais precoces da DP (7). Num modelo animal de MPTP, este antibiótico apresentou-se

também eficaz na prevenção da neurodegeneração, inibindo seletivamente a polarização da microglia no sentido do fenótipo pró-inflamatório (7).

Em paralelo, um dos achados mais prevalentes em biópsias cerebrais *post mortem* de doentes com PD passa pelo aumento do número de células da glia, nomeadamente de astrócitos distróficos contendo acumulações de α -sinucleína patológica (7). Julga-se que os astrócitos sejam capazes de acumular a α -sinucleína libertada pelos neurónios, formando corpos de inclusão. Em cultura, estes astrócitos são então responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1, IL-6 e TNF- α , e de quimiocinas, como a CXCL1. Neste contexto de neuroinflamação e astrogliose reativa, ocorre disrupção da função astrocitária, nomeadamente da captação de glutamato e manutenção da regulação da BHE, em articulação com fenómenos de ativação microglial no mesencéfalo, tronco cerebral e medula espinhal, que, em conjunto, contribuem para a perda de neurónios dopaminérgicos e motores (54–56).

A evidência em torno de um putativo papel causal dos astrócitos na patogénese da DP em humanos é, todavia, ainda parca, assumindo-se que diferentes estados conformacionais de α -sinucleína possam afetar seletivamente astrócitos e neurónios, resultando em sintomatologias e cursos de doença respetivamente distintos (4). Curiosamente, num estudo experimental de Domenico et al. (2019), com recurso à co-cultura de astrócitos e neurónios derivados de iPSCs de doentes com DP familiar associada à mutação LRRK2, sugere-se um possível papel dos astrócitos na amplificação da patologia, por acumulação e transmissão da α -sinucleína aos neurónios dopaminérgicos vizinhos, na SNpc (57). Os neurónios em cultura originados a partir de indivíduos saudáveis revelaram-se mais suscetíveis à morte celular, assim que contactaram com astrócitos derivados de doentes com DP (57). Tais resultados permitiram postular que a disfunção astrocitária e o contacto direto com neurónios poderá revelar-se essencial na disseminação da α -sinucleína, no contexto de progressão da DP (5).

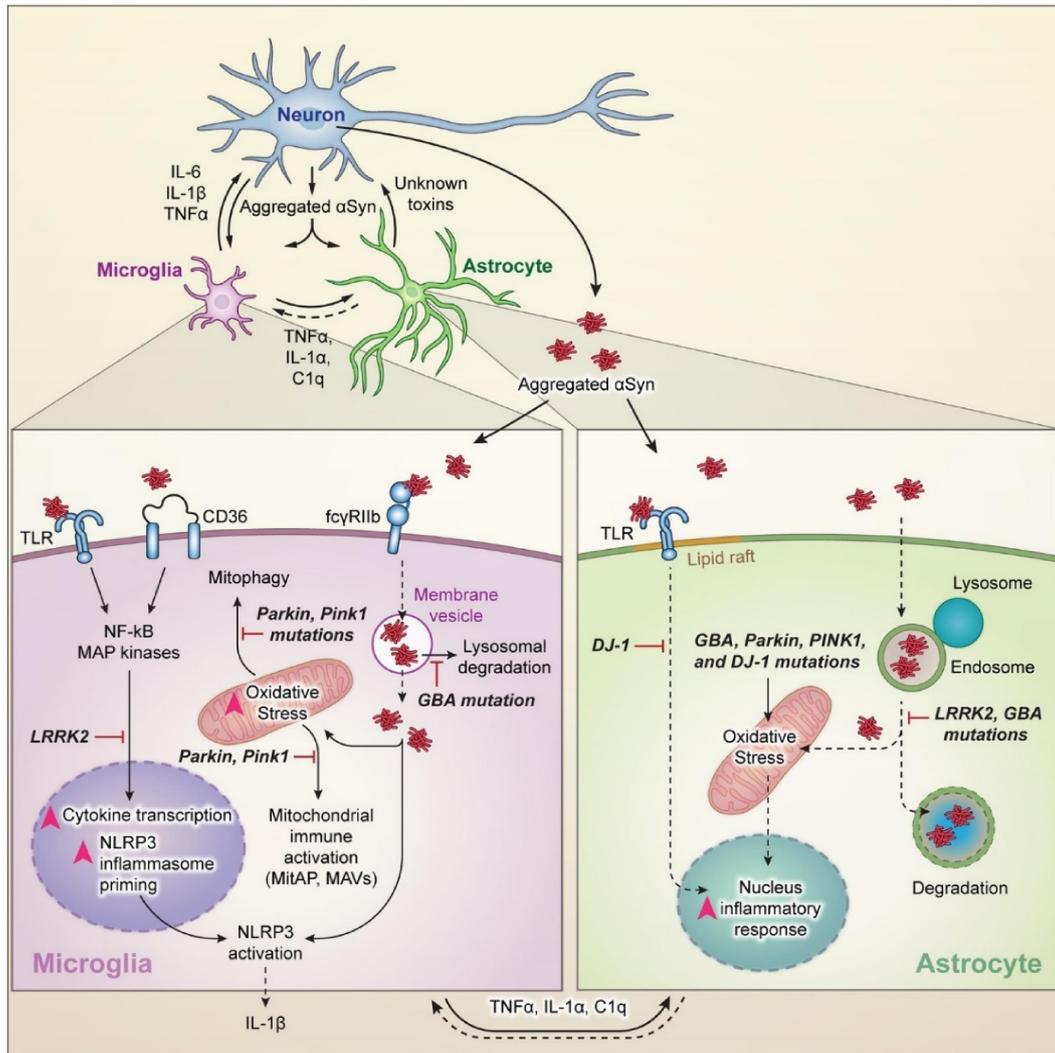


Figura 10 | Neuroinflamação na Doença de Parkinson. A libertação neuronal de α -sinucleína patológica permite ativar células da microglia e astrócitos, desencadeando a neurodegeneração dopaminérgica típica da DP. Mutações nos genes que codificam para a parkina contribuem para um ambiente de stress oxidativo, desencadeando as respostas pró-inflamatórias das células gliais. As mutações associadas à glucocerebrosidase comprometem também a degradação proteica ao nível do lisossoma, promovendo a acumulação da α -sinucleína. Imagem originalmente publicada em Kam *et al* (54). Para mais informação, consultar texto principal e nota de rodapé ¹.

A neurodegeneração dos neurónios dopaminérgicos tem também sido associada ao compromisso do sistema antioxidante da glia, tendo sido reportado por

¹ aSyn, alpha-synuclein; C1q, Subunit of the C1 enzyme complex that activates the serum complement system; CD36, Class B scavenger receptor CD36; FcyRIIB, Fc gamma receptor IIB; GBA, Glucocerebrosidase; IL, Interleukin; LRRK2, Leucine rich repeat kinase 2; MAP, Mitogen-activated protein; MAVS, Mitochondrial antiviral signalling protein pathway; MitAP, Mitochondrial antigen presentation; NF- κ B, Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; NLRP3, Nod-like receptor protein 3; PINK1, PTEN-induced kinase 1; TLR, Toll-like receptor; TNF α , Tumour necrosis factor alpha.

Solano et al. (2008) um decréscimo na síntese de glutathiona (GSH) por astrócitos, subsequentemente à disfunção pela proteína parkina (5,58). Esta, a par da proteína cinase 1 induzida por PTEN (PINK1), decorrem de mutações de perda de função associadas à desregulação do controlo mitocondrial. A libertação de ROS e DAMPs mitocondriais poderão ajudar a perpetuar a resposta inflamatória por parte da microglia e a ativação do inflamassoma NLRP3 (54).

Num estudo recente de Yun et al. (2018), sugere-se que a expressão do recetor do Péptido-1 semelhante à glucagina (GLP1R, do inglês, *glucagon-like peptide-1 receptor*) na *substantia nigra* de doentes com DP assume uma expressão essencialmente microglial (59). Os autores reportaram, após a administração de um agonista do GLP1R, uma diminuição *in vitro* da produção de fatores pró-inflamatórios, incluindo a IL-1 α , TNF- α e o componente C1q do complemento, fatores esses que se pensam estar na base do fenótipo neurotóxico de astrócitos vizinhos (4). Esta descoberta é consistente com alguns dos achados mais prevalentes em estudos com modelos toxicológicos da DP em ratinhos (MPTP, 6-hidroxidopamina, rotenona) e com modelos transgênicos de α -sinucleína mutada (M7KO, M83KO e SYNKO), designadamente em virtude da presença de microgliose, níveis elevados de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ e TNF- α), concentrações aumentadas de enzimas associadas a inflamação (COX-1, COX-2, iNOS) e níveis reduzidos de neurotrofinas (NGF, *Fator de Crescimento Neuronal*; BDNF, *Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo*) (7).

6. Esclerose Lateral Amiotrófica: Uma Visão Gliocêntrica da Neurodegeneração Motora

A Esclerose Lateral Amiotrófica (outrora Doença de Lou Gehrig) configura-se como uma doença paralisante progressiva com desfecho fatal, na maioria dos doentes. Descoberta no final do século XIX pelo neurologista Jean-Martin Charcot, o início típico da ELA ocorre entre os 40 e 70 anos de idade, sendo que a morte dos doentes, geralmente por insuficiência respiratória, ocorre 3 a 5 anos após o seu início (60,61). Epidemiologicamente, em termos de incidência, é umas das doenças do neurónio motor mais comuns na população adulta, com 1 a 3 novos casos por cada 100 000 pessoas, a nível mundial (7,62).

A morte dos neurónios motores (NMs) superiores e/ou inferiores no córtex motor primário, córtex somatossensorial primário, tronco cerebral e medula espinhal está na base do quadro clínico típico de fraqueza muscular incapacitante, espasticidade e perda do controlo voluntário dos músculos (7). Quando ocorre compromisso dos neurónios motores superiores (corticoespinhais), os sintomas de rigidez muscular e espasticidade têm lugar, ao passo que, no caso de perturbação dos neurónios inferiores, iniciam-se espasmos musculares espontâneos (fasciculações), cujo processo de degeneração potencia a perda de conectividade sináptica com os respetivos músculos por estes inervados, culminando em atrofia (ver Tabela 1) (63).

A apresentação clínica da ELA é deveras heterogénea em função das populações de neurónios motores afetadas, tendendo a afetar inicialmente os membros. Em 1/3 dos casos, a apresentação é bulbar e traduz-se num quadro de disfagia e disartria, com pior prognóstico (63). Nas últimas duas décadas, em cerca de 10 a 20% dos doentes, observam-se marcadas alterações cognitivas e comportamentais que, em conjunto com evidências patológicas de neurodegeneração nos lobos frontal e temporal, correlacionam-se com um quadro demencial, designado de demência frontotemporal (FTD ou Doença de Pick) (63).

Em virtude da heterogeneidade da apresentação clínica e da variabilidade na velocidade de progressão da doença, o diagnóstico da ELA constitui-se desafiante (62). Este assenta no exame clínico em associação com estudos de condução nervosa e registos eletromiográficos que permitem determinar a presença de desnervação muscular, uma característica chave no diagnóstico diferencial da ELA (64). Os critérios de diagnóstico *El Escorial* ou *Awaji* são essencialmente utilizados em doentes com historial de fraqueza muscular que se tende a alastrar localmente ou

para outras regiões (bulbar, cervical, torácica ou lombar), com evidência de envolvimento dos NM inferiores (clínica ou eletrofisiológica) e dos NM superiores (clínica), para o qual nenhum outro mecanismo de doença se aplica, e ainda em contexto de investigação (65).

Características Clínicas	Patologia	Mutações Genéticas
Atrofia muscular	Inclusões positivas para a ubiquitina	<i>SOD1</i> (20% dos casos de <i>fALS</i>)
Disfagia		
Disartria	Inclusões de TDP-43	<i>C9orf72</i>
Espasticidade	Inclusões de SOD1	<i>TARDBP</i>
Rigidez muscular	Inclusões de FUS	<i>FUS</i>
Hipereflexia		<i>OPTN</i>
Sinal de Babinski positivo		<i>PFN1</i>
Fasciculações		<i>MATR3</i>
Demência frontotemporal		<i>TUBA4A</i>
Falência respiratória		<i>TBK1</i>

Tabela 1 | Características clínicas, patológicas e genéticas associadas à Esclerose Lateral Amiotrófica. Adaptada de *Lattante et al* (61). Para mais informação, consultar texto principal e nota de rodapé ¹.

A maioria dos casos de ELA são esporádicos (sALS, 90%), sendo que a fração restante apresenta uma componente hereditária familiar (fALS, 10%) (60). A descoberta das primeiras mutações no gene codificante para a superóxido dismutase 1 (SOD1) data de 1993, tendo aberto portas daí em diante para a identificação de mais de 20 genes diferentes envolvidos na patogénese da doença (60).

A mutação mais frequentemente envolvida na patogénese da ELA afeta o gene SOD1 (com *locus* no cromossoma 21q22.11), sendo que as mutações relacionadas com os genes codificantes para a Proteína de ligação ao TAR DNA 43 (TDP-43), Proteína de ligação ao DNA/RNA *Fused in sarcoma* (FUS), Optineurina (OPTN) e *C9orf72* foram também recentemente consideradas (ver Figura 11) (7,61).

¹ *C9orf72*, Chromosome 9 open reading frame 72; *fALS*, Familial amyotrophic lateral sclerosis; *FUS*, Fused-in-Sarcoma; *MATR3*, Matrin 3; *OPTN*, Optineurin; *PFN1*, Profilin 1; *SOD1*, superoxide dismutase 1; *TARDBP*, TAR DNA Binding Protein; *TBK1*, TANK Binding Kinase 1; *TDP-43*, Transactive DNA-binding protein 43; *TUBA4A*, Tubulin alpha 4a.

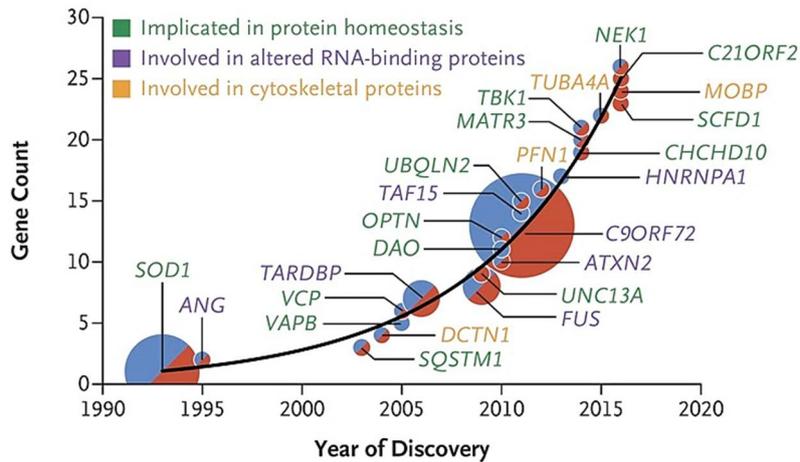


Figura 11 | Descoberta de mutações genéticas associadas à Esclerose Lateral Amiotrófica desde 1990. Verifica-se um crescimento célere no que toca ao conhecimento dos diferentes genes associados à patogénese da Esclerose Lateral Amiotrófica desde o final do século passado. Os círculos a azul relacionam-se com os genes somente associados à Esclerose Lateral Amiotrófica familiar, ao passo que os encarnados indicam genes relacionados com a Esclerose Lateral Amiotrófica esporádica. Imagem originalmente publicada em *Brown e Al-Chalabi* (63). Para mais informação acerca dos genes envolvidos na doença, consultar o artigo original.

A superóxido dismutase [Cu-Zn] (SOD1) constitui uma proteína predominantemente citosólica, expressa de forma ubíqua, com funções associadas à proteção das células contra as espécies reativas de oxigénio, como o anião superóxido (63). A ELA associada à mutação SOD1 exhibe fenótipos muito heterogêneos que se supõem resultar de múltiplos mecanismos fisiopatológicos importantes na degeneração dos neurónios motores (63). A patogénese associada à SOD1 mutada relaciona-se sobretudo com um ganho de função tóxica em virtude da acumulação desta SOD1 “mal dobrada” no soma e formação de agregados nos neurofilamentos e axónios dos neurónios motores, culminando na degeneração do retículo endoplasmático e disfunção mitocondrial. Em conjunto, estes fenómenos potenciam um ambiente de stress oxidativo exacerbado e processos de excitotoxicidade associada ao glutamato extracelular, com envolvimento de populações de células gliais ativadas (63).

