

ESTUDOS VIROLÓGICOS EM PACIENTES COM ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA

*JOSÉ MAURO BRAZ DE LIMA **
*CLAUDIO DE MORAES ANDRADE ***
*LUIZ ANTONIO ALVES DURO ****
*MARIA LUISA LOPEZ-ALVAREZ *****
*NATALIA DE MESQUITA ******

Nos últimos 20 anos tem-se observado crescente interesse pela relação entre vírus e esclerose lateral amiotrófica (ELA). Isto decorre dos seguintes fatores: descoberta da elevada incidência entre os nativos do grupo linguístico Chamorro da ilha de Guam e na península japonesa de Kii; a transmissão do Kuru e da doença de Creutzfeldt-Jakob; descoberta de estreita relação entre vírus e algumas doenças crônicas degenerativas do sistema nervoso. Contudo, já em 1925, Neri⁴⁰ questionava uma etiologia viral.

Os mecanismos patogênicos da infecção por vírus são desde há muito conhecidos e têm por base a complexa interação vírus-hospedeiro^{1,35,36,49}. Oldstone & col.⁴² observaram em camundongos com infecção persistente por vírus da coriomeningite linfocitária, disfunção específica no mecanismo enzimático, levando a alterações do tipo degenerativo que pode ser traduzida por uma doença de evolução crônica limitada a um determinado sistema. Poderíamos citar hipoteticamente como modelos dessa enfermidade, a doença de Parkinson (metabolismo das dopaminas), esclerose em placas (disfunção metabólica da oligodendroglia, interferindo com a formação da bainha de mielina), esclerose lateral amiotrófica (alterações degenerativas dos neurônios motores das pontas anteriores da medula espinhal e esclerose do cordão antero-lateral), e diabetes (acometimento das células B do pâncreas).

O conceito de vírus de ação lenta foi introduzido por Björn Sigurdsson⁴⁶ em 1954 e se aplicava a uma série de doenças crônicas degenerativas do carneiro, das quais a mais importante é o "scrapie"^{2, 30}. Este autor estabeleceu os seguintes critérios para definir viroses de ação lenta ou infecção por vírus lento: período de latência de meses ou anos; doença crônica de curso prolongado e mau prognóstico; infecção limitada a um hospedeiro e lesões anatomopatológicas restritas a um órgão ou sistema. Acrescentaríamos ausência de sinais infla-

Trabalho realizado no Instituto de Neurologia Deolindo Couto (Serviço do Prof. Bernardo Couto) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (INDC/UFRJ) e nos Laboratórios de Virologia e Microscopia Eletrônica do Instituto de Microbiologia da UFRJ (Diretor: Prof. Diogo Machado); * Auxiliar de Ensino do INDC/UFRJ; ** Prof. Adjunto do IM/UFRJ; *** Mestrando em Neurologia do INDC/UFRJ; **** Responsável pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica do IM/UFRJ; ***** Residente do INDC/UFRJ.

matórios e de resposta imunológica evidenciável. Nessas formas de infecção, nem todos os postulados de Koch são satisfeitos³¹.

A observação de Hardlow²⁵ quanto à semelhança anatomopatológica entre o Scrapie e o Kuru, levou Gajdusek e col.¹⁰ a demonstrar a transmissibilidade do Kuru para chimpanzés, tornando esta a primeira doença humana provocada por um vírus de ação lenta. Ulteriormente, Gajdusek e Gibbs¹² e Gibbs e Gajdusek^{20, 22} fizeram outra importante descoberta demonstrando a etiologia infecciosa da doença de Creutzfeldt-Jakob (transmissão para chimpanzés). Em seguida, outros estudos em doenças crônicas degenerativas do sistema nervoso foram feitos, na tentativa de descobrir uma relação com vírus de ação lenta 6, 11, 13, 14, 15, 16, 23, 27, 48.

