

MARIA JOSÉ PONTES MARQUES DE SÁ

**ESTUDO DA FORMAÇÃO DO HIPOCAMPO E DO LÍQUIDO
CÉFALO-RAQUIDIANO NA ENCEFALOPATIA POR VIH**

PORTO

1998

**ESTUDO DA FORMAÇÃO DO HIPOCAMPO E DO LÍQUIDO
CÉFALO-RAQUIDIANO NA ENCEFALOPATIA POR VIH**

MARIA JOSÉ PONTES MARQUES DE SÁ

**ESTUDO DA FORMAÇÃO DO HIPOCAMPO E DO LÍQUIDO
CÉFALO-RAQUIDIANO NA ENCEFALOPATIA POR VIH**

*Dissertação de candidatura ao grau de Doutor apresentada
à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto*

PORTO

1998

Artigo 48º, parágrafo 3 - A Faculdade não responde pelas doutrinas
expendidas na dissertação.

*(Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto - Decreto 19337,
de 29 de Janeiro de 1931).*

CORPO CATEDRÁTICO DA FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO

Professores Efectivos

Doutor Alexandre Alberto Guerra de Sousa Pinto
Doutor António Alberto Falcão de Freitas
Doutor António Augusto Lopes Vaz
Doutor António Carvalho de Almeida Coimbra
Doutor António Fernandes Oliveira Barbosa Ribeiro Braga
Doutor António Germano Pina Silva Leal
Doutor António Luís Tomé Rocha Ribeiro
Doutor António Manuel Sampaio de Araújo Teixeira
Doutor Belmiro dos Santos Patrício
Doutor Cândido Alves Hipólito Reis
Doutor Carlos Rodrigo Magalhães Ramalhão
Doutor Daniel Filipe de Lima Moura
Doutor Eduardo Jorge Cunha Rodrigues Pereira
Doutor Francisco José Zarco Carneiro Chaves
Doutor Henrique José Ferreira Gonçalves Lecour de Meneses
Doutor Joaquim Germano Pinto Machado Correia Silva
Doutor Jorge Manuel Mergulhão Castro Tavares
Doutor José Agostinho Marques Lopes
Doutor José Augusto Fleming Torrinha
Doutor José Carvalho de Oliveira
Doutor José Manuel Costa Mesquita Guimarães
Doutor Levi Eugénio Ribeiro Guerra
Doutor Luís António Mota Prego Cunha Soares de Moura Pereira Leite
Doutor Manuel Alberto Coimbra Sobrinho Simões
Doutor Manuel Augusto Cardoso de Oliveira
Doutor Manuel Machado Rodrigues Gomes
Doutor Manuel Maria Paula Barbosa
Doutor Manuel Miranda Magalhães
Doutora Maria Amélia Duarte Ferreira
Doutora Maria da Conceição Fernandes Marques Magalhães
Doutora Maria Isabel Amorim de Azevedo
Doutor Mário José Cerqueira Gomes Braga
Doutor Norberto Teixeira dos Santos
Doutor Patrício Manuel Vieira Araújo Soares da Silva
Doutor Serafim Correia Pinto Guimarães
Doutor Valdemar Miguel Botelho Santos Cardoso
Doutor Victor Manuel Oliveira Nogueira Faria

Professores Jubilados / Aposentados

Doutor Abel José Sampaio da Costa Tavares
Doutor Albano dos Santos Pereira Ramos
Doutor Amândio Gomes Sampaio Tavares
Doutor António Fernandes da Fonseca
Doutor Artur Manuel Giesteira de Almeida
Doutor Casimiro Águeda de Azevedo
Doutor Celso Renato Paiva Rodrigues da Cruz
Doutor Daniel dos Santos Pinto Serrão
Doutor Fernando Carvalho Cerqueira Magro Gomes Ferreira
Doutor Francisco de Sousa Lé
Doutor João da Silva Carvalho
Doutor Joaquim Oliveira da Costa Maia
Doutor José Fernando Barros Castro Correia
Doutor José Manuel Gonçalves Pina Cabral
Doutor José Pinto de Barros
Doutor Júlio Machado de Sousa Vaz
Doutor Manuel José Bragança Tender
Doutor Manuel Teixeira Amarante Júnior
Doutor Walter Friedrich Alfred Osswald

À memória da minha Mãe

Ao meu Pai

Para o Zé, Maria João e Zé Pedro

À memória do Professor Doutor
Carlos Alberto Silva

Ao Professor Doutor

Manuel Maria Paula Barbosa

Em 1993 fui convidada pelo Professor Doutor Manuel Paula Barbosa para participar num Projecto de Investigação dirigido ao estudo das alterações da formação do hipocampo na SIDA, a decorrer no Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina do Porto, projecto multidisciplinar que congregava investigadores de outros Serviços da Faculdade de Medicina do Porto e da Universidade de Freiburg. O tema interessava-me sobremaneira, uma vez que as doenças infecciosas, inflamatórias e imunológicas do sistema nervoso central constituíam, desde há bastante tempo, uma área clínica da minha preferência. Além disso, era possível incluir também o estudo do líquido céfalo-raquidiano de doentes seropositivos, cujos primeiros resultados havia já comunicado em reuniões científicas de Neurologia.

Algum tempo depois, no âmbito desse projecto, tornou-se exequível delinear o fio condutor desta dissertação de doutoramento, que o Professor Doutor Manuel Paula Barbosa aceitou de bom-grado orientar, depositando em mim uma confiança inextinguível, que creio ter sido baseada em características de quem, há tantos anos, fora sua aluna. Como se compreende, a realização de um trabalho desta envergadura foi possível apenas à custa do empenho e da crítica estimulante que o Professor Doutor Manuel Paula Barbosa exerceu no dia-a-dia, orientando e corrigindo com rigor todos os passos. Daqui decorre que as minhas primeiras palavras de agradecimento a ele se destinem, tanto mais que me possibilitou concretizar a aspiração de me candidatar ao grau de Doutor pela Faculdade de Medicina do Porto, onde me formei, o que considero ter sido mais uma inegável demonstração de sincera amizade.

No Instituto de Anatomia desenrolaram-se quase todos os procedimentos desta tese, fundamentalmente os de ordem estereológica. A aprendizagem das metodologias mais adequadas, a interpretação judiciosa dos resultados, a correcção do manuscrito e a resposta a inúmeras dúvidas, foram marcos importantes e imprescindíveis para o desenvolvimento desta dissertação que devo à Professora Doutora Maria Dulce Madeira, a quem quero expressar a minha estima, salientando ainda que, a partir deste convívio, nasceu uma nova amizade.

Ao Professor Doutor Carlos Ruela manifesto também o meu reconhecimento pela colheita cuidadosa do material utilizado nesta dissertação, bem como pela ajuda no seu processamento inicial, fase indispensável para levar este estudo a bom termo. A sua colaboração na elaboração de posters, nos quais divulguei alguns dos resultados preliminares obtidos, é também digna do meu maior apreço.

Cabe-me igualmente agradecer ao Professor Doutor José Paulo Andrade toda a afável colaboração que me prestou, mais especificamente a orientação e a supervisão do estudo de material impregnado pelo método de Golgi.

Ao Dr. Nuno Sousa agradeço, não só a iniciação nos primeiros passos da metodologia a empregar, mas também a assistência amigável à elaboração da documentação iconográfica da tese.

Finalmente, no que ao Instituto de Anatomia se refere, cabe-me testemunhar a todos os seus elementos sentimentos de profunda gratidão pela generosidade e deferência com que sempre me trataram. É justo, no entanto, salientar o Sr. Artur Pereira, a quem devo as inúmeras secções de material incluído em metacrilato, a D. Ana Carolina, a quem devo o processamento do material pelo método de Golgi e o Sr. Alberto Alfaia pelo modo como levou a cabo o trabalho iconográfico.

Esta tese foi efectuada tendo como base material proveniente de doentes seropositivos, ou seja, de doentes que não estiveram a meu cargo, mas sim foram assistidos no Serviço de Doenças Infecciosas da Faculdade de Medicina do Porto e do Hospital de São João. Desta forma, devo aqui agradecer reconhecidamente a possibilidade de realização deste estudo ao Professor Doutor Henrique Lecour. Na pessoa do Dr. António Mota-Miranda, a quem fico muito grata pelo auxílio que me prestou quer na recolha dos dados clínicos quer no apoio bibliográfico, torno este agradecimento extensivo aos médicos assistentes dos doentes.

Expresso também o meu agradecimento ao Professor Doutor Vicente Gonçalves, então elemento do Serviço de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina do Porto e Hospital de São João e ulteriormente Director do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia, a realização do estudo neuropatológico de rotina e do estudo imuno-histoquímico destes casos.

De igual modo, agradeço ao Professor Doutor Benedict Volk, Director do Departamento de Neuropatologia da Universidade de Freiburg, a cedência de material neuropatológico de doentes com SIDA.

Agradeço ainda ao Professor Doutor José Eduardo Pinto da Costa, Director do Instituto de Medicina Legal do Porto, a autorização concedida para efectuar o estágio que permitiu estudar material utilizado como controlo.

Um capítulo significativo desta dissertação é dedicada ao estudo do líquido céfalo-raquidiano de doentes seropositivos, que decorreu no Laboratório de LCR do Serviço de Neurologia e de Neurocirurgia da Faculdade de Medicina do Porto e Hospital de S. João. Este Laboratório, fundado há muitos anos pelo Professor Doutor Celso Cruz, foi todavia desenvolvido de forma verdadeiramente marcante pelo saudoso Professor Doutor Carlos Alberto Silva, com o objectivo fundamental de prestar apoio à clínica, mas também para investigação. Prova disto foi a sua actividade científica, divulgada em revistas estrangeiras com a maior exigência editorial.

Assim, é este o momento adequado para lhe agradecer, a título póstumo, o convite que me endereçou enquanto aluna do 5º ano para colaborar no Laboratório, mais especificamente no estudo das células do LCR, e participar nas actividades de investigação aí desenvolvidas, que tiveram como corolário as primeiras publicações de que fui co-autora. Ao Professor Doutor Carlos Alberto Silva, meu Mestre nas ciências neurológicas, devo a formação sólida de neurologista e um modo mais completo de ser Médica. De facto, para além da competência, desempenho zeloso e apetência científica, destaco algumas características naturais da sua personalidade que sobressaíam no decurso do acto médico, como o aprumo, humildade e respeito para com os outros, nomeadamente para com os seus doentes.

Agradeço também sinceramente ao Sr. Óscar Campos a sua colaboração, por vezes inexcedível, no estudo do LCR.

À Dr.ª Isabel Leal Barbosa, investigadora do Laboratório de Imunologia Celular do Serviço de Hemoterapia do Instituto Português de Oncologia do Porto, agradeço a colaboração na montagem da técnica de citometria de fluxo que possibilitou o estudo das subpopulações linfocitárias do LCR na SIDA.

Fico também grata ao Professor Hansotto Reiber, Director do Laboratório de Neuroquímica da Universidade de Gottingen, o envio e a permissão para utilização dos gráficos de Reiber, destinados à avaliação simultânea da barreira hemato-encefálica e da síntese intratecal de imunoglobulinas.

Finalmente, agradeço aos colegas do Serviço de Neurologia e Neurocirurgia que, de uma forma ou de outra, me manifestaram a sua ajuda. Saliento, todavia, a colaboração das Dr.as Ângela Silva e Maria do Céu Castro na revisão dos processos clínicos dos doentes dos quais estudei o LCR e na elaboração de posters referentes aos resultados obtidos. Cabe-me também agradecer ao Professor Doutor António Saraiva, actual Director de Serviço, as atitudes de compreensão, especialmente a autorização que me concedeu para efectuar um estágio no Instituto de Anatomia na fase inicial da redacção do manuscrito.

Este trabalho foi financiado pela J.N.I.C.T., projecto PBIC/C/SAU/1557/92, enquadrando-se nas actividades da Unidade 121/94 do Centro de Morfologia Experimental da Universidade do Porto.

Por último, dirijo palavras de caloroso agradecimento a todos os familiares e amigos que me apoiaram e compreenderam ao longo de tanto tempo, em especial o meu marido e os meus filhos.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	3
MATERIAL E MÉTODOS	
1. Material	15
1.1. <i>Proveniência do material</i>	15
1.2. <i>Dados clínicos</i>	16
2. Processamento do material	22
2.1. <i>Processamento para inclusão em glicolmetacrilato</i>	23
2.2. <i>Processamento para impregnação pelo método de Golgi</i>	24
2.3. <i>Processamento para estudo imuno-histoquímico</i>	27
3. Análises estereológicas	29
3.1. <i>Determinação de volumes</i>	29
3.2. <i>Determinação do número total de neurónios</i>	37
3.3. <i>Determinação dos volumes dos núcleos e dos corpos celulares dos neurónios</i>	42
4. Estudo das arborizações dendríticas dos neurónios da formação do hipocampo	43
4.1. <i>Número total de segmentos dendríticos</i>	44
4.2. <i>Análise métrica dos segmentos dendríticos</i>	47
4.3. <i>Densidade de arborização dendrítica</i>	47
4.4. <i>Densidade das espinhas dendríticas</i>	48
5. Estudo do líquido céfalo-raquidiano	51
5.1. <i>Estudo da imunidade celular</i>	51
5.2. <i>Estudo da imunidade humoral</i>	52
6. Análise estatística	56
RESULTADOS	
1. Características da amostra	59
1.1. <i>Amostra utilizada nos estudos estereológicos</i>	59
1.2. <i>Amostra utilizada no estudo do líquido céfalo-raquidiano</i>	59
2. Resultados qualitativos	60
2.1. <i>Estudo neuropatológico de rotina</i>	60
2.2. <i>Estudo da formação do hipocampo</i>	61
2.3. <i>Estudo imuno-histoquímico</i>	62
3. Resultados quantitativos	63
3.1. <i>Estudo morfométrico da formação do hipocampo</i>	63
3.2. <i>Estudo do líquido céfalo-raquidiano</i>	85

DISCUSSÃO

<i>Considerações iniciais</i>	97
<i>Vírus VIH e sistema nervoso</i>	98
<i>SIDA</i>	102
<i>Manifestações neurológicas da SIDA</i>	103
<i>Demência associada à SIDA. Sintomas neuropsiquiátricos</i>	104
<i>Formação do hipocampo</i>	108
<i>Líquido céfalo-raquidiano</i>	111
<i>Material</i>	113
<i>Morfometria</i>	116
<i>Discussão global dos resultados</i>	119
<i>Conclusões</i>	137

RESUMO E CONCLUSÕES	141
---------------------------	-----

SUMMARY AND CONCLUSIONS	143
-------------------------------	-----

BIBLIOGRAFIA	147
--------------------	-----

INTRODUÇÃO

Pouco tempo depois das primeiras descrições do Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) publicadas em 1981 (46, 47), doença transmissível provocada por um retrovírus designado por vírus da imunodeficiência humana (VIH) (12, 124), começou a ser notória a frequência de doentes infectados que apresentavam alterações do foro neurológico (126, 264, 367). Os estudos epidemiológicos, publicados mais tarde, mostraram que as complicações neurológicas ocorriam em cerca de 50 a 60% dos doentes com SIDA (17, 18, 34, 120, 155, 167, 169, 182, 197, 243, 249, 264, 367, 391) e eram mesmo o sinal de apresentação da afecção em 7 a 20% dos casos (17, 18, 43, 120, 155, 182, 197, 199, 264). Mais ainda, verificou-se que o leque de doentes seropositivos para o VIH (VIH+) com envolvimento neurológico era muito mais vasto do que a clínica permitiria supor, já que foram descritas alterações neuropatológicas no exame necrótico em cerca de 95% dos doentes infectados (13, 143); isto é, mesmo na ausência de sintomas ou sinais clínicos de índole neurológica, o atingimento do sistema nervoso na infecção pelo vírus VIH pode considerar-se um dado constante.

O espectro de manifestações neurológicas associadas à SIDA é muito variado e a sua história natural depende da fase da infecção. Assim, durante a infecção aguda por VIH, designada também por fase primária, podem ocorrer quadros geralmente auto-limitados, de meningite asséptica (154), encefalopatia aguda (42), mielopatia (78) ou neuropatia (291); mais tarde, quando existe já ligeira disfunção imunitária, estão descritos quadros de meningite asséptica assintomáticos, polirradiculonevrites desmielinizantes, radiculopatias por herpes zoster e miopatias (168). Nos doentes com imunodeficiência moderada ou grave surgem alterações cognitivas, quadros demenciais, mielopatias, neuropatias sensitivas, miopatias, infecções neurológicas por agentes oportunistas e neoplasias raras do sistema nervoso (169, 243, 290). Como se verifica, o envolvimento neurológico pelo VIH é precoce e pode manifestar-se clinicamente em qualquer fase após a infecção pelo vírus (146), embora a sua frequência aumente à medida que se agrava a imunodeficiência. Para além disso, de um ponto de vista etiopatogénico, as complicações neurológicas podem ser provocadas por acção directa do próprio vírus VIH - encefalite, mielopatia vacuolar e polineuropatia sensitiva axonal (245) -

ou, pelo contrário, podem ser indirectas, isto é, secundárias à imunossupressão, como as neoplasias (288) e as bem conhecidas infecções oportunistas - toxoplasmose cerebral (197, 218), meningite criptocócica (426), leucoencefalopatia multifocal progressiva (375) e infecção por vírus do grupo herpes (302). São ainda de referir outros quadros menos vulgares, mas não menos importantes, de base autoimune, como acidentes vasculares cerebrais devidos a vasculites e síndromes antifosfolipídeos, polineuropatias idiopáticas agudas e crónicas, doenças musculares de tipo miasténico e até quadros deficitários com evolução surto/remissão semelhantes à esclerose múltipla (19, 161). Também a terapêutica retroviral, utilizada em doses altas e em regime de associação, pode causar complicações neurológicas como a miopatia mitocondrial induzida pela azidotimidina (69) e as neuropatias tóxicas da didanosina, zalcitibina e stavudina (362, 363). Verificou-se ainda que podem coexistir no mesmo doente quadros neurológicos de diferente etiologia (68).

Das diferentes complicações neurológicas da SIDA merece destaque a mais frequente, específica deste síndrome, e que, desde 1987, é considerada uma das condições que definem a existência de SIDA em indivíduos seropositivos: a demência associada à SIDA (49). Esta forma de demência foi descrita inicialmente por Snider e colaboradores (367) como uma encefalite subaguda com manifestações demenciais marcadas. Posteriormente foram-lhe atribuídas diversas designações como encefalopatia da SIDA (345), complexo demencial associado ao VIH-1 ou "*AIDS dementia complex*" (ADC) (264) e encefalopatia por VIH-1 (120).

Price e colaboradores (264, 294, 296, 297) publicaram belíssimas revisões clínicas do ADC onde caracterizaram pormenorizadamente os sintomas mais comuns desta afecção e o seu perfil neurológico: disfunção cognitiva, em particular os lapsos mnésicos, perda de concentração e lentificação do pensamento. Associam-se-lhe em cerca de metade dos casos sintomas de disfunção motora como perdas de equilíbrio, paresias, tremor e, ainda, se bem que menos frequentemente, alterações do comportamento, como apatia, afastamento social, depressão, alterações da personalidade e até quadros psicóticos. Já a ataxia, hipertonia, incontinência esfinteriana, mioclonias e convulsões são sintomas de aparecimento mais tardio. Na fase inicial a demência pode ser muito subtil o que dificulta o seu diagnóstico como sintoma de apresentação da SIDA, mas, nos casos mais avançados há uma demência grave com alterações do estado de consciência, mutismo acinético, estupor ou coma (262-264). A demência por VIH diagnostica-se pela presença de um quadro demencial progressivo em

doentes seropositivos nos quais os exames não demonstraram outra etiologia ou, noutros casos, de forma retrospectiva, através dos achados de autópsia do sistema nervoso central (SNC), onde se observam alterações difusas da substância branca, células multinucleadas e infiltrados macrofágicos; o vírus pode ser isolado a partir quer do sangue quer do tecido nervoso central e periférico e do líquido céfalo-raquidiano (LCR) (25, 153, 195, 300, 345). Os exames imagiológicos, como a tomografia computadorizada e a ressonância magnética cerebrais, mostram em regra atrofia cerebral difusa, rarefacção da substância branca e lesões hiperintensas (198, 414). A análise do LCR revela, na maioria dos casos, ligeira pleocitose linfocitária, aumento das proteínas totais e da imunoglobulina G (IgG) (246), bem como bandas oligoclonais de IgG, síntese intratecal de IgG anti-VIH-1 (397) e aumento de marcadores de activação imunitária como a β_2 -microglobulina (248).

Classicamente considera-se que a demência da SIDA tem características clínicas e neuropatológicas que a identificam com o grupo das demências subcorticais (65, 264, 300, 413). Todavia, e ao contrário do que inicialmente se considerava (294), não parece haver correlação significativa entre a clínica e as alterações neuropatológicas da encefalite por VIH (168). Com efeito, as estimativas mais elevadas da prevalência da demência da SIDA em estudos de autópsia relativamente aos de ordem clínica, evidenciam com toda a clareza que a disfunção cognitiva é frequentemente subclínica, sendo de presumir que passe despercebida pela ocorrência de sintomas de outras doenças sistémicas mais graves. No entanto, permanece em aberto se as alterações cognitivas, que se admite ocorram em 25 a 40 % dos doentes VIH+, irão inevitavelmente evoluir para quadros demenciais (68), bem como se o processo encefalítico provocado pelo VIH é a causa directa do processo demencial (99, 100).

Deste modo, para além dos casos mais clássicos e mais restritos de encefalite por VIH caracterizada pela clínica e pelas alterações neuropatológicas que marcam a presença do vírus no cérebro, há todo um espectro de doentes com algum grau de compromisso cognitivo, por vezes subclínico, mas sem demonstração subsequente de encefalite. Tal facto foi reconhecido pelo Grupo de Trabalho sobre SIDA da Academia Americana de Neurologia que, em 1991, publicou o relatório de nomenclatura das manifestações neurológicas da infecção pelo VIH-1 (6). São aí definidos critérios consensuais de diagnóstico da demência associada à SIDA, denominada a partir dessa data complexo cognitivo/motor associado ao VIH-1, designação que até hoje se mantém. A expressão mais grave desta afecção e que corresponde à forma clássica de ADC, inclui as alterações cognitivas acompanhadas por perturbações motoras e/ou

do comportamento, havendo uma forma menos grave, com menor impacto nas actividades da vida diária, designada por doença cognitiva/motora *minor*, tal como a anterior também associada ao VIH-1 (6).

Passados que foram em revista os principais aspectos clínicos dos quadros neurológicos associados à SIDA, em particular o ADC, tem absoluta pertinência tentar desvendar as alterações neuronais, nomeadamente de índole morfológica, que estarão na base desta tão peculiar forma de demência. Por outras palavras, analisar detalhadamente que alterações estruturais estarão subjacentes à disfunção neurológica da demência da SIDA.