Atualmente, assiste-se a uma crescente emergência de modelos animais que reproduzem de forma mais fidedigna uma ou mais características do curso da doença em vertebrados (modelo ambiental associado à exposição ao bisfenol A em peixe-zebra, a título de exemplo) e invertebrados (*C. elegans* e *Drosophila*), acelerando o progresso da investigação de translação na ELA (61). Neste âmbito, o modelo *mSOD1^{G93A}* (Cu/Zn superóxido dismutase 1-G93A) em ratinho constitui o mais utilizado, tendo sido amplamente integrado no desenvolvimento de diversas

terapêuticas na ELA, designadamente Riluzol e Edavarona, validando-o como modelo pré-clínico (66,67).

O modelo transgênico *mSOD1* em ratinho tem por base a expressão da proteína humana SOD1 contendo a mutação G93A, revelando-se crítico para a identificação da putativa disfunção celular que ocorre aquando da patogénese da ELA (66,68). Dispõe de uma rápida degeneração dos neurónios motores, que se traduz em paralisia e morte entre os primeiros cinco meses de vida. Este modelo possui a validade de face mais apreciável, apresentando, contudo, algumas fragilidades em termos de validade preditiva e de construto, especialmente pela existência de efeitos dependentes de espécie, associados à axonopatia em ratinho motivada pela sobreexpressão de SOD1 humana *wild-type*. O segundo modelo mais utilizado é o *mSOD1^{G37R}* (66). Outros modelos transgênicos incluem os modelos em peixe-zebra *TDP43^{A315T}*, *C9orf72 knockdown* e *mSOD1^{G93R}*, bem como os modelos em ratinho *TDP43^{Q331K}* e *C9orf72 BAC* (66,68).

Até aos dias de hoje, nenhuma terapêutica verdadeiramente eficaz foi desenvolvida, condenando os doentes a uma curta esperança média de vida (7). O Riluzol (Rilutek®) constitui atualmente o único tratamento farmacológico aprovado na Europa e Estados Unidos da América (1996) capaz de aumentar a sobrevivência dos doentes em 2 a 3 meses, atrasando a progressão da doença (7). Nesta sequência, mais de 60 moléculas foram investigadas no contexto de um possível tratamento para a ELA. Todavia, a maioria dos fármacos a atingir as fases de ensaios clínicos tem apresentado vulnerabilidades inexoráveis na demonstração da sua eficácia clínica, inviabilizando a sua aprovação (67).

A Edaravona (Radicava®), um agente neuroprotetor e sequestrador de radicais livres, foi recentemente autorizada pela FDA (2017), tendo por fundamento os resultados de um ensaio clínico aleatorizado realizado em doentes com ELA em fases precoces, no Japão, sob coadministração com o riluzol (clinicaltrials.gov ID: NCT01492686) (7). Neste ensaio, o grupo experimental revelou um decréscimo funcional menos apreciável, num período de 24 semanas, comparativamente com o grupo tratado com o placebo. Contudo, é de assinalar que os resultados são ainda pouco satisfatórios, sendo que este fármaco não demonstrou eficácia quando administrado em dois ensaios clínicos com doentes em todas as fases da ELA, inviabilizando a generalização da sua indicação para outras populações de doentes (7,36).

6.1 Papel das Células Gliais

A ELA assume-se como uma doença multifatorial em que a interação entre os diferentes tipos celulares se reveste da maior importância, impactando todo o seu curso de evolução, desde a fase pré-clínica até ao início da sintomatologia (7). Com efeito, a disfunção glial tem sido implicada na patogénese da ELA, assumindo um papel crítico (69).

Através de modelos animais e biópsias *post mortem* de doentes com ELA, os principais achados neuropatológicos passam efetivamente por uma robusta ativação microglial, astrogliose reativa e infiltração moderada do tecido neural por linfócitos T e macrófagos, contribuindo para a disfunção clássica dos neurónios motores na sALS e fALS (7,36,70).

Os fenómenos de stress celular e ativação inflamatória tendem a caracterizar as células da glia aberrantes, com degeneração do retículo endoplasmático, a par da presença de abundantes vesículas secretoras e autofágicas (36).

Os genes associados às mutações causais da ELA são, de facto, expressos em diversos tipos celulares, sendo que a doença emerge da combinação da lesão existente, tanto nos NM, como nas células gliais (68). Num estudo pioneiro de Pramatarova et al. (2001), em que se procedeu à restrição da expressão da mSOD1 em neurónios, num modelo em ratinho, verificou-se, porém, que a doença não se desenvolvia, sugerindo que as células gliais pudessem constituir determinantes críticos na evolução da ELA (68). Contudo, apesar de a mSOD1 ser expressa noutros tipos celulares, que não os neurónios, participando na progressão do fenótipo típico da ELA em ratinhos, a expressão isolada desta proteína aberrante somente em astrócitos ou na microglia não é efetivamente suficiente para induzir a morte dos NMs. Sugere-se então que, na fase de iniciação da doença, para além da necessidade de esta ser expressa pelos NMs, ocorra igualmente uma cooperação ativa entre as diferentes populações celulares na vizinhança para induzir uma degeneração efetiva dos NMs (71,72).

A neuroinflamação e o stress oxidativo são então fenómenos indissociáveis que influenciam a patogénese das DN, sendo que as células gliais e as células infiltradas do sistema imunitário constituem os principais produtores de ROS e RNS no SNC, em condições patológicas (36). O stress oxidativo poderá, não só acelerar a progressão da doença, mas também contribuir para a degeneração da junção neuromuscular na ELA. Esta disfunção está presente até nas fases mais precoces, fazendo

acompanhar-se do incremento de marcadores inflamatórios e da perda de suporte trófico (36).

A resposta antioxidativa nos doentes com ELA parece estar igualmente comprometida, registando-se níveis diminuídos de glutatona ao nível do córtex motor, em comparação com indivíduos saudáveis (36). A acumulação de mTDP-43 numa linhagem de neurónios motores parece relacionar-se ainda com a ocorrência destes fenómenos, resultando na desregulação da via Nrf2 (do inglês, *nuclear factor E2-related factor 2*), relevante em mecanismo de destoxificação, anti-inflamatórios e citoprotetores (36). Em concordância, estudos com modelos de rato evidenciam o efeito benéfico de níveis elevados de Nrf2 em astrócitos, um dos maiores exportadores de glutatona para os neurónios vizinhos (36).

Adicionalmente, também os oligodendrócitos evidenciam algum grau de participação no desenvolvimento da ELA, nomeadamente por diminuição de transportadores de lactato associado ao suporte metabólico de axónios (MCT1), tratando-se de um achado encontrado tanto em modelos animais, como em doentes (4,68). Num modelo em rato *mSOD1^{G93A}*, a degeneração dos oligodendrócitos precedeu a morte dos NM, seguindo-se uma rápida proliferação das OPCs ao nível da medula espinal. Contudo, as novas células derivadas não atingiram a maturação, não substituindo os oligodendrócitos degenerados (68). Num estudo de Kim et al. (2019), com recurso ao modelo de peixe-zebra *mSOD1^{G93A}*, foi reportada a indução da degeneração ao nível dos oligodendrócitos maduros (73). A disrupção das bainhas de mielina, a par da subregulação do transportador MCT1, provocou então a degeneração dos neurónios motores. Todavia, o tratamento subsequente com inibidores dos canais de K⁺, que permitiu recuperar alguns défices comportamentais, não se revelou, ainda assim, eficaz na recuperação da expressão deste transportador, sugerindo porventura um fenómeno de disfunção independente de MCT1 (73).

O papel desempenhado pelas células NG2⁺ na ELA permanece ainda por elucidar, constituindo uma área de investigação pouco explorada (68). Assinala-se, porém que, após neurodegeneração, estas células tendem a originar apenas oligodendrócitos (com inibição da diferenciação em astrócitos protoplasmáticos), sendo que a taxa de proliferação permanece elevada durante todo o curso da ELA (68). Kang et al. (2013), por exemplo, constatou, num modelo *mSOD1* em murganho, uma proliferação diferencial de OPCs em função da região cerebral, sendo que, na substância cinzenta ventral, este fenómeno intensifica-se previamente ao início da sintomatologia e perdura ao longo da progressão da ELA. Já na substância branca

ventral e cinzenta dorsal, observaram-se taxas de proliferação inferiores, sobretudo nas fases mais avançadas (74). Por outro lado, a deleção da *mSOD1* nas OPCs, no primeiro mês de vida numa linhagem de ratinhos NG2-Cre^{ERT2} induzível, por exemplo, mostrou unicamente desacelerar o início da ELA, não existindo, ainda assim, alterações ao nível da sobrevivência após o aparecimento da doença (4). O papel das células de Schwann na ELA é igualmente pouco conclusivo (70).

Sublinhe-se ainda que a importância do tráfego de RNA foi recentemente considerada no âmbito da disfunção celular intrínseca decorrente da agregação de proteínas (69). Julga-se que tal fenómeno de agregação patológica típica em neurónios, a par da formação de *foci* de RNA nuclear nos casos de expansão no gene *C9orf72*, produza especificamente efeitos tóxicos associados a um ganho de função, por sequestro de mRNAs (a maioria de tradução local, como o da GFAP) e de proteínas de ligação ao RNA críticas para o funcionamento de astrócitos e oligodendrócitos (69). Tem-se igualmente destacado o potencial de modulação da autofagia e da sua maquinaria celular na degradação destes substratos aberrantes, no sentido de aproveitar os seus efeitos benéficos e deletérios ao nível da imunidade, inflamação e metabolismo nas células da glia, como provável estratégia de desaceleramento da progressão da ELA (16).

6.1.1 Ativação Microglial

Numerosos estudos têm confirmado a ativação da microglia nas proximidades da lesão dos NM em todas as fases da ELA, tanto em doentes, como em modelos transgênicos *mSOD1* em ratinho (68,75). Verifica-se uma correlação neuropatológica direta entre o grau de ativação microglial e a severidade da lesão dos neurónios motores superiores (67). De acordo com Filipi et al. (2020), num modelo *mSOD1* em ratinho, observou-se o aumento da CCAAT/ Proteína de ligação do *enhancer* (C/EPB) em células microgliais ativadas da medula espinhal, produzindo-se níveis mais elevados de NO sintase-2, COX-2 e a sobre-regulação de outros genes pró-inflamatórios (70). Tem-se que as ROS, a par das citocinas, aumentam a suscetibilidade dos neurónios motores à excitotoxicidade por glutamato e inibem a expressão dos transportadores glutamatérgicos em astrócitos (70). A modulação da via de sinalização NF- κ B mostrou também condicionar a ativação pró-inflamatória em células da microglia (ver Figura 12) (70).

Atendendo a estudos focados na progressão da ELA, em ratinhos, regista-se um aumento da população da microglia residente e do seu estado de ativação, num *continuum* entre os seus dois fenótipos clássicos (76). Ohgomori et al. (2016) descreveu inclusivamente, a partir do modelo de ratinho transgénico *mSOD1^{G93A}*, o fenótipo “R1”, correspondendo morfológicamente a células de processos curtos e pouco ramificados, originados a partir da microglia em vigilância e predominantes nas fases mais precoces. Em contraste, o fenótipo “R3” exhibe somas de elevada dimensão com processo curtos e espessos, típico das fases mais avançadas da doença (77).

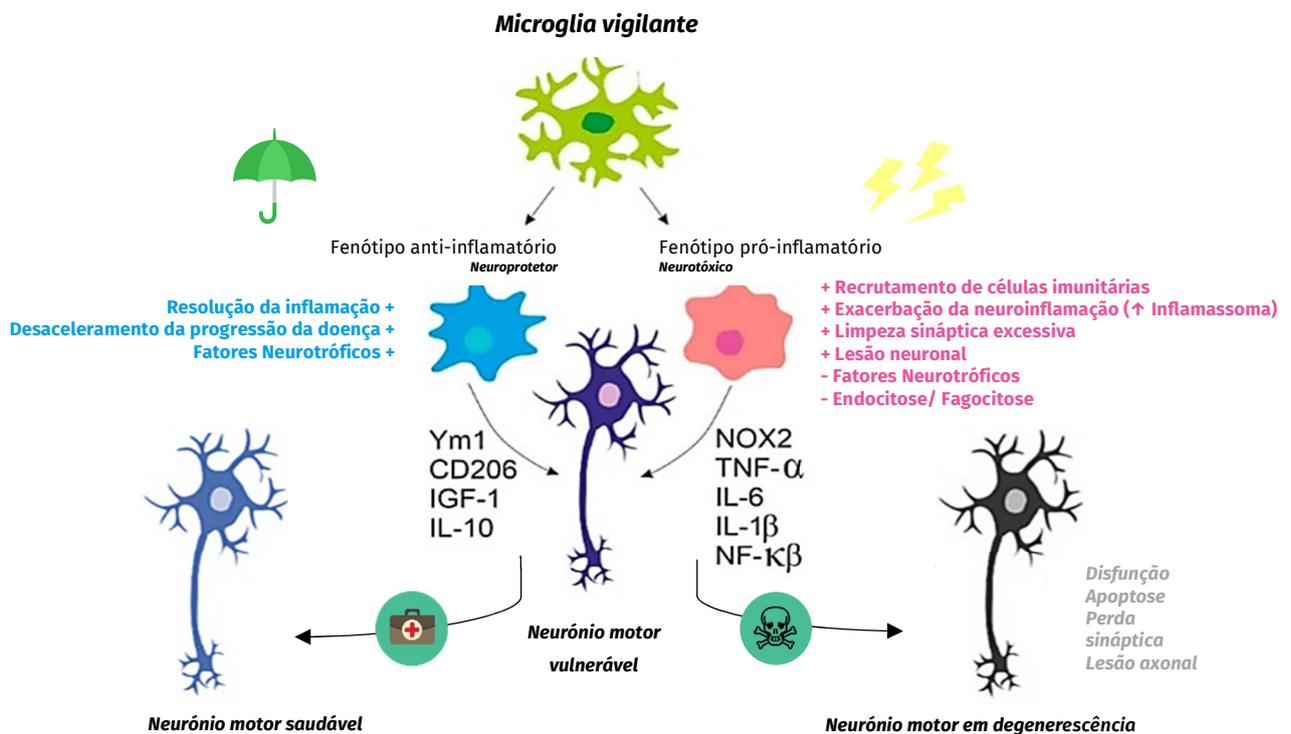


Figura 12 | Fenótipos Microgliais na Esclerose Lateral Amiotrófica. Os fenótipos microgliais libertam moléculas que influenciam e condicionam a sobrevivência dos neurónios motores. O fenótipo anti-inflamatório é neuroprotetor, ao passo que o fenótipo pró-inflamatório é neurotóxico. Imagem adaptada de *Filipi et al* (68). Para mais informação, consultar texto principal e nota de rodapé ¹.

¹ CD206, *Macrophage mannose receptor type C*; IGF-1, *Insulin-like Growth Factor-1*; IL, *Interleukin*; NF-κB, *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*; Nox2, *NADPH oxidase 2*; TNFα, *Tumour necrosis factor α*; Ym1, *Chitinase 3-like 3*.

Microglia na Patologia SOD1

É num contexto de neuroinflamação que a progressão da doença toma lugar, relacionando-se com a fase sintomática da ELA, tanto nos casos esporádicos como familiares (36). A microglia ativada tende então a libertar citocinas pró-inflamatórias (como TNF- α , IL-1 β , IL-12, IFN- γ , C1q), fatores mitogénicos (como MCP-1, M-CSF), fatores neurotróficos (IGF-1) e fatores anti-inflamatórios (TGF- β), que em conjunto poderão exercer um efeito neurotóxico nos NM (36). Neste seguimento, níveis anormalmente elevados de citocinas como IL-2, IL-15, IL-17, proteína inflamatória de macrófagos-1 α (MIP1 α), TNF α e Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) têm vindo a ser identificados no líquido destes doentes (36).