De acordo com alguns autores^{2, 5, 6, 26, 29, 32, 33}, podemos separar em dois grupos as doenças provocadas por vírus de ação lenta: as comprovadas e as suspeitas.

Assim sendo, dados mais recentes apontam a hipótese de ser a ELA de origem viral (vírus de ação lenta) como viável, apesar de diversos pontos obscuros necessitarem de melhor esclarecimento^{19, 21, 24, 29, 34, 41}. Não podemos esquecer a experiência pioneira de Neri⁴⁰ que, acreditando numa etiologia infecciosa, inoculou uma suspensão de medula em coelhos, sem resultados positivos, experiência esta repetida por Zil'ber⁵², utilizando macacos, apesar de críticas ulteriores^{7, 28}, com resultados positivos, isto é, os animais desenvolveram ao cabo de três anos, atrofia muscular progressiva e hiperreflexia, com exame anatomopatológico similar aos pacientes.

Segundo Johnson³⁴, a ELA poderia ser considerada como representante de infecção crônica por vírus da poliomielite, uma espécie de infecção persistente. Citamos ainda o trabalho de Lipton e Canto³⁷ relativo a uma doença semelhante em camundongos. Froment⁹, Wimmer⁵⁰ e Ornsteen⁴³ mostram casos de ELA relacionados com quadro pós-encefálico. Austregésilo e Couto⁴ observaram sensível aumento de doença de Parkinson nas décadas de 30 e 40, sugerindo uma relação viral.

Gardner & col.¹⁸ isolaram em camundongos, vírus tipo C. Esses animais tinham apresentado paralisia por lesão celular da ponta anterior. Esse vírus do tipo C (RNA) era do grupo Oncorna vírus. Andrews e Gardner³ observaram em camundongos selvagens com síndrome paralítica, partículas virais de vírus tipo C. Este material foi transmitido por inoculação a outros animais que desenvolveram quadro similar com características de doença degenerativa. Esse vírus tipo C foi encontrado por Viola⁴⁷ em cérebros de pacientes de Guam. Costa & col.⁸ relataram os casos de dois irmãos, um com leucemia e o outro com amiotrofia espinhal progressiva, com indícios de infecção por vírus tipo C, grupo Oncorna. Esses achados não foram confirmados por Gardner e Henderson¹⁷.

Müller e Hilgenstock³⁹ mostraram o isolamento de um vírus do grupo arbovírus (TbE complex) a partir do líquido cefalorraqueano (LCR) de um

paciente com 38 anos. Utilizando o mesmo material, Poussepp e Rives⁴⁵ realizaram estudo de inoculação em coelhos, sem resultados positivos. Ao examinar fragmentos musculares com microscópio eletrônico, Oshiro e col.⁴⁴ encontraram partículas do grupo picornavírus. Wolfgram⁵¹ mostrou que 50% dos soros de pacientes com ELA apresentam toxicidade para células da ponta anterior da medula (cultura de tecido em monocamadas). Recentemente tem-se pesquisado a relação dos antígenos de histocompatibilidade (HLA) com a ELA, havendo relatos de HLA-A3 e HLA-BW35 aumentados.

MATERIAL E MÉTODOS

Não obstante outros autores terem utilizado fragmentos de encéfalo e/ou medula para inoculação em animais, julgamos válida a inoculação de LCR em camundongos recém-nascidos. As tentativas de isolamento da amostra viral foram realizadas em LCR de pacientes internados no INDC/UFRJ, retirado por meio de punção lombar e acondicionado assepticamente em cubas com gelo, levadas de imediato ao IM/UFRJ, onde eram estocadas a -70°C. A inoculação foi feita em camundongos suíços brancos com 1 a 2 dias de idade, por via intracerebral, com o LCR diluído a 1/10, volume/volume, em P.B.S. (salina fosfato tamponada), contendo albumina bovina fração V (Armour) a 0,75%, antibióticos (penicilina e estreptomicina) e fungistático (fungizona). A dose foi de 0,02 ml, usando-se seringa B.D. Champion de 1/4 ml e agulha de 0,5 x 5.