A este respeito, salientam-se, de entre as numerosas e pormenorizadas descrições das alterações neuropatológicas da SIDA, os estudos dirigidos à avaliação da atrofia cerebral (275) e à quantificação das populações neuronais incidindo fundamentalmente no neocórtex (99, 101, 179, 276, 338, 403, 416), cujos resultados, publicados na literatura, são contudo díspares. Com efeito, diversos autores referem a presença de morte neuronal no neocórtex de grau variável, entre 18% e 50%, de maior magnitude nos cortices frontal e visual (99, 101, 179, 403, 416), mesmo na ausência de sintomatologia neurológica, enquanto outros (338), não encontraram qualquer morte neuronal no neocórtex. No entanto a grande maioria dos trabalhos referidos tem como base densidades numéricas (99, 101, 179, 338, 403, 416), ou seja, números obtidos por unidade de volume, parâmetro estereológico que, tal como foi calculado, tem um apreciável "*bias*", sendo ainda de referir que os critérios de distinção entre neurónios e células gliais foram por vezes pouco seguros (179, 416). Acresce que também não há, entre esses estudos, unanimidade de critérios quanto à triagem de doentes a serem incluídos. Na realidade encontram-se doentes quer com os mais diversos tipos de quadros neurológicos (179, 338, 403) quer com encefalites por VIH ou simples lesões cerebrais mínimas só comprovadas por exame anátomo-patológico (99, 101, 416). Ora, como se compreende, esta disparidade da amostra dificulta a comparação entre os resultados existentes.

Estudos estereológicos mais recentes, em que foram determinados números totais de neurónios, mostram existir perda neuronal de 27% no neocórtex de doentes com SIDA, dados estes obtidos em doentes sem quadros neurológicos secundários (276). Em jeito de resumo, decorre da apreciação destes trabalhos uma evidência clara a favor da existência de morte neuronal no neocórtex de doentes com SIDA (99, 101, 179, 276, 403, 416), cuja grandeza se pode considerar apreciável, mesmo na ausência de complicações neurológicas secundárias à infecção (99, 101, 276, 416).

Surpreendentemente, e contrastando com as discrepâncias apontadas relativamente à morte neuronal no neocórtex de doentes com SIDA, existe uma considerável unanimidade de pontos de vista quanto às alterações neocorticais do neurópilo (axonais, dendríticas e sinápticas) (177, 238, 240, 416). Masliah e colaboradores (240), recorrendo ao método de Golgi, descreveram lesões neuríticas das células piramidais frontais, bem como nos interneurónios da mesma região com auxílio de técnicas imuno-citoquímicas (239); Wiley e colaboradores (416) encontraram em estudos de microscopia electrónica diminuição da densidade sináptica e vacuolização dos dendritos no neocórtex de doentes VIH+.

Mas, como anteriormente se referiu, importa pesquisar de modo exaustivo as bases anatómicas da demência da SIDA, pelo que, os estudos específicos da formação do hipocampo nesta afecção se revelam absolutamente indispensáveis, tendo em linha de conta o papel de relevo que o circuito trissináptico excitatório unidireccional dessa região cerebral desempenha em algumas funções cognitivas como a aprendizagem e a memória (71, 171, 214, 274, 346, 372). Assim sendo, ao analisar a literatura referente ao estudo da formação do hipocampo na SIDA, verificou-se que as publicações são escassas e não são consensuais quanto à existência de perda neuronal (239, 316, 370). Spargo e colaboradores (370) em estudos comparativos baseados em densidades numéricas, entre a demência associada ao VIH e a associada à doença de Huntington, não encontraram morte neuronal na SIDA ao invés do que descrevem na doença de Huntington; outro estudo de base imuno-histoquímica e morfométrica descreve diminuição selectiva de neurónios parvalbumina positivos na região CA3 do hipocampo (239). Reyes e colaboradores (316) estudaram com técnicas imuno-citoquímicas a formação do hipocampo de doentes com SIDA e encontraram maior abundância de células microgliais positivas para a proteína do invólucro vírico gp-41 no subículo. Porém, não existem estudos dirigidos às arborizações dendríticas dos neurónios hipocámpais na SIDA, o que surpreende dada a sua importância a nível da conectividade hipocámpal.

Esta escassez de estudos estereológicos da formação do hipocampo na infecção por VIH contrasta com os numerosos estudos efectuados noutras demências primárias como a doença de Alzheimer, afecção que nesta dissertação será denominada indiferentemente doença ou demência de Alzheimer, onde foram descritas marcadas alterações neuropatológicas nesta zona do córtex. Refiram-se, a título de exemplo, os trabalhos de Hyman e colaboradores (162) que encontraram patologia celular específica no subículo e nas camadas II e IV do córtex entorrinal na demência de Alzheimer, de Damasio (71) que demonstrou ser o corte das

conexões hipocampais para o córtex entorrinal uma das causas das alterações demenciais no Alzheimer, de West e colaboradores (410) que descreveram perda celular em CA1, e os de Simic e colaboradores (361) que evidenciaram perda de células na camada de células granulares da fâscia denteada e no subículo.

Em 1993 surgiu a possibilidade de efectuar no Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina do Porto (F.M.P.), em colaboração com o Serviço de Doenças Infecciosas e o Serviço de Anatomia Patológica da mesma instituição e do Hospital de São João (H.S.J.) e ainda com o Departamento de Neuropatologia da Universidade de Freiburg, um estudo centrado na formação do hipocampo de doentes com SIDA, recorrendo a técnicas estereológicas modernas, inteiramente *unbiased*, que permitem determinar com rigor volumes e números totais de células e consequentemente apreciar se há morte neuronal. Essas técnicas, como o *disector* óptico (140, 141, 408) e o *fractionator* (140, 409), são fruto dos enormes avanços que a estereologia sofreu na última década, acompanhados muito de perto pelos investigadores do Instituto de Anatomia que os aplicaram de modo extremamente frutuoso como o comprovam os resultados com eles obtidos.

Resumidamente, refira-se que no período inicial da designada estereologia moderna (64), se calculavam apenas densidades numéricas, isto é, número de neurónios por unidade de volume de uma determinada região do SNC. No entanto, a densidade numérica é um parâmetro pouco fiável, podendo levar a erros significativos, como o que Gundersen (141) designou por “*reference trap*” e que se baseia no seguinte: se se determinar o número de neurónios por unidade de volume de uma determinada estrutura cerebral que tenha sofrido atrofia, esse valor virá falsamente elevado devido ao “*packing*” celular; no entanto, ao calcular-se o seu número total, verificar-se-á uma redução do seu número, logo, o oposto do previamente calculado. Isto é, a quantificação das estruturas tem de obedecer a metodologias rigorosas, sob pena de se induzirem erros com consequente distorção de resultados e falsas interpretações. Posteriormente, passaram a efectuar-se determinações de números totais de neurónios de uma dada região, multiplicando a densidade numérica pelo valor do volume corrigido pelo factor de retracção tecidual. Actualmente, utilizando o *disector* óptico e o *fractionator*, é possível determinar números totais de neurónios sem prévia determinação de volumes, recorrendo a uma técnica de amostragem simultaneamente aleatória e sistemática, desenrolada em cadeia hierarquizada. Com esta metodologia calcula-se primeiro o número de neurónios numa fracção de um corte histológico aplicando o *disector* óptico, em seguida

determina-se o número total dessas células no corte e daí, em virtude dos procedimentos sistemáticos com que se efectuou a recolha do material, é possível obter o número total de neurónios. Deve ainda salientar-se que do ponto de vista citoarquitectónico a formação do hipocampo é justamente uma estrutura bem adaptada à execução de trabalhos estereológicos de grande qualidade devido ao seu padrão trilaminar e ao facto de os seus neurónios se distribuírem por camadas com limites bem definidos, em regra de fácil identificação. Todavia, o que atrás se disse não significa que as determinações volumétricas das estruturas deixassem de ter interesse. Bem pelo contrário, também estas passaram a ser determinadas em termos absolutos e com recurso ao princípio de Cavalieri (45). Este princípio matemático descrito no século XVII, segundo o qual o volume de um objecto pode ser estimado a partir de secções paralelas separadas por uma distância conhecida, se adequadamente aplicado, é inteiramente *unbiased*, nomeadamente se se tiver em conta factores de retracção tecidual. Com efeito, a determinação dos volumes das diferentes camadas da formação do hipocampo através desse método revelou-se de grande utilidade na avaliação da eventual existência de atrofia parcelar e global. Acresce ainda que, no que se refere às camadas não celulares da formação do hipocampo, permitiu inferir sobre o estado do neurópilo.

Além disso, foi também possível estudar o neurópilo da formação do hipocampo lançando mão do método de Golgi. Sendo um método centenário, mantém-se pleno de interesse por possibilitar a visualização da totalidade do neurónio e, logo, permitir a análise detalhada do neurópilo, facultando a definição da forma e arranjo espacial das arborizações dendríticas e axonais de diferentes tipos de neurónios e conseqüentemente, dos padrões de conectividade neuronal (26). O emprego do método de Golgi tem dado provas de grande eficácia em material humano e experimental de que são exemplos bem marcantes os numerosos trabalhos realizados no Instituto de Anatomia (10, 39, 40, 281-285, 378-380). Como se referiu, existem estudos baseados no método de Golgi realizados no córtex frontal de doentes com SIDA (240) que apontam para a possibilidade de a demência ocorrer como consequência da redução marcada da superfície receptora neuronal do neocórtex, mas não os há na formação do hipocampo. Ora, realçando uma vez mais o papel da formação do hipocampo nas funções cognitivas (71, 171, 214, 274, 346, 372), pretendeu-se, ao lançar mão desta metodologia, aquilatar do estado dos seus circuitos neuronais e assim se poder inferir da sua funcionalidade nos doentes com SIDA.

Deve também acrescentar-se que se entendeu ser útil complementar o estudo quantitativo da formação do hipocampo na SIDA com técnicas que visassem uma apreciação

de carácter qualitativo. Neste particular, procedeu-se à realização de técnicas imuno-histoquímicas, principalmente dirigidas a evidenciar a presença de degenerescência neuronal (ubiquitina) e gliose (GFAP), para além de, como é óbvio, se ter previamente efectuado o estudo neuropatológico de rotina necessário ao diagnóstico necrópsico.

Por último, foi outro objectivo desta dissertação, e fazendo jus ao carácter simultaneamente linfotrópico e neurotrópico do VIH (61, 100), abrir uma janela para observação do comportamento neuroimunológico destes doentes, órgão classicamente considerado santuário do sistema imune e possível reservatório de vírus nas infecções por vírus lentos (153, 155). Ora, quando se pretende abrir uma janela para observar a reacção do sistema nervoso do hospedeiro face à infecção vírica, faz-se uma punção lombar e estuda-se o LCR.

Com efeito, se numa fase inicial o LCR era apenas encarado como um meio auxiliar de diagnóstico, mais tarde verificou-se que muitas outras informações se podiam colher, nomeadamente no que se refere à progressão e resposta terapêutica da encefalopatia por VIH. Na verdade, a infecção pelo VIH compromete quer o sistema imunitário sistémico periférico, quer as funções imunológicas de determinadas células do SNC como os monócitos, macrófagos, astrócitos, oligodendrócitos e microglíocitos, alterações que estão na base da sua incapacidade de resposta apropriada às infecções (161). Por outro lado, ocorrem também alterações autoimunes durante o curso da infecção por VIH, elas próprias causadoras de doenças neurovasculares e neuromusculares já referidas. É ainda de toda a justiça realçar que o estudo do LCR na SIDA tem oferecido contributos de diversa ordem muitíssimo importantes, não só para o estudo directo dos doentes, por exemplo em caso de suspeita de complicações infecciosas do sistema nervoso onde é um meio de diagnóstico por excelência (66, 110, 187, 220, 255, 268, 293, 402, 412), mas também para a compreensão da patogenia da doença (62, 133, 134, 157, 195, 364).

Neste particular, destacam-se os estudos de grande impacto científico que permitiram isolar o VIH do LCR, mesmo em seropositivos assintomáticos (157, 195), os quais, a par da demonstração por Shaw e colaboradores (345) da existência de vírus HTLV-III em cérebros de doentes com encefalopatia da SIDA, foram de uma importância inultrapassável no lançar da hipótese, que se veio a verificar certa, de o vírus poder infectar outras células para além dos linfócitos T, causar síndromes neurológicas, ou seja, ser neurotrópico. Mais tarde, Goudsmit e colaboradores (133) descreveram o aparecimento do antígeno do VIH no LCR e Conrad e colaboradores (62) em estudos de amplificação vírica através da *polymerase chain reaction*

(PCR), concluíram que o ARN do VIH-1 pode ser detectado no LCR na maioria de indivíduos infectados, em todas as fases da doença. Para além disso, outros autores têm procurado pesquisar no LCR marcadores da demência da SIDA, como a β_2 -microglobulina (29, 30, 91, 248), a neopterina (30) e o ácido quinolínico (148, 149), os quais, não fora a sua pouca especificidade (20, 29) e difícil interpretação (135), teriam uma altíssima importância clínica. Por fim, destaca-se uma série de trabalhos sobre a avaliação da resposta imunitária intratecal do hospedeiro quer específica como a síntese intratecal de anticorpos anti-VIH e de IgG (37, 55, 80, 90, 92, 122, 134, 213, 217, 314, 397) quer inespecífica (36, 89, 123, 157, 234, 235, 246, 315). O estudo inespecífico da activação intratecal na SIDA permite frequentemente detectar um atingimento precoce, muitas vezes assintomático, do sistema nervoso (36, 157, 234, 246, 315) e é um precioso auxiliar da clínica.

Desta forma, decidiu-se incorporar neste trabalho os dados clínicos e laboratoriais retrospectivos de uma série de doentes infectados por VIH, cujas amostras de LCR e de soro tinham sido estudadas no Laboratório do Serviço de Neurologia e Neurocirurgia da F.M.P. e H.S.J. para pesquisa de alterações imunitárias celulares e humorais. Recorreu-se, assim, a métodos de rastreio especialmente dirigidos a detectar alterações celulares, nomeadamente linfocitárias, disfunção da barreira hemato-encefálica, presença de bandas oligoclonais de globulina γ e síntese intratecal de imunoglobulinas, nos quais se adquirira experiência ao longo de mais de duas décadas. Estes parâmetros neuroimunológicos têm particular interesse nas doenças inflamatórias, infecciosas e desmielinizantes do sistema nervoso; com efeito, é de realçar que através do estudo cito-proteico do LCR se tem dado um contributo muitas vezes essencial no estudo clínico de doentes com patologias neurológicas de carácter imune, como bem se constata nos trabalhos da linha de investigação amplamente desenvolvida pelo Professor Doutor C. A. Silva (289, 320, 322, 352-360, 400).

Finalmente, e tendo em linha de conta os numerosos aspectos crípticos de que se reveste a encefalopatia por VIH, pretende-se, com esta tese, contribuir para a sua clarificação tentando-se encontrar resposta para questões como as que adiante se colocam. Trata-se, sem dúvida, de temas da maior pertinência, cuja elucidação se entende ser não só necessária como premente. Com efeito, se ao neurologista por um lado inquieta o impacto que esta infecção por um outro tipo de vírus lento detém na clínica neurológica corrente (51), de que se destaca o facto de ser o mais frequente factor causal de quadros demenciais em idades precoces (168),

por outro, sente o mesmo a tentação de colocar a demência da SIDA a par do grupo das demências primárias e de a submeter ao mesmo tipo de estudos neuroanatómicos, com a finalidade de poder apreciar se há ou não congruência entre as alterações estruturais do hipocampo descritas nesses grupos de quadros demenciais, que seja eventualmente indicadora da existência de mecanismos subjacentes comuns.

E, por tudo o que disse, se colocam as seguintes interrogações:

1. Haverá ou não base anatómica para as alterações neuropsiquiátricas dos doentes com SIDA? Na afirmativa,

1.1. Haverá lesão hipocampal subjacente envolvendo perda celular? Isto é, existirá morte neuronal?

1.2. Ficarão as alterações confinadas aos neurónios? Como se encontram os dendritos atendendo ao papel que desempenham como superfície receptora destas células? Até que ponto estarão afectados os circuitos neuronais?

2. Qual o estado imunitário do sistema nervoso nos doentes com SIDA? Serão as alterações imunoquímicas do LCR correlacionáveis com os achados estruturais e a progressão inexorável dos sintomas clínicos?

MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1. Proveniência do material

O material necrótico utilizado proveio de 20 doentes falecidos após infecção por VIH e de 12 indivíduos sem história de infecção por VIH. Destes, 10 casos tinham falecido após traumatismos fatais sem que, no entanto, tivesse havido envolvimento directo do crânio; os 2 restantes faleceram após período de agonia por doença natural.

Os encéfalos do primeiro dos grupos mencionados tiveram proveniências distintas: 9 pertenciam a doentes falecidos no Serviço de Doenças Infecciosas e autopsiados no Serviço de Anatomia Patológica, entre 1992 e 1994, e 11 pertenciam a doentes autopsiados entre 1990 e 1993 no Departamento de Neuropatologia da Universidade de Freiburg.

Dez dos casos que constituem o grupo de controlo foram obtidos no Instituto de Medicina Legal do Porto no decurso de um estágio de Tanatologia aí efectuado entre 1993 e 1994. Os 2 restantes foram recolhidos no Serviço de Anatomia Patológica. Os dados clínicos e anátomo-patológicos relevantes para este trabalho foram disponibilizados pelos responsáveis das Instituições e Serviços referidos.

O estudo imuno-histoquímico da formação do hipocampo foi realizado pelo Professor Doutor V. Gonçalves primeiro na qualidade de elemento do Serviço de Anatomia Patológica da F.M.P./H.S.J. e posteriormente na de Director do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia.

As amostras de LCR e de sangue foram colhidas em 61 doentes. Destes, 57 estiveram internados no Serviço de Doenças Infecciosas e 4 no Serviço de Neurologia e Neurocirurgia, no período compreendido entre 1985 e 1996. O estudo do LCR foi realizado no Laboratório do Serviço de Neurologia e Neurocirurgia.

1.2. Dados clínicos

1.2.1. Indivíduos nos quais se procedeu ao estudo da formação do hipocampo

Os dados clínicos dos doentes infectados por VIH relevantes para este estudo foram sistematicamente registados de acordo com um protocolo de estudo clínico que se elaborou em colaboração com o Dr. A. Mota-Miranda. Os dados dos doentes alemães foram recolhidos a partir dos registos existentes no Departamento de Neuropatologia da Universidade de Freiburg. O diagnóstico de SIDA baseou-se nos critérios definidos pelo CDC/OMS (*Centers for Diseases Control/Organização Mundial de Saúde*).

Consideraram-se os seguintes elementos clínicos: *idade, sexo, tipo de vírus, doenças sistémicas*, somente as mais relevantes no contexto clínico, *quadro neurológico/psiquiátrico e duração da doença* - intervalo de tempo, em meses, decorrido desde o conhecimento da seropositividade ou da primeira manifestação da doença, até à morte.

De acordo com o tipo de envolvimento neurológico dividiram-se os doentes em 3 grupos: A, B1 e B2. O grupo A inclui 6 indivíduos VIH+ sem alterações neuropatológicas atribuíveis à SIDA e em regra sem sintomatologia do foro neurológico, isto é, sem aparente envolvimento do sistema nervoso (Quadro I); o grupo B1 compreende 4 doentes com envolvimento neurológico directo por VIH, demonstrado através da observação neuropatológica, isoladamente (caso 8) ou em associação com infecções por agentes oportunistas (Quadro II); o grupo B2 é constituído pelos restantes 10 doentes, todos eles com atingimento neurológico secundário a infecções oportunistas ou neoplasias centrais (Quadro III). Apresentam-se ainda 3 histórias clínicas resumidas que pretendem tipificar a evolução clínica dos doentes de cada um dos grupos.

Quadro I. Doentes com SIDA - Grupo A

Nº	Idade	Sexo	Doenças Sistémicas	Quadro Neurológico e Psiquiátrico	Duração	Neuropatologia
1	30	M	Pneumonia, pancitopenia	Assintomático	36	Sem lesões do SNC
2	30	M	Sarcoma de Kaposi	Assintomático	12	Sem lesões do SNC
3	50	M	Linfoma, pneumonia por CMV	Assintomático	22	Sem lesões do SNC
4	38	M	Sarcoma de Kaposi	Assintomático	2	Sem lesões do SNC
5	46	M	Carcinoma laríngeo	Assintomático	84	Sem lesões do SNC
6	31	M	Hemofilia A	Psicose prévia	60	Sem lesões do SNC

CMV, vírus citomegálico; M, masculino

A..B., doente do sexo masculino, de 30 anos, homossexual, seropositivo para VIH-1 desde 1992 e assintomático durante cerca de 1 ano. Em 1993 surgiram lesões cutâneas dispersas pelo tronco, abdómen e membros, de dimensões variáveis e limites circinados e acastanhados que foram biopsadas. O exame anátomo-patológico revelou tratar-se de sarcoma de Kaposi. Em 1993 foi internado por quadro respiratório febril agudo e diarreia; as análises revelavam anemia, trombocitopenia; os exames microbiológicos foram negativos. Iniciou então terapêutica antibiótica de largo espectro por pneumonia alvéolo-intersticial bilateral. O seu estado clínico deteriorou-se rapidamente com agravamento da insuficiência respiratória, falecendo três dias depois. A autópsia revelou lesões de sarcoma de Kaposi cutâneo, necrose tubular aguda, lesões nos órgãos linfáticos típicas de SIDA e pneumonia intersticial por agente não identificado.

Quadro II. Doentes com SIDA - Grupo B1

Nº	Idade	Sexo	Doenças Sistémicas	Quadro Neurológico e Psiquiátrico	Duração	Neuropatologia
7	24	M	Micobacteriose PPC	Alterações demenciais	16	Encefalite VIH-1, Meningite criptocócica
8	32	F	Linfoma Hodgkin	Alterações demenciais	14	Encefalite VIH-1, PSA, HSA
9	41	M	Pneumonia	Alterações demenciais	17	Encefalite VIH-1, miopatia toxoplasmose cerebral
10	32	F	Pneumonia	Défices mnésico e motor	18	Mielopatia VIH-1, miopatia toxoplasmose cerebral

HSA, hemorragia subaracnoideia; F, feminino; M, masculino; PPC, pneumonia por *Pneumocystis carinii*; PSA, polineuropatia sensitiva axonal

C.D., doente do sexo masculino, de 40 anos, internado em 1988 no Serviço de Neurologia e Neurocirurgia para estudo de "ataxia, diplopia e síndrome demencial rapidamente progressivo", com o diagnóstico provisório de "quadro demencial associado a esclerose múltipla". A família referia que os sintomas iniciais, desequilíbrio da marcha e visão dupla, se haviam instalado 2 meses antes, aos quais, recentemente, se tinham adicionado outras queixas: alterações esfínterianas, défice da memória para factos recentes, inibição psicomotora, dificuldade de reconhecimento dos familiares e desorientação. No decurso do internamento estas alterações agravaram-se progressivamente, surgindo depois síndrome meníngeo, hipertermia e infecção respiratória. Tratava-se de um indivíduo até então saudável, sem história prévia de alterações neurológicas; era embarcado da Marinha Mercante referindo contactos heterossexuais múltiplos na Guiné, Cabo Verde, Canadá e Estados Unidos. No exame neurológico realizado com o doente acamado, vigil e colaborante em ordens verbais simples, encontrou-se ligeira desorientação, lentificação psicomotora, discreta rigidez da nuca, diplopia inconstante mas sem evidentes paresias oculares, ausência de paresias dos membros, ligeira hipotonia generalizada e incontinência esfínteriana. Os exames complementares de diagnóstico revelaram: TC cerebral - atrofia cortical; Electroencefalograma - traçados de baixa amplitude sugerindo sofrimento cerebral difuso; Punção lombar - LCR límpido, normotenso, 12 células/mm³ com predomínio de linfócitos reactivos e plasmócitos, aumento das proteínas totais (125 mg/100 ml) com perfil electroforético transudativo; Doseamento de anticorpos anti-VIH positivos para VIH-2. Foi transferido para o Serviço de Doenças Infecciosas, com o diagnóstico clínico de **Demência associada à SIDA**. Nesse Serviço foi diagnosticada tuberculose pulmonar e pneumonia por *Pneumocystis Carinii*. Faleceu 2 meses depois e o exame necrópsico revelou alterações típicas de encefalite por VIH.