O transplante de células microgliais *wild-type* em ratinhos com mSOD1 desprovidos de microglia mostrou inclusivamente incrementar a sua sobrevivência, sugerindo um papel importante destas células na progressão da doença (4). Curiosamente, nas fases mais precoces da ELA mediada pela mSOD1, antes do seu início, o sistema imunitário parece exercer um efeito neuroprotetor sobre a viabilidade dos neurónios motores, em particular, por intermédio de células da microglia com fenótipo anti-inflamatório, através de uma resposta atenuada pelo TLR2 e sobreexpressão da citocina anti-inflamatória IL-10, células T *helper* 2 (Th2) e T *regulatory* (T reg) (36,68). Ainda assim, à medida que o curso da doença evolui e a lesão se agrava, reconhece-se uma segunda fase de natureza deveras rápida, pautada pela sobre-regulação dos níveis de microglia com fenótipo pró-inflamatório (com elevação de marcadores como Ym1 e CD206), células T Th1 e Th17 (36,68).

Na fase final, a microglia tende a expressar níveis elevados de NOX2, uma subunidade da NADPH oxidase expressa por macrófagos e considerada um marcador dos fenótipos pró-inflamatórios (68).

A proteína NF- κ B encontra-se sobre-regulada na medula espinhal de doentes com ELA e em modelos *mSOD1*^{G93A} de ratinho, sendo que a deleção seletiva desta via de sinalização na microglia permitiu recuperar os NM em morte celular *in vitro* e aumentar a sobrevivência dos animais, por inibição da ativação microglial. (68). A produção excessiva de superóxido extracelular constitui outro mecanismo de lesão associado à mSOD1 pela microglia, em virtude da sua ligação à proteína Rac1, uma enzima com atividade GTPase (68).

À semelhança das alterações encontradas em modelos de mSOD1 em ratinho, sugere-se que as mutações OPTN promovam a inflamação através da ativação da via

NF- κ B, sobretudo ao nível da microglia que irá secretar uma série de citocinas, como a IL-1 β , IL-6 e TNF- α que conduzem a fenómenos intensos de morte neuronal (78). Por seu turno, as mutações TDP-43 crêem-se estar implicadas na ativação da via canónica do inflamassoma NLRP3 na microglia, despoletando a libertação de IL-1 β e IL-18, por meio da ativação da caspase-1 (78). Em concomitância, todos estes mecanismos parecem então concorrer para a exacerbação da sinalização inflamatória que se revela altamente nociva para a viabilidade dos NMs (7).

Microglia na Patologia TDP-43

A TDP-43 é uma proteína insolúvel multifuncional que se liga a ácidos nucleicos, desempenhando um importante papel no metabolismo neuronal, principalmente durante o desenvolvimento neuronal e o estabelecimento de sinapses (4). Os achados de ativação microglial e degeneração dos NM são transversais aos modelos transgênicos *TDP-43^{Q331K}*, sendo que em mais de 90% dos doentes com ELA, verificaram-se agregados citoplasmáticos desta proteína na medula espinhal, em contexto *post mortem* (68). Esta tem uma localização nuclear, sendo que na ELA tende a acumular-se no citoplasma, sob a forma de agregados que potenciam sobremaneira a resposta imunitária da microglia (4).

A supressão da constituição destes agregados, após a sua formação sustentada no tempo, induz uma intensa proliferação de populações da microglia residente no SNC (4). Tal parece sugerir que, na ELA esporádica, a microglia residente do SNC em específico pode influenciar a recuperação do fenótipo motor induzido pela acumulação esporádica de agregados de TDP-43 (4). Existem, de facto, algumas evidências que reforçam a ideia de que doentes com mutações genéticas de componente hereditária podem apresentar características da doença em muito distintas das dos casos esporádicos. A microgliose tende a ser mais acentuada em doentes com mutações SOD1, ao passo que nos casos esporádicos de ELA, ou em doentes com expansões em *C9orf72*, os resultados relativos à ativação da microglia tendem a ser mais inconsistentes (4,79,80).

À semelhança da mSOD1, a interação da TDP-43 com o recetor CD14 na microglia desencadeia a ativação das vias do inflamassoma NF- κ B, AP-1 e NLRP3, com produção subsequente de TNF- α , pró-IL-1 β e pró-IL-18, seguida dos passos de ativação, clivagem e libertação das moléculas na sua forma madura (8). A TDP-43 parece também induzir a sobre-regulação da NADPH oxidase 2 (NOX2), uma

importante fonte de ROS que, por sua vez, também estimulam a ativação do inflamassoma NLRP3 (ver Figura 13) (8). Uma estratégia pouco convencional, e contrastante com a mais utilizada na patologia SOD1, assente na sobre-regulação da inflamação mediada pela microglia foi sugerida num estudo de Spiller et al. (2018). A modulação para o estado pró-inflamatório foi então otimizada de forma a depurar a proteína patológica TDP-43, promovendo a regeneração axonal durante o início/progressão da ELA (68,81).

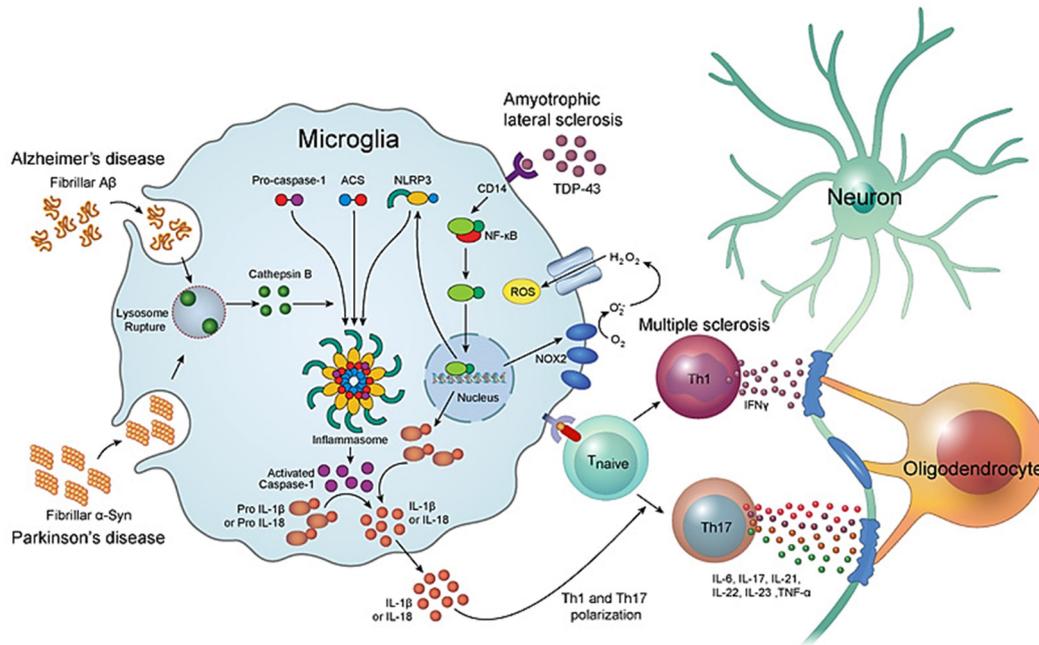


Figura 13 | Descrição esquemática da via de ativação do inflamassoma nas doenças neurodegenerativas. Na Esclerose lateral amiotrófica, a interação entre a proteína de ligação ao TAR DNA 43 e o receptor CD14 desencadeia a ativação da via do fator de transcrição nuclear κB. Esta potencia, por sua vez, a ativação do inflamassoma NLRP3 e a produção de caspase-1 e interleucina 1β. Imagem originalmente publicada em *Park et al* (8). Para mais informação, consultar texto principal e nota de rodapé ¹.

6.1.2 Astroglise Reativa

Em doentes e modelos animais da ELA, observa-se a proliferação anormal de astrócitos a circundar os neurónios motores em degeneração. Estes astrócitos reativos expressam marcadores inflamatórios, como a COX-2 e NOS neuronal, bem como moléculas inibitórias que previnem a regeneração do axónio lesado (82). Em

¹ Aβ, Amyloid beta peptide; ACS, Apoptosis-associated speck like protein containing a caspase recruitment domain; αSyn, α-Synuclein; CD14, Cluster of differentiation 14 or monocyte differentiation antigen; IL, Interleukin; NF-κβ, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; NLRP3, Nod-like Receptor Family Pyrin Domain Containing 3; Nox2, NADPH oxidase 2; ROS, Reactive oxygen species; TDP-43, Transactive DNA-binding protein 43; TNFα, Tumour necrosis factor alfa.

co-culturas com neurónios motores, astrócitos derivados da medula espinhal de doentes com sALS ou fALS têm revelado inclusivamente uma citotoxicidade consistente (36).

Um conjunto vasto de mecanismos através dos quais os astrócitos poderão impactar a morte neuronal têm sido propostos, designadamente associados ao ganho de função (libertação de um fator tóxico) e à perda de função protetora (ver Figura 14) (70). O achado major associado à atividade astrocitária na fisiopatologia da ELA prende-se com a disfunção dos transportadores de glutamato, na sequência da subregulação dos transportadores EAAT2 (em modelo de ratinho, tomam a designação GLT-1) no córtex motor e no corno anterior da medula espinhal, contribuindo para a excitotoxicidade observada tipicamente na sALS (70). A caspase-3, como mediadora do transporte de glutamato, é responsável pela clivagem da proteína EAAT2, cujos fragmentos se tendem a acumular nos núcleos astrocíticos na medula espinhal, coincidindo com a progressão da doença (68).

Este fenómeno causa alterações morfológicas marcadas nos astrócitos e desregulação da sua expressão genética, nomeadamente associada a funções mitocondriais e respiração celular (68). O decréscimo deste transportador só ocorre na fase sintomática da ELA, tanto em ratinho como em doentes, sendo subsequente às alterações que os astrócitos sofrem quando sob um fenótipo reativo. Reflete assim a deterioração da capacidade de tamponamento dos astrócitos, num fenómeno excitotóxico mediado pelo glutamato que se tende a acumular na fenda sináptica (68).

O processo de astrogliose reativa exhibe uma ação dual, limitando, por um lado, a dispersão da lesão e prevenindo a infiltração por células imunitárias ativadas, com consequente restrição da inflamação (68,69). Por outro, as alterações que tendem a ocorrer ao nível da matriz extracelular, importantes para a formação da cicatriz glial, contribuem para inibir a regeneração axonal e crescimento (68,69). É de relevar que os astrócitos ativados na ELA, em modelo *mSOD1^{G93A}*, têm vindo a exhibir características distintas daqueles que ocorrem no tecido saudável, nomeadamente um potencial de proliferação *in vitro* superior, dimensão aumentada e processos hipertrofiados, expressão de marcadores típicos da astrogliose e de astrócitos

imaturas (como GFAP), assim como níveis elevados de conexina-43 (Cx43) que tendem a incrementar ao longo do curso da doença (68).

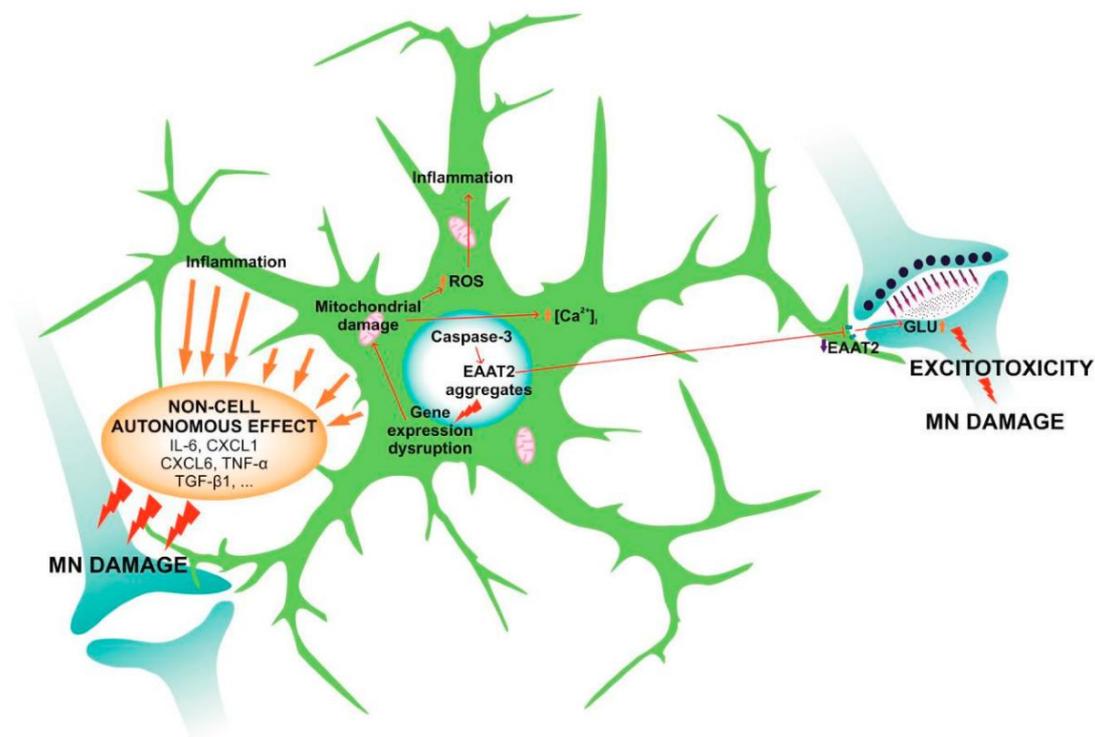


Figura 14 | Impacto da atividade astrocitária na patogênese da Esclerose Lateral Amiotrófica. Os astrócitos apresentam níveis de diminuídos da proteína transportadora do aminoácido excitatório 2, que é posteriormente clivada pela Caspase-3, formando agregados nos respectivos núcleos. Ocorre um aumento dos níveis de glutamato extracelular que causam estimulação neuronal excessiva, que através do fenômeno de excitotoxicidade, origina a lesão dos neurónios motores. A presença de tais agregados promove ainda a disrupção da expressão genética e lesão mitocondrial, a par da libertação de fatores solúveis inflamatórios que reduzem, simultaneamente, a sobrevivência dos neurónios motores. Imagem originalmente publicada em *Filipi et al* (68). Para mais informação, consultar texto principal e nota de rodapé ¹.

Até ao momento, todavia, ainda nenhum mecanismo único subjacente aos astrócitos foi diretamente vinculado à progressão ou início da ELA, sendo que alguns estudos apontam como crítico o designado efeito autónomo não celular. É através deste processo que os astrócitos potenciam a lesão dos NMs, sendo mediado por fatores solúveis específicos de astrócitos, como citocinas ou fatores de crescimento, que são posteriormente secretados para o tecido em redor, afetando também a

¹ CXCL, C-X-C Motif Chemokine Ligand; EAAT2, Excitatory amino acid transporter 2; GLU, Glutamate; IL, Interleukin; MN, Motor neuron; ROS, Reactive oxygen species; TGF-β1, Transforming growth factor beta 1; TNF-α, Tumour Necrosis Factor alpha.

microglia. Sucodem-se alterações morfológicas nos NMs, como corpos celulares mais pequenos e axónios reduzidos. A par, ocorre edema axonal e a acumulação de agregados de mSOD1 e de ubiquitina, cujos níveis tendem a aumentar em função do tempo de doença. Estes contribuem para um fenómeno de disfunção mitocondrial, tornando as mitocôndrias permeáveis, com libertação subsequente de fatores proapoptóticos que promovem a necroptose dos NMs (68).

Astrócitos com mutações no gene SOD1 tendem assim a produzir ROS e moléculas solúveis com toxicidade seletiva para os neurónios motores da medula espinhal. Neste contexto, num modelo de mSOD1 em ratinho, foi inclusive observada a ativação da via de sinalização associada ao recetor 75 das neurotrofinas (NGF-p75) (70). A libertação de glutamato pelos astrócitos é também potenciada por níveis elevados de COX-2 que condicionam a síntese de PEG2 e a hiperestimulação dos recetores glutamatérgicos NMDA, com produção paralela de ROS (70).

A indução do decréscimo das moléculas associadas ao complexo major de histocompatibilidade I (MHC I) nos neurónios motores pelos astrócitos constitui uma das hipóteses de ganho de função mais estabelecidas, ficando por esclarecer o fenómeno mecanístico subjacente à subregulação do mesmo e conseqüente morte neuronal (4). Outros mecanismos incluem a regulação direta da expressão da subunidade dos recetores do glutamato GluR2 nos recetores AMPA em neurónios motores e libertação deficitária de fatores neurótróficos (VEGF, BDNF, GNF) (70). Neste contexto de excitotoxicidade, propõe-se que a mSOD1 possa prevenir a expressão induzida por astrócitos da subunidade do recetor AMPA impermeável ao cálcio, GluA2. Tal aumentará a entrada de cálcio através dos canais de cálcio dos recetores AMPA, potenciando novamente o fenómeno de excitotoxicidade (4).