Um grupo de animais com as mesmas condições foi inoculado com material idêntico e sem o LCR, na mesma dose e pela mesma via, a fim de servirem de grupo controle.

Os animais inoculados com LCR, foram observados por um período de 10 dias. Neste período, os que apresentavam alterações (paralisias) foram sacrificados, coletando-se o cérebro para passagens ulteriores. Os que não apresentaram tais alterações foram igualmente sacrificados e coletados cérebros para as passagens cegas.

Os cérebros foram estocados a -70°C e no momento de uso foram diluídos a 10% (peso/volume) em PBS/albumina a 0,75%, antibióticos e fungistático. Em seguida, foram triturados em Ten Broeck (triturador de vidro) evitando-se os triturados de alta rotação dado o risco de formação de aerossóis. A suspensão obtida foi centrifugada a 8000 x g, durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi estocado a -70°C.

Os animais controle (seis para cada grupo inoculado nas 26 passagens), foram observados de rotina, sem constatação de qualquer anormalidade.

Para melhores esclarecimentos sobre o preparo de cada solução vide Lima³⁶.

RESULTADOS

Foram, pois, inoculados 704 animais com material proveniente de 9 pacientes. O LCR foi o preferido devido às dificuldades de se conseguir necrópsias em nosso meio.

Consideramos como resultados positivos mudanças no comportamento motor dos animais: dificuldade em se locomoverem e se equilibrarem (paralisias) comparados com os do grupo controle. Aqueles que apresentavam resultados positivos eram sacrificados.

Destes, retiravam-se fragmentos de cérebros que eram utilizados em parte para estudos histológicos e ultraestruturais e, em parte, para novas reinoculações.

Conforme pode ser observado na tabela 1, os casos de número 1, 2, 6, 7 e 9 mostraram positividade na primeira passagem. A resposta não foi quantitativamente positiva para todos, sendo expressa em números de camundongos acometidos de alteração motora logo após o teste (inoculação). Desse modo, por exemplo, no caso 1 foram inoculados 36 camundongos, tendo 23 apresentado sinais de acometimento motor (63,8%). Na segunda e terceira passagens, apenas os casos 1 e 6 demonstraram positividade, sendo que os demais foram negativos. O caso 9, por motivos de ordem material, ficou somente com a primeira passagem (o estudo desse e outros casos está em andamento). Somente no caso 1 foi feita a quarta passagem com positividade: 10 dos 30 camundongos inoculados, apresentaram positividade (33,3%). Não nos parece haver dúvidas quanto à expressividade dos casos 1 e 6. Nada observamos nos animais de controle que merecesse qualquer referência.

Foram realizados estudos pela microscopia ótica e eletrônica nos tecidos nervoso e muscular dos animais com resultados positivos, os quais ainda não nos permitem conclusões.

COMENTÁRIOS

A inoculação de LCR de pacientes com ELA em camundongos recém-natos, com a finalidade de isolamento viral, não apresentou resultados conclusivos. Dos 9 pacientes estudados, somente os casos 1 e 6 apresentaram dados significativos, tendo sido obtido resultados objetivos até a terceira e quarta passagens (Tabela 1). Os casos 1 e 6 referem-se a pacientes jovens, de 38 e 28 anos de idade, com a forma bulbar evoluindo no caso 1 em um ano.

Em virologia, a partir da terceira passagem, considera-se o resultado positivo como significativo. Porém, com os dados por nós obtidos, podemos apenas supor a existência de um fator de natureza desconhecida capaz de ser transmitido para animais de experimentação. Devemos lembrar que Johnson sugere que "... a não demonstração de vírus não afasta a possibilidade da etiologia viral".

