

# ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA: NOVAS POSSIBILIDADES TERAPÊUTICAS EM UM ARCABOUÇO FISIOPATOLÓGICO AINDA EM CONSTRUÇÃO

## AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS: NEW THERAPEUTIC POSSIBILITIES IN A PATHOPHYSIOLOGICAL FRAMEWORK STILL UNDER CONSTRUCTION

Marco Orsini<sup>1</sup>; Marcondes Cavalcante França Júnior<sup>2</sup>; Marcos RG de Freitas<sup>3</sup>; Pedro Ribeiro<sup>3</sup>; Mauricio Sant'Anna Jr<sup>4</sup>; Manuel Leite Lopes<sup>5</sup>; Ana Carolina Andorinho de Freitas Ferreira<sup>6</sup>; Cecilia de Medeiros Vidal<sup>6</sup>; Carlos Henrique Melo Reis<sup>3</sup>; Carlos Eduardo Cardoso<sup>1</sup>; Adriana Leico Oda<sup>2</sup>; Acary Bulle Oliveira<sup>2</sup>

### RESUMO

**Introdução:** A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é definida como uma doença neurológica progressiva e inexorável, com cerca de 80% dos casos de etiologia desconhecida. Novos medicamentos têm emergido no tratamento de doenças neurodegenerativas, inclusive na ELA, redesenhando o modelo fisiopatológico. Dentre eles, destacam-se o uso da: Edaravone, Vitamina K2, Serina, Metilcobalamina, Pirroloquinolina quinona (PQQ), Ubiquinol e Glutathione. Especificamente na ELA, alguns já foram validados em estudos randomizados-controlados. **Metodologia:** Atualização da literatura (PUBMED, Medline) sobre a utilização desses fármacos em doenças neurológicas degenerativas, com enfoque para a Doença do Neurônio Motor (DNM-ELA), nos idiomas Português, Inglês, Espanhol e Francês, compreendidos entre os anos de (2010-2017). **Discussão:** A associação desses medicamentos tem mostrado resultados positivos em inúmeras doenças neurológicas. Alguns, como, por exemplo, a Metilcobalamina e o Edaravone, exerceriam mecanismos de ação capazes de interferir no processo de depleção dos neurônios motores da ponta anterior e do feixe piramidal em pacientes com ELA. **Conclusão:** Seria precipitado concluir que o uso associado desses fármacos poderia modificar ou mesmo restaurar os danos às unidades motoras; entretanto, faz-se necessário destacar seus mecanismos de ação e potencial capacidade de intervir na evolução da doença, principalmente, a partir de estudos em modelos fisiopatológico que culminam na degeneração dos neurônios motores.

**Palavras-Chave:** Esclerose Lateral Amiotrófica, Fisiopatologia, Neurônio Motor, Tratamento, Suplementação.

### ABSTRACT

**Introduction:** Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is defined as a progressive and inexorable neurological disease, with about 80% of cases of unknown etiology. New drugs have emerged in the treatment of neurodegenerative diseases, including ALS, redesigning the pathophysiological model. Among them, the use of: Edaravone, Vitamin K2, Serine, Methylcobalamin, Pyrroloquinoline quinone (PQQ), Ubiquinol and Glutathione are noteworthy. Specifically in ALS, some have been validated in randomized controlled trials. **Methodology:** Update of the literature (PUBMED, Medline) on the use of these drugs in degenerative neurological diseases, with a focus on Motor Neuron Disease (DNM-ELA) in the Portuguese, English, Spanish and French languages, of (2010-2017). **Discussion:** The association of these drugs has shown positive results in neurological diseases. Some, such as Methylcobalamin and Edaravone, would exert mechanisms of action capable of interfering in the process of depletion of the motor neurons of the anterior horn and pyramidal tracts in patients with ALS. **Conclusion:** It would be precipitate to conclude that the associated use of these drugs could modify or even restore damage to motor units; however, it is necessary to highlight its mechanisms of action and potential ability to intervene in the evolution of the disease, mainly from studies in pathophysiological models that culminate in the degeneration of motor neurons

**Keywords:** Amyotrophic Lateral Sclerosis, physiopathology, Motor Neuron, Treatment, Supplementation.

<sup>1</sup>Programa de Mestrado em Ciências Aplicadas à Saúde – USS – Vassouras e Ciências da Reabilitação - UNISUAM;

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Neurologia | Neurociências – Universidade Federal de São Paulo;

<sup>3</sup>Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ;

<sup>4</sup>Instituto Federal do Rio de Janeiro | IFRJ – Departamento de Fisioterapia;

<sup>5</sup>Clínica Sinapse – RJ.

<sup>6</sup>Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense - UFF

**Endereço para correspondência:** Marco Orsini – orsinimarco@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) pode ser definida como uma doença neurológica progressiva, degenerativa e inexorável, cuja patogênese ainda é de difícil entendimento. Fatores vários contribuem na desprogramação celular e no processo de morte neuronal. A busca por uma melhor inter-relação, em novos marcadores e associações com tipos celulares e/ou moleculares distintos parece o grande desafio. O delineamento de pesquisas clínicas em ELA, com informações a respeito de tipo, ação e dose de medicamentos emerge à medida que novas teorias são apresentadas e somadas ao modelo atual<sup>1,2</sup>.

A ELA é uma doença multifatorial. O estresse oxidativo, a excitotoxicidade mediada pelo glutamato, a mutação do superóxido dismutase, a agregação anormal proteico-específica, a desestruturação de neuro-filamentos intermediários, a alteração do transporte axonal anterógrado e retrógrado, a ativação microglial, a inflamação e os transtornos nos fatores de crescimento, o influxo excessivo de cálcio intracelular e apoptose celular são todos parte desse amplo mas ainda incompleto modelo teórico<sup>3</sup>.

Recentemente, a ocorrência de danos ao retículo endoplasmático (ER) em formas esporádicas de ELA foi documentada em modelos experimentais animais. É sabido que a medula espinhal desses pacientes apresenta sinais de estresse no sistema de comunicação celular, desde o citoplasma até a carioteca. Dentre as causas potenciais do comprometimento proteasomal no (ER), alguns fatores são relevantes: aumento da imunorreatividade à ubiquitina e de proteínas lipo-oxidativas ou glico-oxidativas, quando comparadas com grupos controles, evidenciados por espectroscopia de massa e por métodos imunológicos.<sup>4</sup>

Permanece um desafio decifrar o “ambiente favorável” para o funcionamento de uma rede neuronal, na qual se articulam as células da glia e a barreira hematoencefálica está íntegra. Evidências sugerem que tais processos são afetados por cascatas de sinalização celular e molecular denominados de neuroinflamação. Com base nesse referencial, supõe-se que novas abordagens terapêuticas dirigidas às células da glia e envolvendo agentes anti-inflamatórios podem ser benéficos<sup>5-6</sup>.