Quadro III. Doentes com SIDA - Grupo B2

Nº	Idade	Sexo	Doenças Sistémicas	Quadro Neurológico e Psiquiátrico	Duração	Neuropatologia
11	50	M	Tuberculose disseminada	Alterações demenciais tardias	6	Toxoplasmose cerebral
12	44	M	Criptococose, Micobacteriose	Alterações demenciais tardias	17	Meningite criptocócica
13	41	M	Criptococose	Alterações demenciais cefaleias, paraparesia	8	Meningite criptocócica
14	30	M	Linfoma gástrico	Alterações demenciais hemiparesia	2	Linfoma cerebral
15	36	M	Candidíase	Alterações demenciais hemiparesia, cefaleias	57	Toxoplasmose cerebral
16	36	M	Pneumonia por CMV	Alterações motoras amaurose	11	Encefalite e retinite por CMV
17	31	M	Endocardite bacteriana, sepsis	Síndrome meníngeo	36	Meningite linfocitária encefalite séptica
18	32	F	Pneumonia, tuberculose	Alterações demenciais e motoras	24	Toxoplasmose e linfoma cerebrais
19	36	F	Micobacteriose	Alterações demenciais e motoras	48	Meningoencefalite por CMV
20	36	M	Pneumonia	Afasia, hemiparesia	8	Toxoplasmose cerebral

CMV, vírus citomegálico; F, feminino; M, masculino

*E.F., doente do sexo masculino, de 31 anos, toxicod dependente por via i.v., referindo diversos contactos sexuais não protegidos com companheiras heroinómanas i.v., seropositivo para VIH-1 desde 1990 e assintomático durante 2 anos. Em 1992 apresentou candidíase orofaríngea e no ano seguinte apareceram alterações analíticas das funções hepática e renal. Em 1995 surgiu agravamento do estado geral com acentuado emagrecimento, astenia, tosse com expectoração mucosa, síndrome febril, cefaleias, queixas depressivas e diminuição da força muscular dos membros esquerdos, quadro que motivou o seu internamento. No exame físico apresentava idade aparente superior à real, facies emagrecida, gengivite, adenomegalias cervicais e hemiparesia esquerda com paresia facial de tipo central. O doente fazia tratamento com azidotimidina desde 1990 e com fluconazol desde o aparecimento de candidíase oral, e profilaxia da pneumonia por *Pneumocystis Carinii* com pentamidina; fizera ainda durante alguns meses profilaxia da tuberculose com isoniazida. Nos meses que precederam o seu internamento observou-se descida progressiva dos linfócitos CD4⁺ até 4/mm³. A TC cerebral revelou uma lesão hipodensa temporo-parietal direita, com efeito de massa e captação de contraste, sugestiva de toxoplasmose e atrofia cortico-subcortical generalizada. O LCR continha 1 célula/mm³, com citomorfologia normal, glicose 0,45 g/l, proteínas totais 27 mg/100 ml, perfil electroforético normal, desaminase da adenosina 2,8 U/l, antígeno criptocócico e exame cultural negativos. Não houve melhoria com a terapêutica instituída - pirimetamina e sulfadiazina. O doente faleceu 2 meses depois do internamento e o exame necrópsico mostrou **encefalite por *Toxoplasma gondii***.*

São ainda de salientar os seguintes factos:

1) Todos os doentes estavam infectados pelo vírus VIH-1. Apesar de se julgar interessante que o estudo da formação do hipocampo incluísse doentes infectados por VIH-2, com o objectivo de levar a cabo um estudo comparativo entre os 2 tipos de vírus, não foi possível constituir um grupo de doentes infectados por VIH-2.

2) Infelizmente não foi possível realizar testes psicométricos para melhor avaliação e quantificação das funções cognitivas. Assim, a definição de “alterações demenciais” tem como base os registos dos protocolos clínicos e inclui os défices da orientação, atenção, concentração, compreensão de material verbal e escrito, memória recente e remota e a lentificação psicomotora, avaliados através das provas clinicamente exequíveis durante os exames neurológicos de rotina dos doentes. De qualquer forma, refira-se que alguma homogeneidade existiu na avaliação das funções nervosas superiores, efectuada pelo Neurologista destacado para apoiar o Serviço de Doenças Infecciosas. Quando estas alterações se observaram apenas em fases terminais de evolução da doença, são especificadas como “alterações demenciais tardias”.

3) Designou-se como encefalopatia por VIH a lesão do SNC provocada pelo vírus VIH, independentemente de os doentes apresentarem apenas infecção sistémica ou ainda qualquer tipo de complicação neurológica.

Os restantes dados obtidos a partir dos relatórios necrópsicos dos doentes VIH+, nomeadamente causa de morte, intervalo de tempo que mediou entre o óbito e a autópsia, peso e altura corporais e peso do cérebro são apresentados no Quadro IV.

Quadro IV. Outros dados referentes aos doentes com SIDA

Nº	Causa de morte	Intervalo tempo (h)	Peso (kg)	Estatura (cm)	Peso do cérebro (g)
1	Paragem cardíaca	36	-	-	1330
2	Falência multissistémica	29	-	-	1090
3	Hemorragia digestiva	17	65,5	182	1350
4	Insuficiência respiratória	23	64	173	1280
5	Insuficiência respiratória	24	68	190	1740
6	Broncopneumonia	27	51	172	1300
7	Insuficiência respiratória	24	54	182	1480
8	Compressão tronco cerebral	36	61	176	1500
9	Pneumonia	28	50	178	1500
10	Broncopneumonia	12	39	183	1360
11	Falência multissistémica	35	-	-	1460
12	Falência multissistémica	26	-	-	1370
13	Insuficiência respiratória	36	-	-	1430
14	Hematemese fulminante	26	-	-	-
15	Paragem cardiorespiratória	30	-	-	1450
16	Broncopneumonia	20	36	164	1430
17	Endocardite bacteriana	36	70	187	1500
18	Pneumonia	72	-	-	1150
19	Insuficiência renal aguda	48	-	-	1290
20	Falência multissistémica	16	-	-	1270

No Quadro V apresentam-se os dados dos indivíduos cujos encéfalos foram utilizados para a constituição do grupo de controlo. Todos os indivíduos eram do sexo masculino e não tinham história de infecção por VIH ou de factor de risco a ela predisponente. Nos casos 1 a 10 a morte ocorreu após traumatismo sem envolvimento directo do crânio e pode ser considerada como imediata. Nos casos 11 e 12 a morte ocorreu em consequência de doença natural.

Quadro V. Dados referentes aos casos do grupo de controlo

Nº	Idade	Causa de morte	Intervalo tempo (h)	Peso (kg)	Estatura (cm)	Peso do cérebro(g)
1	22	Traumatismo tóraco-abdominal	23	68	160	1340
2	23	Traumatismo tóraco-abdominal	42	78	158	1500
3	20	Traumatismo torácico	29	68	167	1450
4	21	Traumatismo tóraco-abdominal	26	75	170	1675
5	27	Traumatismo raquimedular	38	58	163	1405
6	54	Traumatismo torácico	24	51	172	1370
7	27	Traumatismo tóraco-abdominal	36	78	174	1430
8	23	Traumatismo abdominal e crural	38	77	174	1485
9	49	Traumatismo torácico	40	89	180	1505
10	33	Traumatismo raquimedular	27	76	174	1425
11	38	Paramiloidose; paragem cardíaca	36	-	-	1390
12	21	Colite ulcerosa; choque hemorrágico	28	-	-	1422

1.2.2. *Indivíduos nos quais se procedeu ao estudo do líquido céfalo-raquidiano*

Esta série é constituída por 61 doentes de ambos os sexos com idades compreendidas entre 21 e 65 anos (média: 38 anos), nos quais se efectuou punção lombar para despiste de doença infecciosa do sistema nervoso (Quadros VI, VII e VIII). Considerou-se apenas uma amostra de LCR por doente; nos casos em que se efectuaram punções lombares seriadas incluiu-se sempre a primeira, geralmente realizada para diagnóstico. Só foram incluídos os casos em que se dispunha de informação clínica bem como de resultados do LCR obtidos no Laboratório do Serviço de Neurologia e Neurocirurgia. Consideraram-se os seguintes dados clínicos: *sexo e idade; tipo de vírus; estadio clínico* - de acordo com a classificação do CDC/OMS; *duração* - período de tempo em meses, decorrido desde o conhecimento da seropositividade ou do primeiro sintoma da infecção e a colheita do LCR; *tipo de envolvimento neurológico* - ausente, directo ou secundário, com distribuição dos doentes por 3 grupos como anteriormente apresentado (A, B1 e B2, respectivamente); *quadro sistémico*, com base nos elementos da história pregressa fornecidos na altura da colheita do LCR - no grupo A; *sintomas e quadro neurológico e psiquiátrico* - nos grupos B1 e B2.

Quadro VI. Doentes com SIDA - Grupo A

Nº	Sexo	Idade	VIH	CDC	Duração	Quadro sistémico
1	M	50	2	IVC2	24	TP, candidíase, PPC, criptosporidiose
2	F	27	1	IVC2	0	Síndrome privação alcoólica, ARC
3	M	50	1	IVC2	4	Tuberculose pulmonar, candidíase
4	M	28	1	IVC2	16	Pneumonia, candidíase, ARC
5	M	30	1	IVC2	6	Tuberculose ganglionar
6	F	50	1	IVC1	3	PPC, infecção por CMV, candidíase
7	M	40	1	IVD	24	Sarcoma de Kaposi
8	M	31	1	II	3	Adenopatias, candidíase
9	M	32	1	III	1	Linfadenopatia generalizada persistente
10	F	31	1	IVC1	24	PPC, candidíase
11	M	28	1	IVC2	36	ARC
12	M	31	1	II	1	Sífilis
13	M	35	1	IVC1	0	Adenopatias, astenia
14	M	41	1	III	2	Adenopatias, astenia
15	M	43	1	IVC2	24	Candidíase, criptosporidiose, síndrome febril
16	M	44	1	IVD	36	Linfoma de Hodgkin
17	F	65	2	IVC1	1	Adenopatias, síndrome febril, TP
18	F	46	2	IVC2	5	ARC
19	M	36	1	IVC1	10	Tuberculose pulmonar, síndrome febril
20	M	22	1	IVC1	0	Hepatite, micobacteriose
21	M	29	1	IVC2	34	Pneumonia, herpes, TP
22	M	45	2	IVC1	53	PPC
23	M	30	1	IVC2	120	ARC
24	M	21	1	IVC1	11	Infecção por Parvovirus
25	M	42	1	IVD	1	Astenia, anorexia, adenopatias
26	M	32	1	IVC2	0	Sífilis secundária

ARC, *AIDS related complex*; CMV, vírus citomegálico; F, feminino; M, masculino; PPC, pneumonia por *Pneumocystis carinii*; TP, tuberculose pulmonar.

Quadro VII. Doentes com SIDA - Grupo B1

Nº	Sexo	Idade	VIH	CDC	Duração	Sintomas neurológicos e psiquiátricos	Quadro neurológico e psiquiátrico
27	M	50	2	IVA	7	Alt. mentais, cognitivas e comportamentais	Demência VIH
28	M	40	2	IVA	4	Alt. mentais, cognitivas e comportamentais	Demência VIH
29	M	57	2	I	2	Tetraparesia flácida	Polirradiculonevrite
30	M	34	1	IVC1	36	Alt. mentais, depressão	Demência VIH
31	F	36	2	IVA	48	Demência	Demência VIH
32	M	29	1	IVB	0	Tetraparesia flácida	Polirradiculonevrite
33	M	34	1	IVC2	22	Paraparesia espástica	Mielopatia VIH
34	F	51	1	IVB	1	Neuropatia	Neuropatia periférica
35	F	31	1	IVC1	14	Tetraparesia distal	Miopatia distal
36	M	33	1	IVD	6	Hemiparesia, disartria, crises convulsivas	Demência VIH
37	M	25	1	IVC1	1	Tetraparesia, HIC, crises convulsivas	Neuropatia sensitivo-motora +Toxoplasmose
38	M	31	1	IVB	3	Alt. mentais <i>minor</i>	Demência VIH
39	M	39	2	IVB	1	Demência	Demência VIH

HIC, hipertensão intracraniana; F, feminino; M, masculino

Quadro VIII. Doentes com SIDA - Grupo B2

Nº	Sexo	Idade	VIH	CDC	Duração	Sintomas neurológicos e psiquiátricos	Quadro neurológico e psiquiátrico
40	M	35	HTLV-III	IVC1	3	Alt. mentais e focais, SM	Toxoplasmose + LMP
41	M	23	HTLV-III	IVC2	9	Síndrome meníngeo	Meningite criptocócica
42	M	37	2	IVC1	3	Alt. mentais, sinais focais	Toxoplasmose cerebral
43	M	40	1	IVC1	4	SM, sinais focais	Micose SNC
44	M	26	1	IVD	10	SM, sinais focais	Toxoplasmose cerebral
45	M	57	1	IVC1	20	Hemiparesia + mielite transversa	Toxoplasmose cerebral + mielite
46	M	45	1	IVC1	2	Sinais focais	Toxoplasmose cerebral
47	M	55	1	IVB	1	Paraplegia, demência	Encefalo-meningomielite + toxoplasmose
48	M	28	1	IVC1	1	Sinais focais	Meningite tuberculosa + toxoplasmose cerebral
49	F	33	1	IVC1	47	Hipostesia, arreflexia membros inferiores	Meningite criptocócica + neuropatia
50	M	31	1	IVC1	7	Cefaleias, estupor	Meningite criptocócica
51	F	36	2	IVE	24	Hemiparesia	Toxoplasmose cerebral
52	M	22	1	IVC1	6	Afasia, hemiparesia crises convulsivas	Toxoplasmose cerebral
53	M	46	2	IVC1	48	Síndrome meníngeo	Meningite criptocócica
54	M	41	1	IVC1	1	Cefaleias, alt. mentais	Meningite criptocócica
55	M	36	1	IVC1	57	Alt. mentais, hemiparesia	Toxoplasmose cerebral
56	M	57	1	IVC1	36	Cefaleias, SM	Meningite criptocócica
57	M	44	1	IVD	10	Depressão	Meningite criptocócica
58	M	28	1	IVC1	17	Cefaleias	Meningite criptocócica
59	F	23	1	II	4	Assintomático	Neurossífilis
60	M	47	1	II	0	Assintomático	Neurossífilis
61	M	50	1	IVB	3	Monoparesia crural	Neurossífilis

F, feminino; M, masculino; HTLV-III, designação do vírus em 1985; LMP, leucoencefalopatia multifocal progressiva; SM, síndrome meníngeo. Os casos 54 e 55 correspondem respectivamente aos casos 13 e 15 da casuística de que se estudou a formação do hipocampo (ver Quadro III).

2. PROCESSAMENTO DO MATERIAL

As formações do hipocampo foram obtidas no decurso de autópsias realizadas no Serviço de Anatomia Patológica e no Instituto de Medicina Legal. Foram isoladas através da dissecação dos hemisférios cerebrais direito e esquerdo. Porém, nem sempre foi possível dissecá-las e utilizá-las bilateralmente porque em alguns casos havia lesões que interessavam um dos lados. Após a colheita, o material foi fixado em formol a 4%. Na Alemanha, o material foi obtido a partir de secções coronais, de aproximadamente 1 cm de espessura, de encéfalos já imersos em formol a 4%. A duração do período de fixação das formações do hipocampo utilizadas oscilou entre três meses e dois anos.

Nos Serviços atrás referidos decorreu o estudo neuropatológico que permitiu identificar e caracterizar as alterações do sistema nervoso dos doentes VIH+ através de observações realizadas em fragmentos de tecido nervoso que, após fixação em formol e inclusão em parafina, foram processados segundo técnicas histológicas de rotina.

2.1. Processamento para inclusão em glicolmetacrilato

Nem todas as formações do hipocampo recolhidas foram usadas para os estudos estereológicos. Tal facto deveu-se basicamente a duas razões. Por um lado, não foi possível reconstruir com precisão algumas delas, passo indispensável às metodologias a aplicar, o que se ficou a dever quer à falta de uma ou mais secções quer à presença de lesões; por outro, à opção de apenas se estudarem indivíduos do sexo masculino atendendo ao número escasso de amostras obtidas em mulheres. Esteve na base desta decisão a existência de marcados dimorfismos sexuais em diversos componentes da formação do hipocampo (222-225). Feita a selecção do material com base nos critérios mencionados, processaram-se para inclusão em glicolmetacrilato 20 formações do hipocampo, provenientes de 10 indivíduos com SIDA (números 1 - 4, 7 e 11 - 15 dos quadros I, II e III respectivamente) e 10 dos indivíduos utilizados como controlos (1 - 10 do Quadro V). Dada a existência de assimetrias direito/esquerdo na organização estrutural da formação do hipocampo (323), utilizaram-se formações do hipocampo dos hemisférios direito e esquerdo em igual número, quer no material proveniente dos doentes com SIDA quer no recolhido em controlos.

Depois de dissecadas (Fig. 1.A) e reconstruídas, as formações do hipocampo eram de seguida colocadas num aparelho de corte, construído para o efeito, constituído por placas de material acrílico de forma adaptada ao hipocampo humano e cuja principal característica era permitir a passagem de uma lâmina de corte a espaços uniformes ao longo de toda a extensão rostro-caudal da peça (Fig. 1.B). As formações do hipocampo eram colocadas com o seu eixo longitudinal aproximadamente perpendicular ao plano coronal, segundo o qual se pretendia seccioná-las, mantendo-se nesta posição através da sua inclusão em solução de agar a 7%. Deste modo obtinham-se 12 a 14 secções coronais (Fig. 1.C), paralelas e seriadas, com 3,7 mm de espessura. O conjunto das secções espessas assim obtidas continha a totalidade da formação do hipocampo, desde o seu pólo anterior até à circunvolução fasciolar.

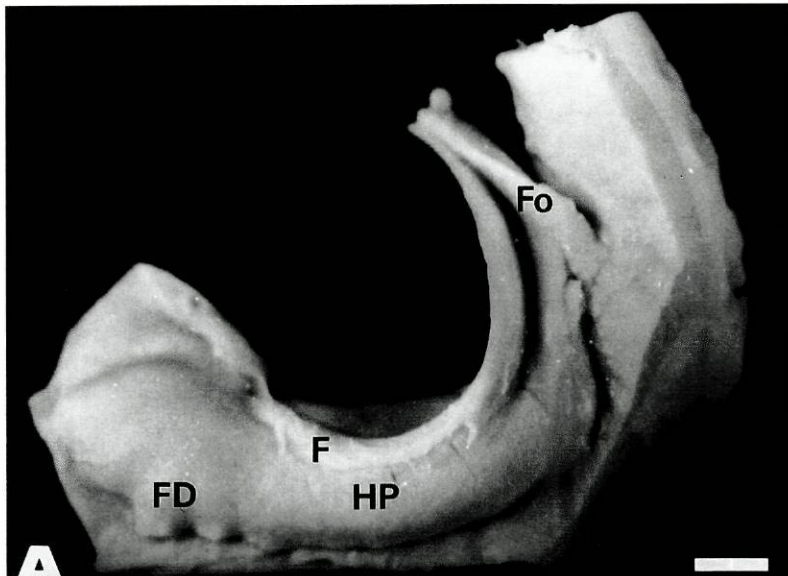
Cada secção era desidratada através de passagens sucessivas, com a duração de 60 minutos cada, em soluções alcoólicas de concentrações crescentes (70%, 90%, 95%) e, por fim, em álcool absoluto. Terminada a desidratação, as secções permaneciam imersas durante 6 dias numa solução composta por 100 ml de glicolmetacrilato (hidroxietilmetacrilato; Technovit 7100, Kulzer, Alemanha) e 1 g de peróxido de dibenzoílo que diariamente era substituída. Em seguida as secções eram colocadas de modo orientado em recipientes próprios, de tal modo que a face rostral de cada corte se orientasse inferiormente. Eram, então, imersas num meio de inclusão constituído por 15 ml de solução de infiltração e 1 ml de dimetilsulfóxido, o que permitia a polimerização da resina em cerca de duas horas à temperatura ambiente. Após a inclusão em glicolmetacrilato, cada uma das secções era retirada do seu recipiente e colocada no suporte de um micrótopo rotativo Jung Multicut (Leica, Alemanha) equipado com faca de tungstato de carbono. Eram, então, seccionadas no plano coronal a intervalos de 50 µm, recolhendo-se de cada secção o primeiro corte em que a estrutura da formação do hipocampo estivesse totalmente preservada. Obtinham-se, deste modo, para cada caso, conjuntos de 12 a 14 cortes coronais de 50 µm de espessura nominal. Os cortes eram depois montados em lâminas de vidro, secos em estufa a 60°C durante 24 horas e corados pelo método de Giemsa modificado para material incluído em glicolmetacrilato (409). Por fim, eram cobertos com lamelas de vidro utilizando Histomount como meio de montagem.

O material incluído em glicolmetacrilato foi utilizado para a determinação dos volumes das principais subdivisões da formação do hipocampo, bem como do número total e volume dos neurónios dessas subdivisões.