A demonstração da transmissibilidade da doença de Creutzfeldt-Jakob e do Kuru sem que se encontrasse qualquer agente responsável pela transmissão dessas doenças, mostrou que a transmissibilidade tornou-se a principal evidência de doenças infecciosas deste tipo, o que torna nossos resultados significativos, apesar de não obtermos o isolamento de qualquer agente.

Apoiando-se nos critérios de Sigurdsson sobre a infecção por vírus de ação lenta, nos dados epidemiológicos de Kurland sobre os casos de Guam e Kii, na demonstração da natureza infecciosa das doenças de Creutzfeldt-Jakob e do Kuru, em estudos virológicos e imonológicos referentes ao aumento de HLA-A3, admitimos fortes evidências favoráveis à hipótese infecciosa (vírus de ação lenta) da ELA.

Casos	Passagens												Totais		
	1ª			2ª			3ª			4ª			Inoc.	Pos.	%
	Inoc.	Pos.	%	Inoc.	Pos.	%	Inoc.	Pos.	%	Inoc.	Pos.	%			
1. J.J.S.	36	23	63,8	32	12	37,5	30	30	100	30	10	33,3	128	75	73,5
2. A.B.F.	43	4	9,5	12	0	0,0	24	0	0,0	—	—	—	78	4	5,1
3. O.A.O.	24	0	0,0	24	0	0,0	24	0	0,0	—	—	—	72	0	0,0
4. J.A.L.	54	0	0,0	24	0	0,0	24	0	0,0	—	—	—	102	0	0,0
5. E.T.M.	72	0	0,0	24	0	0,0	24	0	0,0	—	—	—	120	0	0,0
6. J.O.	18	18	100	18	18	100	18	18	100	—	—	—	54	54	100
7. M.R.	18	5	27,7	24	0	0,0	24	0	0,0	—	—	—	66	5	7,5
8. J.B.S.F.	18	0	0,0	24	0	0,0	24	0	0,0	—	—	—	66	0	0,0
9. M.E.S.	18	15	83,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	18	15	83,3
Totais	300	65	21,6	182	30	16,5	192	48	25,0	30	10	33,3	704	153	21,7

Resultados obtidos com a inoculação de LCR de pacientes com esclerose lateral amiotrófica em camundongos: proporção relativa de animais com resultados positivos. Total de camundongos inoculados: 704. Legenda: INOC. = número camundongos inoculados; POS. = número camundongos com resultados positivos;

RESUMO

São estudados os efeitos da inoculação de líquido cefalorraqueano de pacientes com ELA em camundongos recém-natos (via intracerebral). Os autores discutem os resultados encontrados, bem como a hipótese da ELA ser de natureza infecciosa (doença causada por vírus de ação lenta).

SUMMARY

Viral studies in patients with amyotrophic lateral sclerosis

The effects of intracerebral inoculation of cerebrospinal fluid in mice from 9 patients with amyotrophic lateral sclerosis are reported. There were 704 animals inoculated. The results were considered positives when the animals presented difficulties in walking and equilibrating. Cases 1, 2, 6, 7 and 9 were positives in first passage. In case 1, the positivity was reached from first to fourth passage and in case 6, to third passage. At sight of this results, the possibility of that disease to be caused by slow-virus is discussed.