6.1.3 Disfunção de Oligodendrócitos

Os mecanismos concretos relativos à participação dos oligodendrócitos na patogénese da ELA permanecem por clarificar (33,68). Os principais fenómenos descritos relacionam-se com um processo espontâneo de reparação, a remielinização, no qual as OPCs passam de um estado quiescente para um outro de ativação, migrando e diferenciando-se até às regiões críticas, numa tentativa infrutífera de substituição (83).

A formação de agregados tóxicos de proteínas mutadas relacionadas com a ELA promove a degeneração dos oligodendrócitos, confirmada pela presença de achados típicos da apoptose, como reatividade da caspase 3 clivada (83). Sucede-se então a desmielinização axonal que promove a proliferação das OPCs e posterior diferenciação em oligodendrócitos maduros (83). Estas novas populações tendem, contudo, a apresentar a sobreexpressão anormal do recetor GPR17, o que poderá contribuir para a inibição da maturação final destas células (ver Figura 15). Simultaneamente, ocorre a subregulação do transportador MCT1, perturbando o fornecimento de lactato e nutrientes aos NMs. Em conjunto, estes mecanismos originam oligodendrócitos dismórficos e imaturos, incapazes de remielinizar axónios e restaurar o suporte trófico dos NMs (83).

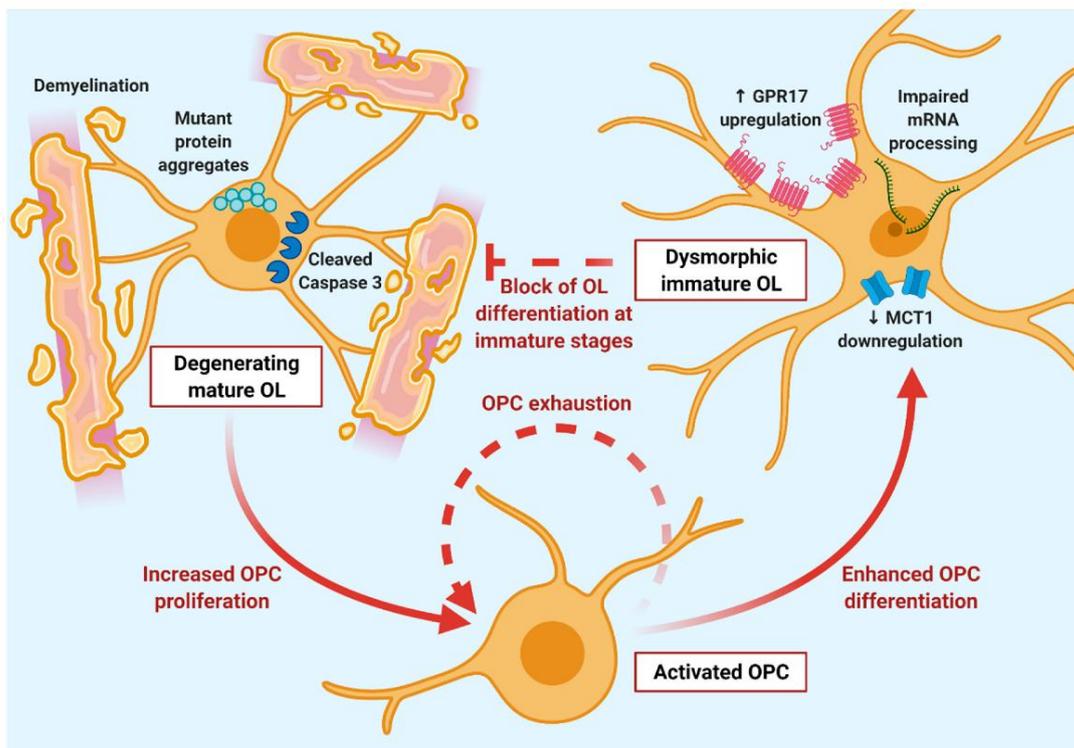


Figura 15 | Disfunção de oligodendrócitos na Esclerose Lateral Amiotrófica. Imagem originalmente publicada em Raffaele et al (83). Para mais informação, consultar texto principal e nota de rodapé ¹.

¹ GPR17, G Protein-Coupled Receptor 17; MCT1, Monocarboxylate transporter 1; OL, Oligodendrocyte; OPC, Oligodendrocyte progenitor cell.

6.2 Perfil de Comunicação Intercelular Patológica: Exossomas

As vesículas extracelulares (VE) correspondem a nanopartículas (< 200 nm) envoltas por uma membrana lipídica, sendo libertadas por todas as células que integram algum tipo de comunicação intercelular, incluindo células neuronais (84).

Mais especificamente, os exossomas são VE com dimensão compreendida entre 30 a 150 nm, libertadas após fusão das vesículas derivadas do endossoma tardio com a membrana plasmática. Atendendo a que as diferentes populações de VE podem ser caracterizadas em função da sua origem intracelular, estrutura, carga e biogénese, que ocorre através de um mecanismo dependente de ESCRT (do inglês, *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*), existe uma área de investigação em expansão centrada no estudo destas estruturas (84,85).

Reconhecem-se hoje múltiplas funções fisiológicas associadas aos exossomas no SNC, os quais podem ser libertados por todas as células neurais, incluindo células estaminais/células progenitoras, neurónios, astrócitos e microglia, atuando em células proximais ou distais (84). Estas nanovesículas podem ainda ser transferidas entre as diferentes células num processo de modulação de fenómenos como a neurogénese, plasticidade sináptica e, em particular, da neuroinflamação (84,86). Nas doenças neurodegenerativas, julga-se, por exemplo, que os exossomas possam constituir uma via alternativa às vias autofágicas-lisossómicas envolvidas na eliminação de proteínas “mal dobradas”, decorrente de uma potencial saturação destas vias protetoras (84).

O envolvimento do tráfego de exossomas na ELA foi primeiramente descrito por Gomes et al. (2007), num modelo de ratinho (*neuron-like NSC-34*, com sobreexpressão da mSOD1), através do estudo do transporte de SOD1 na sua forma nativa (*wild-type* SOD1) e SOD1 “mal dobrada” (87). Atualmente, a libertação de SOD1 “mal dobrada” em vesículas extracelulares é um fenómeno consensual em astrócitos e neurónios, a partir de modelos animais *SOD1^{G93A}* (84,85). Esta é então armazenada em vesículas intraluminais (VILs) no endossoma tardio, sendo secretada para o espaço extracelular em exossomas (88). A SOD1 “mal dobrada” pode posteriormente ser captada por endocitose pelas células alvo, servindo de molde à SOD1 na forma nativa ou “mal dobrada”. As células em morte celular podem também libertar agregados de SOD1, os quais podem ser captados por macropinocitose (ver Figura 16) (88).

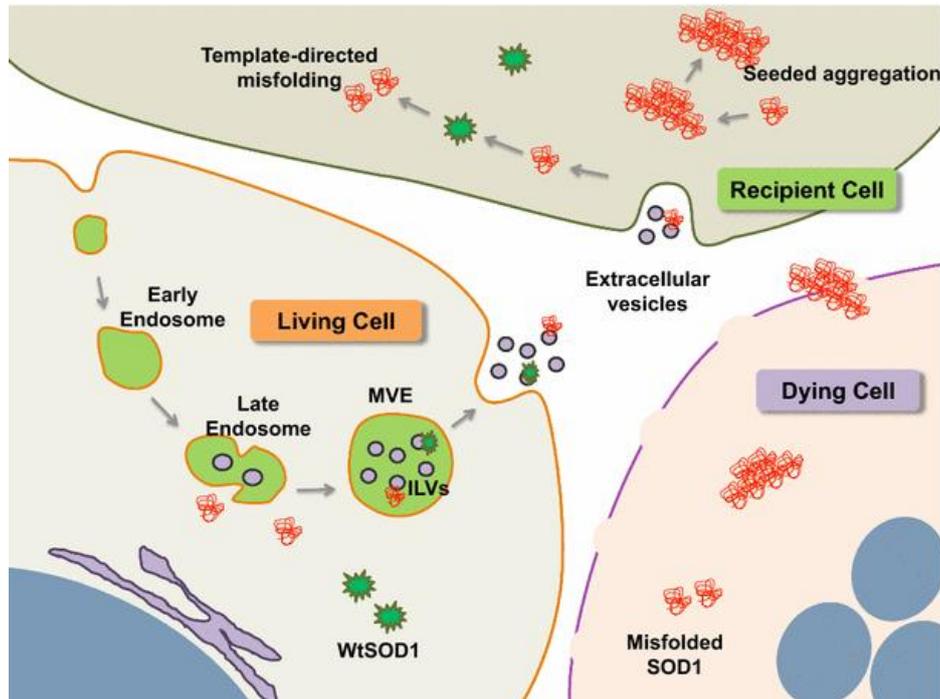


Figura 16 | Transmissão intercelular da enzima superóxido dismutase 1 “mal dobrada”. Imagem originalmente publicada em Silverman et al (88). Para mais informação, consultar texto principal e nota de rodapé ¹.

A SOD1 “mal dobrada” revelou estar presente em VE no encéfalo e medula espinhal de doentes com ELA, reforçando a premissa de um importante papel na propagação sistemática da toxicidade, num mecanismo celular semelhante ao da propagação de príões (88,89). Os resultados deste estudo de Silverman et al. (2019) sustentam o papel das VE derivadas do tecido neural, ao nível do encéfalo e da medula espinhal, no transporte da SOD1 “mal dobrada” e respetivos agregados, apesar de o proteoma destas VE, originadas a partir de tecido de ratinho SOD1G93A, não ter revelado quaisquer alterações, relativamente a ratinhos *wild-type*. Basso et al. (2013) constatou igualmente que culturas de astrócitos primários mSOD1 secretam VE contendo esta mesma proteína mutada, sendo capazes de a transportarem para culturas de neurónios espinhais, com indução da morte dos NMs (90). Num trabalho de Varcianna et al. (2019), com recurso a iPSCs derivadas de doentes com ELA, portadores da mutação *C90rf72*, observou-se que os exossomas derivados de astrócitos destes doentes são suficientes para induzir a morte dos NMs e que os

¹ LVs, Intraluminal vesicles; MVE, Multivesicular endosome; WtSOD1, wild type superoxide dismutase 1.

miRNAs, tipicamente alterados na ELA, têm como alvo transcriptos envolvidos na regulação do crescimento axonal e de neurites (91). Nesta linha de investigação, releve-se que outras proteínas mutadas que não a SOD1, como a TDP-43, foram também já identificadas sob transporte em exossomas, nomeadamente quando isoladas a partir do LCR de doentes com ELA, num estudo de Ding et al. (2015) (92).

A identificação de níveis alterados de miRNAs (como o miR-124-3p e o miR-146a-5p) em exossomas derivados de neurónios e exossomas totais de doentes com ELA (no LCR e plasma) concedeu igualmente a oportunidade para aprofundar o conhecimento sobre a progressão destes processos neurodegenerativos e sua potencial aplicabilidade terapêutica (84). Num trabalho de Gomes et al. (2020), reportou-se a subregulação de miRNAs associados à inflamação, designadamente do miR-155, miR-21 e do miR-146a, em astrócitos corticais primários, ao passo que nos astrócitos da medula espinhal foi verificada a sua sobreexpressão (93). Curiosamente, em VE derivadas tanto de astrócitos corticais como da medula, constatou-se a redução dos níveis destes miRNAs, sugerindo-se um papel essencial por parte destes exossomas no processo inflamatório associado à ELA (85).

6.3 Microglia e Astrócitos: Diálogo na Neuroinflamação

Perspetivando a ELA como uma doença mecanisticamente complexa e multifatorial, o diálogo entre os distintos tipos celulares afirma-se como uma premissa válida que carece de um investimento mais profundo por parte da comunidade científica (68). A maioria dos estudos focados na função e interação entre a microglia e astrócitos assenta na utilização de sistemas de culturas isoladas, tendo tal permitido identificar várias moléculas associadas ao suporte trófico, tais como o Factor estimulador de colónias 1 (CSF-1), IL-34 e fator de crescimento transformador beta 2 (TGF- β 2), no caso da microglia, e HB-EGF (do inglês, *Heparin-Binding EGF-like growth factor*) no caso dos astrócitos (94).

À semelhança da microglia, quer a perda das funções homeostáticas, como a libertação de fatores neurotóxicos, encontram-se implicadas nos mecanismos autónomos não-celulares responsáveis pela morte dos NM na ELA. Parece ocorrer um diálogo bidirecional entre os dois tipos celulares, com preponderância da componente microglial (ver Figura 17) (45).

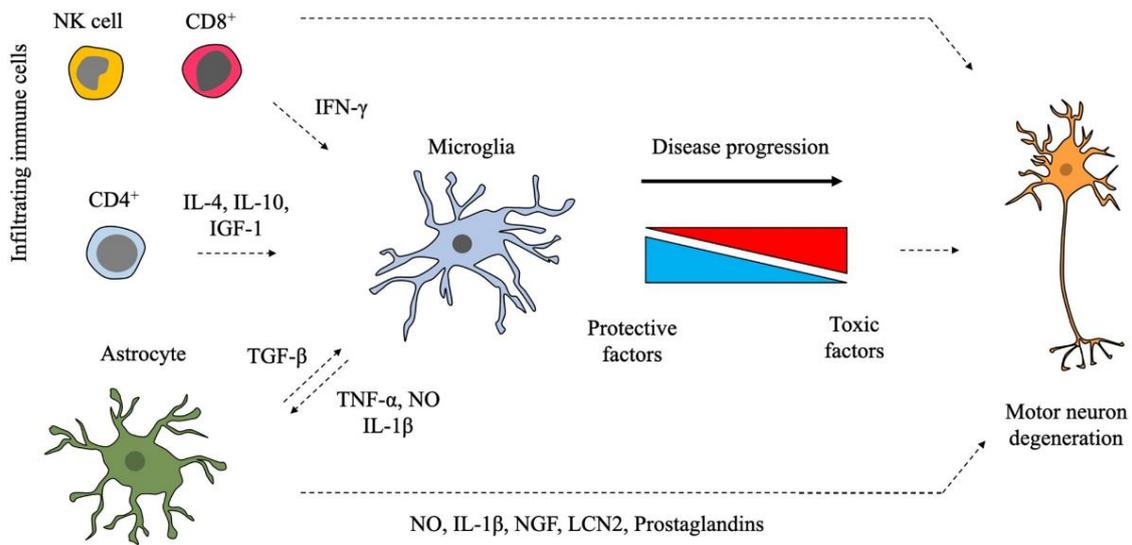


Figura 17 | Envolvimento dos diferentes tipos celulares na resposta microglial na Esclerose Lateral Amiotrófica. Quer os astrócitos, como as células imunitárias periféricas que tendem a infiltrar o sistema nervoso central durante a progressão da Esclerose lateral amiotrófica, podem condicionar a resposta da microglia, despoletando um fenótipo essencialmente neuroprotetor ou neurotóxico. Múltiplos fatores influenciam este equilíbrio entre fenótipos, nomeadamente a composição celular, envelhecimento e fatores libertados pelas populações em morte celular. Imagem originalmente publicada em *Clarke e Patani (75)*. Para mais informação, consultar texto principal e nota de rodapé ¹.

Tendo em conta que os astrócitos reativos secretam mediadores pró-inflamatórios, afetando a ativação microglial, o aumento da sobrevivência, após deleção da mSOD1 destas células num modelo mSOD1, constitui um achado interessante, do ponto de vista terapêutico (68). Do mesmo modo, a microglia ativada com fenótipo pró-inflamatório apresenta a capacidade de induzir astrogliose reativa, típica em DN (68). Os mecanismos que regulam a comunicação entre estas duas populações na ELA são ainda pouco compreendidos. Não obstante de a microglia libertar variados fatores capazes de influenciar a expressão genética em astrócitos, nenhum foi ainda de forma liminar e diretamente implicado na manipulação desta mesma em modelos de ELA (45).