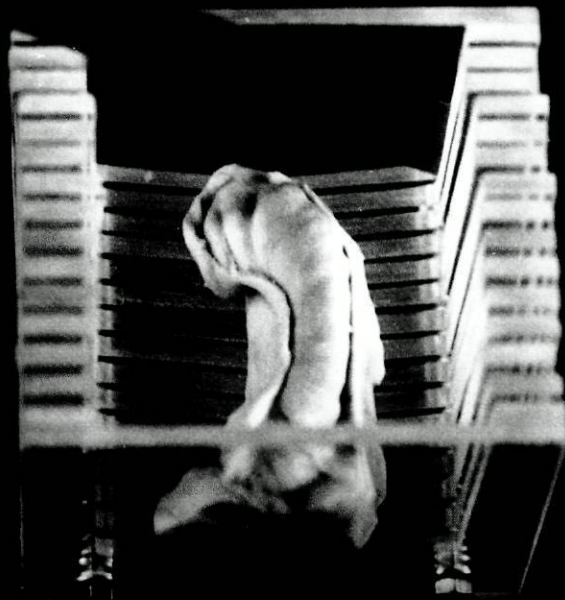
2.2. Processamento para impregnação pelo método de Golgi

Das formações do hipocampo não utilizadas para os estudos estereológicos, atrás descritos, colheram-se blocos que se processaram para impregnação pelo método rápido de Golgi modificado, adaptado no Laboratório do Instituto de Anatomia, de forma a produzir melhor impregnação em material de autópsia (306).

Resumidamente, apresentam-se os passos mais importantes desta variante de impregnação Golgi. Os fragmentos da formação do hipocampo eram inicialmente fixados durante 5 dias numa solução de ósmio a 0,2% e dicromato de potássio a 2,4%; em seguida



A



B



C

Fig. 1. A. Fotografia de uma formação do hipocampo do hemisfério direito, depois de dissecada, tal como foi processada para estereologia. Reconhecem-se algumas das suas subdivisões: FD, fásia denteada; HP, hipocampo; F, fímbria; Fo, fórnix. Barra = 5 mm. B. Aparelho de corte utilizado para obter secções coronais seriadas da formação do hipocampo. Observa-se a lâmina com que se efectuaram os cortes da referida estrutura. Conjunto de 15 secções seriadas (3,7 mm de espessura) da formação do hipocampo, dispostas em recipientes, nos quais se procedeu a grande parte do processamento histológico.

eram imersos numa solução de dicromato de potássio a 3%, onde permaneciam 24 horas ao abrigo da luz, e depois eram transferidos para uma solução de nitrato de prata a 0,75% onde permaneciam três dias, sendo ulteriormente mudados para solução idêntica onde permaneciam mais três dias, sempre ao abrigo da luz. Terminada a impregnação, e após rápidas passagens por álcool absoluto e terpineol, os fragmentos eram parcialmente incluídos em bases de parafina e colocados no suporte do micrótomo de deslizamento. Obtinham-se, assim, cortes com espessura de 100 μm que, após passagem por álcool absoluto, eram mergulhados ordenadamente numa placa de Petri contendo terpineol. Finalmente eram montados em lâminas, lavados com xilol e cobertos por uma camada de resina Dammar xilol.

2.3. Processamento para estudo imuno-histoquímico

Com o material de necrópsia disponível (fragmentos das formações do hipocampo não processadas para inclusão em glicolmetacrilato ou para estudo pelo método de Golgi), proveniente de 15 casos com SIDA e dos 12 controlos, procedeu-se à pesquisa de alterações neurodegenerativas através da utilização de técnicas de imuno-histoquímica e, ainda, à caracterização anátomo-patológica de outras alterações existentes.

Os fragmentos, fixados em formol, foram incluídos em parafina segundo o método clássico de processamento histopatológico. A avaliação das lesões foi feita em cortes corados pela hemateína-eosina. Efectuaram-se, igualmente, colorações pelo método de Perls para pesquisa de depósitos de ferro e pelo método da hematoxilina ácida fosfotúngstica de Mallory para estudo da glia. No estudo imuno-histoquímico, baseado em técnicas referidas na literatura e que adiante se descrevem (56, 93, 180, 216, 236, 250, 384, 388), utilizaram-se imuno-soros (DAKO) para a proteína acídica fibrilar glial (GFAP, monoclonal), lisosima (policlonal), ubiquitina (policlonal) e sinaptofisina (monoclonal), respectivamente nas diluições de 1/50, 1/200, 1/100 e 1/10.

Os cortes eram recolhidos em lâminas revestidas por gelatina. As peroxidases endógenas eram inibidas com solução a 0,3% de peróxido de hidrogénio em metanol absoluto. Para evidenciação dos antigénios, os cortes eram imersos em tampão de citrato de sódio 0,01M, pH 6 e submetidos a um pré-tratamento em micro-ondas. O método de detecção utilizado foi o da estreptavidina conjugada com *horseradish peroxidase*, HRP (DAKO). Na

revelação usou-se uma solução de tetracloreto de 3,3' diaminobenzidina (DAB) constituída por 6 mg deste produto em 10 ml de TBS, à qual se adicionou-se 0,1 ml de peróxido de hidrogénio a 3%, no acto de utilização. Resumidamente, a técnica de imuno-histoquímica compreendeu os seguintes passos:

A) Processamento em micro-ondas: os cortes de 3 μ m colados em lâminas revestidas por gelatina eram colocados em estufa a 58-60°C durante 30 a 40 minutos. Em seguida, procedia-se à desparafinação em xilol, 3x5 minutos, à passagem em álcool absoluto, 3x5 minutos, à inibição das peroxidases com solução a 0,3 % de peróxido de hidrogénio em metanol absoluto, durante 15 minutos, e a lavagem em água corrente seguida de água destilada, durante 5 minutos. Depois procedia-se à recuperação antigénica pelo calor, efectuando-se 3 ciclos de 5 minutos no micro-ondas a 700 W e em tampão de citrato de sódio 0,01 M, pH 6. Após arrefecimento, mantinham-se os cortes no tampão durante 15 a 20 minutos, que a seguir se lavavam em água corrente e depois em água destilada.

B) Processamento imuno-histoquímico: os cortes eram inicialmente lavados com tampão Tris HCl, pH 7,6, em 3 passagens de 3 minutos cada. Em seguida eram incubados ou em soro normal de coelho, no caso do soro primário monoclonal, ou em soro normal de porco, no caso de soro primário policlonal, na diluição de 1/5 em tampão Tris HCl, durante 30 minutos. Seguia-se a incubação nos soros primários, durante 30 minutos, e a lavagem com o mesmo tampão através de 3 passagens de 3 minutos cada. Aplicava-se então o anticorpo de ligação, utilizando-se o anticorpo de coelho biotinilado, anti-imunoglobulina de ratinho, no caso de soro primário monoclonal e anticorpo de porco biotinilado anti-imunoglobulina de coelho, no caso de soro primário policlonal durante 30 minutos. Os cortes eram depois lavados com tampão Tris HCl, pH 7,6 em 3 passagens de 3 minutos cada. Em seguida, procedia-se à passagem para o sistema de detecção (estreptavidina conjugada com HRP) durante 30 minutos, a 3 lavagens com o mesmo tampão e a revelação com DAB, durante 5 a 10 minutos. Após novas lavagens com tampão e passagem por água destilada, os cortes eram contrastados com hematoxilina de Mayer, durante 1 minuto, lavados em água destilada, azulados com amónia a 0,4% e, posteriormente, lavados em água corrente e depois em água destilada. Por último, eram desidratados, diafanizados e montados em lâminas gelatinadas.

A utilização do soro para GFAP tinha por objectivo definir áreas de gliose e o soro para lisosima destinava-se a realçar macrófagos. O soro para ubiquitina (proteína ligada aos lisosomas com participação em sistema enzimático para eliminação de proteínas anormais,

nomeadamente com expressão em doenças neurodegenerativas) foi utilizado para evidenciar células com eventuais alterações degenerativas. O soro para sinaptofisina (proteína dos grânulos neuro-endócrinos e das vesículas sinápticas) destinava-se a evidenciar alterações a nível sináptico, mas, por motivos que se crêem ter sido de ordem técnica, não se conseguiu infelizmente obter qualquer marcação com este soro.

3. ANÁLISES ESTEREOLÓGICAS

3.1. Determinação de volumes

Para a determinação dos volumes das camadas dos diversos componentes da formação do hipocampo foi necessário proceder ao desenho do perfil de cada uma das camadas. Utilizou-se, para o efeito, uma câmara clara acoplada a um microscópio óptico e uma objectiva 3X (ampliação final de 24X). Delinearam-se as diversas camadas em todos os cortes seleccionados, ou seja, num total de 12 a 14 cortes. Assim, na fâscia denteada desenhou-se o perfil da camada de células granulares, da camada molecular e do hilo (camada polimórfica); no hipocampo desenhou-se o perfil da camada de células piramidais, do *stratum oriens* e dos *strata lacunosum-moleculare* e *radiatum* das subdivisões CA3 e CA1.

Para melhor compreensão da citoarquitettura das camadas da formação do hipocampo remete-se o leitor para a Figura 2. Aí se podem observar fotografias de 3 cortes seriados de uma formação do hipocampo, onde se indicam as principais subdivisões e respectivos limites.

Para distinguir as diferentes camadas da formação do hipocampo teve-se em linha de conta as características da sua organização citoarquitectónica, alvo de numerosas descrições em diversas espécies animais incluindo o Homem (3, 23, 24, 202, 203, 406-408, 410, 424) e que se descrevem sumariamente de seguida.

1) Camada de células granulares - camada fina e sinuosa com elevada densidade celular. É fácil a sua identificação em todas as secções dada a marcada intensidade da coloração dos seus neurónios e a ausência de continuidade com as camadas celulares do hipocampo. Na porção medioseptotemporal da formação do hipocampo a camada de células granulares apresenta configuração em ferradura, unindo-se as suas lâminas lateral e medial posteriormente para formar a crista denteada (Fig. 2). A este nível, é constituída por células de citoplasma escasso e núcleos esféricos dispostas em 6 ou 7 fileiras compactas (Fig. 3.A e 3.B).

Contudo, nos pólos da formação do hipocampo, onde o seu pregueamento é particularmente acentuado, observam-se verdadeiras ilhas de células granulares de configuração muito variada, dispersas entre outras camadas da formação do hipocampo. Nestas circunstâncias as células granulares são facilmente reconhecidas pela forma, densidade e intensidade de coloração.

2) Camada molecular da fásia denteada - camada pobre em células que contém os dendritos das células granulares e das células em cesto e polimórficas do hilo, bem como terminais axonais de diversas origens, mas provenientes sobretudo do córtex entorrinal (4, 5). Na porção lateral é delimitada pela pia-máter e na porção medial por uma linha imaginária que, iniciando-se nos vértices lateral e medial da camada de células granulares, se dirige em arco, paralelamente ao contorno externo dessa camada até à fissura hipocampal, no caso da sua lâmina medial, e até à fissura fimbriodenteada, no caso da sua lâmina lateral. Essa linha era traçada na zona de transição da fásia denteada para o *stratum lacunosum-moleculare* de CA3 e CA1, do qual se distinguiu pela diferente orientação das fibras e intensidade de coloração.

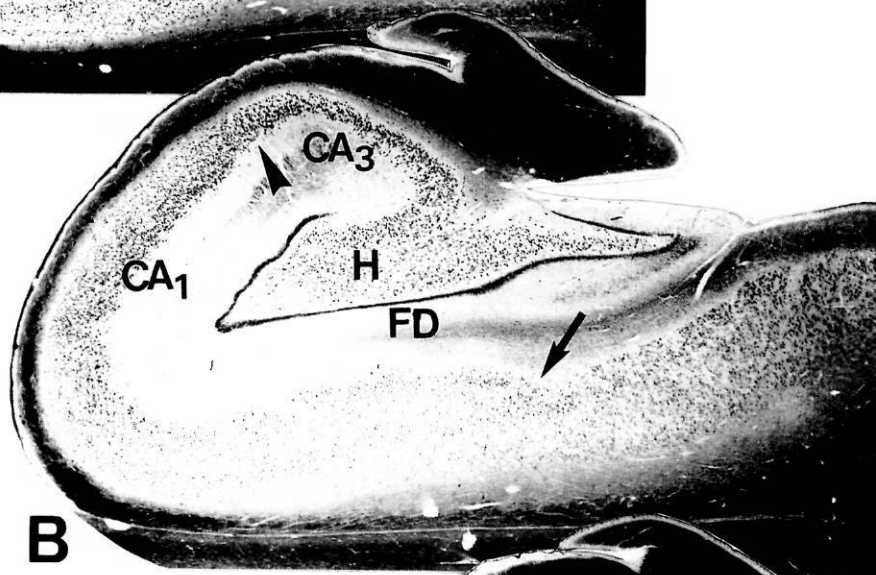
3) Hilo da fásia denteada - o hilo da fásia denteada foi delimitado pelo contorno interno da camada de células granulares e por uma linha imaginária que une os vértices dessa camada, passando pela extremidade proximal da subdivisão CA3 do hipocampo (215) e que corresponde ao campo CA4 de Lorente de Nó (215) (Fig. 2). As células hilares, polimórficas e de tamanho variável, distribuem-se de modo disperso por todo o hilo (Fig. 3.C e 3.D).

4) Camadas de células piramidais das subdivisões CA3 e CA1 do hipocampo - os contornos das camadas de células piramidais das subdivisões CA3 e CA1 do hipocampo foram definidos de acordo com os critérios estabelecidos para o hipocampo humano por West e Gundersen (408). Assim, a camada de células piramidais de CA3 corresponde aproximadamente à porção da camada piramidal que Ramón e Cajal (305) definiu como “regio inferior” e que engloba as regiões CA3 e CA2 de Lorente de Nó (215). Deste modo, a camada de células piramidais da região CA3 do hipocampo estende-se desde o hilo da circunvolução denteada até ao limite distal de uma zona mais alargada, “de transição”, onde a densidade celular e a dimensão dos corpos celulares são menores, a região CA2 do hipocampo (Fig. 2). Em CA3 as células dispõem-se de forma compacta em 4 a 5 fileiras e apresentam corpos celulares de grandes dimensões, alongados e intensamente corados; os seus núcleos são ovóides e os nucléolos de grandes dimensões (Fig. 3.E e 3.F).

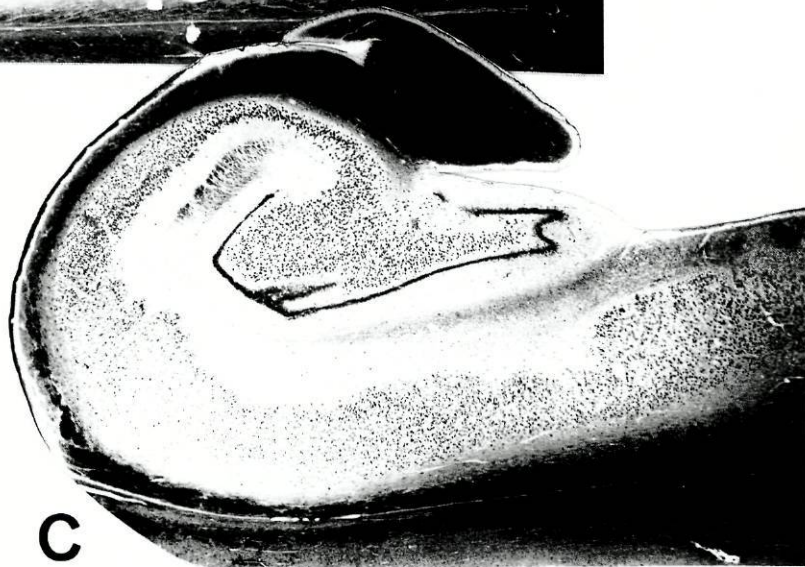
A camada de células piramidais de CA1, correspondente à “regio superior” de Ramón e Cajal (305), inicia-se na região onde as grandes células piramidais de CA3 são substituídas pelas pequenas pirâmides de CA1, com núcleos esféricos de menores dimensões, citoplasma



A



B



C

Fig. 2. A-C. Conjunto de microfotografias de 3 cortes coronais seriados da formação do hipocampo corados pelo Giemsa. FD, fásia denteada; H, hilo; CA3, região CA3 do hipocampo; CA1, região CA1 do hipocampo. As zonas de transição entre as diferentes subdivisões estão indicadas da seguinte forma: ponta de seta, transição entre CA3 e CA1; seta, transição entre CA1 e subículo. Este conjunto de cortes faz parte de uma série em que se procedeu às determinações volumétricas aplicando o Princípio de Cavalieri. Barra = 2 mm.

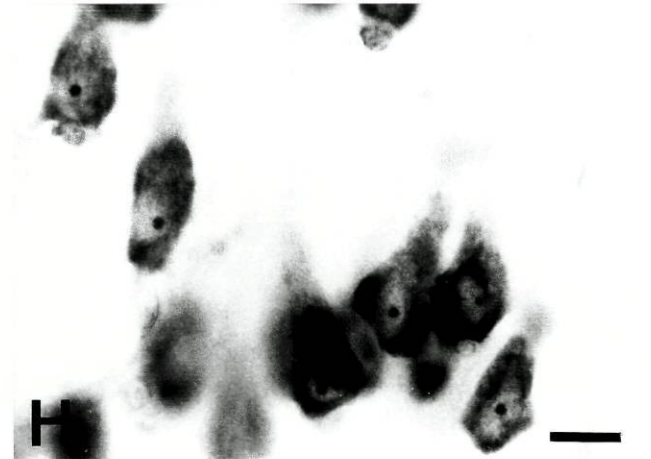
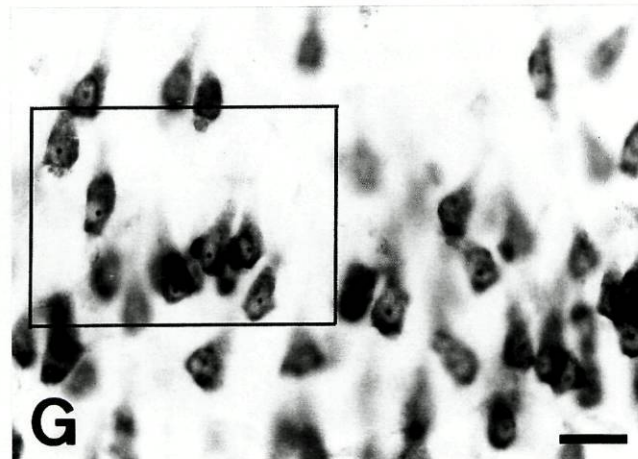
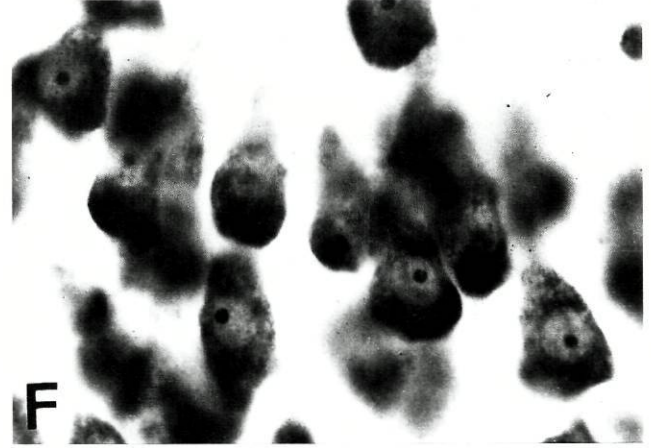
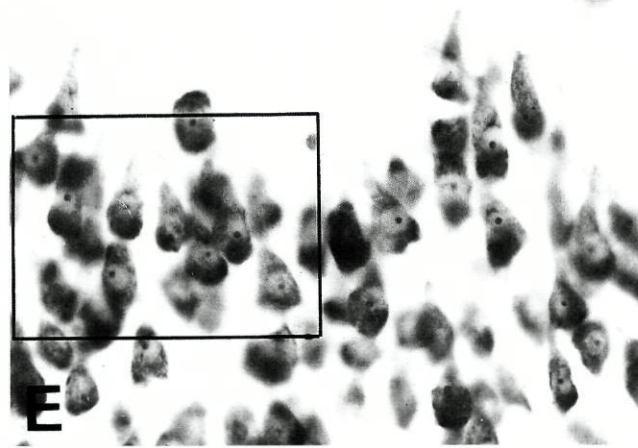
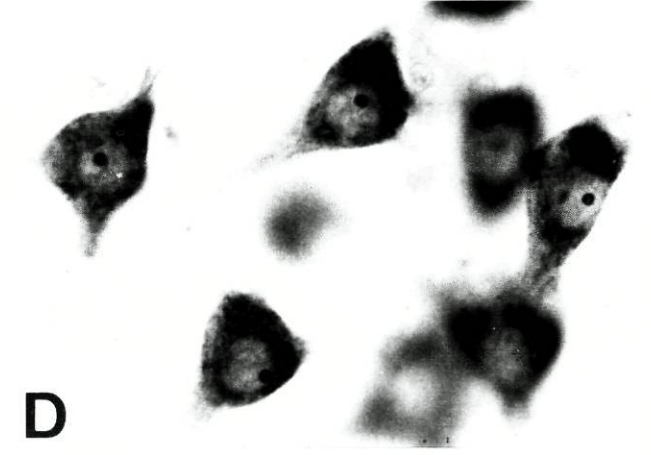
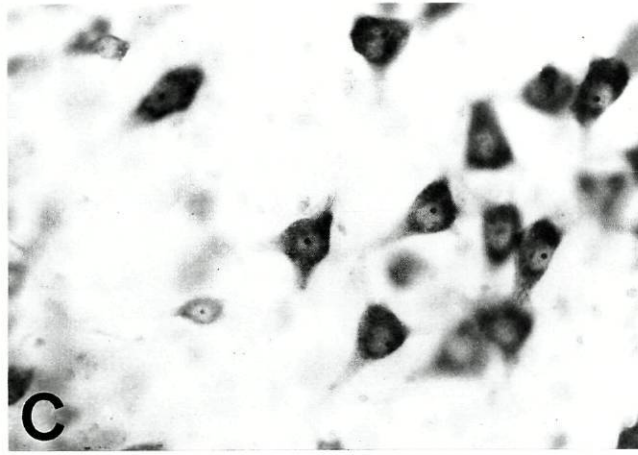
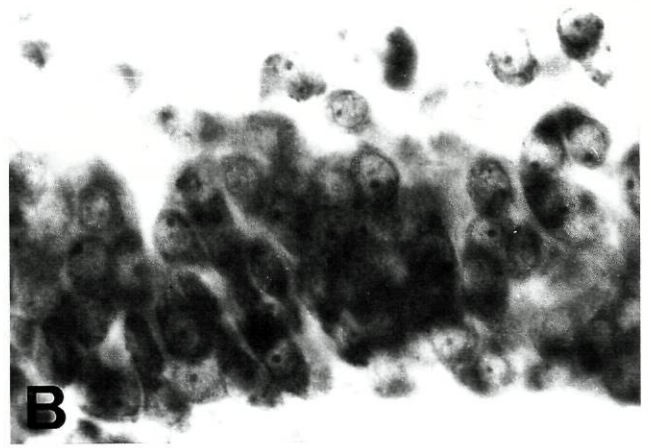
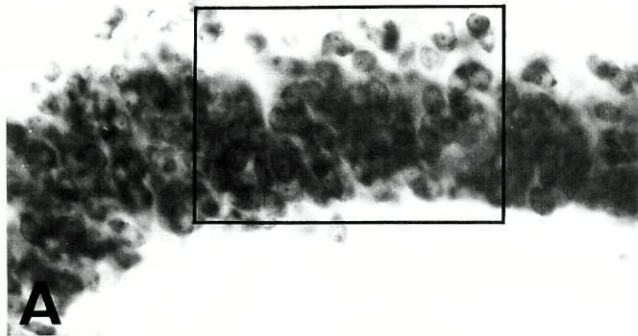


Fig. 3. A. Microfotografia da camada de células granulares da fásia denteada. O rectângulo representa a área mostrada em maior ampliação em B. B. Células granulares em maior ampliação: intensamente coradas, com citoplasma escasso e núcleos esféricos. C-D. Microfotografias de interneurónios hilares, polimórficos e de tamanho variável. E. Microfotografia da camada de células piramidais da região CA3. O rectângulo representa a área que se ampliou em F, permitindo observar com mais detalhe as células piramidais de CA3, caracterizadas por apresentarem corpos celulares de grandes dimensões, alongados e intensamente corados e núcleos ovóides com grandes nucléolos. G. Microfotografia de células piramidais da região CA1, cujos núcleos e corpos celulares apresentam menores dimensões que os das pirâmides de CA3, a par de coloração menos intensa e mais homogénea. O rectângulo representa a área mostrada em maior ampliação em H. Barra (A, C, E, G) = 20 μm . Barra (B, D, F, H) = 10 μm .

menos abundante e com coloração menos intensa e mais homogénea (Fig. 3.G e 3.H). A camada piramidal de CA1 é mais espessa mas possui menor densidade celular que a camada piramidal da região CA3-CA2; assim, o limite entre as duas camadas define-se facilmente pela transição abrupta que se observa quer na organização quer no tamanho das células (Fig. 2). A camada piramidal de CA1 expande-se progressivamente em direcção ao subículo. A este nível dispõe-se em duas camadas, a mais superficial das quais, e que é também a mais densamente celular, se sobrepõe ao subículo, definindo com este um bordo oblíquo que permite a sua delimitação.