REFERÊNCIAS

1. ACTON, D. J.; KUCERA, L. S.; MIRVIK, Q. N. & WEISSER, R. S. — Enfermidades virales de larga duração. *In* Virologia Médica. Ed. Nueva Editorial Interamericana, México. cap. 22, 1974.
2. ADAMS, D. H. & BELL, T. M. — Slow viruses. Addison-Wesley Publishing Company, Boston, 1976.
3. ANDREWS, J. M. & GARDNER, M. B. — Murine mielopathy with motor neuron degeneration caused by an indigenous RNA tumor virus. *Neurology (Minneapolis)* 24:383, 1974.
4. AUSTREGESILLO, A.; COUTO, D.; FILHO, A. & COSTA, N. — Algumas considerações clínico-patológicas acerca das neuro-viroses observadas no Brasil. *J. Bras. Neurol. (Rio de Janeiro)* 1:363, 1949.
5. BAUER, S. — Langsame Viren und ZNS. *Nervenarzt* 44:393, 1973.
6. BRODANO, B. G. — I virus lenti. *Giornale di Malattie Infettive e Parassitarie* 29:711, 1977.
7. BRODY, J. A.; HADLOW, W. J.; HOTCHIN, J.; JOHNSON, R. T.; KOPROWSKY, H. & KURLAND, R. T. — Soviet search for viruses that cause chronic neurologic diseases in the U.R.S.S. *Science* 147:1114, 1965.
8. COSTA, J. C.; RASSON, A. S.; TRALKE, T. S.; ENGEL, W. K.; CANELLON, G. P. & BRATENAHE, C. G. — Leukemia and lower-motor-neuron disease. *The Lancet* II (872):107, 1974.
9. FROMENT, M. J. — Sclérose latérale amyotrophique et encephalite épidémique. *Rev. Neurol. (Paris)* I:842, 1925.
10. GAJDUSEK, D. C.; GIBBS, C. J. Jr. & ALPERS, M. — Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 209:794, 1966.

11. GAJDUSEK, D. C. — Slow-virus infections of the nervous system. *New England J. Med.* 16:392, 1967.
12. GAJDUSEK, D. C. & GIBBS, C. J. Jr. — Transmission of two subacute encephalopathies of man (Kuru and Creutzfeldt-Jakob disease) to new world monkeys. *Nature* 230:588, 1971.
13. GAJDUSEK, D. C. — Slow infections spongiform virus encephalopathies. *J. Clin. Pathol.* 25 (Suppl.): 78, 1972.
14. GAJDUSEK, D. C. — Kuru in the New Guinea Highlands. *In* J. D. Spillane, ed. — *Tropical Neurology*. Oxford University Press, London, pp. 376-383, 1973
15. GAJDUSEK, D. C. — New aspects of spongiform subacute viral encephalopathies. Abstracts of the IV Congresso Pan-Americano de Neurologia, México, pp. 12-17, 1975.
16. GAJDUSEK, D. C. & GIBBS, C. J. Jr. — Kuru, Creutzfeldt-Jakob diseases and transmissible presenile dementias. *In* V. Ter. Meulen & M. Katz, eds. — *Slow-virus Infections of the Central Nervous System*. Springer Verlag, Berlin, pp. 15-49, 1977.
17. GARDNER, M. B. & Henderson, B. E. — Lower motor neurone disease in mice and amyotrophic lateral sclerosis in man. *The Lancet* 2 (II): 952, 1974.
18. GARDNER, M. B.; RASHEED, S.; KLEMENT, J.; ROUGEY, R. W.; BROWN, C. J.; DWORSKY, R. & HENDERSON, B. E. — Lower motor neuron disease in wild mice caused by indigenous type C virus and search for a similar etiology in human amyotrophic lateral sclerosis. *In* J. M. Andrews, R. T. Johnson & M. A. Brazier, eds. — *Amyotrophic Lateral Sclerosis Recent Research Trends*. Academic Press, New York, pp. 217-234, 1976.
19. GIBBS, C. J. Jr & GAJDUSEK, D. C. — Kuru: a prototype subacute infectious disease of the nervous system as a model for the study of amyotrophic lateral sclerosis. *In* F. H. Norris & L. T. Kurland, eds. — *Motor Neuron Disease*. Grune and Stratton Inc., New York, pp. 269-279, 1969.
20. GIBBS, C. J. Jr. & GAJDUSEK, D. C. — Infection as the etiology of spongiform encephalopathy (Creutzfeldt-Jakob disease). *Science* 165 (3897): 1023, 1969.
21. GIBBS, C. J. Jr. & GAJDUSEK, D. C. — Amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease and the amyotrophic lateral sclerosis, Parkinsonism dementia complex on Guam: a review and summary of attempts to demonstrate infection as the etiology. *J. Clin. Pathol.* 25 (Suppl.): 132, 1972.
22. GIBBS, C. J. Jr. & GAJDUSEK, D. C. — Isolation and characterization of the subacute spongiform virus encephalopathies of man. *J. Clin. Pathol.* 25 (Suppl.): 84, 1972.
23. GIBBS, C. J. Jr. & GAJDUSEK, D. C. — Biology of Kuru and Creutzfeldt-Jakob disease. *In* W. Zeman & E. H. Lennette, eds. — *Slow-virus disease*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1974.
24. HANISCH, R.; DWORSKI, R. L. & HENDERSON, B. E. — A search for clues to the cause of amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.* (Chicago) 33:456, 1976.
25. HARDLOW, W. J. — Scrapie and Kuru. *The Lancet* 2 (7097): 289, 1959.
26. HIRANO, A.; KURLAND, L. T.; KROOTHY, R. S. & LESSEL, S. — Parkinsonism dementia complex an endemic disease on the islands of Guam. *Brain* 84:642, 1961.