Dentre as células gliais, os *astrócitos* desempenham funções essenciais para a “homeostase” do sistema nervoso central (SNC), incluindo: gerenciamento dos níveis iônicos do meio extracelular; captação e liberação de neurotransmissores, com papel crítico no metabolismo do glutamato e de GABA; participação na formação da bar-

reira hematoencefálica; secreção de fatores tróficos essenciais para sinalização e diferenciação neuronal, além de direcionamento axonal<sup>7</sup>. Em modelos animais (ratos) com ELA por mutação de SOD1<sup>G93A</sup>, o início da fraqueza muscular coincide com uma intensa sinalização e proliferação de células da glia com fenótipo “astrócito-like” (AbA cells), além de acúmulo de fatores neurotróficos<sup>7-10</sup>. Diante disso, deve-se ampliar a visão sobre a ELA: de uma doença exclusiva dos neurônios motores alfa para uma afecção que abarca todo o sistema celular da glia.

A proposta deste estudo é apresentar, com base nos atuais modelos fisiopatológicos da doença, os novos medicamentos (parte deles já submetida a estudos randomizados controlados) e como seus mecanismos de ação podem atuar sobre as causas de desajuste neuronal, de modo a contribuir em futuras pesquisas envolvendo pacientes com ELA.

## METODOLOGIA

Foi realizada uma revisão bibliográfica não sistemática em bases de dados Medline, Pubmed, (2010-2017) com as seguintes palavras-chave, isoladas ou combinadas: vitamina K, quinolina de pirroloquinolina, serina, metilcobalamina, edaravone, arginina-alfa-cetoglutarato, naltraxone e esclerose lateral amiotrófica. Também foram incluídas referências à parte desse intervalo mas que envolviam os termos já citados e foram indicadas pelos artigos previamente selecionados

## RESULTADOS

### VITAMINA K

#### *Mecanismo de Ação*

Mecanismos que levam ao estresse oxidativo (EO) são importantes em inúmeras doenças neurológicas como, por exemplo, na ELA. As células da glia (particularmente os oligodendrócitos) são sensíveis a esses tipos de lesão. Estudos demonstraram que a *filoquinona* - vitamina K1 - e *menaquinona MK-4*, - forma principal da vitamina K2 - são de extrema importância na proteção de pré-oligodendrócitos e neurônios em maturação. Atuam também contra o EO) induzido pela glutatona<sup>11</sup>.

Pesquisas relatam que a vitamina K, em concentrações nanomolares impede o EO induzido pelo ácido araquidônico (AA) aos oligodendrócitos, através do bloqueio da ativação da lipoxigenase-12 (LOX-12)<sup>12</sup>. O metabolismo

do AA é uma fonte potencial para a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) durante a isquemia e reperfusão. A exposição de pré-oligodendrócitos ao AA provoca morte celular por EO e quanto maiores as doses aplicadas, mais significativos os danos. Consequentemente, se intensifica a cascata de depleção celular<sup>11-13</sup>.

### *Relação com as Células da Glia e Esclerose Lateral Amiotrófica*

Em estudo realizado por Li e colaboradores<sup>12</sup>, a administração de vitamina K (K1-MK4) impediu completamente a toxicidade celular *in vitro*. Os autores salientaram que tal efeito protetor fora gerado pela inibição de 12-LOX, o que permitiu abolir a produção de ERO e a morte celular. Sabe-se que a ativação de 12-LOX é ponto-chave na morte pré-oligodendrócitos induzida pelo AA. Vale ressaltar que a vitamina K isoladamente não foi capaz de inibir diretamente a atividade enzimática da 12-LOX em ensaios-clínicos, somente *in vitro*<sup>12, 13</sup>.

Browne e colaboradores conduziram análises celulares sequenciado o ácido nucleico de péptido não-américo (PNA) -ligante do RNA mitocondrial que codifica a superóxido dismutase 1 (SOD-1), além de uma série de ácidos nucleicos peptídicos conjugados com análogos de vitaminas lipofílicas sintéticas, incluindo um novo análogo de menadiona (vitamina K). A redução de inclusão de SOD-1 mutante e atenuação do estresse ao RE, duas das principais características patológicas celulares na ELA, por dois dos oligômeros de PNA preparados, foram pela primeira vez descritos na literatura através do emprego desses agente<sup>14</sup>.

### *Segurança e Eficácia em Modelos Animais*

Kresimir Pucaj e colaboradores<sup>15</sup> investigaram a segurança e a eficácia da vitamina K2 sintética, ou seja, a MK-7 (parte da família da vitamina K, assim como de co-factores essenciais para a enzima  $\gamma$ -glutamil carboxilase). Em testes de toxicidade oral aguda em ratos, administrou-se dose oral única de 2000 mg/kg de peso corporal (dose limite), não se observando toxicidade durante o período de 14 dias. Nos testes de toxicidade oral subaguda, foi administrada a MK-7 durante 90 dias: 2,5, 5 e 10 mg/kg de peso corporal/dia. Todos os dados analisados, incluindo observações clínicas, exames oftalmológicos, busca por achados clínicos, necropsia macroscópica e estudos histo-

patológicos, não revelaram toxicidade. Todos os parâmetros de patologia clínica e/ou pesos de órgãos observados ao final foram considerados como estando dentro da variabilidade biológica normal. Nessas condições, determinou-se que a dose letal média de MK-7 após uma única administração oral em ratos era superior ao nível de dose limite de 2000 mg/kg. O nível de efeito adverso não observado de MK-7, quando administrado por via oral a ratos durante 90 dias, foi considerado igual a 10 mg/kg/dia. Essa foi a dose mais elevada testada, com base na ausência de toxicidade durante o tratamento com 90 dias de duração. Em resumo, acredita-se que EO seja a causa da morte celular em múltiplas doenças neurológicas. O glutamato, a privação de cistina, o ácido homocisteico e o inibidor da síntese de glutathiona butiionina sulfoximina causam danos oxidativos a neurônios imaturos e oligodendrócitos por depleção da glutathiona intracelular<sup>15</sup>. A eficácia protetora e potente dessa vitamina, sem efeitos colaterais clínicos estabelecidos, sugere uma potencial aplicação terapêutica e no desenvolvimento de novos modelos experimentais<sup>16</sup>.

### *Segurança e Eficácia em Humanos*

Até o momento, os requerimentos humanos de vitamina K são baseados somente na sua clássica função na coagulação. A ingestão usual de vitamina K em países ocidentais é estimada em 150-500  $\mu$ g diariamente; quantidade essa bem acima do requerimento dietético estabelecido<sup>17</sup>.

## **QUINOLINA DE PIRROLOQUINOLINA (PQQ)**

### *Mecanismo de Ação*

O quinolina de pirroloquinolina (PQQ) foi inicialmente identificado como cofator em enzimas bacterianas com potencial redox. A PQQ influencia o metabolismo energético e as funções neurológicas em modelos animais, através de interações com vias de sinalização celular e de função mitocondrial. A literatura é escassa sobre a resposta ao PQQ em seres humanos. Embora o PQQ não seja atualmente considerado uma vitamina, seu envolvimento nas vias de sinalização celular, particularmente aquelas importantes para a mitocondriogênese em modelos animais experimentais, pode justificar que se considere a PQQ como vital para a sobrevivência celular. Para os seres humanos, essa evidência sugere que pode haver paralelos semelhantes ou benefícios ao se melhorar o nível sérico de PQQ<sup>18</sup>.