5) *Stratum oriens das subdivisões CA3 e CA1 do hipocampo* - camada rica em fibras que contém os dendritos basais das células piramidais das camadas celulares adjacentes, axónios, aferentes e eferentes e seus ramos colaterais e, ainda, interneurónios inibitórios. Verificou-se ser difícil a demarcação correcta da zona de transição desta camada com o *stratum alveus*, pelo que se considerou o epêndima como o limite externo do *stratum oriens* de CA3 e CA1 e o bordo externo das camadas de células piramidais de CA3 e CA1 como o seu limite interno.

6) *Strata radiatum e lacunosum-moleculare das regiões CA3 e CA1 do hipocampo* - camadas de fibras nervosas que contém os dendritos apicais das células piramidais, colaterais dos axónios desses neurónios, terminais axonais das diversas aferências hipocámpais e interneurónios. O limite externo desta camada é definido pelo extremo interno da camada de células piramidais das regiões CA3 e CA1 e o limite interno pela linha imaginária referida na alínea 2), onde confina com a camada molecular da fâscia denteada.

Não foi estudado o subículo nesta dissertação por duas ordens de razões. Por um lado, o subículo nem sempre se encontrava completo nos casos estudados, devido à necessidade de adequar a extensão do material a analisar à dimensão do suporte de apoio do micrótomo. Por outro lado, como a dissertação se dirige à apreciação estrutural subjacente a uma forma de demência, a associada à encefalopatia por VIH, o objecto a estudar diz respeito ao circuito trissináptico da formação do hipocampo, que não inclui o subículo.

A determinação do volume das camadas dos diversos componentes da formação do hipocampo foi efectuada de acordo com o clássico princípio de Cavalieri (45). Com efeito, e conforme descrito no ponto 2.1., os cortes utilizados para as determinações volumétricas

foram seleccionados aplicando metodologias de escolha simultaneamente aleatória e sistemática (139). Em cada corte, a área de cada camada foi estimada através de técnicas de contagem de pontos utilizando para o efeito grelhas apropriadas. As grelhas foram construídas de modo a que no total dos cortes de cada caso que incluía a camada a estudar, se contassem entre 100 e 200 pontos (9, 141, 226-228). Assim, as distâncias inter-pontos, bem como as respectivas áreas por ponto, variavam conforme a extensão das camadas da formação do hipocampo, como se pode observar no Quadro IX, onde se mostra também o número médio de pontos contados e as médias dos coeficientes de erro (CE) obtidos.

Quadro IX. Determinação de volumes da formação do hipocampo: distância inter-pontos, área por ponto - a(p) -, número médio de pontos, média do CE

	Distância inter-ponto (mm)	a(p) (mm ²)	Nº médio de pontos	CE
<i>Fáscia denteada</i>				
<i>Camada de células granulares</i>	9	0,14	176	0,077
<i>Hilo</i>	18	0,56	124	0,100
<i>Camada molecular</i>	18	0,56	162	0,077
<i>Hipocampo</i>				
<i>Região CA3</i>				
<i>Camada de células piramidais</i>	12,5	0,27	155	0,145
<i>Stratum oriens</i>	12,5	0,27	231	0,105
<i>Strata radiatum+lacunosum-moleculare</i>	12,5	0,27	173	0,173
<i>Região CA1</i>				
<i>Camada de células piramidais</i>	31	1,67	143	0,055
<i>Stratum oriens</i>	18	0,56	222	0,063
<i>Strata radiatum+lacunosum-moleculare</i>	25	1,09	171	0,071

Para a contagem dos pontos que se sobrepunham a determinada camada, a grelha era colocada aleatoriamente sobre o desenho. O volume de cada uma das camadas estudadas era então calculado multiplicando o número total de pontos obtidos dentro dos limites dessa camada pela distância entre os cortes, recorrendo à seguinte fórmula:

$$V = \bar{t}.a(p).\Sigma P$$

na qual \bar{t} representa a distância entre os cortes analisados, calculada a partir da espessura dos cortes e do intervalo de obtenção dos mesmos (3,7 mm), a(p) a área associada a cada ponto da grelha e ΣP o número total de pontos “caídos” sobre a camada em estudo (141).

Os volumes determinados deste modo não vieram a requerer correcção pelo factor de retracção tecidual, FR_T , que se calculou como a seguir se refere, uma vez que o valor médio obtido do FR_T foi inferior a 0,05.

Estimativa do factor de retracção tecidual: o factor de retracção tecidual foi determinado em 6 casos (3 VIH+ e 3 controlos), utilizando em cada caso uma secção da formação do hipocampo obtida como anteriormente descrito (cf. 2.1.). Para esse efeito começava-se por fotografar à lupa uma das superfícies da secção a fresco e, posteriormente, após inclusão dessa secção em glicolmetacrilato, fotografava-se o primeiro corte com 50 µm de espessura correspondente à mesma superfície da secção. As áreas das secções eram depois medidas nas fotografias, obtidas à ampliação final de 20X, com um analisador de imagem Videoplan. Com base no pressuposto que a retracção dos tecidos é isométrica, o FR_T foi calculado a partir dos valores obtidos para as áreas, mediante aplicação da fórmula:

$$FR_T = \frac{c \cdot A_f^{3/2} \cdot V_f}{c \cdot A_m^{3/2} \cdot V_m} = \frac{V_f}{V_m} \cdot \left(\frac{A_f}{A_m}\right)^{3/2}$$

em que c é uma constante dependente da forma dos cortes, A_f é a área da secção fotografada a fresco, A_m é a área da secção fotografada após inclusão em glicolmetacrilato e V_f e V_m são os volumes dos cortes obtidos a fresco e após inclusão em glicolmetacrilato, respectivamente (226, 396).

3.2. Determinação do número total de neurónios

A determinação do número total de neurónios da formação do hipocampo foi efectuada nas seguintes camadas - camada de células granulares e hilo da fásia denteada, camadas de células piramidais das subdivisões CA3 e CA1 do hipocampo. O número total de neurónios foi estimado através do método do *fractionator* óptico (227, 228, 408, 409) para o que se utilizou um sistema de análise estereológica vídeo Olympus (Olympus Danmark A/S), com um microscópio Olympus BH-2 acoplado a uma câmara de vídeo Sony CCD-Iris MTV-3. Esta câmara fazia interface com um monitor a cores, onde se visualizavam os cortes histológicos, via um adaptador de vídeo Sony e um computador Commodore Amiga 2000. Os movimentos da platina do microscópio ao longo dos eixos x e y eram controlados através de um sistema motorizado que lhe está acoplado. A medição dos movimentos verticais, isto é, ao longo do eixo z , era efectuada com o auxílio de um microcator digital Heidenhain MT-12 (Heidenhain GmbH), também acoplado à platina do microscópio.

Uma vez que as estimativas se efectuaram a partir de cortes seleccionados como se referiu no ponto 2.1., ou seja, em cortes de 50 μm de espessura separados entre si de 3,7 mm, a *section sampling fraction (ssf)* foi de 0,013. Em cada corte as células eram contadas através do *disector* óptico (227, 228, 373, 408, 409). Este método consiste na contagem do número de partículas que pela primeira vez aparecem em foco dentro dos limites de uma grelha, a área do *disector*, e numa fracção fixa da espessura do corte, a altura do *disector*. As contagens obedeceram à regra das linhas proibidas de Gundersen (137) que exclui as partículas que são interceptadas pelas linhas inferior e esquerda da grelha.

O esquema de amostragem foi aplicado, em cada caso, a todos os cortes que continham a camada celular em apreço, variando o número de cortes de caso para caso, conforme a extensão rostrocaudal da camada. As determinações eram efectuadas na imagem vídeo do corte, sobre a qual se sobrepunha uma grelha de contagem adequada à camada que se pretendia contar e que havia sido previamente determinada tendo em consideração a dimensão e a densidade celular dessa camada. As grelhas foram dimensionadas de acordo com as propostas de West e Gundersen (408) para o estudo do hipocampo humano, de forma a contar não mais de 5 células em cada *disector* (ver Quadro X). A amplitude das deslocações ao longo dos eixos x e y foi calculada para cada uma das camadas, de modo a que em cada camada se contassem entre 100 e 200 células (Quadro X). Assim, a *area sampling fraction (asf)* variava conforme a camada e os seus valores mostram-se no Quadro X. A altura do *disector* (h) foi de 20 μm para todas as camadas estudadas.

Quadro X. Valores das deslocações ao longo dos eixo x e y, da área da grelha e da *area sampling fraction* utilizados nas diferentes subdivisões da formação do hipocampo

	x	y	área da grelha (μm^2)	asf
<i>Camada de células granulares</i>	468	480	391	0,0016
<i>Hilo</i>	700	616	9130	0,022
<i>Camada de células piramidais de CA3</i>	472	490	3588	0,015
<i>Camada de células piramidais de CA1</i>	1464	1376	3588	0,0018

Na Figura 4 podem observar-se núcleos de células piramidais da subdivisão CA3 contados num *disector*, segundo o método acima descrito.

Em resumo, no caso do material a quantificar, a técnica do *fractionator* óptico consiste no seguinte: a partir de uma posição inicial aleatória, fora dos limites da camada em estudo, procedia-se à deslocação sistemática da área de amostragem, a intervalos regulares

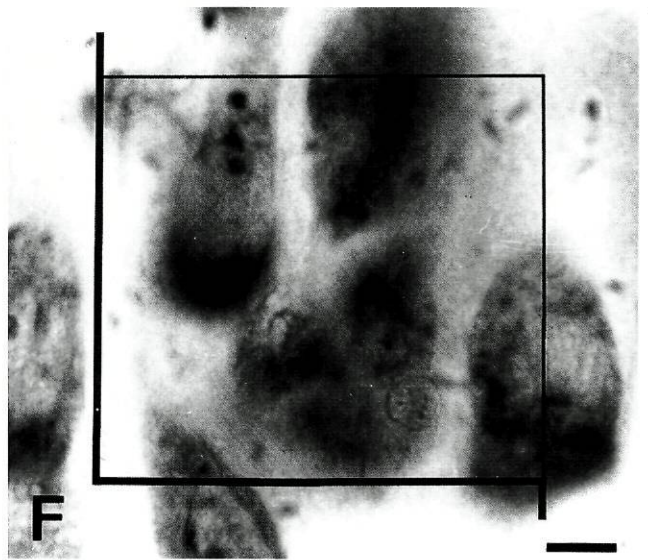
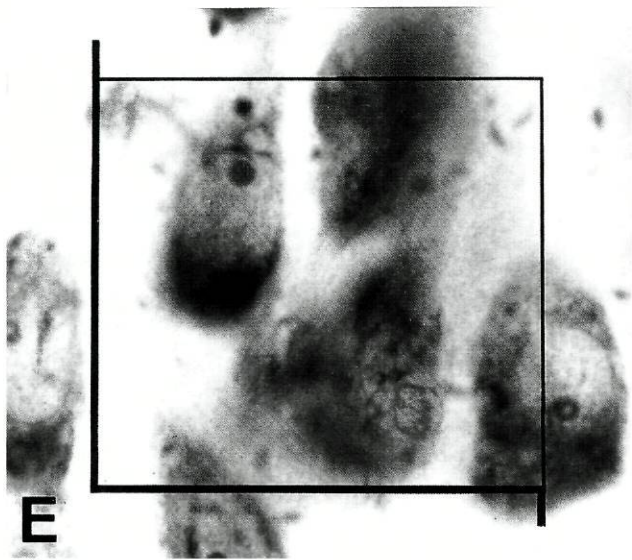
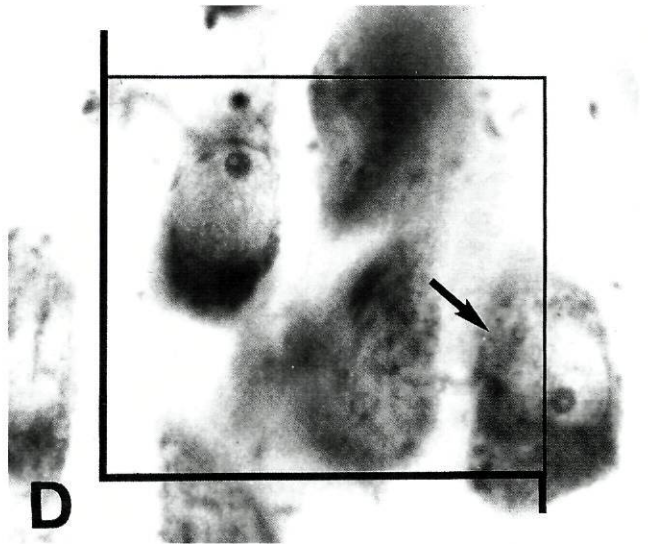
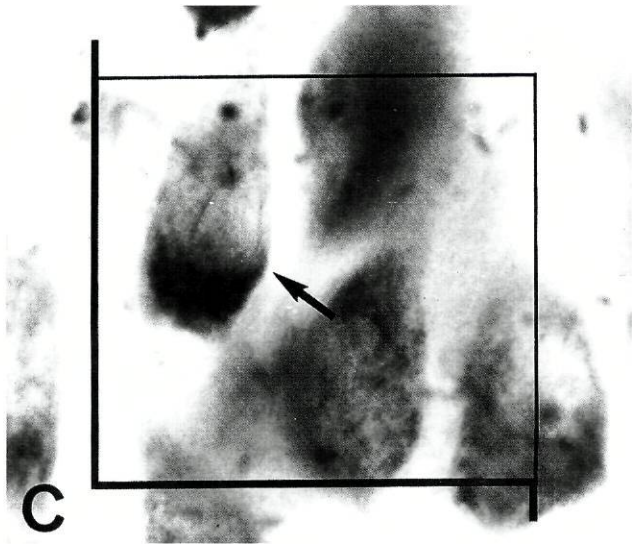
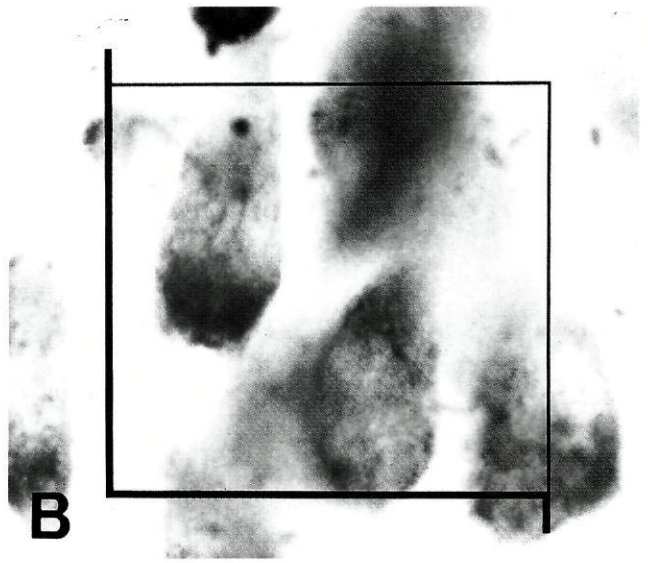
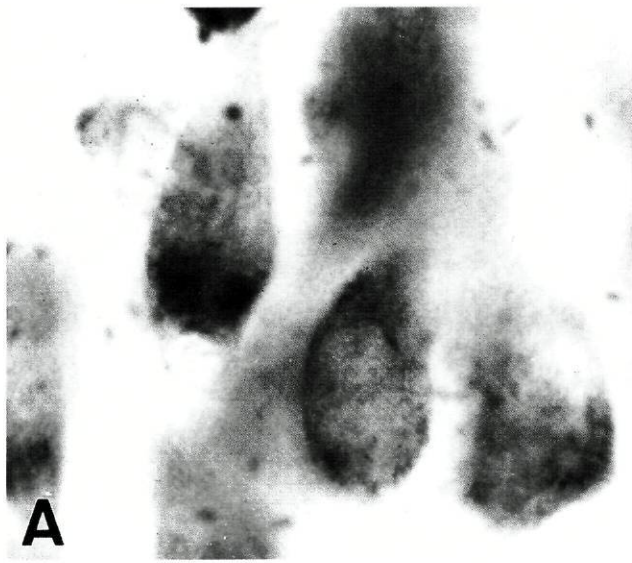


Fig. 4. A-F: Exemplificação de um disector óptico na região CA3 do hipocampo (caso de controlo). Os limites superior e inferior do disector estão representados em A e F, respectivamente. B, C, D e E representam níveis intermédios do disector. A fotografia em A foi tirada a 3 μm da superfície superior da secção; a distância entre A e F é de 20 μm (altura do disector). A célula em foco em A não foi contada, porque está situada no nível mais superior do disector. A grelha utilizada na contagem de células está representada. As células foram contadas sempre que surgiram em foco dentro da grelha de contagem, à excepção daquelas cujos núcleos interceptavam as linhas proibidas (linhas mais espessas). As setas indicam as células que foram contadas neste disector. Coloração de Giemsa. Barra = 5 μm .

determinados pelo sistema, de acordo com as amplitudes de deslocação atribuídas para os eixos x e y. Nas posições em que a grelha de contagem se sobrepunha à camada em estudo, depois de focar a superfície do corte, avançavam-se 3 µm através da sua espessura (eixo z); assim, ficava definido o plano óptico a partir do qual se contavam, com objectiva de imersão 100X (ampliação final de 2250X), todos os núcleos neuronais que dentro da grelha de contagem assumiam pela primeira vez o melhor foco à medida que se aprofundava o mesmo através dos 20 µm de espessura do corte, ou seja ao longo da altura do *disector*. A *thickness sampling fraction (tsf)* foi em média de 0,55. Para cada corte estudado, registava-se o número de *disectors* efectuados (F) e o número de células contado em cada *disector* (\bar{Q}). O número total de neurónios (N) das camadas celulares analisadas em cada subdivisão da formação do hipocampo era finalmente calculado multiplicando o número de neurónios contado pelo inverso do somatório das fracções utilizadas, segundo a fórmula:

$$N = \Sigma \bar{Q} \cdot \frac{t}{h} \cdot \frac{1}{asf} \cdot \frac{1}{ssf}$$

sendo $\Sigma \bar{Q}$ o número total de neurónios efectivamente contado nos *disectors* que caíam nos perfis da secção da subdivisão observados na amostragem das secções e *ssf* a fracção das secções considerada ou *section sampling fraction*.

O número médio de *disectors* efectuado e o número médio de neurónios contado foram, respectivamente: 111 e 155 na camada de células granulares, 133 e 183 no hilo, 154 e 175 na camada de células piramidais da região CA3, e 130 e 146 na camada de células piramidais da região CA1. Com esta técnica foi possível estimar o número total de neurónios a partir da contagem directa de menos de 200 células num conjunto de pequenas fracções de cada subdivisão da formação do hipocampo.

Através da aplicação deste esquema de amostragem obtiveram-se as seguintes médias dos coeficientes de erro das estimativas das contagens neuronais: 0,055 para as células granulares, 0,045 para as células do hilo, e 0,045 para as células piramidais das regiões CA3 e CA1.

Os neurónios de cada camada eram contados sempre numa única sessão, de modo a manter constante a aferição dos aparelhos. Os casos eram identificados por código, pelo que se desconhecia a sua origem. A distinção entre neurónios e células gliais baseou-se nos critérios

propostos por Ling e colaboradores (207): citoplasma neuronal claramente definido, núcleo neuronal convexo delimitado por membrana nuclear, com padrão cromatínico difuso e uniforme, nucléolo bem aparente nos neurónios.

3.3. Determinação dos volumes dos núcleos e dos corpos celulares dos neurónios

Simultaneamente foram também estimados o volume médio dos núcleos (\overline{VN}) e dos corpos celulares (\overline{VS}) dos neurónios das mesmas subdivisões da formação do hipocampo, ou seja, das células granulares e hilares da fâscia denteada e células piramidais das subdivisões CA3 e CA1 do hipocampo. Nas células granulares apenas se determinou o volume nuclear, devido à escassez e à dificuldade de delimitação do citoplasma. O volume médio dos núcleos e corpos celulares dos neurónios foi determinado através do método do *nucleator* (138, 140) que se aplicava às células contadas nos *disectors*, nos mesmos 20 casos. Quando o nucléolo estava em foco, marcava-se o “ponto único” de referência da célula. Eram então fornecidas linhas, orientadas de forma aleatória, através de um programa informático (*GRID stereological software* para computador Commodore Amiga, Versão 2.01, Olympus, Danmark) e marcavam-se em seguida as intersecções entre essas linhas e os limites da célula ou do núcleo. A distância entre o ponto único de referência e os perfis da célula ou do núcleo eram medidos, em cada célula, segundo quatro direcções. Sempre que as células tinham mais de um nucléolo, as medições eram efectuadas a partir do maior. No caso das células granulares, que não possuem um nucléolo bem definido, considerou-se como ponto único de referência o centro do núcleo. Em cada formação do hipocampo foram medidas, em média, 70 células granulares, 65 neurónios hilares, 60 neurónios piramidais da subdivisão CA3 e 60 células piramidais da subdivisão CA1. A média dos coeficientes de erro das estimativas individuais dos volumes nucleares médios foi 0,032 (células granulares), 0,045 (neurónios hilares), 0,042 (células piramidais de CA3) e 0,046 (células piramidais de CA1), enquanto a referente aos volumes somáticos médios foi 0,045, 0,049 e 0,044 para as células hilares, e neurónios piramidais de CA3 e CA1, respectivamente. Os valores foram expressos em μm^3 .