27. HORTA BARBOSA, L.; FUCILLO, D. A. & SEVER, J. L. — Subacute sclerosing panencephalites: isolation of measles virus from a brain biopsy. *Nature* 221:974, 1969.
28. JOHNSON, R. T. — Virological studies and summary of soviet experiments on the transmission of amyotrophic lateral sclerosis to monkeys. *In* F. H. Norris & L. T. Kurland, eds. — *Motor Neuron Disease*. Grune and Stratton Inc., New York, pp. 280-285, 1969.
29. JOHNSON, R. T. & HERNDON, R. M. — Virologic studies of multiple sclerosis and others chronic and relapsing neurological disease. *Progr. Med. Virol.* 18:214, 1974.
30. JOHNSON, R. T. — Slow infections: virus host relationship. *In* W. Zeman & E. LENNETTE, eds. — *Slow virus disease*. The Williams and Wilkins Co. Baltimore, pp. 1-9, 1974.
31. JOHNSON, R. T. & GIBBS, C. J. Jr. — Koch's postulate and slow infections of the nervous system. *Arch. Neurol. (Chicago)* 30:36, 1974.
32. JOHNSON, R. T. — Slow-virus infections and chronic neurological diseases. *In* P. Seeman & G. M. Brown, eds. — *Frontiers in Neurology and Neuro-science Research*. University of Toronto, pp. 89-96, 1974.
33. JOHNSON, R. T. — Slow-virus diseases of the central nervous system: transmissibility vs communicability. *Clinical Neurosurgery* 24:590-597, 1977.
34. JOHNSON, R. T. — Virological studies of amyotrophic lateral sclerosis: an overview. *In* J. M. Andrews; R. T. Johnson & M. A. Brazier, eds. — *Amyotrophic Lateral Sclerosis Recent Research Trends*. Academic Press, New York, pp. 173-180, 1976.
35. JOHNSON, R. T. & GRIFFIN, D. E. — Pathogenesis of virus infections. *In* P. J.inken & G. W. Bruyn, eds. — *Handbook of Clinical Neurology*. North Holland Publishing Co., London, cap. 2, 1978.
36. LIMA, J. M. B. — Contribuição para o estudo da esclerose lateral amiotrófica: aspectos clínicos, epidemiológicos e virológicos. Tese INDC/UFRJ, Rio de Janeiro, 1979.
37. LIPTON, H. L. & COUTO, M. C. B. — Theiler's virus induced central nervous system disease in mice. *In* J. M. Andrews; R. T. Johnson & M. A. Brazier, eds. — *Amyotrophic Lateral Sclerosis: Recent Research Trends*. Academic Press, New York, pp. 263-277, 1976.
38. MANZ, H. J. — Pathology and pathogenesis of viral infections of central nervous system. *Human Pathology* 8:3, 1977.
39. MÜLLER, W. K. & HILGENSTOCK, F. — An uncommon case of amyotrophic lateral sclerosis with isolation of a virus from CSF. *J. Neurol.* 211:11, 1975.
40. NERI, V. — Rapport clinique sur la sclérose latérale amyotrophique. *Rev. Neurol. (Paris)* I: 759, 1925.
41. NORRIS, F. H. Jr. — Current status of the search for virus in amyotrophic lateral sclerosis. Abstracts of the IV Panamerican Congress of Neurology, México D. F., 1975.
42. OLDSTONE, M. B. A.; PERRIN, L. H. & WELSH, R. M. — Potential pathogenic mechanism of injury in amyotrophic lateral sclerosis. *In* J. M. Andrews; R. T. Johnson & M. A. Brazier, eds. — *Amyotrophic Lateral Sclerosis: Recent Research Trends*. Academic Press, New York, pp. 251-262, 1976.