### *Relação com a Esclerose Lateral Amiotrófica*

O PQQ é considerado um co-fator redox na cadeia respiratória mitocondrial, protegendo as células SH-SY5Y contra a citotoxicidade induzida pela rotenona, um inibidor do complexo mitocondrial<sup>19-20</sup>. Na Reunião da Sociedade Internacional de Transporte de Oxigênio ao Tecido de 2014, foi relatado que o sal disódico PQQ (BioPQQ™) melhorou a função cognitiva em seres humanos, conforme avaliado previamente pelo teste Stroop. No entanto, o mecanismo fisiológico do PQQ permanece obscuro<sup>20</sup>.

Autores já estudaram os efeitos neuroprotetores de PQQ contra a lesão promovida pela rotenona em neurônios mesencéfalicos cultivados em modelos animais (ratos) de doença de Parkinson (DP). O pré-tratamento com PQQ protegeu os neurônios contra a apoptose induzida pela rotenona, restaurou o potencial da membrana mitocondrial, inibiu a produção de espécies de oxigênio reativo intracelular EROS e afetou a despolimerização dos microtúbulos. Ao se estender os estudos para modelos animais, verificou-se que a administração intraperitoneal de PQQ em ratos que receberam injeção de rotenona no feixe mediano do prosencéfalo foi capaz de diminuir a rotação evocada por apomorfina, além de inibir tanto a perda neuronal quanto a down regulation da TH (tirosina hidroxilase, enzima responsável pela conversão da L-tirosina em L-Dopa) na substância negra *pars compacta* (SNc), aumentando a capacidade antioxidante e regulando expressões intracelulares de Ndufs1 e Ndufs4 (duas subunidades do complexo mitocondrial). Os resultados sugerem que a neuroproteção PQQ pode ser mediada pela inibição da disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, bem como pela modulação gênica de Ndufs1 e Ndufs4<sup>21</sup>.

Embora as conclusões estejam associadas a modelos animais na DP, o arcabouço fisiopatológico da ELA também possui associação com estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, por vias coincidentes de sinalização celular. Acreditamos que novos estudos devam ser desenvolvidos para a associação da PQQ no tratamento da ELA.

### Segurança e Eficácia em Humanos

Harris e colaboradores, em estudo “crossover”, selecionaram 10 indivíduos (cinco mulheres, cinco homens), que ingeriram PQQ adicionada a bebida com sabor de fruta em dois estudos distintos. No estudo 1, a PQQ foi administrada em dose única de (0,2mg PQQ/kg). Foram realizadas mensurações múltiplas dos níveis de PQQ no plasma e urina, além de mudanças no potencial antioxidante - com base no potencial de captura de radicais de

peroxil total e nos ensaios de produto reativo de ácido tio-barbitúrico (TBAR) ao longo do período de 48 h. No estudo 2, PQQ foi administrado como uma dose diária (0,3 mg PQQ/kg).

Após 76 h, as medidas incluíram índices de inflamação (proteína C-reativa plasmática, níveis de interleucina 6, IL-6) e índices clínicos (colesterol, glicose, lipoproteína de alta densidade, lipoproteína de baixa densidade, triglicéridos, etc.). e espectroscopia dos metabolitos urinários relacionados ao metabolismo oxidativo. Os índices clínicos padrão não foram alterados pela suplementação com PQQ. Entretanto, a exposição dietética à PQQ (Estudo 1) resultou em alterações aparentes no potencial antioxidante com base nas avaliações de produtos reativos de TBAR. No Estudo 2, a suplementação com PQQ resultou em diminuições significativas nos níveis de proteína C-reativa no plasma, IL-6, bem como na redução urinária de metabolitos e intermediários relacionados a atividade mitocondrial. Tal achado é consistente com o aumento da eficiência mitocondrial. Os dados estão entre os primeiros a associar os efeitos sistêmicos de PQQ em animais à efeitos correspondentes em seres humanos<sup>22</sup>.

Nakano e colaboradores<sup>20</sup> estudaram 20 indivíduos saudáveis com faixa etária entre 50 e 70 anos, submetidos à administração de BioPQQ™ (20 mg) ou placebo por via oral uma vez por dia durante 12 semanas. A concentração de hemoglobina (Hb) e a saturação absoluta de oxigênio tecidual (SO<sub>2</sub>) no Córtex Pré Frontal (CPF) bilateral foram avaliadas em condições de repouso utilizando a Espectroscopia de Infravermelho de forma Temporal (EIFT). Os autores concluíram que as concentrações basais de hemoglobina e hemoglobina total no CPF direito aumentaram significativamente após a administração de PQQ. Em paralelo, houve diminuição da SO<sub>2</sub> no CPF significativamente mais pronunciada no grupo PQQ do que no grupo. Esses resultados apontam que o uso de PQQ se associou a aumento de fluxo sanguíneo, com maior atividade do CPF e maior consumo de oxigênio<sup>20</sup>.

### Contra-Indicações

O potencial genotóxico do sal dissódico de PQQ (BioPQQ™) foi avaliado em uma bateria de testes de genotoxicidade. Os resultados do ensaio de mutação bacteriana (teste de Ames) foram negativos. Resultados positivos fracos foram obtidos em dois testes de aberração cromossômica *in vitro* em fibroblastos de pulmão de hamster chinês (CHL). Após o teste num ensaio de aberração

cromossômica *in vitro* em linfócitos de sangue periférico humano, não foi observada qualquer atividade genotóxica de PQQ. No ensaio de micronúcleos em murganços, o PQQ em doses até 2.000 mg/kg de peso corporal demonstrou que não se expressam efeitos genotóxicos *in vivo* em eritrócitos da medula óssea. Devido às respostas fracas e apenas no teste *in vitro*, foi concluído que o PQQ disódico não tem atividade genotóxica *in vivo*<sup>23</sup>.

## SERINA

A serina é um aminoácido não essencial constituinte das proteínas e da dieta humana. É gerada partir do 3-fosfo-piruvato e pode se converter em glicina, mediante reação reversível dependente de folatos. A serina também é precursora de outros aminoácidos (cistationina, cistina) e compostos importantes (glutationa, purinas e pirimidinas) e ainda indispensável na formação de fosfolipídeos e fosfoglicerídeos, esses de importância metabólica, especialmente para o sistema nervoso central.<sup>24-27</sup>

### Mecanismo de Ação

Possui papel importante em uma variedade de vias biossintéticas, incluindo as que envolvem pirimidinas, purinas, creatina e profrinas. Encontra-se no sítio ativo de uma importante classe de enzimas chamada “proteases de serina”, que inclui a tripsina e a quimotripsina, que catalisam a hidrólise das ligações peptídicas. A L-serina, a forma comum deste aminoácido, pode transformar-se em D-serina, que, tal como a glicina, é um neuromodulador do receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAR). O NMDAR é receptor do neurotransmissor glutamato, implicado no desenvolvimento do sistema nervoso, nos mecanismos de plasticidade cerebral, assim como na neurodegeneração<sup>25-26</sup>

### Relação com a Esclerose Lateral Amiotrófica

Estudo recente realizado por Lee e colaboradores<sup>25</sup> demonstrou que alterações nos níveis de D-serina associam-se à patogênese da ELA esporádica, assim como em modelos animais com mutação de SOD1 (G93A).