Neste contexto de diálogo intercelular, é de ressaltar ainda um achado interessante, embora pouco recente, que se prende com o facto de, na ausência de astrócitos, as OPCs se revelarem incapazes de remielinizar axónios da medula espinhal, após lesão desmielinizante, em ratos adultos. Tal achado num estudo de

¹ CD, Cluster of differentiation; IFN- γ , Interferon gamma; IGF-1, Insulin-like growth factor 1; IL, Interleukin; LCN2, Lipocalin 2; NGF, Nerve growth factor; NK cell, Natural killer cell; NO, Nitric oxide; TGF- β , Transforming growth factor beta; TNF α , Tumour necrosis factor alpha.

Talbott et al. (2005) sugere que os astrócitos poderão afetar de forma crítica a regeneração por parte dos oligodendrócitos, na ELA (95). Paralelamente, num estudo de Kang et al. (2013), verificou-se a ocorrência de neurodegeneração ao nível dos oligodendrócitos, em modelo de ratinho *mSOD1*, juntamente com ativação da microglia e localização microglial dos oligodendrócitos apoptóticos. A deleção da *mSOD1* nestas células resultou no desaceleramento do início da ELA, coincidindo com um atraso na ativação microglial (74). Ainda assim, a relação entre a microglia e oligodendrócitos/OPCs permanece, ainda, em larga escala por compreender (75).

6.4 Perfil de Expressão de microRNAs (miRNAs)

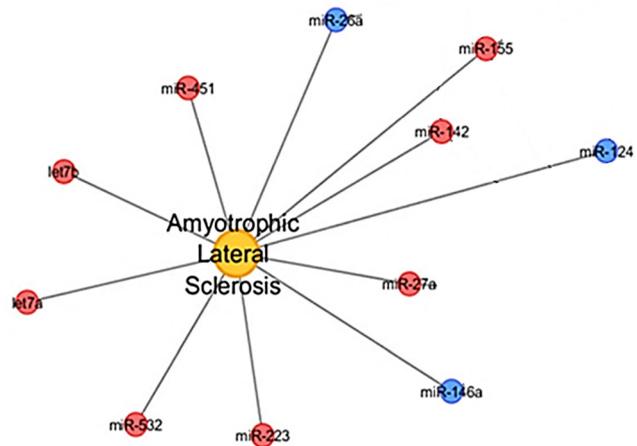
Os miRNAs consistem em modificadores epigenéticos da expressão genética que atuam através da ligação da proteína argonauta 2, formando o Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC) (96). Múltiplos miRNAs relevantes na neuroinflamação, incluindo o miR-155, miR-21, miR-146, miR-125b e miR-124, têm vindo a ser associados a distintos fenótipos e funções da microglia e astrócitos na ELA (ver Figura 18) (97,98).

De acordo com o seu papel anti-inflamatório, o miR-124 foi encontrado subregulado em leucócitos humanos, LCR e na medula espinhal de doentes com ELA, bem como a nível da medula e tronco cerebral de ratinhos com patologia *SOD1* (98). O miR-124 é expresso predominantemente no córtex cerebral, combinando-se com o ligando do Notch1, a *Jag2*, subregulando a sua expressão, ao inibir a via de sinalização Notch1 e ao promover, em consequência, a transformação de células gliais radiais corticais em astrócitos (99).

Num estudo de Zhou et al. (2018), com recurso ao modelo de ratinho *mSOD1^{G93A}* foi descoberta a localização de células positivas para o miR-124 em regiões de neurodegeneração na medula espinhal e no tronco cerebral, relacionando-se com a diferenciação de células estaminais neurais em astrócitos, pelos genes *Sox2* e *Sox9* (100). Em termos de potencial terapêutico, a administração *in vivo* de miRNA-124a (mediado por exossomas) mostrou desempenhar um papel importante na sinalização entre neurónios e astrócitos, incrementando os níveis deste miRNA em astrócitos e proteínas GLT1, no contexto da ELA, em ratinhos (99).

Proinflammatory			Anti-inflammatory		
↑miR-155	↑miR-9	↑miR-23a	↑↓miR-21	↓miR-124	↓miR-26a
↑miR-27a	↑miR-34a	↑miR-125b	miR-195	miR-190	↑miR-146a
↑miR-142	↑miR-223	↑let-7			
↑miR-532	↑↓miR-7	↑miR-451			

Figura 18 | MicroRNAs inflamatórios envolvidos na Esclerose Lateral Amiotrófica. Imagem originalmente publicada em *Nuzziello e Liguori* (98). Para mais informação, consultar texto principal e nota de rodapé ¹.



Parisi et al. (2013) constataram também experimentalmente o impacto da modulação de alguns destes miRNAs, de natureza pró-inflamatória. A sobreexpressão do miR-365 e do miR-25b, por exemplo, preveniu a resposta anti-inflamatória, associada à via IL-3/STAT3, inibindo-a diretamente (101).

Por seu turno, o miR-146a, de natureza anti-inflamatória, envolvido na diferenciação, proliferação e ativação de células imunitárias, foi encontrado aumentado em astrócitos humanos estimulados com IL-1 β , por Butovsky et al. (2012), remetendo-se-lhe um papel crítico na regulação da resposta inflamatória nestas células (102). Mais recentemente, Gomes et al. (2019), em astrócitos de murgancho com mSOD1, reportou que a subregulação deste miR-146a foi responsável pela sobreexpressão da Cinase 1 associada ao recetor da IL-1 (IRAK1) e do Fator 6 associado ao recetor do TNF (TRAF6), modulando a via de sinalização TLR/NF- κ B, fundamental na neuroinflamação. Em adição, demonstrou-se que a recuperação da expressão deste miR em astrócitos corticais com mSOD1, através do pré-miR-16a, previne as alterações fenotípicas e a ocorrência das consequências deletérias parácrinas nos NMs e microglia, qualificando-o como um potencial alvo terapêutico no âmbito dos processos patogénicos em astrócitos na ELA (103).

Por sua vez, o miR-155 assume-se como um regulador crítico da neuroinflamação, contribuindo para a ativação das cascatas de sinalização pró-inflamatórias, constituindo o miRNA mais intensamente expresso na microglia da medula espinhal, tanto em doentes com ELA, como em modelos de rato

¹ miR, microRNA.

mSOD1^{G93A} (98). Num estudo de Butovsky et al. (2015), a sua deleção genética mostrou-se capaz de recuperar a microglia e diminuir o recrutamento de monócitos na medula espinhal de ratinhos com patologia SOD1 (104). A sobreexpressão do miR-155, em particular, parece ocorrer numa fase precoce, previamente ao início da doença e, sobretudo, na ausência de outros marcadores pró-inflamatórios, tornando-o um potencial biomarcador da ELA, numa fase pré-sintomática (97). Esta sobreexpressão ao nível da medula espinhal, nas fases mais iniciais da doença, pode traduzir uma tentativa de neuroproteção contra os mecanismos inflamatórios, incluindo a agregação de SOD1, com interferência concomitante da fagocitose microglial, desacelerando a sua progressão (25).

Relativamente à disfunção astrocitária, o miR-218 é libertado pelos NM em morte celular e captado pelos astrócitos, regulando, em simultâneo, a expressão do EAAT2 (99). Este miRNA desempenha, portanto, um papel fundamental na regulação da neurotransmissão glutamatérgica, cuja subregulação mostrou capaz de corrigir parcialmente a disfunção astrocitária, tendo por base um estudo de Hoye et al. (2018) (105).

6.5 Biomarcadores Gliais

A descoberta de biomarcadores fiáveis constitui uma prioridade máxima na investigação da ELA, nomeadamente de biomarcadores de diagnóstico que possam reduzir o tempo até ao diagnóstico (9 a 12 meses, presentemente) e facilitar o acesso célere a tratamentos eficazes, numa janela de oportunidade temporal mais alargada (42,65). O biomarcador ideal deverá revelar-se fiável e apresentar facilidade de medição, podendo associar-se, no caso da ELA, à progressão da doença, designadamente ao tempo entre cada fase, em detrimento da utilização de parâmetros como a sobrevivência (65,106). O estudo da patologia glial na ELA tem contribuído simultaneamente para o aumento de estudos em torno de múltiplos biomarcadores com potencial de translação significativo, particularmente úteis na avaliação dos diferentes fenótipos e progressão da doença (97).

Considerando que os astrócitos regulam diversas características passíveis de serem avaliadas por técnicas de neuroimagem e que a própria ativação microglial pode ser visualizada em imagem PET, biomarcadores baseados na glia apresentam resolução anatómica particularmente útil para monitorização local da resposta à terapêutica. Em adição, dado que as respostas inflamatórias associadas à glia alteram

a composição do plasma e do LCR, materializa-se a possibilidade de desenvolvimento de biomarcadores de atividade da doença (97,107).

Múltiplos biomarcadores centrais e periféricos relacionados com a função glial na ELA têm sido identificados, particularmente em virtude de avanços recentes na área da neuroimagem. A aplicação da técnica PET com recurso a ligandos TSPO (do inglês, *Translocator protein 18 kDa*), como o $[^{18}\text{F}]\text{-DPA-714}$, tem permitido verificar de forma direta no SNC os fenómenos de neuroinflamação e diversos marcadores de ativação glial (97).

Outros biomarcadores assentes na disfunção glial na ELA têm sido validados em sangue e no LCR, como marcadores surrogados da ativação inflamatória (97). Em doentes com ELA, foram detetados níveis elevados de IL-4, IL-7, IL-10, IL-17 e G-CSF (Fator estimulador de colónias de granulócitos) no LCR (97). Títulos mais elevados de IL-4 e IL-10 são encontrados em doentes com quadros sintomatológicos menos severos, podendo configurar-se como potenciais assinaturas de citocinas em doentes com uma progressão mais lenta da doença (97). Em contraste, níveis diminuídos da proteína primariamente expressa em astrócitos, a S100 β , têm sido detetados no líquor (97). Níveis aumentados de IL-6 em exossomas derivados de astrócitos foram também já reportados em doentes com sALS. Tal parece enrobustecer a evidência em torno do marcado potencial que os exossomas derivados do SNC apresentam nos doentes com ELA, associando-se positivamente à taxa de progressão da doença (36).

Já no que diz respeito a estudos pré-clínicos em torno de biomarcadores no plasma, a investigação é, contudo, menos robusta (97). Níveis aumentados de G-CSF e TNF- α foram, por exemplo, encontrados no plasma, num estudo de Furukawa et al. (2015), consistente com o aumento das IL-17 e IL-23 no trabalho de Saresella et al. (2013), estas últimas possivelmente correlacionados com a contribuição das células Th17 no contexto da resposta imunitária na ELA (108,109).

Em adição, os exossomas derivados do SNC destacam-se por atravessarem a BHE e acederem à circulação sistémica, sendo facilmente detetáveis nos fluidos biológicos, como sangue, LCR e urina (42). As biópsias líquidas são minimamente invasivas e exequíveis, providenciando informação significativa sobre a patogénese das doenças. (42). Num trabalho de Sproviero et al. (2019), foram inclusivamente reportados níveis elevados de microvesículas derivadas de leucócitos em doentes com ELA que se correlacionaram com a taxa de progressão observada na última visita, enquadrando-se como possíveis biomarcadores de progressão da doença (110). Chen et al. (2019) reportaram também níveis aumentados de IL-6 em

exossomas derivados de astrócitos, a partir do plasma de doentes com sALS, correlacionando-se positivamente com a progressão da doença, um achado consistente com o papel da neuroinflamação na ELA (111). Em articulação, a possibilidade de desenvolvimento de estratégias baseadas em miRNAs apresenta-se igualmente promissora, na medida em que a sua inibição poderia prevenir a ligação a genes alvos, através de sequências oligonucleotídicas quimicamente modificadas e, mais concretamente, veiculadas através de exossomas (99).

No que respeita a potenciais biomarcadores baseados em miRNAs associados à inflamação (*inflama-miRNAs*), a investigação é ainda pouco robusta. Um dos inflama-miRNAs mais promissores, a título de exemplo, e sobretudo nas fases mais precoces, é o miR-155, descrito num quadro de sobreexpressão por Cunha et al. (2017) (25). Também Benigni et al. (2016) evidenciaram a sobreexpressão do miR181a-p e a subregulação do miR21-5p e miR15b-5p como potenciais biomarcadores da doença. O estudo envolveu a determinação dos perfis de regulação de miRNAs implicados nas vias apoptóticas e degeneração motora, no LCR de 24 doentes com ELA (112). Um estudo recente de Dobrowolny et al. (2021) permitiu também identificar, entre os demais, o miR-199a-5p como um potencial biomarcador de diagnóstico, num contexto de desregulação temporalmente consistente com a hiperativação microglial e neuroinflamação persistente. O estudo objetivou a quantificação absoluta de miRNAs circulantes em doentes com ELA, possibilitando a discriminação entre doentes com uma progressão de doença lenta da rápida (113).

Um tema emergente, no âmbito da descoberta de biomarcadores na ELA, prende-se com a necessidade cada vez mais evidente de identificar várias assinaturas de marcadores em combinação, de forma a reduzir a dependência sobre a variabilidade interindividual (106). Sheinerman et al. (2017) identificaram 37 miRNAs associados à inflamação no plasma de doentes com ELA e outras DN, sendo que a combinação de três pares de miRNAs (miR206/miR338-3p, miR9/miR129-3p e miR335-5p/miR338-3p) permitiu discriminar doentes com ELA dos controlos na respetiva coorte, com uma sensibilidade e especificidade de 84% e 82%, respetivamente (114).

6.6 Estratégias Terapêuticas Focadas na Recuperação das Células Gliais

Atualmente prescrito na maioria dos doentes com ELA, o Riluzol parece acelerar a depuração dos elevados níveis de glutamato extracelulares, podendo ainda prevenir a libertação deste mesmo neurotransmissor a partir dos terminais pré-sinápticos, num mecanismo ainda não totalmente elucidado (36,67). Presentemente, todos os outros procedimentos clínicos utilizados em doentes com ELA visam essencialmente a prática de cuidados paliativos, através de assistência respiratória e terapia física, sendo considerada, no limite, a eutanásia (36,65).

Uma das abordagens terapêuticas mais recentemente consideradas consiste na utilização de um inibidor da tirosina cinase, o masitinib, cujo mecanismo de ação se prevê estar associado à redução da inflamação promovida pelas células da microglia, ao nível dos neurónios motores do encéfalo e medula espinhal. Num ensaio clínico de fase 3, com a duração de 48 semanas, a administração deste fármaco, em conjunto com o riluzol, demonstrou uma redução do declínio funcional em cerca de 27% (*clinicaltrials.gov* ID: NCT02588677) (36).

Nos últimos anos, dezenas de fármacos têm sido propostos como promissores no tratamento da ELA, no âmbito de ensaios pré-clínicos. Contudo, dificuldades significativas associadas à complexidade da doença têm inviabilizado a tradução deste potencial para a realidade dos doentes (68). A maioria dos estudos pré-clínicos focados na glia podem ser integrados em categorias distintas em função dos alvos terapêuticos, tais como a captação astrocitária de glutamato, desenvolvimento de astrogliose e ativação microglial, associando-se aos fenótipos pró-inflamatórios da microglia (5).

Aumento dos Níveis de Transportadores Glutamatérgicos EAAT2 (GLT-1)

Um conjunto vasto de estudos têm direcionado o seu foco para a disfunção da captação do glutamato extracelular pelos astrócitos, cuja concentração excessiva poderá despoletar a ativação de recetores glutamatérgicos em NM e conseqüente morte celular (68,115). Neste sentido, Lapucci et al. (2017) investigaram o efeito de um inibidor das Desacetilases de Histonas (HDACs) pertencentes à Classe II, o fármaco experimental MC1568M (115). Estas enzimas com atividade epigenética encontram-se responsáveis pela desacetilação de proteínas envolvidas na regulação

transcricional, influenciando a expressão genética. O grupo reportou um aumento da expressão de EAAT2 em culturas primárias de astrócitos, não observando, contudo, qualquer incremento da captação do neurotransmissor excitatório pelos astrócitos (115). Neste contexto, o potencial de estimulação da expressão de GLT-1 associada a antibióticos β -lactâmicos, tal como a ceftriaxona, foi igualmente explorado em modelos animais da ELA, por Rothstein et al. (1993), com sucesso registado ao nível da redução da perda de NM e sobrevivência aumentada dos ratinhos (116). Ainda assim, em ensaios clínicos de fase III, a eficácia clínica do agente não se revelou considerável, ocorrendo a suspensão dos mesmos (68). O potencial antioxidante, anti-inflamatório e antiapoptótico das antocianinas, nomeadamente a de um constituinte primário, a calistefina, foi também explorado, em ratinhos com patologia *mSOD1^{G93A}*, por Winter et al. (2018). Demonstrou-se uma preservação significativa da força muscular no decurso da progressão da ELA e redução da astrogliose ao nível da medula espinhal, em termos de histopatologia (117).