4. ESTUDO DAS ARBORIZAÇÕES DENDRÍTICAS DOS NEURÓNIOS DA FORMAÇÃO DO HIPOCAMPO

O estudo das arborizações dendríticas em material impregnado pelo método de Golgi incidiu nos seguintes neurónios: células granulares da fásia denteada, interneurónios hilares nomeadamente as células em cesto (2) células piramidais de CA3 e células piramidais de CA1. Quanto às pirâmides de CA3 e CA1 o estudo efectuou-se nas arborizações basais e apicais, mas nas células em cesto hilares apenas foi possível analisar os domínios basais. Estas últimas, embora se tratem de células estreladas, dada a sua complexidade são passíveis de divisão num domínio basal e outro apical (2).

A selecção das células destinadas a serem analisadas obedeceu aos critérios morfológicos classicamente utilizados em estudos desta índole (10, 39, 40, 76), dos quais se salientam: integridade da arborização dendrítica, boa qualidade de impregnação celular, corpos celulares localizados na porção média da espessura da secção para minimizar o corte dos troncos dendríticos no plano da secção e ausência de sobreposição significativa com células vizinhas, vasos sanguíneos ou depósitos de prata.

Por estes condicionalismos, pelo facto de a impregnação pelo método de Golgi ser imprevisível e por nem sempre se dispôr das duas formações hipocampais de cada cérebro, é fácil compreender que a amostragem estudada seja menor que a utilizada para as análises estereológicas atrás descritas. Desta forma, estudaram-se 5 casos de controlo (nº 1, 2, 3, 4, 7 do Quadro V) e 5 casos de SIDA: 2 do grupo A (nº 3 e 4), 2 do grupo B1 (nº 7 e 9) e 1 do grupo B2 (nº 14).

Procedeu-se ao desenho à câmara clara das arborizações dendríticas de 10 células granulares por caso, com objectiva 20X e à ampliação final de 450X. Para o efeito escolheram-se as células granulares cujos corpos celulares se localizavam nos dois terços internos da camada granular. Os desenhos dos domínios basais das células em cesto hilares (média: 5 células por caso) e dos domínios basais e apicais das células piramidais de CA3 e de CA1 (média: 8 células por caso) foram realizados com uma objectiva 20X e à ampliação final de 425X.

A partir dos desenhos das arborizações dendríticas procedeu-se à classificação dos segmentos de cada árvore dendrítica em terminais e intermédios. A presença de segmentos terminais cortados não foi considerado critério de exclusão da célula uma vez que tal procedimento tenderia a desviar a amostra para neurónios de pequenas dimensões (10, 395),

com redução subsequente dos comprimentos dendríticos totais, pelo que se incluíram os segmentos seccionados. Procedeu-se depois à classificação, contagem e medição dos segmentos dendríticos, de forma a possibilitar a análise métrica e topológica.

Na Figura 5 podem observar-se os dendritos de células granulares (A) e de um interneurónio hilar (C), bem como os seus desenhos à câmara clara (B e D, respectivamente).

4.1. Número total de segmentos dendríticos

O método de ordenação centrífuga foi utilizado para determinar, em cada célula, o número de segmentos por ordem dendrítica (59, 394, 395). Esta ordenação aplicou-se de forma diversa conforme se tratava das arborizações dendríticas das células granulares e dos domínios basais das células em cesto hilares e das células piramidais de CA3 e CA1, por um lado, e dos domínios apicais das células piramidais por outro. No primeiro caso, que se exemplifica na Figura 5.D, referente ao desenho à câmara clara de um interneurónio hilar, os segmentos dendríticos que emergiam do corpo celular eram considerados de ordem 1 e os que sucessivamente surgiam após cada bifurcação eram acrescidos de uma unidade no seu número de ordem até aos segmentos terminais (10, 39). Nos domínios apicais das células piramidais de CA3 e CA1 a ordem 1 era atribuída, quer ao dendrito apical principal até à sua bifurcação principal em dois ramos terminais e simétricos, quer aos segmentos iniciais dos ramos dendríticos oblíquos que de lá emergiam assimetricamente; depois, os segmentos dendríticos surgidos após cada bifurcação, em ambos os casos - ramos terminais e ramos oblíquos - eram classificados do modo acima explicitado (395). Esta adaptação teve como objectivo assegurar que segmentos dendríticos com a mesma ordem mas pertencentes a células piramidais diferentes recebessem classificações equivalentes. Calcularam-se os números totais de segmentos dendríticos de cada célula pela soma dos números parcelares das diferentes ordens de segmentos.

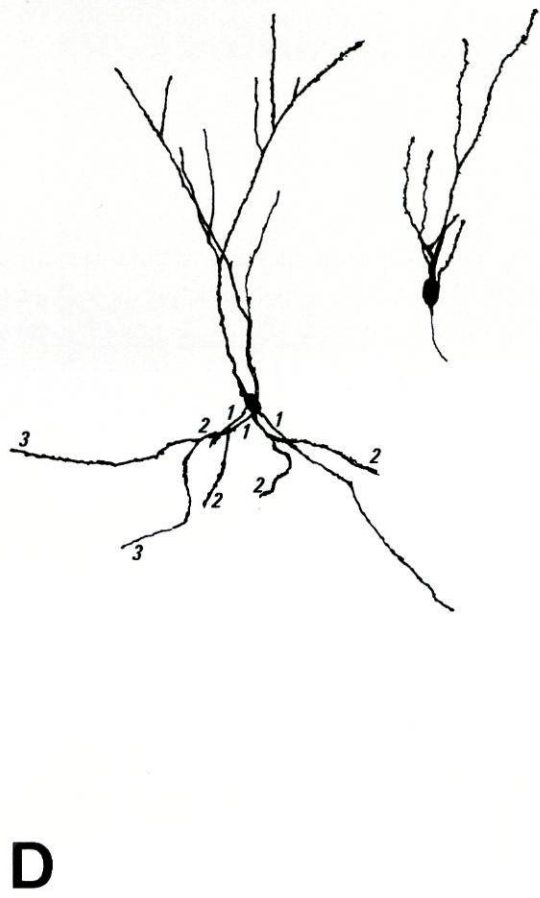
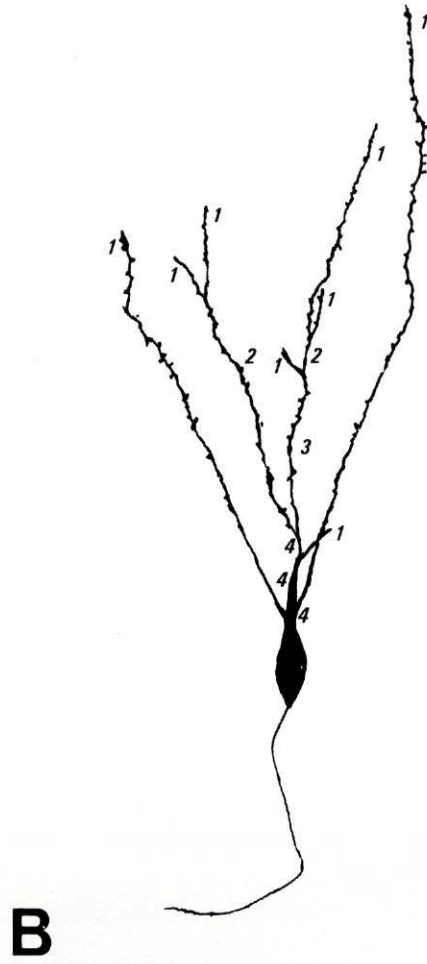


Fig. 5. A. Fotomontagem de uma célula granular impregnada pelo método de Golgi de um caso controlo. São bem visíveis os dendritos, as espinhas (seta) e o axónio (ponta de seta). Barra = 10 μm . B. Desenho à câmara clara da célula granular mostrada em A. Os números representam o grau dos segmentos dendríticos: 1, segmentos terminais (*t*); 2, segmentos intermédios que se bifurcam em 2 segmentos terminais (*itt*); 3 e 4, segmentos intermédios que se bifurcam num segmento terminal e noutro segmento intermédio (*iit*). C. Fotomontagem de uma célula hilar em cesto de um caso controlo impregnada pelo método de Golgi. Num plano de foco diferente encontra-se uma célula granular. De referir o número escasso de espinhas dendríticas (seta) visíveis no interneurónio. A arborização dendrítica atinge a camada molecular da fâscia denteada. Barra = 15 μm . D. Desenho à câmara clara da célula hilar que se observa em C, bem como da célula granular atrás referida. A numeração dos segmentos após ordenação centrífuga está assinalada.

4.2. Análise métrica dos segmentos dendríticos

Consideraram-se os seguintes subgrupos de segmentos dendríticos, conforme o seu grau, isto é, o número de extremidades terminais periféricas a um dado segmento, de acordo com Uylings e colaboradores (395):

a) *Segmentos terminais (t)*: segmentos localizados entre a extremidade distal dos dendritos e o primeiro ponto de bifurcação encontrado, a que se atribuía o grau 1.

b) *Segmentos intermédios de grau 2 (itt)*: segmentos que se bifurcam em 2 segmentos terminais.

c) *Segmentos intermédios de grau 3 (iit)*: segmentos que se ramificam num terminal e num intermédio *itt*.

d) *Segmentos intermédios de grau ≥ 4* : segmentos intermédios com árvores periféricas com 4 ou mais segmentos terminais, podendo designar-se *iit* quando se bifurcam num segmento intermédio *itt* e noutro terminal, ou *iii* quando se bifurcam em outros dois segmentos intermédios.

Em seguida, utilizando um analisador de imagem Videoplan mediram-se os comprimentos de cada tipo de segmento, o que possibilitou a obtenção dos comprimentos dendríticos totais. Determinaram-se também os valores totais e os valores médios dos comprimentos dos segmentos terminais *t* e os dos segmentos intermédios. Procedeu-se ainda à determinação do número de segmentos terminais segundo a sua ordem centrífuga (*cf.* nº 4.1).

Na Figura 5.B, referente ao desenho à câmara clara de uma célula granular, está assinalada a classificação dos segmentos dendríticos segundo o seu grau, em terminais e intermédios.

4.3. Densidade de arborização dendrítica

A densidade de arborização dendrítica foi avaliada mediante aplicação de uma variante do método dos círculos concêntricos (87, 395). Com esta finalidade, desenharam-se grelhas de círculos concêntricos, equidistantes, separados por uma distância adequada às dimensões das arborizações dendríticas das células granulares, das células hilares e das células piramidais de CA3 e de CA1 e à ampliação a que as mesmas haviam sido desenhadas, que se fotocopiaram em folha de acetato transparente. Sobrepunham-se depois os acetatos aos desenhos das

árvores dendríticas fazendo coincidir o centro do primeiro círculo com o centro do corpo celular; em seguida contava-se o número de intersecções entre os dendritos e os círculos desde o 1º até ao 15º, sendo o valor determinado registado individualmente para cada círculo. Os círculos concêntricos eram calibrados a intervalos de 20 μm para as células granulares, a 15 μm para os domínios basais das células hilares e das células piramidais de CA3 e de CA1 e a 30 μm para os domínios apicais das células piramidais de CA3 e de CA1.

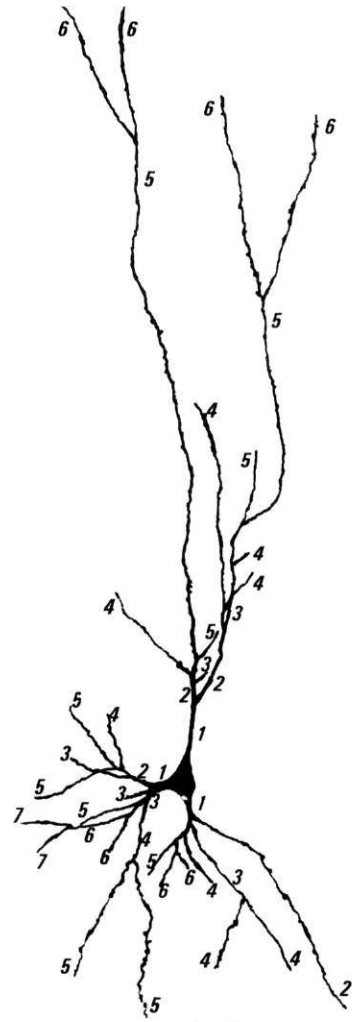
4.4. Densidade das espinhas dendríticas

As espinhas dendríticas foram contadas ao longo de 10 μm de comprimento dendrítico, usando uma câmara clara e uma objectiva plana 40X (ampliação final de 700X). A escolha das porções dos segmentos dendríticos em que as espinhas foram contadas baseou-se nos critérios já descritos (10, 39, 40, 76, 79): boa impregnação dos dendritos, segmentos tanto quanto possível rectilinizados, ramos dendríticos no plano de foco numa extensão de pelo menos 10 μm , não inclusão de porções dendríticas adjacentes aos pontos de ramificação (39). Foram estudadas, em média, 10 células por caso para cada tipo de arborização das 4 populações celulares: granulares, células em cesto hilares e pirâmides de CA3 e de CA1. De cada célula granular escolheram-se 5 segmentos para a contagem das espinhas quer no terço interno quer no terço externo da camada molecular (39). Relativamente aos domínios basais das células em cesto hilares e aos domínios basais e apicais das células piramidais as contagens foram efectuadas nos segmentos terminais. Não se discriminaram variedades morfológicas de espinhas (159). Os resultados das densidades de espinhas dendríticas foram expressos em número médio de espinhas dendríticas por 10 μm de ramo dendrítico e por caso.

Na Figura 6 podem observar-se as arborizações dendríticas basais e apicais de células piramidais de CA3 (A) e CA1 (C), bem como os respectivos desenhos à câmara clara. No desenho à câmara clara da célula piramidal de CA3 (Fig. 6.B) estão assinalados os segmentos segundo a ordem centrífuga. Podem ainda observar-se excrescências dendríticas nessa célula (Fig. 6.A). Na Figura 5.A, atrás referida, mostram-se também espinhas dendríticas de uma célula granular.



B



D

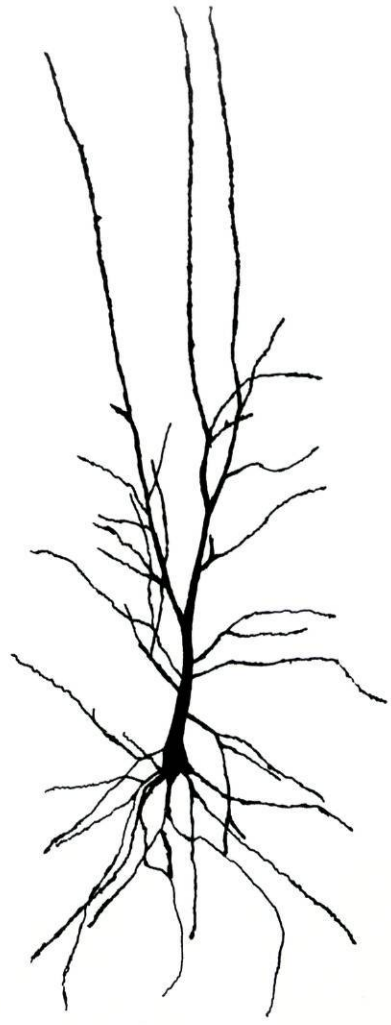


Fig. 6. A. Fotomontagem de uma célula piramidal da região CA3 do hipocampo impregnada pelo método de Golgi de um caso controlo, onde se podem observar os dendritos basais (seta) e apicais (dupla seta). Visualizam-se excrescências dendríticas (ponta de seta). B. Desenho à câmara clara da pirâmide de CA3 apresentada em A, onde se assinalam os segmentos segundo a ordem centrífuga. C. Fotomontagem de uma célula piramidal da região CA1 do hipocampo impregnada pelo método de Golgi de um caso controlo, onde se podem observar as arborizações dendríticas basal (seta) e apical (dupla seta). D. Desenho à câmara clara da célula piramidal de CA1 mostrada em C. Barra (A, C) = 15 μ m.

5. ESTUDO DO LÍQUIDO CÉFALO-RAQUIDIANO

5.1. Estudo da imunidade celular

5.1.1. Contagem celular

As contagens celulares foram realizadas a fresco, logo após a recepção das amostras de LCR, numa câmara clássica de Neubauer. Os valores foram expressos em número de células/mm³, tendo-se considerado como valor normal ≤ 5 células/mm³.

5.1.2. Identificação e contagem diferencial das células

A análise da citomorfologia efectuou-se em sedimentos de LCR obtidos após sedimentação de 1 ml de LCR, segundo o método de Sayk (328) modificado por Oehmichen (271), utilizando uma câmara especificamente construída para o efeito. Resumidamente, colocava-se a amostra de LCR num cilindro de plástico disposto verticalmente, sob pressão, em cima de uma lâmina. Entre o cilindro e a lâmina colocava-se um círculo de papel de filtro com um orifício central de diâmetro igual ao da secção do cilindro, que se fazia coincidir com uma das suas extremidades, de modo a que os bordos do orifício do papel de filtro aspirassem o líquido, permitindo aos elementos figurados depositarem-se suavemente numa pequena área previamente definida da lâmina. Os sedimentos eram depois corados pelo método de May-Grunwald/Giemsa (83), secos à temperatura ambiente e cobertos com lamela, como anteriormente descrito (320, 322). Em cada sedimento de LCR observado ao microscópio contavam-se diferencialmente as células até 100, com objectiva 40X, em áreas aleatórias do campo microscópico. Para tal, fazia-se deslizar a platina do microscópio segundo o eixo do x e do y de forma sistemática, de modo a não haver repetição de campos. Os sedimentos celulares eram classificadas em normais ou patológicas. Os sedimentos normais do LCR caracterizam-se pela presença apenas de células mononucleares, com predomínio (50 a 70%) de linfócitos maduros, pequenos. Os sedimentos celulares patológicos assumem o nome do tipo de célula dominante: linfoplasmocitário, monocitário, neutrofilico ou misto (83, 86, 271).

5.1.3. Determinação das subpopulações leucocitárias do LCR e do sangue

Em 4 casos determinaram-se as subpopulações leucocitárias do LCR e do sangue por imunofluorescência de duas cores e citometria de fluxo num Citómetro Coulter Profile I, segundo o método descrito por Margolick e colaboradores (232) e adaptado pela Dr.^a I.

Barbosa, no Laboratório de Imunologia Celular do Serviço de Hemoterapia do Centro Regional do Porto do Instituto Português de Oncologia. Identificaram-se os seguintes antígenos nas populações leucocitárias: pan-leucócitos - CD45; Monócitos - CD14; Linfócitos T - CD2, CD3, CD4, CD8, CD29, CD45RA; Linfócitos B - CD19, CD20.

No sangue periférico a população linfocitária era definida por critérios morfológicos de tamanho e granularidade (*light scatter*) e por características fenotípicas: mais de 95% das células exprimindo CD45 e menos de 5% das células exprimindo CD14. Por cada determinação eram contados 5000 linfócitos. Consideraram-se como exprimindo o marcador as células cuja intensidade de fluorescência era superior à obtida em 98% do controlo isotópico/ensaio negativo. Os resultados deste estudo foram comparados com os obtidos em amostras de sangue de um *pool* de doadores saudáveis.

Para as determinações realizadas no LCR utilizou-se a seguinte técnica: após centrifugação das amostras, as células eram lavadas com solução salina tamponada com fosfato contendo albumina sérica bovina a 1% e azida a 0,1% e colocadas em 300 µl do mesmo tampão. Juntava-se 100 µl a tubos de ensaio que continham as combinações de anticorpos referidas para as análises efectuadas no sangue, que se incubavam durante 30 minutos a 4°C e procedia-se em seguida à lise eritrocitária. As células marcadas eram contadas até a amostra estar esgotada. As amostras de LCR contaminadas com sangue ou que apresentassem menos de 50% de linfócitos CD45⁺, eram rejeitadas. Os resultados obtidos no LCR, nomeadamente as razões CD4/CD8, foram comparados com os do sangue periférico.

5.2. Estudo da imunidade humoral

5.2.1. Doseamento das proteínas totais

As proteínas totais do LCR e do soro foram determinadas por espectrofotometria (353, 354). Considerou-se como valor normal das proteínas do LCR ≤ 45 mg/dl.

5.2.2. Electroforese das proteínas

A electroforese das proteínas do soro e do LCR concentrado foi efectuada em gel com mistura de agarose, segundo o método desenvolvido e descrito por Silva e Sá (354). Em resumo, o LCR era concentrado por filtração sob pressão positiva utilizando filtros de

membrana; o volume do LCR aplicado variava entre 0,5 e 3 ml sendo inversamente proporcional à concentração das proteínas totais previamente determinada. A electroforese era efectuada em lâminas (1" x 3"), nas quais se começava por colocar 3,5 ml do gel de agarose a 1,2% em tampão barbital pH 8,6; antes da agarose solidificar fazia-se uma ranhura transversal na qual se applicava 10 µl do líquido concentrado ou a mesma quantidade de soro diluído a 50%. Submetiam-se depois as lâminas a electroforese sob voltagem de 150 V (cerca de 4 mA por lâmina) durante 45 a 60 minutos. Após a electroforese as lâminas eram fixadas, cobertas com papel de filtro, secas ao ar, coradas com negro de amido e descoradas com ácido acético a 5%. A quantificação percentual das diversas fracções electroforéticas era efectuada por densitometria, com filtro de 590 nm de comprimento de onda (densitómetro Helena Process-24). Obtinham-se, assim, os valores relativos por leitura directa, calculando-se em seguida os valores absolutos das diversas fracções entrando em linha de conta com os valores das proteínas totais (358). Atendendo a estes valores e ao aspecto da globulina γ por observação das lâminas, os perfis electroforéticos eram ainda classificados em normais, degenerativos, transudativos e γ -globulínicos com ou sem bandas oligoclonais (190-192, 352). Consideraram-se como normais os seguintes valores percentuais das fracções electroforéticas do LCR (352):

Pré-albumina	6,3%	$\pm 1,5$
Albumina	57,1%	$\pm 4,1$
Globulinas		
α_1	4,6%	$\pm 0,8$
α_2	8,1%	$\pm 1,5$
β	11,3%	$\pm 1,6$
τ (Tau)	5,2%	$\pm 0,8$
$\gamma + \delta a^T$	7,4%	$\pm 1,7$

Resumidamente, tecem-se algumas considerações sobre a origem e a distribuição das fracções do LCR face às séricas, bem como sobre os critérios de distinção dos diversos tipos de perfis (352, 353), que se consideram indispensáveis para a ulterior apresentação e análise dos resultados. A pré-albumina é uma proteína de origem sérica mas que atinge concentrações mais elevadas no LCR que no sangue devido a um processo activo de concentração pelas células coróides; a globulina β_1 , designada no LCR apenas por β , apresenta também maior concentração no LCR que no soro; a fracção τ (Tau) é exclusiva do LCR e deriva da transferrina sérica por acção de uma enzima tecidual, a neuraminidase; a globulina γ do LCR é constituída quase exclusivamente por IgG, a par de quantidades mínimas de IgA e em condições normais não há IgM. A IgG, por sua vez, é normalmente de origem sérica, mesmo quando existe alteração da barreira hemato-encefálica (BHE); só há produção intratecal de IgG

em doenças neurológicas inflamatórias subagudas e crónicas. A globulina $\delta\alpha^T$, também designada fracção pós-gama, é uma proteína de origem exclusivamente tecidular, não ultrapassando 1,5% a sua concentração no LCR.