A D-serina é um co-agonista do NMDAR no gerenciamento das funções do glutamato assim como nos efeitos patológicos mediados pela sua excitotoxicidade. Mais recentemente, sugeriu-se uma ligação direta com a ELA, através de estudos em que níveis de D-serina estão elevados na forma esporádica e no modelo G93A SOD1.

Além disso, uma mutação patogênica (R199W) na enzima que degrada D-serina, a D-aminoácido oxidase (DAO), possui relação com ELA familiar<sup>26</sup>. A D-serina, a sua enzima sintetizadora - serina racemase (SR)- a e DAO possuem grandes concentrações na medula espinhal. Após realização de modelos de cultura celular, foram estabelecidos os efeitos de R199W-DAO na autofagia, na formação de agregados ubiquitinados e consequente apoptose. Vale ressaltar que todos esses processos foram atenuados por um antagonista local do NMDAR D-serina/glicina. Novamente, emerge uma interrelação entre neurônios e glia, além de potenciais abordagens terapêuticas para a ELA. Em resumo, a D-serina, um co-agonista endógeno de NMDAR, promove está envolvida na morte de neurônios motores, tanto em pacientes com ELA esporádica/ familiar como em modelos experimentais em ratos (mSOD1) de G93A-SOD1<sup>27</sup>.

O mecanismo exato do transporte de D-serina ainda não é conhecido. Buscando compreender a distribuição da D-serina, Lee e colaboradores<sup>25</sup> determinaram a atividade e a expressão do transportador de serina em linhagens celulares (neurônios motores modificados para ELA com mutação de SOD1, NSC-34/hSOD1<sup>G93A</sup>). A captação de D-serina foi significativamente menor em células NSC34/hSOD1<sup>G93A</sup>, quando comparada às células NSC34 e NSC34/hSOD1<sup>wt</sup> (grupo controle). Em contrapartida, a captação de L-serina, precursor de D-serina, foi significativamente maior em células NSC34/hSOD1<sup>G93A</sup>. A captação de D-serina e de L-serina ocorreu por meio de transportadores dependentes de Na<sup>+</sup>: ASCT1, com alta afinidade por L-serina e o ASCT2, com afinidade por D-serina comparativamente menor. Em concordância com tais resultados, verificou-se que os níveis de mRNA SLC1A4 (codificante de ASCT1) estavam significativamente aumentados em NSC-34/hSOD1<sup>G93A</sup> em comparação com as células NSC-34 e NSC-34/hSOD1<sup>wt</sup>. Em contraste, NSC-34/hSOD1<sup>G93A</sup> apresentaram níveis reduzidos de mRNA de SLC7A10 (codificante de ASC1, transportador de D-serina mas com alta afinidade, sendo independente de Na<sup>+</sup>) Resumindo, nas células NSC-34/hSOD1<sup>G93A</sup>, a recaptação de D-serina está reduzida (devido à relativa baixa afinidade de seu transportador de D-serina) enquanto o influxo de L-serina está aumentado. Os dados apresentados pelos autores sugerem que a alteração patológica da D- e L-serina na ELA seja impulsionada por alterações de afinidade do sistema de captação.

### Utilização, Segurança e Eficácia em Humanos

Sabe-se pouco sobre a manipulação e os efeitos secundários da L-serina em humanos. A utilização de até 300mg/dia parece ser segura embora os estudos sejam escassos<sup>28,29</sup>.

Não existem estudos com doses já estabelecidas para o uso da serina em doenças neurológicas. Atualmente, tal aminoácido, principalmente o L-serina, possui ações envolvidas na proteção do metabolismo da pele, no aumento da produção de anticorpos, no metabolismo de ácidos graxos e do crescimento muscular. Comumente utiliza-se a dose de 100 a 300mg ao dia. Devido à meia-vida curta no organismo, recomenda-se que seja ingerida em várias doses ao longo do dia, 100, por exemplo, 3x ao dia.

## **METILCOBALAMINA**

### *Mecanismo de ação*

Trata-se do metabólito ativo da cobalamina, atuando como cofator na reação catalisada pela metionina sintase, em que a metilcobalamina (MeCbl) fornece o radical metil à homocisteína, permitindo sua conversão em metionina. O radical metil, por sua vez, é doado pela metiltetrafolato redutase (MTPHR) à cobalamina, o que permite a ela ciclicamente se regenerar no cofator ativo após cada doação.<sup>30</sup>

A MeCbl demonstrou ter efeito protetor em culturas de neurônios corticais, expostas à citotoxicidade induzida por glutamato.<sup>31</sup> A base para explicar tal efeito pode decorrer do fato de a MeCbl reduzir os níveis séricos de homocisteína. Segundo a revisão de Zoccolella e colaboradores, os níveis altos de homocisteína podem predizer maior declínio da capacidade física em humanos.<sup>32</sup> Nos estudos em motoneurônios transfectados com SOD1 mutante, teria sido comprovada a citotoxicidade da homocisteína, sobretudo, pela produção de radicais livres. O estudo em ratos revelou que os mutantes para SOD1 teriam maior nível sérico de homocisteína, em comparação com os controles. A distribuição da homocisteína se concentraria nas células gliais da medula e do tronco, as quais estariam hipertrofiadas e hipermetabólicas. O metabólito da homocisteína atuaria também como agonista do NMDAR, levando ao influxo de cálcio e à subsequente degeneração celular.<sup>33</sup> Estudo *in vitro* comprovou que a apoptose de neurônios motores induzida por homocisteína foi reduzida com a administração simultânea de MeCbl, o que proporcionou a queda na ativação das caspases 3/7. Entretanto, a redução máxima obtida foi de 34% - o que sugere mecanismos à parte das caspases que não foram inibidos; além disso, a

aplicação de metiltetrafolato redutase não mostrou o mesmo efeito de resgate.<sup>34</sup>

### *Relação com a Esclerose Lateral Amiotrófica*

Desde o final da década de 90, vem se tentando utilizar altas doses de MeCbl para se tentar obter algum grau de melhora sintomática entre os pacientes. Kaji e colaboradores compararam 12 pacientes submetidos à aplicação intramuscular diária de baixa dose (0,5mg) de MeCbl com 12 sob alta dose (25mg). Após quatro semanas, o grupo recebendo alta dose da medicação mostrou melhora na média do potencial de ação muscular composto (CMAP).<sup>35</sup> Izumi e Kaji mostraram que a administração intramuscular de MeCbl (50mg duas vezes por semana) se associou a maior sobrevida ou a maior tempo não dependente de ventilador mecânico.<sup>36</sup>