Modulação da Ativação Microglial e Astrocitária

Uma grande proporção de agentes antioxidantes tem vindo a ser aplicada com o objetivo de travar o papel crítico do stress oxidativo na perda de NM na ELA (68). Fármacos como a bromocriptina, um agonista dos recetores dopaminérgicos D2, foram considerados em ensaios pré-clínicos em ratinhos com patologia *mSOD1^{H46R}*, em virtude da sobreexpressão da proteína inibitória da apoptose neuronal (NAIP). Neste estudo de Tanaka et al. (2011), a administração após o início da sintomatologia permitiu assegurar o desempenho motor, suprimir a perda de NM na medula, reduzir a ativação de astrócitos e a produção de fatores inflamatórios (118).

Outras estratégias incluem ainda fitocanabinoides, canabinoides sintéticos e lípidos constituintes do sistema endocanabinoide, em virtude dos seus putativos efeitos neuroprotetores. A administração de canabigerol, por exemplo num estudo de Rodriguez-Cueto (2018), promoveu a ativação de recetores por proliferadores peroxissomais (PPARs), um grupo de fatores de transcrição que permitiu anteriormente atenuar a perda de NM colinérgicos da medula de ratinhos *mSOD1^{G93A}* e reduzir a reatividade astrogliosa (119).

Recetores de quimiocinas, como o CXCR4, a par do ligando CXCL12, parecem igualmente constituir potenciais alvos terapêuticos a explorar na ELA, dado que a sua inibição permitirá a prevenção da apoptose neuronal e alterar de forma célere a

migração das células hematopoiéticas estaminais e progenitoras (HSPCs). Parecem igualmente modular a função neuronal e a apoptose através da sinalização da libertação de glutamato (68). Outras moléculas antioxidantes perspetivadas com resultados satisfatórios na atenuação da inflamação em ensaios pré-clínicos, incluem inibidores do recetor do fator estimulador de colónias 1 (CSF1R) e IGF-1 (68,83). Anti-histamínicos de primeira geração, como a clemastina, foram igualmente investigados, com resultados favoráveis ao nível da redução da microgliose e aumento da sobrevivência dos NM, afirmando-se como uma potencial terapêutica modificadora da doença (68,83).

Atendendo, em concomitância, que múltiplos fenótipos microgliais e astrocitários coexistem após o início da doença, é também cada vez mais reforçada uma perspetiva de desenvolvimento de terapêuticas combinadas. Tal permitirá alcançar uma maior eficácia no desaceleramento da progressão da ELA, através da combinação de várias intervenções moleculares com funções pleiotrópicas, no sentido da neuroprotecção global (25).

Esteróides neuroativos

Os esteroides neuroativos, como a progesterona, encontram-se atualmente disponíveis como alternativas terapêuticas em várias doenças do SNC, prevenindo a perda neuronal após trauma. Nas DN, esta parece ser eficaz na melhoria da função mitocondrial e, concomitantemente, despoleta efeitos neuroprotectors já validados na DA e DH (68).

Num estudo de Gargiulo-Monachelli et al. (2019), em ratinhos Wobbler, a administração subcutânea de progesterona mostrou ser capaz de atenuar a neuropatologia, inibir o stress oxidativo, recuperar o transporte axonal e aumentar a expressão de genes envolvidos no funcionamento dos NM (120). Num outro estudo com ratinhos de patologia *mSOD1^{G93A}*, de Kassa et al. (2017), esteroides anabólicos, como a nandrolona, mostraram exercer um efeito marcado na ativação de astrócitos, sendo que, em combinação com exercício físico, a ativação da microglia ocorreu em conjunto com uma lesão menos severa dos NM, atribuindo-se-lhe a este último um potencial papel neuroprotector (121).

Ensaio Clínico: Uma Perspetiva de Futuro

Apesar de muitos dos novos fármacos avaliados se revelarem clinicamente seguros e toleráveis pelos doentes, a maioria dos ensaios clínicos vê a sua viabilidade comprometida, na medida em que poucos conseguem demonstrar de forma robusta a eficácia clínica das moléculas em estudo. Presentemente, uma das abordagens terapêuticas de maior investimento reside na terapia génica para o tratamento da ELA, através de terapia génica *antisense*. O fármaco BIIB067 (Tofersen® da Biogen) configura-se como a terapêutica mais promissora, tratando-se de um oligonucleótido *antisense* que estabelece ligação com o mRNA codificante para a SOD1, endereçando a dupla cadeia de DNA para degradação, com conseqüente decréscimo dos níveis de mSOD1 (68). Encontram-se atualmente a decorrer ensaios clínicos de fase III (clinicaltrials.gov ID: NCT02623699).

Terapias Focadas em Astrócitos

O transplante de astrócitos tem acolhido cada vez mais interesse por parte dos investigadores, nomeadamente através de estratégias que incluem o transplante de linhagens de astrócitos especificamente modificadas para secretarem fatores de crescimento, existindo já alguns ensaios clínicos em curso focados no aumento da sobrevivência e desaceleração da perda neuronal (56,82). Algumas incógnitas permanecem por esclarecer, nomeadamente qual a localização ideal no SNC e qual a janela ótima de oportunidade temporal para proceder ao transplante de astrócitos (82).

Uma das estratégias emergentes de maior originalidade tem por base um estudo publicado de Izrael et al. (2018), focando-se no transplante de astrócitos derivados de células estaminais embrionárias humanas (hESC), cujos resultados preliminares sugeriram que o transplante destas células saudáveis promove a recuperação da função neurotóxica dos astrócitos endógenos na ELA (122). Nesta sequência, a empresa Kadimastem Ltd. (<https://www.kadimastem.com>) desenvolveu uma patente (AstroRx®) em torno de um tratamento que recorre à administração intratecal destes astrócitos funcionais ao nível da medula espinhal em doentes com ELA, visando o suporte de células disfuncionais no encéfalo e medula. No final de 2020, a empresa anunciou resultados encorajadores, relativos a ensaios clínicos de Fase 1/2a (clinicaltrials.gov ID: NCT03482050), divulgando que, numa monitorização de 6 meses pós-tratamento, nenhum efeito adverso ou problema de toxicidade relacionado com o

mesmo foram observados. Deu-se ainda conta de um declínio clínico significativo da progressão da doença durante os primeiros três dos 6 meses de seguimento médico, um resultado consistente entre as duas coortes de doentes participantes. Foi-lhe garantida a designação de medicamento órfão pela FDA, representando um potencial ponto de viragem no panorama das abordagens terapêuticas na ELA.

Outro tratamento promissor baseia-se no transplante alogénico, a nível lombar/cervical, de células progenitoras gliais humanas (hGRPs; Tecnologia Q-Cells® da empresa QTherapeutics), na medula espinhal de doentes com ELA. Ensaio clínico de fase 1 e 2 (clinicaltrials.gov ID: NCT02478450) têm início previsto para o final do presente ano, objetivando a avaliação inicial da sua segurança (parâmetro primário), tolerabilidade e eficácia preliminar. A utilização destes precursores das linhagens de astrócitos e oligodendrócitos no contexto terapêutico da ELA permitirá o enriquecimento celular do sistema nervoso através do transplante de astrócitos derivados de dadores saudáveis.

A premissa de um outro ensaio clínico com um tratamento focado nas células da glia consiste no transplante de células progenitoras neurais, geneticamente modificadas de modo a produzir o fator neurotrófico derivado de uma linhagem celular glial (GDNF), na medula espinhal de doentes com ELA. A diferenciação é restrita para astrócitos e pretende promover a sobrevivência das células neurais, designando-se CNS10-NPC-GDNF. O ensaio clínico de fase 1/2a (clinicaltrials.gov ID: NCT02943850), com ocultação, centra-se na avaliação da segurança de duas doses crescentes destas células, sob administração na região lombar em doentes com envolvimento moderado dos membros inferiores. Os fenótipos astrocitários senescentes tendem a perder a capacidade de suporte trófico dos NM, promovendo a neuroinflamação. Uma vez que este fenómeno de senescência pode ser revertido pelo GDNF, prevê-se que o transplante de astrócitos jovens possa influenciar a atividade deletéria das células da glia no microambiente celular da ELA (123).

Modulação do Sistema Imunitário

Assinala-se existência de múltiplos ensaios clínicos focados na infusão autóloga de linfócitos T reguladores (Treg), juntamente com a administração de interleucinas, como a IL-2, nas fases precoce e avançada da doença ELA em doentes com distintas velocidades de progressão (clinicaltrials.gov ID: NCT04055623). Considerando que a microglia e as Treg constituem elementos críticos na patogénese da ELA, a modulação de tais alvos terapêuticos apresenta um potencial de conversão de um

ambiente essencialmente pró-inflamatório, neurotóxico para um anti-inflamatório, em condições de neuroprotecção, influenciando o início e progressão da doença. Nesta linha, ensaios clínicos focados no transplante fecal do microbioma na ELA são também uma realidade, visando um aumento do número de células Treg e a modulação do sistema imunitário próximo dos NM, no sentido de um estado neuroprotetor, anti-inflamatório. A maioria destas intervenções pretendem ser validadas na prevenção da progressão da doença nas fases mais iniciais.

Adicionalmente, Cunha et al. (2017) identificaram um conjunto de potenciais alvos terapêuticos que poderão constituir estratégias neuroprotetoras no tratamento da ELA, nomeadamente miRNAs associados à neuroinflamação, inflamassoma NLRP3, alarmina HMGB1, CX3CL1-CX3CR1, Cx-43 e Panexina-1 (25). A sobreexpressão do miR-155, por exemplo, foi identificada como um potencial alvo farmacológico em fases muito precoces da ELA, numa fase pré-sintomática (25).

Terapias baseadas em Células Estaminais

Ensaio com diferentes tipos de células estaminais como células estaminais mesenquimatosas (CEM) ou células estaminais neurais (CENs) têm sido conduzidos ao longo dos últimos anos, com relativo sucesso (68). Um dos principais obstáculos associados prende-se com o reduzido poder estatístico que tende a pautar a maioria dos estudos (68). Os principais efeitos decorrentes da utilização de CEMs passam pelo suporte à produção de fatores tróficos, citocinas imunomoduladoras e anti-inflamatórias, com diminuição da excitotoxicidade (124). *NurOwn*® (BrainStorm Cell Therapeutics, Inc.) constitui um dos tratamentos mais destacados, baseando-se no transplante autólogo de CEMs da medula óssea e consequente modificação *ex vivo* que permite a indução da secreção de fatores neurotróficos (células MSC-NTF). A libertação direta e local destes fatores aumentará a sobrevivência das células neuronais, desacelerando a progressão da ELA. No final de 2020, foi concluído um ensaio clínico de fase III, aleatorizado, multicêntrico e com dupla ocultação (*clinicaltrials.gov* ID: NCT03280056), focado na avaliação da segurança e eficácia de administrações repetidas, via intratecal, de *NurOwn*®. Ainda assim, a apreciação mais recente da FDA aponta que as diferenças encontradas entre as respostas aos tratamentos (*NurOwn* vs. placebo) não foram estatisticamente significativas para demonstrar de forma robusta o seu benefício clínico e, assim, suportar a sua aprovação na população de doentes com ELA. O relatório da FDA baseia-se no facto de o parâmetro primário (desaceleramento da progressão da doença) não ter sido

atingido, isto é, referindo-se à proporção de doentes que apresentaram uma velocidade de declínio 1,25 vezes inferior, de acordo com a *ALS Functional Rating Scale* (ALSFRS-R). (125)

Vesículas Extracelulares: Exossomas

Os exossomas representam ferramentas com imenso potencial de aplicabilidade terapêutica, nomeadamente na qualidade de sistemas de libertação de moléculas bioativas como fármacos, proteínas, miRNAs não codificantes e agentes de terapia génica, tendo os neurónios e a glia como células alvo no âmbito de doenças do SNC (84). Entre as principais vantagens, relevam-se a elevada estabilidade quando em circulação, excelente biocompatibilidade, fraca imunogenicidade e toxicidade, a par da presença de moléculas de superfície e afinidade elevada para tecidos, permitindo diminuir o risco de efeitos fora do alvo (42). Em termos de limitações, debate-se o desafio da purificação destas vesículas e otimização da respetiva carga, assegurando simultaneamente a manutenção da sua estrutura e eficácia funcional (42).

A modulação das funções das VE, enquanto transportadores putativos de proteínas “mal dobradas” patológicas em DN, poderá revelar-se benéfica no sentido de prevenir a neurodegeneração (42). Existem várias estratégias focadas nas diferentes etapas das vias associadas, nomeadamente na formação de vesículas, libertação, tráfego e captação (42). Numa outra perspetiva, as células estaminais secretam exossomas contendo fatores derivados de células que, sob um efeito parácrino, modulam o ambiente local. As CEMs, isoladas de tecido fetal e adulto, apresentam inclusive efeitos benéficos mediados, em parte, pela secreção de exossomas (42). Num estudo de Lopez-Verrilli et al. (2016), verificou-se que exossomas derivados de CEMs humanas promoviam de forma seletiva o crescimento de neurites em culturas de neurónios corticais, configurando-se como uma estratégia terapêutica bastante atrativa para o tratamento de doenças como a ELA (126). A utilização de exossomas derivados de astrócitos constitui uma estratégia já validada *in vivo*, sendo que num recente estudo de Bonafede et al. (2020), em modelo de ratinho mSOD1, a administração repetida de exossomas derivados de astrócitos mostrou melhorar o desempenho motor e reduzir a ativação glial, protegendo os NM espinhais da neurodegeneração e poupando a junção neuromuscular (127).

Em jeito de conclusão, é possível inferir que o nível de conhecimento em torno da patologia multicelular da ELA tem propulsionado a investigação e desenvolvimento de

terapêuticas baseadas nas propriedades das células da glia. Em virtude do reconhecimento do impacto das células gliais na sobrevivência e função dos NM, assiste-se a um ponto de viragem na abordagem de potenciais terapêuticas que permitirá, a longo prazo, alterar o prognóstico desta doença (68). O atual estado da arte da terapia génica, focada na interferência da função de astrócitos endógenos, é também um excelente indicador da presente revolução terapêutica, materializando-se, por exemplo, na tecnologia miQure® que objetiva a subregulação da expressão de *C9orf92* (82). A veiculação destas terapêuticas através da BHE e o conhecimento ainda rudimentar em torno da relação entre astrócitos e neurónios constituem desafios a considerar (82).

7. Conclusão e Perspetivas Futuras

As conquistas brilhantes da Medicina Moderna e os esforços da Saúde Pública no sentido de redução da mortalidade precoce e associada à meia-vida relativamente a determinados cancros, doenças infecciosas e doenças cardiovasculares traduzem, por um lado, um incremento da longevidade e um inexorável aumento da população envelhecida, efetivamente mais suscetível ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Em concreto, a perda neuronal progressiva em regiões do encéfalo e/ou medula espinhal transpõe-se potencialmente em défices cognitivos, disfunção motora e alterações comportamentais, constituindo-se como patologias verdadeiramente debilitantes, sobretudo nas fases mais avançadas.

Atendendo a que os fenómenos mecanísticos subjacentes à etiologia e fisiopatologia destas doenças não foram ainda integralmente elucidados, existe uma franca urgência em torno do desenvolvimento de terapêuticas modificadoras da doença seguras e eficazes. Uma visão partilhada pela OMS que sugere a possibilidade de, no futuro, as DN primariamente associadas à disfunção motora representarem a segunda causa mais prevalente de morte, seguindo-se às doenças cardiovasculares.

Com efeito, as doenças de Alzheimer, Parkinson, Esclerose Lateral Amiotrófica e de Huntington traduzem as condições neurodegenerativas mais comuns, de maior impacto económico e, mais importantemente, com maior peso em termos de saúde pública. Neste âmbito de investigação, os fatores genéticos têm sido, pois, reconhecidos como preponderantes na progressão da neurodegeneração, a par da deposição e agregação de proteínas tóxicas e da disfunção mitocondrial.