43. ORNSTEIN, A. M. — The syndrome of amyotrophic lateral sclerosis in epidemic encephalitis. *J. Nervous and Mental Diseases* 72:369, 1930.
44. OSHIRO, L. S.; CREMER, N. E.; NORRIS, F. H. & LENNETTE, E. H. — Virus like particle in muscle from a patient with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology (Minneapolis)* 26: 57, 1976.
45. POUSSEP ET RIVES, S. — Contribution à la pathologie et à la pathogenie de la sclérose latérale amyotrophique. *Rev. Neurol. (Paris)* 1:834, 1925.
46. SIGURDSSON, B. — RIDA: a chronic encephalitis of sheep: with general remarks on infections which develop slowly and some of their special characteristics. *British Veterinary. (London)* 110:341, 1954.
47. VIOLA, M. Y. — RNA tumor viruses as causative agents of chronic neurological disease. *In* J. M. Andrews, R. T. Johnson & M. A. Brazier, eds. — *Amyotrophic Lateral Sclerosis: Recent Research Trends*. Academic Press, New York, pp. 235-249, 1976.
48. WALKER, D. L.; PADGENTT, B. L.; ZU RHEIN, Z. M.; ALBERT, A. E. & MARSH, R. F. — Current study of an opportunistic papova virus. *In* W. Zeman & E. Lennette, eds. — *Slow Virus Disease*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.
49. WEINER, L. P. & Johnson, R. T. — Virus host clues interactions in slow virus diseases of the nervous system. *In* G. Poste & G. L. Nicholson, eds. — *Virus Infections and Cell Surface*. North Holland Company, Amsterdam, pp. 195-212, 1977.
50. WIMMER, M. — Amyotrophies de type sclérose latérale amyotrophique dans l'encephalite épidémique chronique. *Rev. Neurol. (Paris)* 1:841, 1925.
51. WOLGRAM, F. — Blind studies on the effect of amyotrophic lateral sclerosis sera on motor neurone in vitro. *In* J. M. Andrews; R. T. Johnson & M. A. Brazier, eds. — *Amyotrophic Lateral Sclerosis: Recent Research Trends*. Academic Press, New York, pp. 145-149, 1976.
52. ZIL'BER, L. A.; BAGDAKOVA, Z. L.; GARDAS JAN, A. N.; KONAVALOV, N. V.; BUNINA, T. L. & BARABADZE, E. M. — Study of the etiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Bulletin of World Health Organization* 29:449, 1963.

Instituto de Neurologia Deolindo Couto — Av. Venceslau Braz, 95, Botafogo — 22290 Rio de Janeiro, RJ — Brasil.

Instituto de Microbiologia da UFRJ — Departamento de Virologia — Centro de Ciências da Saúde — Cidade Universitária — Ilha do Fundão — Rio de Janeiro, RJ — Brasil.