Estudo realizado com ratos wobbler – com achados clínicos e patológicos mimetizando ELA – revelou que a infusão intraperitoneal diária de ultra alta dose de MeCbl (30mg/Kg) por quatro semanas foi capaz de retardar a deformação e preservar mais a força das patas dianteiras após a terceira semana de vida. Verificou-se que: o bíceps apresentou maior peso e o nervo musculocutâneo manteve maior número de axônios, quando comparado com placebo e o grupo de alta dose de MeCbl. O número de neurônios motores espinhais, entretanto não apresentou número significativamente maior.<sup>37</sup>

Estudo *in vitro* recente demonstrou a eficácia dose dependente da MeCbl em prevenir a morte de neurônios motores cultivados com astrócitos que expressavam a mutação de SOD1. A sobrevida teria sido ainda maior quando do co-tratamento com riluzol.<sup>33</sup>

## **EDARAVONE**

### *Mecanismo de ação*

Trata-se de um quelante de radicais livres, capaz de eliminar radicais hidroxila, e prevenir a peroxidação de lipídios.<sup>38-40</sup> Foi inicialmente aprovado no Japão para o uso em isquemia cerebral aguda, visando poupar áreas adjacentes ao infarto.<sup>39,40</sup> Estudo com ratos em situação de infarto cerebral seguida de

reperusão mostrou que o edaravone se associou a menor dano oxidativo do DNA e menor peroxidação de lipídios, reduzindo, assim, a cascata inflamatória e a ativação da micróglia na área de penumbra. Além disso, foi raramente expressa na micróglia a oxido nítrico sintetase, embora detectada nas células endoteliais.<sup>38</sup> Mais recentemente, também se constatou a capacidade do edaravone em quelar peroxinitritos, os quais derivam da oxidação de lipídios.<sup>41</sup>

### *Relação com a Esclerose Lateral Amiotrófica*

Um dos mecanismos patogênicos associados a ELA é a hiperexcitabilidade neuronal, tendo sido verificada alteração no funcionamento dos canais iônicos nos casos de mutação para SOD1. Em neurônios motores com mutação SOD1-G93A, foi observada uma recuperação mais rápida da fase de inativação rápida dos canais de sódio, em relação a neurônios controles. Avaliou-se o efeito da exposição do edaravone, porém, a substância não foi capaz de interferir no tempo de recuperação da fase de inativação<sup>39</sup>.

Por outro lado, Ito e colaboradores<sup>42</sup> organizaram estudo com ratos positivos para SOD1-G93A com sintomas recém-instalados, administrando-lhes diariamente uma das seguintes formulações intraperitoneais: placebo, 5mg/Kg ou 15mg/kg de edaravone. A dose mais alta foi capaz de retardar o declínio quanto ao peso total, à força de apreensão e ao desempenho em exercício na roda. Além disso, sob a maior dosagem de medicamento, houve maior preservação de neurônios na ponta anterior da medula e menor concentração de 3-nitrotirosina (3NT) – marcador do estresse oxidativo aos lipídios. Por último, verificou-se menor agregado de SOD1 depositado na emergência da raiz anterior medular de ratos após 10 dias de edaravone 15mg/kg/d. Os autores elencam como possíveis mecanismos protetores envolvidos: a inibição de TNF- $\alpha$ ; a redução das vias apoptóticas Bcl-2/Bax; a maior liberação de óxido nítrico pelas células endoteliais; a queda de apoptose mediada por caspase 12 e a redução do acúmulo de SOD1<sup>42</sup>.

Estudo com ratos wobbler formulou três grupos, conforme a substância administrada: placebo,

edaravone 1mg/Kg e edaravone 10mg/Kg. O grupo que recebeu a maior dose evoluiu significativamente melhor, com menor fraqueza muscular, assim como apresentou maior peso bicipital, maior diâmetro das fibras musculares e mais neurônios motores em raiz anterior da medula cervical. Além disso, a maior dose de edaravone se associou à menor proliferação de astrócitos que foram associados ao processo degenerativo<sup>43</sup>.

Ensaio clínico de fase II avaliou, em humanos, a administração de 30mg e 60mg intravenosa (IV) diariamente por duas semanas. Aplicou-se a escala de ALSFRS-R seis meses antes e seis meses depois do tratamento e se constatou menor declínio funcional entre os submetidos a 60mg. Da mesma forma, se verificou redução expressiva de 3NT<sup>40</sup>. Procedeu-se estudo fase III, envolvendo 206 pacientes que evoluíram, no pré-tratamento, com alteração de -1 a -4 pontos em 12 meses na escala ALSFRS-R. Então, 104 pacientes foram alocados no grupo controle e 102 no teste, o qual recebeu seis ciclos IV de 60mg de edaravone. O primeiro ciclo durou 14 dias e os demais, 10, havendo 14 dias entre cada ciclo para observação. Apesar de sugerida melhor força no parâmetro de apreensão, não se verificou diferença significativa intergrupo no período de sobrevivência. Considerando os achados deste experimento, outro estudo ainda não publicado, envolvendo 137 pacientes, demonstrou que a droga administrada na fase inicial da doença (início menor que dois anos e capacidade forçada vital maior que 80%) seria capaz de reduzir o declínio na escala ALSFRS<sup>44</sup>. Em maio deste ano, o *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso do Edaravone no tratamento da ELA, sendo orientado o uso intravenoso em ciclos intercalados por períodos de 14 dias sem medicação. O primeiro ciclo deve durar 14 dias e os subsequentes, 10 dias<sup>45</sup>.

### *Segurança e Eficácia em Humanos*

Dentre os efeitos colaterais, há relato de fezes diarreicas que melhoraram ao longo do tratamento.<sup>40</sup> Porém, efeitos colaterais graves são raros<sup>41</sup>. No *trial* mais recente, houve relato de três mortes no grupo

controle: duas por desordem e uma por falência respiratória. Porém, tais casos foram atribuídos à própria doença de base<sup>46</sup>.

### **ARGININA-ALFA-CETOGLUTARATO**

A arginina-alfa-cetoglutarato (AAKG) é um precursor da síntese do óxido nítrico (NO), descrita na literatura como um potente vasodilatador que pode promover melhora na perfusão tecidual, em especial no tecido muscular estriado esquelético. Uma maior perfusão proporciona maior eficiência no transporte de nutrientes e oxigênio para a musculatura, além de rápida eliminação das substâncias tóxicas acumuladas, principalmente ácido láctico e amônia, otimizando o metabolismo muscular e a regeneração do músculo durante e após o exercício<sup>47-49</sup>.