Nos últimos anos, assiste-se, em paralelo, a um renovado interesse no estudo do papel desempenhado pelas células da microglia e astrócitos no fenómeno da neurodegeneração, sustentado, em parte, pela crescente disponibilidade de novas técnicas de sequenciamento com resolução celular, rápidas e custo-efetivas. Novos métodos de isolamento e cultura *in vivo* destas mesmas e o investimento em modelos que integram ambos os tipos celulares têm igualmente iluminado este período de “Renascimento” da glia, no contexto das DN, permitindo discriminar processos de comunicação intercelular e enquadrá-los do ponto de vista funcional no SNC. Uma face inexorável deste trilho de investigação prende-se seguramente com a emergência das designadas tecnologias “ómicas” na Biomedicina, como a transcriptómica, epigenética e proteómica, que possibilitam o estudo do secretoma e

do proteoma da microglia e astrócitos e, em adição, conhecer profundamente a dinâmica de diálogo intercelular em diferentes contextos genéticos e ambientais.

Encontra-se estabelecido que uma das principais funções da glia no SNC passa pela coordenação de respostas em contexto de doença, infecção e lesão. Em sequência, a ativação de processos de neuroinflamação extrema envolvem uma verdadeira orquestra de mecanismos transcricionais responsáveis pela secreção de citocinas e neurotransmissores que, por seu turno, ativam respostas dos sistemas de imunidade inata e adaptativa. Por conseguinte, almeja-se a compreensão dos fenómenos de imunomodulação da microglia e dos astrócitos, nomeadamente da relação existente entre o grau de estimulação inflamatória e a magnitude da resposta imunitária desencadeada, enquadrando-a numa janela de oportunidade temporal. Uma das linhas de investigação mais promissoras assenta então na elucidação do efeito inibitório de astrócitos ativados na função microglial e dos mecanismos moleculares específicos que poderão validar a conversão do fenótipo pró-inflamatório para o estado anti-inflamatório da microglia.

Neste sentido, considerando a gravidade, o estadiamento e o enquadramento temporal do início da doença neurodegenerativa como determinantes dos diferentes fenótipos microgliais, entende-se prioritária a realização de estudos funcionais focados nas assinaturas moleculares específicas das DN para cada um dos fenótipos do conjunto microglia-neurónio-astrócitos, integrando-as igualmente em cada fase do curso da doença. A precisão temporal e a contextualização das mesmas na evolução da patologia permitirá a identificação de potenciais alvos terapêuticos e biomarcadores determinantes para um diagnóstico desejavelmente cada vez mais precoce.

Lado a lado com esta possível abordagem de imunomodulação da microglia, poderá estar ainda a inibição cruzada de outras vias de sinalização relevantes nas células neuronais e em astrócitos, as quais poderão concorrer para um efeito sinérgico na neurodegeneração.

Há ainda a relevar a necessidade de investimento em modelos humanos que permitam ultrapassar a fraca capacidade de recapitular a complexidade da doença nos modelos animais. Os organoides cerebrais, derivados de células estaminais pluripotentes induzidas, em consequência do seu carácter mais fisiológico, ao recapitularem todos os componentes celulares do SNC, e da sua própria tridimensionalidade, afirmam-se como promissoras metodologias *in vitro* de elevada

reprodutibilidade que poderão também ajudar na identificação de potenciais terapêuticas ao longo do curso da patologia, inclusivamente na fase pré-clínica.

A verdade é que a realidade enfrentada atualmente pelos doentes deverá nortear um projeto colaborativo entre investigadores de bancada, centros de investigação clínica, corpo médico especializado e Indústria Farmacêutica, em busca do desenvolvimento de terapêuticas inovadoras e seguras que permitam executar um diagnóstico precoce e garantir um prognóstico melhorado. Em última análise, os mais recentes avanços científicos permitem sonhar uma realidade diferente para estes doentes, alinhada com uma maior e melhor qualidade de vida, em toda a sua plenitude, na qual se possam movimentar, pensar, sentir, recordar e decidir. O futuro para as DN mostra-se auspicioso, munamo-nos então de ferramentas para o concretizar.

Referências Bibliográficas

1. Erkkinen MG, Kim M-O, Geschwind MD. Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018;10:a033118. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033118>.
2. Feigin VL, Abajobir AA, Abate KH, Abd-Allah F, Abdulle AM, Abera SF, et al. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Neurol* 2017;16:877–97. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30299-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30299-5).
3. Keswani C. *Bioeconomy for Sustainable Development*. Singapore: Springer Singapore; 2020. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-9431-7>.
4. Gleichman AJ, Carmichael ST. Glia in neurodegeneration: Drivers of disease or along for the ride? *Neurobiol Dis* 2020;142:104957. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104957>.
5. Stevenson R, Samokhina E, Rossetti I, Morley JW, Buskila Y. Neuromodulation of Glial Function During Neurodegeneration. *Front Cell Neurosci* 2020;14:1–23. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00278>.
6. Kaminsky N, Bihari O, Kanner S, Barzilai A. Connecting Malfunctioning Glial Cells and Brain Degenerative Disorders. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2016;14:155–65. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.04.003>.
7. Bernaus A, Blanco S, Sevilla A. Glia Crosstalk in Neuroinflammatory Diseases. *Front Cell Neurosci* 2020;14:1–17. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00209>.
8. Park JY, Kang YW, Cho WG. Inflammasome-Mediated Inflammation in Neurodegenerative Diseases. *Open Neurol J* 2019;13:55–62. <https://doi.org/10.2174/1874205X01913010055>.
9. Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science* 2016;353:777–83. <https://doi.org/10.1126/science.aag2590>.
10. Kandel E, Schwartz J, Jessell T, Siegelbaum S, Hudspeth A. *Principles of Neural Science*. 5th ed. New York: McGraw-Hill Education / Medical; 2012.
11. von Bartheld CS, Bahney J, Herculano-Houzel S. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J Comp Neurol* 2016;524:3865–95. <https://doi.org/10.1002/cne.24040>.
12. Palmer AL, Ousman SS. Astrocytes and Aging. *Front Aging Neurosci* 2018;10:1–14. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00337>.
13. Salas IH, Burgado J, Allen NJ. Glia: victims or villains of the aging brain? *Neurobiol Dis*

- 2020;143:105008. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105008>.
14. Giovannoni F, Quintana FJ. The Role of Astrocytes in CNS Inflammation. *Trends Immunol* 2020;41:805–19. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.007>.
 15. Cunningham C, Dunne A, Lopez-Rodriguez AB. Astrocytes: Heterogeneous and Dynamic Phenotypes in Neurodegeneration and Innate Immunity. *Neurosci* 2019;25:455–74. <https://doi.org/10.1177/1073858418809941>.
 16. Strohm L, Behrends C. Glia-specific autophagy dysfunction in ALS. *Semin Cell Dev Biol* 2020;99:172–82. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.05.024>.
 17. Ben Haim L, Ceyzeriat K, Carrillo-de Sauvage MA, Aubry F, Auregan G, Guillemier M, et al. The JAK/STAT3 Pathway Is a Common Inducer of Astrocyte Reactivity in Alzheimer's and Huntington's Diseases. *J Neurosci* 2015;35:2817–29. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3516-14.2015>.
 18. Harry GJ, Kraft AD. Microglia in the developing brain: A potential target with lifetime effects. *Neurotoxicology* 2012;33:191–206. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.01.012>.
 19. Weinhard L, di Bartolomei G, Bolasco G, Machado P, Schieber NL, Neniskyte U, et al. Microglia remodel synapses by presynaptic trogocytosis and spine head filopodia induction. *Nat Commun* 2018;9:1228. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03566-5>.
 20. Angelova DM, Brown DR. Microglia and the aging brain: are senescent microglia the key to neurodegeneration? *J Neurochem* 2019;151:676–88. <https://doi.org/10.1111/jnc.14860>.
 21. Vainchtein ID, Molofsky A V. Astrocytes and Microglia: In Sickness and in Health. *Trends Neurosci* 2020;43:144–54. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.01.003>.
 22. Dubbelaar ML, Kracht L, Eggen BJL, Boddeke EWGM. The Kaleidoscope of Microglial Phenotypes. *Front Immunol* 2018;9:1753. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01753>.
 23. Gopinath A, Collins A, Khoshbouei H, Streit WJ. Microglia and Other Myeloid Cells in Central Nervous System Health and Disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2020;375:154–60. <https://doi.org/10.1124/jpet.120.265058>.
 24. Palpagama TH, Waldvogel HJ, Faull RLM, Kwakowsky A. The Role of Microglia and Astrocytes in Huntington's Disease. *Front Mol Neurosci* 2019;12:1–15. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00258>.
 25. Cunha C, Santos C, Gomes C, Fernandes A, Correia AM, Sebastião AM, et al. Downregulated Glia Interplay and Increased miRNA-155 as Promising Markers to Track ALS at an Early Stage. *Mol Neurobiol* 2017;55:4207–24. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0631-2>.

26. Greenwood EK, Brown DR. Senescent Microglia: The Key to the Ageing Brain? *Int J Mol Sci* 2021;22:4402. <https://doi.org/10.3390/ijms22094402>.
27. Hatrock D, Caporicci-Dinucci N, Stratton J. Ependymal cells and multiple sclerosis: proposing a relationship. *Neural Regen Res* 2020;15:263. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.265551>.
28. Moore SA. The Spinal Ependymal Layer in Health and Disease. *Vet Pathol* 2016;53:746–53. <https://doi.org/10.1177/0300985815618438>.
29. Marcuzzo S, Kapetis D, Mantegazza R, Baggi F, Bonanno S, Barzago C, et al. Altered miRNA expression is associated with neuronal fate in G93A-SOD1 ependymal stem progenitor cells. *Exp Neurol* 2014;253:91–101. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.12.007>.
30. Natale G, Limanaqi F, Busceti CL, Mastroiacovo F, Nicoletti F, Puglisi-Allegra S, et al. Glymphatic System as a Gateway to Connect Neurodegeneration From Periphery to CNS. *Front Neurosci* 2021;15:1–13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.639140>.
31. Stratton JA, Shah P, Sinha S, Crowther E, Biernaskie J. A tale of two cousins: Ependymal cells, quiescent neural stem cells and potential mechanisms driving their functional divergence. *FEBS J* 2019;286:3110–6. <https://doi.org/10.1111/febs.14930>.
32. Kuhn S, Gritti L, Crooks D, Dombrowski Y. Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells* 2019;8:1424. <https://doi.org/10.3390/cells8111424>.
33. Mot AI, Depp C, Nave K. An emerging role of dysfunctional axon-oligodendrocyte coupling in neurodegenerative diseases. *Dialogues Clin Neurosci* 2018;20:283–93.
34. Tognatta R, Miller RH. Contribution of the oligodendrocyte lineage to CNS repair and neurodegenerative pathologies. *Neuropharmacology* 2016;110:539–47. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.04.026>.
35. Fischer FU, Wolf D, Scheurich A, Fellgiebel A. Altered whole-brain white matter networks in preclinical Alzheimer's disease. *NeuroImage Clin* 2015;8:660–6. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2015.06.007>.
36. Spaas J, van Veggel L, Schepers M, Tiane A, van Horssen J, Wilson DM, et al. Oxidative stress and impaired oligodendrocyte precursor cell differentiation in neurological disorders. *Cell Mol Life Sci* 2021;78:4615–37. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03802-0>.
37. Arneson D, Zhang Y, Yang X, Narayanan M. Shared mechanisms among neurodegenerative diseases: from genetic factors to gene networks. *J Genet* 2018;97:795–806. <https://doi.org/10.1007/s12041-018-0963-3>.
38. Li MD, Burns TC, Morgan AA, Khatri P. Integrated multi-cohort transcriptional meta-

- analysis of neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol Commun* 2014;2:93. <https://doi.org/10.1186/s40478-014-0093-y>.
39. Sankowski R, Mader S, Valdés-Ferrer SI. Systemic Inflammation and the Brain: Novel Roles of Genetic, Molecular, and Environmental Cues as Drivers of Neurodegeneration. *Front Cell Neurosci* 2015;9:1–20. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00028>.
 40. Obrador E, Salvador R, López-Blanch R, Jihad-Jebbar A, Vallés SL, Estrela JM. Oxidative Stress, Neuroinflammation and Mitochondria in the Pathophysiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Antioxidants* 2020;9:901. <https://doi.org/10.3390/antiox9090901>.
 41. Kwon HS, Koh S-H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener* 2020;9:42. <https://doi.org/10.1186/s40035-020-00221-2>.
 42. Gagliardi D, Bresolin N, Comi G Pietro, Corti S. Extracellular vesicles and amyotrophic lateral sclerosis: from misfolded protein vehicles to promising clinical biomarkers. *Cell Mol Life Sci* 2021;78:561–72. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03619-3>.
 43. Dilger RN, Johnson RW. Aging, microglial cell priming, and the discordant central inflammatory response to signals from the peripheral immune system. *J Leukoc Biol* 2008;84:932–9. <https://doi.org/10.1189/jlb.0208108>.
 44. Matejuk A, Ransohoff RM. Crosstalk Between Astrocytes and Microglia: An Overview. *Front Immunol* 2020;11:1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01416>.
 45. Jha MK, Jo M, Kim J-H, Suk K. Microglia-Astrocyte Crosstalk: An Intimate Molecular Conversation. *Neurosci* 2019;25:227–40. <https://doi.org/10.1177/1073858418783959>.
 46. Hu N-Y, Chen Y-T, Wang Q, Jie W, Liu Y-S, You Q-L, et al. Expression Patterns of Inducible Cre Recombinase Driven by Differential Astrocyte-Specific Promoters in Transgenic Mouse Lines. *Neurosci Bull* 2020;36:530–44. <https://doi.org/10.1007/s12264-019-00451-z>.
 47. Congdon EE, Sigurdsson EM. Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 2018;14:399–415. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0013-z>.
 48. Guo T, Zhang D, Zeng Y, Huang TY, Xu H, Zhao Y. Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 2020;15:40. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00391-7>.
 49. Castanho I, Lunnon K. Epigenetic processes in Alzheimer's disease. *Chromatin Signal. Neurol. Disord.*, Elsevier; 2019, p. 153–80. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813796-3.00008-0>.
 50. Baig SS, Strong M, Quarrell OW. The global prevalence of Huntington's disease: a

- systematic review and discussion. *Neurodegener Dis Manag* 2016;6:331–43. <https://doi.org/10.2217/nmt-2016-0008>.
51. Garcia VJ, Rushton DJ, Tom CM, Allen ND, Kemp PJ, Svendsen CN, et al. Huntington's Disease Patient-Derived Astrocytes Display Electrophysiological Impairments and Reduced Neuronal Support. *Front Neurosci* 2019;13:1–14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00669>.
 52. Wilton DK, Stevens B. The contribution of glial cells to Huntington's disease pathogenesis. *Neurobiol Dis* 2020;143:104963. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104963>.
 53. Tran J, Anastacio H, Bardy C. Genetic predispositions of Parkinson's disease revealed in patient-derived brain cells. *Npj Park Dis* 2020;6:8. <https://doi.org/10.1038/s41531-020-0110-8>.
 54. Kam T-I, Hinkle JT, Dawson TM, Dawson VL. Microglia and astrocyte dysfunction in parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2020;144:105028. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105028>.
 55. Domingues A V., Pereira IM, Vilaça-Faria H, Salgado AJ, Rodrigues AJ, Teixeira FG. Glial cells in Parkinson's disease: protective or deleterious? *Cell Mol Life Sci* 2020;77:5171–88. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03584-x>.
 56. Gleichman AJ, Carmichael ST. Glia in neurodegeneration: Drivers of disease or along for the ride? *Neurobiol Dis* 2020;142:104957. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104957>.
 57. di Domenico A, Carola G, Calatayud C, Pons-Espinal M, Muñoz JP, Richaud-Patin Y, et al. Patient-Specific iPSC-Derived Astrocytes Contribute to Non-Cell-Autonomous Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *Stem Cell Reports* 2019;12:213–29. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.12.011>.
 58. Solano RM, Casarejos MJ, Menendez-Cuervo J, Rodriguez-Navarro JA, Garcia de Yébenes J, Mena MA. Glial Dysfunction in Parkin Null Mice: Effects of Aging. *J Neurosci* 2008;28:598–611. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4609-07.2008>.
 59. Yun SP, Kam T-I, Panicker N, Kim S, Oh Y, Park J-S, et al. Block of A1 astrocyte conversion by microglia is neuroprotective in models of Parkinson's disease. *Nat Med* 2018;24:931–8. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0051-5>.
 60. Scarrott JM, Herranz-Martín S, Alrafiah AR, Shaw PJ, Azzouz M. Current developments in gene therapy for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Biol Ther* 2015;15:935–47. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1044894>.
 61. Lattante S, Ciura S, Rouleau GA, Kabashi E. Defining the genetic connection linking amyotrophic lateral sclerosis (ALS) with frontotemporal dementia (FTD). *Trends Genet*