O perfil degenerativo caracteriza-se por concentração normal ou diminuída das proteínas totais do LCR, elevação relativa da pré-albumina, da globulina β e sobretudo das globulinas τ e $\delta\alpha^T$, com redução da globulina γ ; isto é, há enriquecimento electivo das proteínas tecidulares. Quando há alteração da BHE e consequente aumento da permeabilidade para as proteínas plasmáticas, surge o perfil transudativo, também designado por plasmático, caracterizado por aumento das proteínas totais, por aumento das globulinas α_1 e α_2 e também da globulina γ , com redução das restantes fracções, pelo que o perfil do LCR se aproxima em tudo do sérico. Por sua vez, o perfil gamaglobulínico é caracterizado por proteinorraquia normal ou ligeiramente aumentada e por elevação isolada da globulina γ , na qual frequentemente se distinguem duas ou mais bandas oligoclonais (190)

Determinou-se também o Índice Q, quociente entre os valores relativos da globulina γ do LCR e do soro (331, 353), considerando-se como normal o índice inferior a 0,5.

5.2.3. Doseamento das imunoglobulinas IgG, IgA e IgM, cálculo dos Índices IgG e IgA

As imunoglobulinas IgG, IgA e IgM foram doseadas, em 10 casos, no soro diluído e no LCR pelo método de imunodifusão radial descrito por Mancini e colaboradores (229). Resumidamente, utilizaram-se lâminas de vidro com 12x9 cm, previamente recobertas com gel de agarose a 1,2% em tampão barbitálico. Em cada lâmina colocava-se 20 ml de uma mistura de gel de agarose e imunosoro mono-específico de coelho anti-IgG, anti-IgA ou anti-IgM, a concentrações de 0,75%, 1% e 0,8%, respectivamente. Após repouso de 24 horas em câmara húmida, faziam-se orifícios de 2 mm de diâmetro no gel e neles se colocavam 8 μ l de soro ou de líquido. Colocavam-se de novo as lâminas em câmara húmida durante 1 a 3 dias e em seguida eram lavadas, secas e coradas com azul de Coomassie. A leitura era efectuada por determinação dos quadrados do diâmetro dos anéis de precipitado, transpostos para curvas de calibração, a partir de concentrações padrão conhecidas. Consideraram-se os seguintes valores normais das imunoglobulinas séricas, obtidos por imunodifusão radial em casos de controlo, e expressos em mediana e pelos percentis 10 e 90 (353):

IgG	1413 mg/100 ml (1044-2017)
IgA	263 mg/100 ml (125-544)
IgM	126 mg/100 ml (69-191)

No LCR, os limites superiores de detecção das imunoglobulinas considerados como valores normais eram os seguintes (307, 353):

IgG	4,5 mg/100 ml
IgA	0,5 mg/100 ml
IgM	0,05 mg/100 ml

Para a avaliação da síntese intratecal (SIT) de imunoglobulinas, utilizou-se, para além da pesquisa de bandas oligoclonais da globulina γ do LCR, o Índice IgG (77), de uso consagrado na clínica neurológica não só pela facilidade de cálculo mas, sobretudo, por entrar em linha de conta com o estado da BHE ao introduzir a correcção da relação LCR/soro da albumina; consideraram-se significativos de síntese intratecal de IgG os valores superiores a 0,70 (37, 131).

$$\text{Índice IgG} = \frac{\text{IgG do LCR} / \text{IgG do soro}}{\text{Alb. do LCR} / \text{Alb. do soro}}$$

5.2.4. Doseamento da fracção 4 do Complemento

A fracção 4 do Complemento (C4) foi doseada pelo método de imunodifusão radial (229) acima descrito (ponto 5.2.3.), utilizando imunosoro mono-específico de coelho anti-C4 a concentração de 0,80% em gel de agarose. Considerou-se como limite superior do normal o valor de 45 mg/100 ml para o soro (131) e de 0,3 mg/100 ml para o LCR (307).

5.2.5. Estudo da barreira hemato-encefálica

Para avaliação da integridade da BHE utilizou-se o Índice de Albumina (I_{alb}) através da seguinte fórmula (248):

$$I_{alb} = \text{Albumina}_{LCR} / \text{Albumina}_{sérica} \times 1000 \text{ (valor normal: } < 8,0)$$

Com a mesma finalidade calculou-se também o quociente entre a albumina plasmática e a do LCR, considerando-se como valor normal > 100 .

Para a avaliação simultânea da função da barreira hemato-encefálica e da síntese intratecal da IgG ou da IgA, usou-se o método gráfico (125, 310-312). Neste método, os valores do quociente LCR/soro da albumina (Q_{alb}) e os do quociente LCR/soro da IgG (Q_{IgG}) ou de IgA (Q_{IgA}), obtidos em cada caso, são colocados num diagrama que contém linhas de referência dos diversos factores que interferem nos resultados: 1, discriminação entre fracções da Ig derivadas do cérebro ou do soro; 2, extensão percentual da síntese intratecal relativamente à concentração total da Ig no LCR; 3, valores normais do Q_{alb} conforme a idade,

em virtude da modificação da BHE com a idade. A localização do valor final numa das 5 áreas possíveis permite determinar o seu significado: 1, valores normais; 2, valores que traduzem disfunção da BHE; 3, alterações da BHE associadas a SIT das imunoglobulinas; 4, SIT de IgG ou IgA; 5, erro metodológico.

Para o estudo de controlo utilizaram-se amostras de LCR e sangue de 30 doentes que não apresentavam doença orgânica do sistema nervoso e em que o número de células e o valor da concentração das proteínas totais do LCR eram normais. Todas as amostras de LCR e soro foram conservadas a -20 °C até ao seu processamento.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A precisão das estimativas individuais dos números totais de neurónios e dos volumes das camadas foi avaliada através do coeficiente de erro (CE). Este coeficiente foi calculado em função de dois factores independentes: (1) a variância decorrente da selecção dos cortes histológicos segundo um método simultaneamente aleatório e sistemático (411) e (2) a variância devida à amostragem conseguida em cada secção, ou seja, ao “efeito *Nugget*” (139). A precisão das estimativas individuais dos volumes nuclear e somático dos neurónios foi calculada de acordo com Matheron (242) e Gundersen e Jensen (139), recorrendo à seguinte equação: $CE^2 = CV^2/n$. O coeficiente de erro médio foi calculado a partir dos valores individuais usando a relação: $CE \text{ médio} = \sqrt{\text{média } CE^2}$ (409). A variância interindividual observada nas estimativas foi avaliada através do cálculo do coeficiente de variação ($CV = \text{desvio padrão}/\text{média}$) e a influência da variação biológica - $CV \text{ biológico}$ (CV_{biol}) - foi determinada usando a relação: $CV^2 = CV_{\text{biol}}^2 + CE^2$ (184). Na análise estatística dos resultados morfométricos obtidos na formação do hipocampo usou-se a análise de variância (ANOVA) para uma variável. A presença ou ausência de infecção VIH foi tida como variável independente.

A análise estatística utilizada no estudo do LCR incluiu dois tipos de métodos: não paramétricos - teste U de Mann-Whitney e teste de Kruskal-Wallis - para 2 ou > 2 amostras independentes, respectivamente, e paramétricos - teste de regressão linear de Pearson (233, 350).

Consideraram-se estatisticamente significativas as diferenças em que $P < 0,05$.

RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA

1.1. Amostra utilizada nos estudos estereológicos

As médias da idade, peso corporal, estatura e peso do cérebro dos doentes em que se efectuou o estudo estereológico da formação do hipocampo eram as seguintes:

Grupo de controlo: idade, 29,9 anos (variação 20 - 54 anos); peso corporal, 71,8 Kg (variação 51 - 89 Kg); estatura, 169 cm (variação 158 - 180 cm); peso do cérebro, 1458 g (variação 1340 - 1675 g).

Grupo de doentes com SIDA: idade, 37,3 anos (variação 24 - 50 anos); peso corporal, 61 Kg (variação 54 - 65,5 Kg); estatura, 179 cm (variação 173 - 182 cm); peso do cérebro, 1360 g (variação 1090 - 1480 g).

Observaram-se diferenças quanto às médias do peso corporal e da estatura, respectivamente menor e maior nos casos VIH+ que nos controlos, as quais todavia carecem de possibilidade de tratamento estatístico visto que tais valores só eram conhecidos em 3 dos 10 casos com SIDA estudados. Embora o peso dos cérebros fosse, em regra, menor nos casos de SIDA que nos controlos, o teste ANOVA mostrou que as diferenças não eram estatisticamente significativas ($F_{(1,17)} = 3,99$; $P = 0,062$). As médias do intervalo de tempo decorrido desde o óbito até a colheita do material estão dentro dos valores esperados quando se estuda material necrótico e foram idênticos nos 2 grupos - 28,2 horas (variação 17 - 36 horas) nos doentes com SIDA e 32,3 horas (variação 23 - 42 horas) no grupo de controlo. No referente aos doentes com SIDA, verificou-se que a média de duração da doença era de 18 meses em qualquer um dos 3 subgrupos estudados e que, clinicamente, se tinham registado alterações neuropsiquiátricas em 6 doentes.

1.2. Amostra utilizada no estudo do líquido céfalo-raquidiano

As amostras de LCR (e sangue) analisadas provinham de doentes infectados quer por VIH-1 (47 casos) quer por VIH-2 (12 casos). Nos outros 2 casos estudados em 1985, o vírus

foi designado por HTLV-III dado não haver distinção à época entre os 2 tipos de vírus. O LCR foi colhido em doentes que se encontravam em diferentes estadios clínicos, dos quais o mais frequente era o IVC1, conforme se pode observar após consulta dos Quadros VI, VII e VIII, anteriormente apresentados, e, em 5 casos, em doentes que não apresentavam ainda critérios de SIDA, mas apenas de ARC (*AIDS related complex*). Das amostras recolhidas, 26 provinham de doentes que não apresentavam doença neurológica (grupo A) e 13 de doentes com envolvimento directo pelo VIH (grupo B1), sendo a demência a manifestação mais frequente (7 casos). Nos restantes 22 casos do grupo B2 havia envolvimento neurológico secundário, no qual predominava a toxoplasmose cerebral. Não se encontrou qualquer correlação significativa entre o tipo de envolvimento neurológico e o tipo de vírus ($P = 0,879$). A duração da doença era muito variável (< 8 dias - 10 anos), com média de 15 meses, não se tendo encontrado diferenças significativas nos 3 grupos de casos ($P = 0,788$), nem entre os doentes infectados com VIH-1 ou VIH-2 ($P = 0,325$).

2. RESULTADOS QUALITATIVOS

2.1. Estudo neuropatológico de rotina

O estudo neuropatológico realizado em material corado pela hemateína-eosina não revelou alterações do sistema nervoso em 6 casos (grupo A). Nos restantes 14 encontraram-se alterações neuropatológicas que permitiram efectuar o diagnóstico necrópsico do tipo de envolvimento do sistema nervoso, as quais, nos casos seleccionados para o estudo morfométrico, não atingiam as formações do hipocampo. Assim, relativamente ao grupo B1 (doentes com evidência de envolvimento neurológico directo pelo VIH) encontraram-se alterações típicas de encefalite em 3 casos, como nódulos microgliais e células multinucleadas, as quais, em 2 casos, se encontravam associadas a infecções por agentes oportunistas. No restante caso diagnosticou-se mielopatia, miopatia e toxoplasmose cerebral. Nos 10 casos em que havia alterações secundárias a infecções oportunistas ou a neoplasias mas sem evidência de envolvimento neurológico directo pelo vírus (grupo B2), diagnosticou-se toxoplasmose cerebral em 4, meningite criptocócica, meningoencefalite por vírus citomegálico, e linfoma cerebral, respectivamente em 2 casos cada, e meningoencefalite séptica no restante. De salientar que 5 dos 20 casos de SIDA (25%) apresentavam lesões cerebrais múltiplas.

O estudo da glia pela coloração da hematoxilina ácida fosfotúngstica não revelou quaisquer alterações gliais. Assim, não se detectaram diferenças qualitativas ou quantitativas nas formações do hipocampo dos doentes infectados por VIH e dos controlos.

2.2. Estudo da formação do hipocampo

2.2.1. Material incluído em metacrilato

A observação das formações do hipocampo feita em cortes incluídos em metacrilato e corados pelo Giemsa não revelou alterações na organização estrutural das diferentes subdivisões desta área do SNC, que, como seria de esperar, era em tudo idêntica às descrições feitas noutros trabalhos realizados no Homem (202, 203, 407, 408, 410); no entanto verificou-se, como já era esperado, alguma variabilidade de caso para caso quanto à espessura, extensão e configuração das camadas celulares, nomeadamente da camada de células granulares da fásia denteada. Através desta observação qualitativa inicial, não foram aparentes quaisquer diferenças volumétricas ou de densidade celular, entre os grupos de casos estudados.

2.2.2. Material impregnado pelo método de Golgi

As observações qualitativas das células estudadas por este método - arborizações dendríticas das células granulares e de interneurónios hilares (células em cesto) da fásia denteada, e das células piramidais da região CA3 e de CA1 do hipocampo (basais e apicais) - não diferem do que se recolhe das descrições clássicas de Ramón e Cajal (305) e de Lorente de Nó (215) e tão pouco das constantes na literatura mais recente (2, 10, 39, 40, 79, 204).

Assim, verificou-se que os dendritos primários das células granulares surgiam quase sempre do seu pólo apical e dirigiam-se à camada molecular onde se dividiam diversas vezes de forma dicotómica, distribuindo-se em área triangular cujo vértice correspondia ao corpo celular (205). Os dendritos apresentavam espinhas de morfologia e dimensão variáveis em maior número nos segmentos mais distais (39, 40, 79) e com maior incidência nos casos de controlo. Quanto aos interneurónios em cesto, foi mais difícil a sua observação, pois, o número era muito mais reduzido do que o dos outros tipos celulares estudados. Verificou-se que se localizavam junto da camada de células granulares da fásia denteada, tinham corpos celulares e dendritos proximais hispídeos e espiculados, ramos distais que se ramificavam em arco e

distinguiam-se das células piramidais de CA3 pela ausência de excrescências dendríticas e pela presença de terminações dendríticas em cacho (2).

No hipocampo não foi difícil a identificação das células piramidais, quer na região de CA3 quer na de CA1, tomando como referência as numerosas descrições existentes na literatura (10, 111, 164, 215, 305, 389). Assim, as células piramidais de CA3 diferiam das de CA1 e as que mais frequentemente tinham arborizações completas localizavam-se fora da zona mais proximal de CA3; estas células caracterizavam-se pela presença de excrescências dendríticas nos ramos proximais das arborizações apicais, que, por sua vez, se ramificavam em seguida obliquamente; os ramos apicais mais distais atingiam o *stratum lacunosum-moleculare*; as arborizações basais das células piramidais de CA3 apresentavam numerosas ramificações localizadas no *stratum oriens*. As células piramidais de CA1 apresentavam árvores basais menos complexas e os dendritos apicais exibiam ramos oblíquos ao longo de uma maior extensão do ramo principal que as células piramidais de CA3. Os seus ramos mais distais, localizados no *stratum lacunosum-moleculare*, eram encurvados e irregulares; embora as espinhas das células piramidais de CA1 variassem quanto à forma e tamanho, não havia excrescências dendríticas. De um modo geral, encontraram-se em todos os casos numerosas células piramidais impregnadas nas regiões de CA3 e CA1, o que facilitou a obtenção de material para o estudo de arborizações completas. Deve, no entanto, referir-se que foi mais difícil seleccionar as arborizações dendríticas apicais que as basais devido à sua maior extensão e conseqüente maior incidência de ramos incompletos.

À excepção de redução do número de espinhas dendríticas nas células granulares do grupo VIH+, a observação qualitativa dos cortes impregnados pela prata não permitiu vislumbrar qualquer outra alteração morfológica das arborizações dendríticas das células estudadas quer nos doentes com SIDA quer nos casos de controlo.

2.3. Estudo imuno-histoquímico

Com a marcação da formação do hipocampo para ubiquitina observaram-se numerosos corpos amiláceos em ambos os grupos bem como alguns corpos hialinos no citoplasma de raros neurónios, sugestivos de corpos de inclusão, em 3 casos de SIDA e 5 de controlo; estes achados foram considerados inespecíficos. A pesquisa de macrófagos efectuada através da marcação para a lisosima foi positiva no material proveniente dos casos de SIDA que

apresentavam lesões necrosantes provocadas por agentes oportunistas, tendo-se mostrado negativa em todos os outros. Quanto ao estudo imuno-histoquímico da glia, efectuado pela marcação para GFAP, obtiveram-se resultados também idênticos em ambos os grupos, não se tendo encontrado áreas de gliose nos casos VIH+, achado que corrobora as observações feitas no estudo neuropatológico de rotina. Em suma, o estudo imuno-histoquímico não evidenciou, directa ou indirectamente, aspectos sugestivos de degenerescência neuronal hipocampal.

3. RESULTADOS QUANTITATIVOS

3.1. Estudo morfométrico da formação do hipocampo

3.1.1. *Fáscia denteada*

3.1.1.1. *Camada de células granulares*: os dados quantitativos referentes ao volume desta camada, bem como ao número total e volume nuclear médio dos seus neurónios estão representados graficamente na Figura 7.

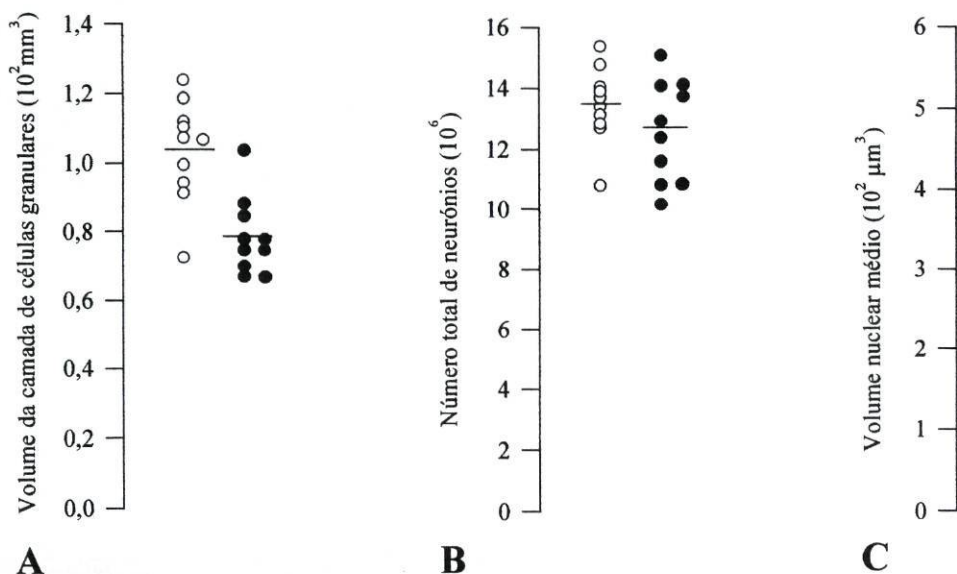


Fig. 7. Representação gráfica dos dados obtidos na camada de células granulares da fáscia denteada do grupo de controlo (o) e do grupo de SIDA (●). A. Volume da camada. B. Número total de células. C. Volume nuclear médio. As linhas horizontais representam as médias.

Encontrou-se nos casos de SIDA uma diminuição de cerca de 25% do volume da camada de células granulares, que se verificou ser estatisticamente significativa ($F_{(1,18)} = 18,57$; $P = 4 \times 10^{-4}$). O número total de neurónios era 6,5% menor nos casos de SIDA que nos controlos mas a diferença não era significativa ($F_{(1,18)} = 1,77$; $P = 0,200$); mais ainda, nos casos de SIDA havia diminuição de 28% do volume nuclear médio das células granulares que se verificou ser estatisticamente significativa ($F_{(1,18)} = 87,51$; $P < 5 \times 10^{-4}$). A variabilidade interindividual média no volume, número total de neurónios e volume nuclear médio era de 14%, 11% e 8%, respectivamente.

Nas Figuras 8 e 9 estão representados graficamente os resultados obtidos após a análise quantitativa e métrica das arborizações dendríticas das células granulares.

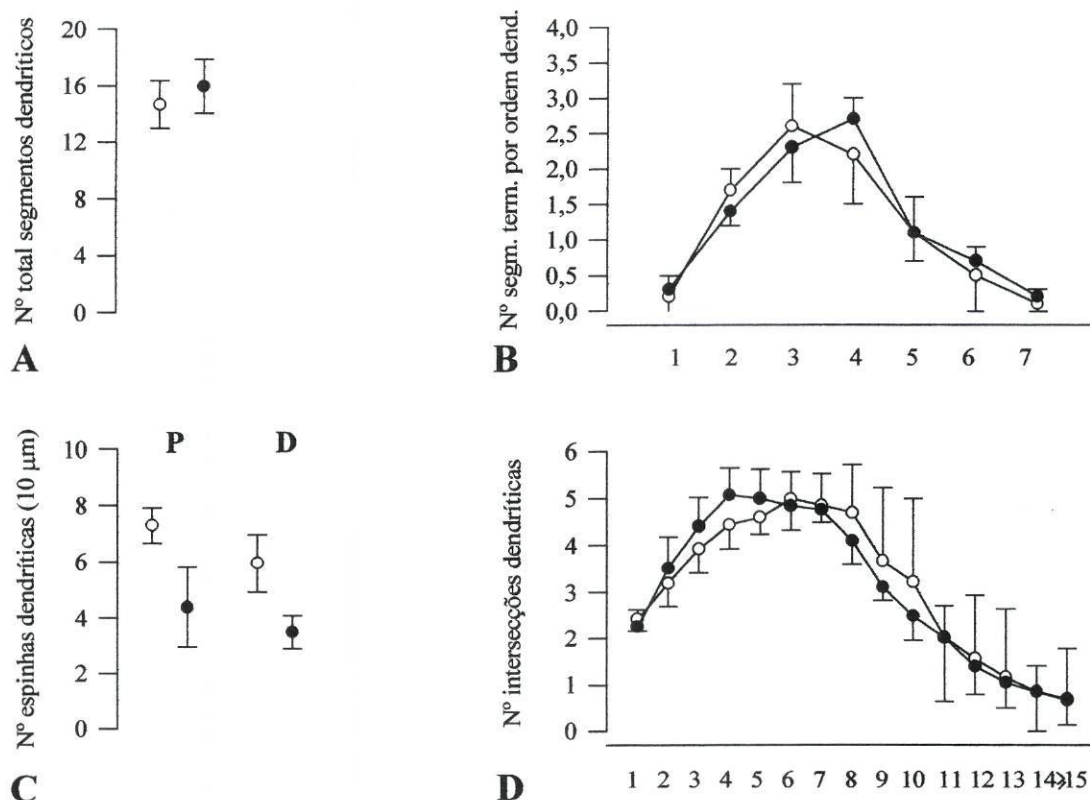


Fig. 8. Representação gráfica dos dados morfométricos obtidos nas arborizações dendríticas das células granulares do grupo de controlo (o) e do grupo de SIDA (●). Os símbolos representam as médias e as linhas verticais 1 desvio padrão. A. Número total de segmentos dendríticos por célula. B. Número de segmentos terminais por ordem dendrítica. C. Densidade de espinhas dendríticas nos segmentos proximais (P) ($P < 0,01$) e nos segmentos distais (D) ($P < 0,01$). D. Densidade de ramificação dendrítica.