#### *Mecanismo de Ação*

A alfa-cetoglutarato é um metabólito produzido pela descarboxilação oxidativa do isocitrato. A suplementação de alfa-cetoglutarato através da AAKG pode acelerar o processo de eventos ocorridos no ciclo de Krebs, aumentando assim a oxidação da acetil-CoA. Além disso, a suplementação com AAKG pode desencadear menor utilização de glutamato, um aminoácido necessário para o anabolismo de proteínas, além de ser conhecido como neurotransmissor excitatório. Esse efeito ganha importância em virtude de a AAKG ser retroalimentada pela transaminação do glutamato. Acredita-se que a suplementação com AAKG pode ter propriedades ergogênicas neurológicas e metabólicas<sup>(50-52)</sup>.

#### *Segurança e Eficácia em Humanos*

Santos e colaboradores<sup>53</sup> realizaram protocolo experimental que objetivou investigar o efeito da suplementação oral de 3g de AAKG por período de 15 dias na fadiga muscular periférica. A amostra foi composta por 12 voluntários saudáveis que realizaram exercício de resistência envolvendo flexão/exatensão de joelhos em equipamento isocinético utilizando protocolo de atividade concêntrica e contínua. Posteriormente, foi calculado o índice de fadiga. Os resultados

mostraram aumento no tempo de fadiga após a realização da suplementação de AAKG.<sup>53</sup> Campbell e colaboradores<sup>54</sup> realizaram estudo randomizado, controlado e duplo-cego utilizando uma amostra composta por dez sujeitos sadios na faixa etária de 30 a 50 anos. Na primeira parte do experimento, os sujeitos ingeriram 4g de AAKG. Após 8 horas foi coletada amostra de sangue para aferição do perfil farmacocinético da AAKG, quando foram observadas diferenças significativas nos níveis de arginina plasmática no grupo que ingeriu AAKG. Na segunda parte do experimento, os indivíduos foram divididos em dois grupos: suplementação, com 20 sujeitos vs. Placebo, com 15 sujeitos. Os participantes foram, então, orientados a ingerir 4 g de AAKG (três vezes ao dia totalizando 12 g diária) e a realizar quatro dias de treinamento de resistência por período de 8 semanas. Antes do início do protocolo e a cada quatro semanas foram verificados: marcadores bioquímicos; repetição máxima de legpress; teste de resistência e potência em equipamento isocinético (músculo quadríceps); capacidade aeróbia; composição corporal e testes de parâmetros psicométricos. Observaram-se diferenças significativas no grupo que realizou a suplementação com AAKG para repetição máxima de legpress, potência, glicemia e arginina plasmática. Não foram registradas diferenças significativas entre os grupos para composição corporal, resistência isocinética do músculo quadríceps ou capacidade aeróbia.

#### *Relação com a Esclerose Lateral Amiotrófica*

Até o momento, os requerimentos humanos da AAKG são baseados somente nas suas propriedades ergogênicas neurológicas e metabólicas principalmente no que diz respeito a melhora do fluxo sanguíneo muscular. Apesar de a ingestão de AAKG ter apresentado resultados contraditórios no que tange à melhora de desempenho, em nenhum dos estudos observou-se efeito adverso da suplementação de AAKG<sup>53,54</sup>. O protocolo Deanna sugere que a suplementação de AAKG poderia atenuar a disfunção mitocondrial, a excitotoxicidade do glutamato e o estresse oxidativo. Resultados preliminares demonstraram que cinco pacientes

acompanhados na clínica de ELA da Duke University que utilizaram o protocolo Deanna tiveram o declínio na capacidade vital forçada reduzido no período de três meses após a suplementação que incluía AAKG, porém, outros pacientes relataram efeitos colaterais (diarréia e/ou mal-estar). Este protocolo ainda não é uma recomendação para portadores de ELA<sup>54,55</sup>.

## NALTREXONE

O naltraxone é um antagonista competidor de longa duração dos receptores de opióides (Mu, delta e Kappa). Ele foi aprovado pela FDA no tratamento de dependentes de álcool e opióides. Nos últimos 25 anos têm sido observados possíveis outros efeitos para essa droga, atuando como uma antagonista opióide ou por outros mecanismos, quando administrado em dose baixa. Essa observação vem sendo feita em várias doenças neurológicas como esclerose múltipla, Parkinson e ELA<sup>(56)</sup>. Nas últimas décadas, evidências vêm apontam que os receptores de opióides estão presentes em células do sistema imunológico e em moléculas sinalizadoras. Estudos *in vitro* já revelaram que medicamentos opióides foram capazes, por exemplo, de inibir atividade de macrófagos não ativados e inibir a quimiotaxia de neutrófilos e monócitos a fatores derivados do complemento<sup>57</sup>.

Existe consenso de que a ELA é uma desordem degenerativa multifatorial, com componentes autoimune em fase de investigação. Holmøy T<sup>58</sup> defende que linfócitos tenham participação na doença, levando à destruição lenta de neurônios motores, embora também facilitem o posterior reparo. Partindo desse pressuposto, a administração de baixas doses de naltraxone pode ter um efeito clínico relevante no sistema imunossupressor, porém, isso ainda não foi claramente estabelecido. Parece haver um potencial efeito neuroprotetor também com naloxone, droga similar ao naltraxone, mas com ação de menor duração. Essa neuroproteção vem sendo demonstrada em neurônios motores de ratos com traumatismo craniano<sup>59</sup>. Entretanto, isso ainda não foi demonstrado em seres humanos.

Ainda não há ensaios clínicos com o uso de

baixas doses de naltraxone em pacientes com ELA ou em outra doença do neurônio motor. Há apenas um estudo piloto com dois pacientes com ELA, publicado em 1983, e que não foi capaz de demonstrar nenhum benefício do tratamento com naloxone<sup>60</sup>.

Sendo assim, são necessários mais estudos farmacológicos com o uso de baixas doses de naltraxone para que se esclareça o seu mecanismo de ação. Caso sejam demonstrados, os supostos efeitos de imunomodulação e neuroproteção podem ser benéficos na ELA.

## CONCLUSÃO

Seria precipitado concluir que o uso associado desses fármacos poderia modificar ou mesmo restaurar os danos às unidades motoras; entretanto, faz-se necessário destacar suas funções e, principalmente, os mecanismos moleculares pelos quais podem intervir e minimizar a depleção dos neurônios motores.

## CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não há qualquer tipo de conflito de interesse.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Orsini M, Oliveira ASB, Nascimento OJM, Reis CHM, Leite MAA, Souza JA, Pupe C, Souza OG, Bastos VH, Freitas MRG, Teixeira S, Bruno C, Davidovich E, Smidt B. Amyotrophic Lateral Sclerosis: New Perspectives and Update *Neurol Int.* 2015 Sep 24; 7(2): 5885.
2. Chieia MA, Oliveira ASB, Silva HCA, Gabbai AA. Considerations on diagnostic criteria: Amyotrophic lateral sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr* 2010;68(6):837-842.
3. Oliveira AS, Pereira RD. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS): three letters that change the people's life. For ever. *Arq Neuropsiquiatr.* 2009;67(3A):750-82.
4. Ilieva EV, Ayala V, Jové M, Dalfo E, Cacabelos D, Povedano M, Bellmunt MJ, Ferrer I, Pamplona R, Portero-Otín M. Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.* 2007 Dec;130(Pt 12):3111-23.
5. Jurate Lasienne and Koji Yamanaka. Glial Cells in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurol Res Int.* 2011;2011:718987.
6. Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science.* 2016 Aug 19;353(6301):777-83.
7. Rodríguez MJ, Mahy N. Neuron-microglia interactions in motor neuron degeneration: the inflammatory hypothesis in amyotrophic lateral sclerosis revisited. *Curr Med Chem.* 2016 Nov 22.
8. Trias E, Ibarburu S, Barreto-Núñez R, Barbeito L. Significance of aberrant glial cell phenotypes in pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett.* 2017 Jan 1;636:27-31.
9. Van Dyke JM, Smit-Oistad IM, Macrandar C, Krakora D, Meyer MG, Suzuki M. Macrophage-mediated inflammation and glial response in the skeletal muscle of a rat model of familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Exp Neurol.* 2016 Mar;277:275-82.
10. Tury A, Tolentino K, Zou Y. Altered expression of atypical PKC and Ryk in the spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Dev Neurobiol.* 2014 Aug;74(8):839-50.
11. Li J, Lin JC, Wang H, Peterson JW, Furie BC, Furie B, Booth SL, Volpe JJ, Rosenberg PA. Novel role of vitamin k in preventing oxidative injury to develop-