- 2015;31:263–73. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.03.005>.
62. Hardiman O, Al-Chalabi A, Chio A, Corr EM, Logroscino G, Robberecht W, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Dis Prim* 2017;3:17071. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.71>.
63. Brown RH, Al-Chalabi A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med* 2017;377:162–72. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1603471>.
64. Hulisz D. Amyotrophic Lateral Sclerosis: Disease State Overview. *Am J Manag Care* 2018;24:320–6.
65. van Es MA, Hardiman O, Chio A, Al-Chalabi A, Pasterkamp RJ, Veldink JH, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 2017;390:2084–98. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31287-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31287-4).
66. Morrice J, Gregory-Evans C, Shaw C. Animal models of amyotrophic lateral sclerosis: A comparison of model validity. *Neural Regen Res* 2018;13:2050. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.241445>.
67. Petrov D, Mansfield C, Moussy A, Hermine O. ALS Clinical Trials Review: 20 Years of Failure. Are We Any Closer to Registering a New Treatment? *Front Aging Neurosci* 2017;9:1–11. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00068>.
68. Filipi T, Hermanova Z, Tureckova J, Vanatko O, Anderova M. Glial Cells—The Strategic Targets in Amyotrophic Lateral Sclerosis Treatment. *J Clin Med* 2020;9:261. <https://doi.org/10.3390/jcm9010261>.
69. Barton SK, Gregory JM, Chandran S, Turner BJ. Could an Impairment in Local Translation of mRNAs in Glia be Contributing to Pathogenesis in ALS? *Front Mol Neurosci* 2019;12:1–8. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00124>.
70. Souza PVS de, Pinto WBVDR, Rezende Filho FM, Oliveira ASB. Far beyond the motor neuron: the role of glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr* 2016;74:849–54. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20160117>.
71. Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, et al. Onset and Progression in Inherited ALS Determined by Motor Neurons and Microglia. *Science* 2006;312:1389–92. <https://doi.org/10.1126/science.1123511>.
72. Barbeito AG, Mesci P, Boillée S. Motor neuron–immune interactions: the vicious circle of ALS. *J Neural Transm* 2010;117:981–1000. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0429-0>.
73. Kim S, Chung A, Na JE, Lee SJ, Jeong SH, Kim E, et al. Myelin degeneration induced by mutant superoxide dismutase 1 accumulation promotes amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* 2019. <https://doi.org/10.1002/glia.23669>.

74. Kang SH, Li Y, Fukaya M, Lorenzini I, Cleveland DW, Ostrow LW, et al. Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 2013;16:571–9. <https://doi.org/10.1038/nn.3357>.
75. Clarke BE, Patani R. The microglial component of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2020;143:3526–39. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa309>.
76. Geloso MC, Corvino V, Marchese E, Serrano A, Michetti F, D'Ambrosi N. The Dual Role of Microglia in ALS: Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Front Aging Neurosci* 2017;9. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00242>.
77. Ohgomori T, Yamada J, Takeuchi H, Kadomatsu K, Jinno S. Comparative morphometric analysis of microglia in the spinal cord of SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 2016;43:1340–51. <https://doi.org/10.1111/ejn.13227>.
78. Markovinovic A, Ljutic T, Béland L-C, Munitic I. Optineurin Insufficiency Disbalances Proinflammatory and Anti-inflammatory Factors by Reducing Microglial IFN- β Responses. *Neuroscience* 2018;388:139–51. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.07.007>.
79. Rostalski H, Leskelä S, Huber N, Katisko K, Cajanus A, Solje E, et al. Astrocytes and Microglia as Potential Contributors to the Pathogenesis of C9orf72 Repeat Expansion-Associated FTLN and ALS. *Front Neurosci* 2019;13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00486>.
80. Trageser KJ, Smith C, Herman FJ, Ono K, Pasinetti GM. Mechanisms of Immune Activation by c9orf72-Expansions in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *Front Neurosci* 2019;13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01298>.
81. Spiller KJ, Restrepo CR, Khan T, Dominique MA, Fang TC, Canter RG, et al. Microglia-mediated recovery from ALS-relevant motor neuron degeneration in a mouse model of TDP-43 proteinopathy. *Nat Neurosci* 2018;21:329–40. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0083-7>.
82. Izrael M, Slutsky SG, Revel M. Rising Stars: Astrocytes as a Therapeutic Target for ALS Disease. *Front Neurosci* 2020;14:1–8. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00824>.
83. Raffaele S, Boccazzi M, Fumagalli M. Oligodendrocyte Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Mechanisms and Therapeutic Perspectives. *Cells* 2021;10:565. <https://doi.org/10.3390/cells10030565>.
84. Beatriz M, Vilaça R, Lopes C. Exosomes: Innocent Bystanders or Critical Culprits in Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:1–17. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.635104>.
85. Pistono C, Bister N, Stanová I, Malm T. Glia-Derived Extracellular Vesicles: Role in

- Central Nervous System Communication in Health and Disease. *Front Cell Dev Biol* 2021;8:1–16. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.623771>.
86. Vaz AR, Pinto S, Ezequiel C, Cunha C, Carvalho LA, Moreira R, et al. Phenotypic Effects of Wild-Type and Mutant SOD1 Expression in N9 Murine Microglia at Steady State, Inflammatory and Immunomodulatory Conditions. *Front Cell Neurosci* 2019;13:1–15. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00109>.
87. Gomes C, Keller S, Altevogt P, Costa J. Evidence for secretion of Cu,Zn superoxide dismutase via exosomes from a cell model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 2007;428:43–6. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.09.024>.
88. Silverman JM, Fernando SM, Grad LI, Hill AF, Turner BJ, Yerbury JJ, et al. Disease Mechanisms in ALS: Misfolded SOD1 Transferred Through Exosome-Dependent and Exosome-Independent Pathways. *Cell Mol Neurobiol* 2016;36:377–81. <https://doi.org/10.1007/s10571-015-0294-3>.
89. Silverman JM, Christy D, Shyu CC, Moon K-M, Fernando S, Gidden Z, et al. CNS-derived extracellular vesicles from superoxide dismutase 1 (SOD1)G93A ALS mice originate from astrocytes and neurons and carry misfolded SOD1. *J Biol Chem* 2019;294:3744–59. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004825>.
90. Basso M, Pozzi S, Tortarolo M, Fiordaliso F, Bisighini C, Pasetto L, et al. Mutant Copper-Zinc Superoxide Dismutase (SOD1) Induces Protein Secretion Pathway Alterations and Exosome Release in Astrocytes. *J Biol Chem* 2013;288:15699–711. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.425066>.
91. Varianna A, Myszczyńska MA, Castelli LM, O'Neill B, Kim Y, Talbot J, et al. MicroRNAs secreted through astrocyte-derived extracellular vesicles cause neuronal network degeneration in C9orf72 ALS. *EBioMedicine* 2019;40:626–35. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.11.067>.
92. Ding X, Ma M, Teng J, Teng RKF, Zhou S, Yin J, et al. Exposure to ALS-FTD-CSF generates TDP-43 aggregates in glioblastoma cells through exosomes and TNTs-like structure. *Oncotarget* 2015;6:24178–91. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4680>.
93. Gomes C, Sequeira C, Barbosa M, Cunha C, Vaz AR, Brites D. Astrocyte regional diversity in ALS includes distinct aberrant phenotypes with common and causal pathological processes. *Exp Cell Res* 2020;395:112209. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112209>.
94. Liddel SA, Marsh SE, Stevens B. Microglia and Astrocytes in Disease: Dynamic Duo or Partners in Crime? *Trends Immunol* 2020;41:820–35. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.006>.
95. Talbott JF, Loy DN, Liu Y, Qiu MS, Bunge MB, Rao MS, et al. Endogenous

- Nkx2.2+/Olig2+ oligodendrocyte precursor cells fail to remyelinate the demyelinated adult rat spinal cord in the absence of astrocytes. *Exp Neurol* 2005;192:11–24. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.05.038>.
96. Ghasemi M, Keyhanian K, Douthwright C. Glial Cell Dysfunction in C9orf72-Related Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *Cells* 2021;10:249. <https://doi.org/10.3390/cells10020249>.
97. Garden GA, Campbell BM. Glial biomarkers in human central nervous system disease. *Glia* 2016;64:1755–71. <https://doi.org/10.1002/glia.22998>.
98. Nuzziello N, Liguori M. The MicroRNA Centrism in the Orchestration of Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases. *Cells* 2019;8:1193. <https://doi.org/10.3390/cells8101193>.
99. Bai Y, Su X, Piao L, Jin Z, Jin R. Involvement of Astrocytes and microRNA Dysregulation in Neurodegenerative Diseases: From Pathogenesis to Therapeutic Potential. *Front Mol Neurosci* 2021;14:1–11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.556215>.
100. Zhou F, Zhang C, Guan Y, Chen Y, Lu Q, Jie L, et al. Screening the expression characteristics of several miRNAs in G93A-SOD1 transgenic mouse: altered expression of miRNA-124 is associated with astrocyte differentiation by targeting Sox2 and Sox9. *J Neurochem* 2018;145:51–67. <https://doi.org/10.1111/jnc.14229>.
101. Parisi C, Arisi I, D'Ambrosi N, Storti AE, Brandi R, D'Onofrio M, et al. Dysregulated microRNAs in amyotrophic lateral sclerosis microglia modulate genes linked to neuroinflammation. *Cell Death Dis* 2013;4:e959–e959. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.491>.
102. Butovsky O, Siddiqui S, Gabriely G, Lanser AJ, Dake B, Murugaiyan G, et al. Modulating inflammatory monocytes with a unique microRNA gene signature ameliorates murine ALS. *J Clin Invest* 2012;122:3063–87. <https://doi.org/10.1172/JCI62636>.
103. Gomes C, Cunha C, Nascimento F, Ribeiro JA, Vaz AR, Brites D. Cortical Neurotoxic Astrocytes with Early ALS Pathology and miR-146a Deficit Replicate Gliosis Markers of Symptomatic SOD1G93A Mouse Model. *Mol Neurobiol* 2019;56:2137–58. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1220-8>.
104. Butovsky O, Jedrychowski MP, Cialic R, Krasemann S, Murugaiyan G, Fanek Z, et al. Targeting miR-155 restores abnormal microglia and attenuates disease in SOD1 mice. *Ann Neurol* 2015;77:75–99. <https://doi.org/10.1002/ana.24304>.
105. Hoye ML, Regan MR, Jensen LA, Lake AM, Reddy L V, Vidensky S, et al. Motor neuron-derived microRNAs cause astrocyte dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2018. <https://doi.org/10.1093/brain/awy182>.
106. Joilin G, Leigh PN, Newbury SF, Hafezparast M. An Overview of MicroRNAs as

- Biomarkers of ALS. *Front Neurol* 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00186>.
107. Swash M. Chitinases, neuroinflammation and biomarkers in ALS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2020;91:338–338. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2019-322520>.
108. Furukawa T, Matsui N, Fujita K, Nodera H, Shimizu F, Miyamoto K, et al. CSF cytokine profile distinguishes multifocal motor neuropathy from progressive muscular atrophy. *Neurol - Neuroimmunol Neuroinflammation* 2015;2:e138. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000138>.
109. Saresella M, Piancone F, Tortorella P, Marventano I, Gatti A, Caputo D, et al. T helper-17 activation dominates the immunologic milieu of both amyotrophic lateral sclerosis and progressive multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2013;148:79–88. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2013.04.010>.
110. Sproviero D, La Salvia S, Colombo F, Zucca S, Pansarasa O, Diamanti L, et al. Leukocyte Derived Microvesicles as Disease Progression Biomarkers in Slow Progressing Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients. *Front Neurosci* 2019;13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00344>.
111. Chen B-Y, Sung CW-H, Chen C, Cheng C-M, Lin DP-C, Huang C-T, et al. Advances in exosomes technology. *Clin Chim Acta* 2019;493:14–9. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.02.021>.
112. Benigni M, Ricci C, Jones AR, Giannini F, Al-Chalabi A, Battistini S. Identification of miRNAs as Potential Biomarkers in Cerebrospinal Fluid from Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients. *NeuroMolecular Med* 2016;18:551–60. <https://doi.org/10.1007/s12017-016-8396-8>.
113. Dobrowolny G, Martone J, Lepore E, Casola I, Petrucci A, Inghilleri M, et al. A longitudinal study defined circulating microRNAs as reliable biomarkers for disease prognosis and progression in ALS human patients. *Cell Death Discov* 2021;7:4. <https://doi.org/10.1038/s41420-020-00397-6>.
114. Sheinerman KS, Toledo JB, Tsvinsky VG, Irwin D, Grossman M, Weintraub D, et al. Circulating brain-enriched microRNAs as novel biomarkers for detection and differentiation of neurodegenerative diseases. *Alzheimers Res Ther* 2017;9:89. <https://doi.org/10.1186/s13195-017-0316-0>.
115. Lapucci A, Cavone L, Buonvicino D, Felici R, Gerace E, Zwergel C, et al. Effect of Class II HDAC inhibition on glutamate transporter expression and survival in SOD1-ALS mice. *Neurosci Lett* 2017;656:120–5. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.07.033>.
116. Rothstein JD, Jin L, Dykes-Hoberg M, Kuncl RW. Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:6591–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.14.6591>.

117. Winter AN, Ross EK, Wilkins HM, Stankiewicz TR, Wallace T, Miller K, et al. An anthocyanin-enriched extract from strawberries delays disease onset and extends survival in the hSOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nutr Neurosci* 2018;21:414–26. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1297023>.
118. Tanaka H, Shimazawa M, Kimura M, Takata M, Tsuruma K, Yamada M, et al. The potential of GPNMB as novel neuroprotective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Rep* 2012;2:573. <https://doi.org/10.1038/srep00573>.
119. Rodríguez-Cueto C, Santos-García I, García-Toscano L, Espejo-Porras F, Bellido MI, Fernández-Ruiz J, et al. Neuroprotective effects of the cannabigerol quinone derivative VCE-003.2 in SOD1G93A transgenic mice, an experimental model of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Pharmacol* 2018;157:217–26. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.07.049>.
120. Gargiulo-Monachelli G, Meyer M, Lara A, Garay L, Lima A, Roig P, et al. Comparative effects of progesterone and the synthetic progestin norethindrone on neuroprotection in a model of spontaneous motoneuron degeneration. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2019;192:105385. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105385>.
121. Kassa RM, Bonafede R, Boschi F, Bentivoglio M, Mariotti R. Effect of physical exercise and anabolic steroid treatment on spinal motoneurons and surrounding glia of wild-type and ALS mice. *Brain Res* 2017;1657:269–78. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.12.029>.
122. Izrael M, Slutsky SG, Admoni T, Cohen L, Granit A, Hasson A, et al. Safety and efficacy of human embryonic stem cell-derived astrocytes following intrathecal transplantation in SOD1G93A and NSG animal models. *Stem Cell Res Ther* 2018;9:152. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0890-5>.
123. Barbeito L. Astrocyte-based cell therapy: new hope for amyotrophic lateral sclerosis patients? *Stem Cell Res Ther* 2018;9:241. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-1006-y>.
124. Ban J, Sámano C, Mladinic M, Munitic I. Glia in amyotrophic lateral sclerosis and spinal cord injury: common therapeutic targets. *Croat Med J* 2019;60:109–20. <https://doi.org/10.3325/cmj.2019.60.109>.
125. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Update on Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) Product Development 2021. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/update-amyotrophic-lateral-sclerosis-als-product-development> (accessed June 22, 2021).
126. Lopez-Verrilli MA, Caviedes A, Cabrera A, Sandoval S, Wyneken U, Khoury M. Mesenchymal stem cell-derived exosomes from different sources selectively promote neuritic outgrowth. *Neuroscience* 2016;320:129–39.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.01.061>.

127. Bonafede R, Turano E, Scambi I, Busato A, Bontempi P, Virla F, et al. ASC-Exosomes Ameliorate the Disease Progression in SOD1(G93A) Murine Model Underlining Their Potential Therapeutic Use in Human ALS. *Int J Mol Sci* 2020;21:3651. <https://doi.org/10.3390/ijms21103651>.