- ping oligodendrocytes and neurons. *J Neurosci*. 2003 Jul 2;23(13):5816-26.
12. Li J1, Wang H, Rosenberg PA. Vitamin K prevents oxidative cell death by inhibiting activation of 12-lipoxygenase in developing oligodendrocytes. *J Neurosci Res*. 2009 Jul;87(9):1997-2005.
  13. Wang H1, Li J, Follett PL, Zhang Y, Cotanche DA, Jensen FE, Volpe JJ, Rosenberg PA. 12-Lipoxygenase plays a key role in cell death caused by glutathione depletion and arachidonic acid in rat oligodendrocytes. *Eur J Neurosci*. 2004 Oct;20(8):2049-58.
  14. Browne EC, Parakh S, Duncan LF, Langford SJ, Atkin JD, Abbott BM. Efficacy of peptide nucleic acid and selected conjugates against specific cellular pathologies of amyotrophic lateral sclerosis. *Biorg Med Chem*. 2016 Apr 1;24(7):1520-7.
  15. Pucaj K, Rasmussen H, Moller M, Preston T. Safety and toxicological evaluation of a synthetic vitamin K2, menaquinone-7. *Toxicol Mech Methods*. 2011 Sep; 21(7): 520-532.
  16. Li J, Lin JC, Wang H, Peterson JW, Furie BC, Furie B, Booth SL, Volpe J, Rosenberg PA. Novel Role of Vitamin K in Preventing Oxidative Injury to Developing Oligodendrocytes and Neurons. *Journal of Neuroscience* 2 July 2003, 23 (13) 5816-5826.
  17. Olson, R.E. Vitamin K. In: SHILS, M.E., A. OLSON, J.A., SHIKE, M. Modern nutrition in health and disease. [s.l] : Lea & Febiger, 1994. p.342-358.
  18. Rucker R1, Chohanadisai W, Nakano M. Potential physiological importance of pyrroloquinoline quinone. *Altern Med Rev*. 2009 Sep;14(3):268-77.
  19. Nakashima Y, Mizoshita N, Tanaka H, Nakaoki Y. Amphiphilic Polymer Mediators Promoting Electron Transfer on Bioanodes with PQQ-Dependent Glucose Dehydrogenase. *Langmuir*. 2016 Dec 13;32(49):12986-12994.
  20. Nakano M, Murayama Y, Hu L, Ikemoto K, Uetake T, Sakatani K. Effects of Antioxidant Supplements (BioPQQ™) on Cerebral Blood Flow and Oxygen Metabolism in the Prefrontal Cortex. *Adv Exp Med Biol*. 2016;923:215-22.
  21. Zhang Q, Chen I, Yu S, Qin J, Zhang J, Cheng Q, Ke I, Ding F. Neuroprotective effects of pyrroloquinoline quinone against rotenone injury in primary cultured midbrain neurons and in a rat model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*. 2016 Sep;108:238-51.
  22. Harris CB, Chohanadisai W, Mishchuk DO, Satre MA, Slupsky CM, Rucker RB. Dietary pyrroloquinoline quinone (PQQ) alters indicators of inflammation and mitochondrial-related metabolism in human subjects. *J Nutr Biochem*. 2013 Dec;24(12):2076-84.
  23. Nakano M1, Suzuki H, Imamura T, Lau A, Lynch B. Genotoxicity of pyrroloquinoline quinone (PQQ) disodium salt (BioPQQ™). *Regul Toxicol Pharmacol*. 2013 Nov;67(2):189-97.
  24. Amaducci L, Crook TH, Lippi A, Bracco L, Baldereschi M, Latorraca S, Piersanti P, Tesco G, Sorbi S. Use of phosphatidylserine in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1991;640:245-9.
  25. Lee NY, Kim Y, Ryu H, Kang YS. The alteration of serine transporter activity in a cell line model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Jan 29;483(1):135-141.
  26. Paul P, de Belleruche J. The role of D-serine and glycine as co-agonists of NMDA receptors in motor neuron degeneration and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Front Synaptic Neurosci*. 2014 Apr 16;6:10.
  27. Sasabe J, Miyoshi Y, Suzuki M, Mita M, Konno R, Matsuoka M, Hamase K, Aiso S. D-amino acid oxidase controls motoneuron degeneration through D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jan 10;109(2):627-32. Tinette S, Feyereisen R, Robichon A. Approach to systematic analysis of serine/threonine phosphoproteome using Beta elimination and subsequent side effects: intramolecular linkage and/or racemization. *J Cell Biochem*. 2007 Mar 1;100(4):875-82.
  28. Naz RK. Involvement of protein serine and threonine phosphorylation in human sperm capacitation. *Biol Reprod*. 1999 Jun;60(6):1402-9.
  29. Jha KN1, Shivaji S. Protein serine and threonine phosphorylation, hyperactivation and acrosome reaction in in vitro capacitated hamster spermatozoa. *Mol Reprod Dev*. 2002 Sep;63(1):119-30.
  30. Koutmos M, Datta S, Patridge KA, Smith JL, Matthews RG. Insights into the reactivation of cobalamin-dependent methionine synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Nov 3;106(44):18527-32.
  31. Akaike A, Tamura Y, Sato Y, Yokota T. Protective effects of a vitamin B12 analog, methylcobalamin, against glutamate cytotoxicity in cultured cortical neurons. *Eur J Pharmacol*. 1993 Sep 7;241(1):1-6.
  32. Zoccollella S, Bendotti C, Beghi E, Logroscino G. Homocysteine levels and amyotrophic lateral sclerosis: A possible link. *Amyotroph Lateral Scler*. 2010;11(1-2):140-7.
  33. Ito S, Izumi Y, Niidome T, Ono Y. Methylcobalamin prevents mutant superoxide dismutase-1-induced motor neuron death in vitro. *Neuroreport*. 2017 Jan 18;28(2):101-107
  34. Hemendinger RA, Armstrong EJ. 3rd, Brooks BR. Methyl Vitamin B12 but not methylfolate rescues a motor neuron-like cell line from homocysteine-mediated cell death. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011 Mar 15;251(3):217-25.
  35. Kaji R, Kodama M, Imamura A, Hashida T, Kohara N, Ishizu M, Inui K, Kimura J. Effect of ultrahigh-dose methylcobalamin on compound muscle action potentials in amyotrophic lateral sclerosis: a double-blind controlled study. *Muscle Nerve*. 1998 Dec;21(12):1775-8.
  36. Izumi Y, Kaji R. Clinical trials of ultra-high-dose methylcobalamin in ALS. *Brain Nerve*. 2007 Oct;59(10):1141-7.
  37. Ikeda K, Iwasaki Y, Kaji R. Neuroprotective effect of ultra-high dose methylcobalamin in wobbler mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 2015 Jul 15;354(1-2):70-4.
  38. Zhang N, Komine-Kobayashi M, Tanaka R, Liu M, Mizuno Y, Urabe T. Edaravone reduces early accumulation of oxidative products and sequential inflammatory responses after transient focal ischemia in mice brain. *Stroke*. 2005 Oct;36(10):2220-5.
  39. Zona C, Pieri M, Carunchio I. Voltage-dependent sodium channels in spinal cord motor neurons display rapid recovery from fast inactivation in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurophysiol*. 2006 Dec;96(6):3314-22.
  40. Yoshino H, Kimura A. Investigation of the therapeutic effects of edaravone, a free radical scavenger, on amyotrophic lateral sclerosis (Phase II study). *Amyotroph Lateral Scler*. 2006 Dec;7(4):241-5.
  41. Ito H, Wate R, Zhang J, Ohnishi S, Kaneko S, Ito H, Nakano S, Kusaka H. Treatment with edaravone, initiated at symptom onset, slows motor decline and decreases SOD1 deposition in ALS mice. *Exp Neurol*. 2008 Oct;213(2):448-55.
  42. Fujisawa A, Yamamoto. Edaravone, a potent free radical scavenger, reacts with peroxynitrite to produce predominantly 4-NO-edaravone. *Redox Rep*. 2016 May;21(3):98-103.
  43. Ikeda K, Iwasaki Y. Edaravone, a Free Radical Scavenger, Delayed Symptomatic and Pathological Progression of Motor Neuron Disease in the Wobbler Mouse. *PLoS One*. 2015 Oct 15;10(10):e0140316
  44. Noto Y, Shibuya K, Vucic S, Kiernan MC. Novel therapies in development that inhibit motor neuron hyperexcitability in amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Rev Neurother*. 2016 Oct;16(10):1147-54.
  45. FDA News Release: FDA approves drug to treat ALS, disponível em < <https://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm557102.htm>; acessado em 10 de junho de 2017
  46. Abe K, Itoyama Y, Sobue G, Tsuji S, Aoki M, Doyu M, Hamada C, Kondo K, Yoneoka T, Akimoto M, Yoshino H; Edaravone ALS Study Group. Confirmatory double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of efficacy and safety of edaravone (MCI-186) in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2014 Dec;15(7-8):610-7
  47. Alvares TS, Meirelles CM, Bhambhani YN, Paschoalin VM, Gomes PS: L-Arginine as a potential ergogenic aid in healthy subjects. *Sports Med* 2011, 41:233-248.
  48. Little JP, Forbes SC, Candow DG, Cornish SM, Chilibeck PD: Creatine, arginine alpha-ketoglutarate, amino acids, and medium-chain triglycerides and endurance and performance. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2008, 18:493-508
  49. Kim K, Lee SG, Kegelmann TP, Su ZZ, Das SK, Dash R, Dasgupta S, Barral PM, Hedvat M, Diaz P. et al. Role of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: opportunities for developing novel therapeutics. *J Cell Physiol*. 2011;226:2484-2493.
  50. Ciruela F, Gomez-Soler M, Guidolin D, Borroto-Escuela DO, Agnati LF, Fuxe K, Fernandez-Duenas V. Adenosine receptor containing oligomers: their role in the control of dopamine and glutamate neurotransmission in the brain. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1808:1245-1255.
  51. Hammarqvist F, Wernerman J, von der Decken A, Vinnars E: Alpha-ketoglutarate preserves protein synthesis and free glutamine in skeletal muscle after surgery. *Surgery* 1991, 109:28-36.
  52. Santos RS, Pacheco MTT, Martins RABL, Villaverde AB, Giana HE, Baptista F, Zangaro RA. Study of the effect of oral administration of L-arginine on muscular performance in healthy volunteers: an isokinetic study. *Isokinet Exerc Sci*. 2002;10:153-158.
  53. Campbell B, Roberts M, Kerkick C, Wilborn C, Marcello B, Taylor L, Nassar E, Leutholtz B, Bowden R, Rasmussen C. et al. Pharmacokinetics, safety, and effects on exercise performance of L-arginine alpha-ketoglutarate in trained adult men. *Nutrition* 2006;22:872-881.
  54. Fournier C, Bedlak B, Hardiman O, Heiman-Patterson T, Gutmann L, et al. ALS Untangled No. 20: The Deanna Protocol: Amyotrophic Lateral Scler Frontotemporal Degener. 2013;14(4):319-323.

55. Ari C, Poff AM, Held HE, Landon CS, Goldhagen CR, et al. (2014) Metabolic Therapy with Deanna Protocol Supplementation Delays Disease Progression and Extends Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) Mouse Model. *PLoS one* 2014 Jul 25;9(7): e103526.
56. Modesto-Lowe V, Van Kirt J. Clinical Uses for Naltrexone: a review of evidence. *Exp Clin Psychopharmacol.*2002;10:213-227.
57. McCarthy L, Wetzell M, Sliker JK, Eisenstein TK, Rogers TJ. Opioids, opioid receptors, and immune response. *Drug alcohol Depend.* 2001;62:111-123.
58. Holmoy T. T-cells in Amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol.*2008;15:360-6.
59. Lyeth BG, Jiang JY, Gong QZ, Hamm RJ, Young HF. Effects of mu opioid agonist and antagonist on neurological outcome following traumatic brain injury in the rat. *Neuropeptides* 1995;29:11-9
60. Silani V, Perini M, Fayoumi ZM, Scarlato G. Naloxone of no benefit in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.*1983;13:222.