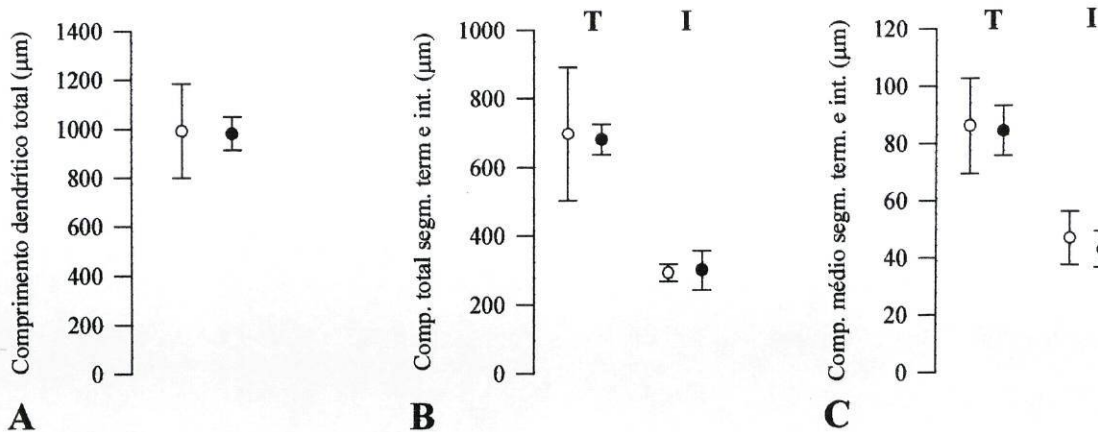


Fig. 9. Representação gráfica dos dados da análise métrica das arborizações dendríticas das células granulares obtidos no grupo de controlo (o) e no grupo de SIDA (•). Os símbolos representam as médias e as linhas verticais 1 desvio padrão. A. Comprimento dendrítico total. B. Comprimento total dos segmentos terminais (T) e dos segmentos intermédios (I). C. Comprimento médio dos segmentos terminais (T) e dos segmentos intermédios (I).

Quadro XI. Resultados da análise estatística dos dados obtidos nas arborizações dendríticas das células granulares (ANOVA)

	$F_{(1,8)}$	P		$F_{(1,8)}$	P
Número total de segmentos	1,27	0,293	Densidade de ramificação dendrítica		
Número de terminais por ordem dendrítica			<i>Círculo 1</i>	2,87	0,129
<i>Ordem 1</i>	0,02	0,879	<i>Círculo 2</i>	0,76	0,409
<i>Ordem 2</i>	2,52	0,151	<i>Círculo 3</i>	1,73	0,224
<i>Ordem 3</i>	0,71	0,423	<i>Círculo 4</i>	3,33	0,105
<i>Ordem 4</i>	2,53	0,151	<i>Círculo 5</i>	1,47	0,259
<i>Ordem 5</i>	0,07	0,801	<i>Círculo 6</i>	0,19	0,677
<i>Ordem 6</i>	0,50	0,498	<i>Círculo 7</i>	0,07	0,801
<i>Ordem 7</i>	0,82	0,392	<i>Círculo 8</i>	1,39	0,272
			<i>Círculo 9</i>	0,58	0,469
Comprimento dendrítico total	0,01	0,921	<i>Círculo 10</i>	0,79	0,402
Comprimento total dos segmentos			<i>Círculo 11</i>	0,00	0,991
<i>Terminais</i>	0,03	0,863	<i>Círculo 12</i>	0,06	0,809
<i>Intermédios</i>	0,06	0,820	<i>Círculo 13</i>	0,03	0,878
Comprimento médio dos segmentos			<i>Círculo 14</i>	0,01	0,981
<i>Terminais</i>	0,04	0,846	<i>Círculo ≥ 15</i>	0,00	0,957
<i>Intermédios</i>	0,62	0,454	Densidade das espinhas dendríticas		
			<i>Segm. Proximais</i>	17,45	0,003 *
			<i>Segm. Distais</i>	21,89	0,002 *

* Estatisticamente significativo

O teste ANOVA permitiu concluir que a única diferença estatisticamente significativa encontrada nas arborizações dendríticas das células granulares era a diminuição marcada da densidade das espinhas dendríticas nos casos de SIDA, da ordem

Os resultados da análise das arborizações dendríticas das células em cesto podem observar-se nas Figuras 11 e 12. No grupo de doentes com SIDA encontrou-se uma significativa diminuição quer do número total de segmentos dendríticos ($P = 0,002$) quer do comprimento dendrítico total ($P = 0,016$) e do comprimento dos segmentos terminais ($P = 0,014$). A densidade de ramificação dendrítica estava também reduzida nesse grupo de doentes nos círculos 1 a 5.

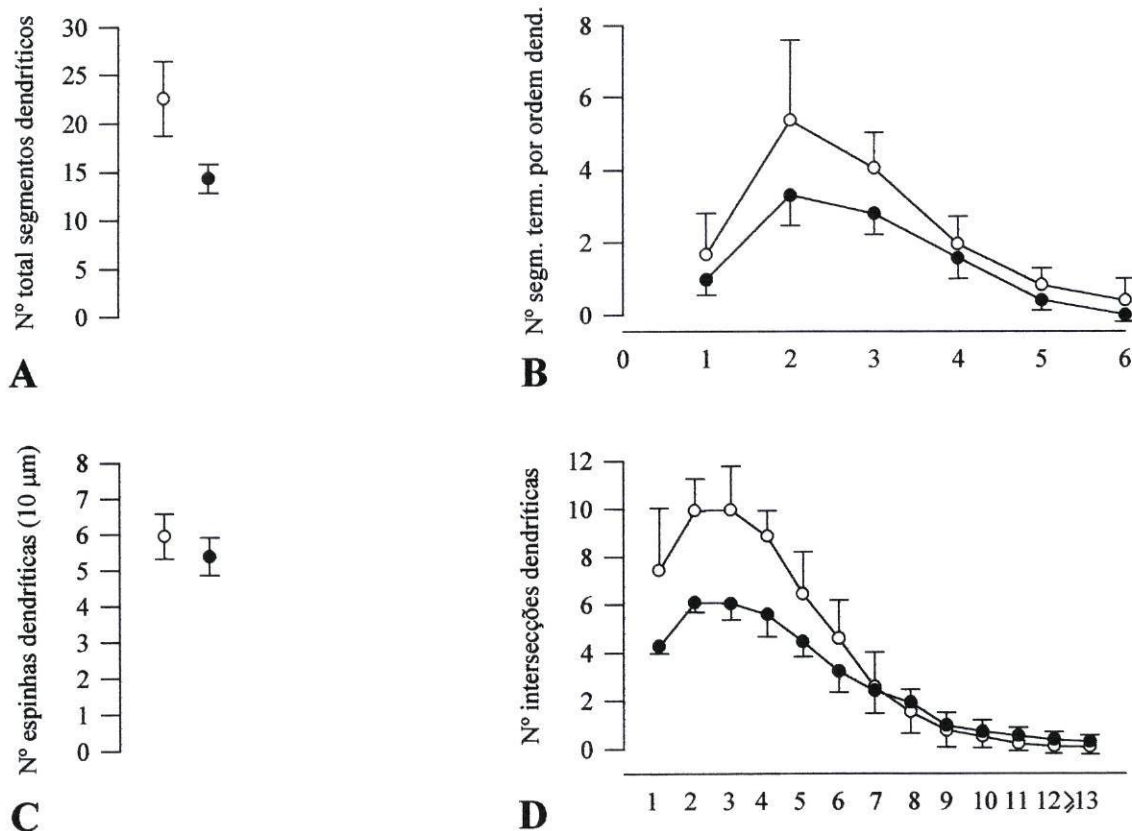


Fig. 11. Representação gráfica dos dados morfométricos obtidos nas arborizações dendríticas basais das células em cesto hilares do grupo de controlo (o) e do grupo de SIDA (●). Os símbolos representam as médias e as linhas verticais 1 desvio padrão. A. Número total de segmentos dendríticos por célula ($P < 0,001$). B. Número de segmentos terminais por ordem dendrítica (ordens 1 e 3, $P < 0,04$). C. Densidade de espinhas dendríticas. D. Densidade de ramificação dendrítica (círculos 1 a 5, $P < 0,05$).

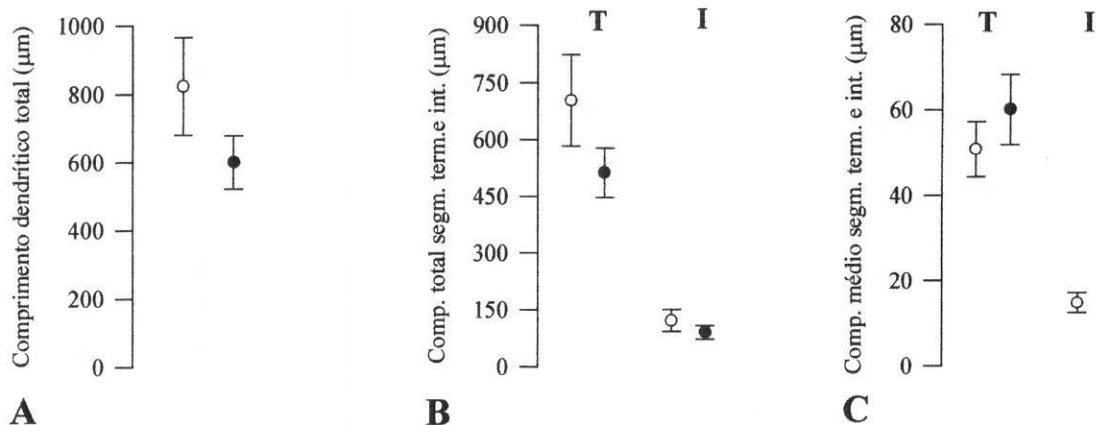


Fig. 12. Representação gráfica dos dados da análise métrica das arborizações dendríticas das células hilares obtidos no grupo de controlo (o) e no grupo de SIDA (●). Os símbolos representam as médias e as linhas verticais 1 desvio padrão. A. Comprimento dendrítico total ($P < 0,02$). B. Comprimento total dos segmentos terminais (T) ($P < 0,02$) e dos segmentos intermédios (I). C. Comprimento médio dos segmentos terminais (T) e dos segmentos intermédios (I).

Os resultados da análise estatística dos dados obtidos nas arborizações dendríticas dos interneurónios hilares encontram-se no Quadro XII.

Quadro XII. Resultados da análise estatística dos dados obtidos nas arborizações dendríticas basais das células em cesto (ANOVA)

	$F_{(1,8)}$	P		$F_{(1,8)}$	P
Número total de segmentos	20,34	0,002 *	Densidade de ramificação dendrítica		
Número de terminais por ordem dendrítica			<i>Círculo 1</i>	7,31	0,027 *
<i>Ordem 1</i>	1,61	0,024 *	<i>Círculo 2</i>	37,75	0,001 *
<i>Ordem 2</i>	3,81	0,087	<i>Círculo 3</i>	19,90	0,002 *
<i>Ordem 3</i>	6,17	0,038 *	<i>Círculo 4</i>	26,92	0,001 *
<i>Ordem 4</i>	0,88	0,375	<i>Círculo 5</i>	5,76	0,043 *
<i>Ordem 5</i>	3,19	0,112	<i>Círculo 6</i>	2,77	0,135
<i>Ordem 6</i>	2,26	0,171	<i>Círculo 7</i>	0,04	0,849
Comprimento dendrítico total	9,39	0,016 *	<i>Círculo 8</i>	0,69	0,428
Comprimento total dos segmentos			<i>Círculo 9</i>	0,28	0,613
<i>Terminais</i>	9,74	0,014 *	<i>Círculo 10</i>	0,44	0,527
<i>Intermédios</i>	4,12	0,077	<i>Círculo 11</i>	2,58	0,147
Comprimento médio dos segmentos			<i>Círculo 12</i>	2,21	0,175
<i>Terminais</i>	3,98	0,081	<i>Círculo ≥ 13</i>	2,21	0,176
<i>Intermédios</i>	2,01	0,194	Densidade das espinhas dendríticas	2,36	0,163

* Estatisticamente significativo

3.1.1.3. *Camada molecular*: Os valores obtidos no volume da camada molecular (Fig. 13) eram, em média, menores nos casos VIH+ (7%), mas o ANOVA não revelou diferenças significativas ($F_{(1,18)} = 1,58$; $P = 0,225$). O CV dos volumes foi de 11% nos controlos e 14% nos casos de SIDA.

3.1.1.4. *Volume global da fáscia denteada*: tomando em consideração os valores individuais encontrados para os volumes das 3 camadas da fáscia denteada, obtiveram-se através da sua soma, em cada caso, os valores volumétricos globais da fáscia denteada. Verificou-se que o volume da fáscia denteada se encontrava reduzido 13% na SIDA, conforme se pode observar na Figura 13, diferença que analisada pelo ANOVA se mostrou significativa ($F_{(1,18)} = 6,93$; $P = 0,017$).

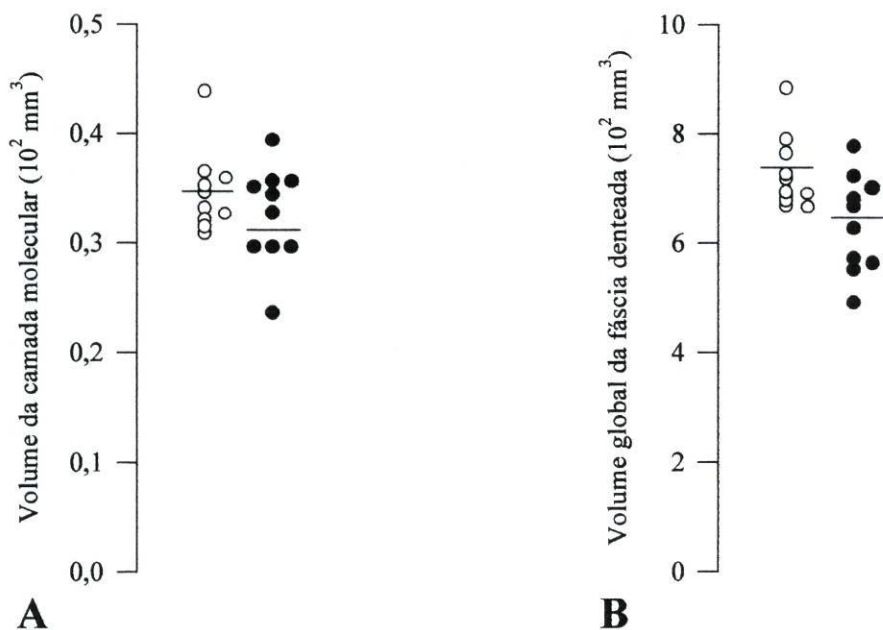


Fig. 13. Representação gráfica dos dados obtidos na camada molecular e na fáscia denteada do grupo de controlo (o) e do grupo de SIDA (●). A. Volume da camada molecular. B. Volume global da fáscia denteada. As linhas horizontais representam as médias.

Em resumo, na fásia denteada dos casos VIH+ observou-se uma apreciável redução volumétrica - 13% - que se fica a dever principalmente à diminuição do volume da camada de células granulares - 25% - e, em menor grau, da região hilar - 16%. Esta variação não era acompanhada por redução do número total de neurónios. Porém, o volume somático médio das células granulares estava reduzido em 28% e dos neurónios hilares em 16%, respectivamente. Além disso, encontraram-se importantes alterações das arborizações dendríticas na SIDA: perda de 40% no número de espinhas dendríticas nos segmentos proximais e de 42% nos distais das células granulares; diminuição do número total de segmentos dendríticos, do comprimento dendrítico total, do comprimento dos segmentos terminais e da densidade de ramificação dendrítica nas regiões proximais das arborizações das células hilares em cesto.

3.1.2. Hipocampo

3.1.2.1. Região CA3

3.1.2.1.1. Camada de células piramidais (Fig. 14):

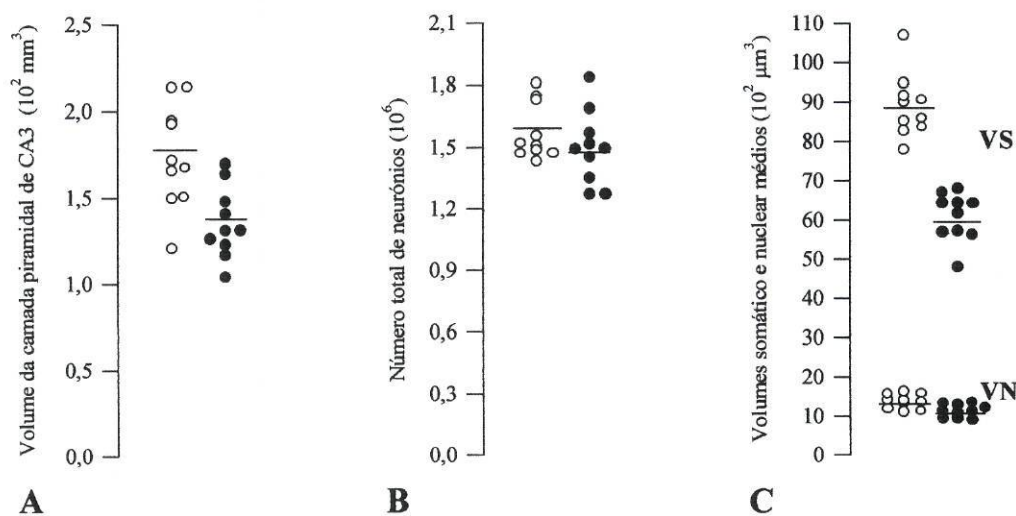


Fig. 14. Representação gráfica dos dados obtidos na camada de células piramidais de CA3 do grupo de controlo (o) e do grupo de SIDA (●). A. Volume da camada. B. Número total de células. C. Volumes nuclear (VN) e somático (VS) médios. As linhas horizontais representam as médias.

Nesta camada registou-se uma redução volumétrica de cerca de 22% no grupo VIH+, que o ANOVA revelou ser significativa ($F_{(1,18)} = 11,36; P = 0,003$). No entanto, não se encontraram diferenças significativas no número total de neurónios ($F_{(1,18)} = 2,50; P = 0,132$). No referente aos volumes celulares observou-se, nos casos de SIDA, diminuição dos volumes nuclear e somático médios da ordem de 22% e 31%, respectivamente, diferenças estas que o ANOVA revelou serem significativas ($F_{(1,18)} = 22,44; P = 2 \times 10^{-4}$ e $F_{(1,18)} = 72,10; P = 5 \times 10^{-4}$). A variabilidade interindividual média quanto ao volume, número total de neurónios e volumes nuclear e somático médios era de 16%, 10%, 11% e 10%, respectivamente.

Os resultados da análise quantitativa e métrica das arborizações dendríticas basais das células piramidais de CA3 obtidos nos dois grupos de doentes, são representados graficamente nas Figuras 15 e 16 e os resultados da respectiva análise estatística no Quadro XIII.

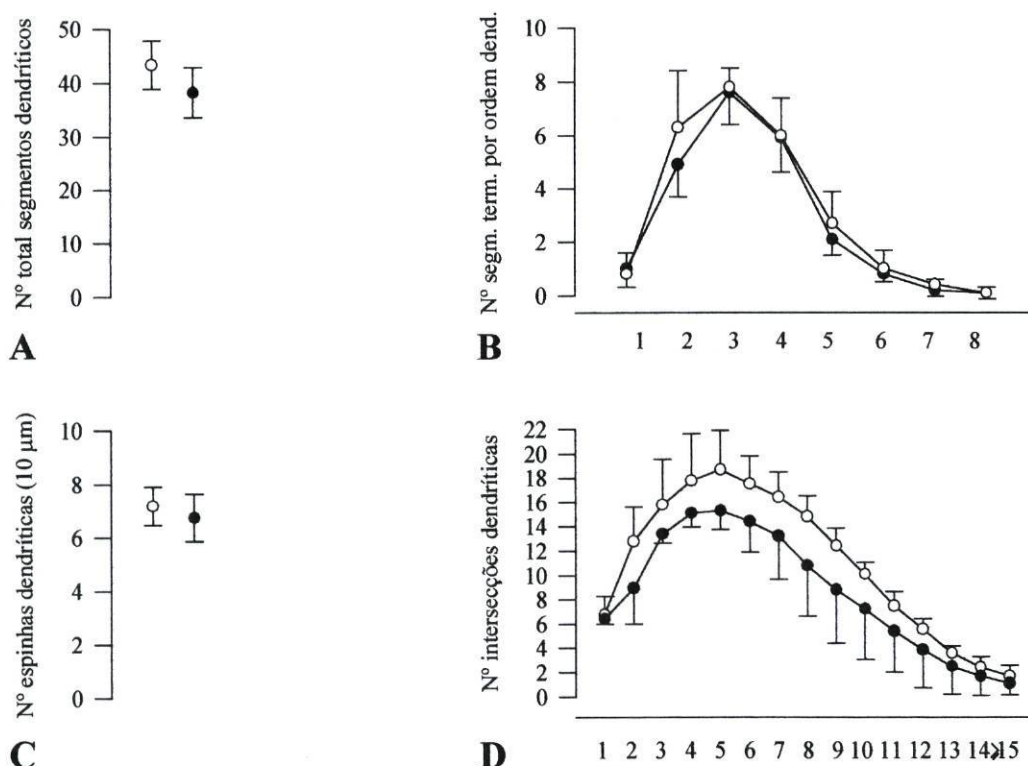


Fig. 15. Representação gráfica dos dados morfométricos obtidos nas arborizações dendríticas basais das células piramidais de CA3 do grupo de controlo (o) e do grupo de SIDA (•). Os símbolos representam as médias e as linhas verticais 1 desvio padrão. A. Número total de segmentos dendríticos por célula. B. Número de segmentos terminais por ordem dendrítica. C. Densidade de espinhas dendríticas. D. Densidade de ramificação dendrítica.

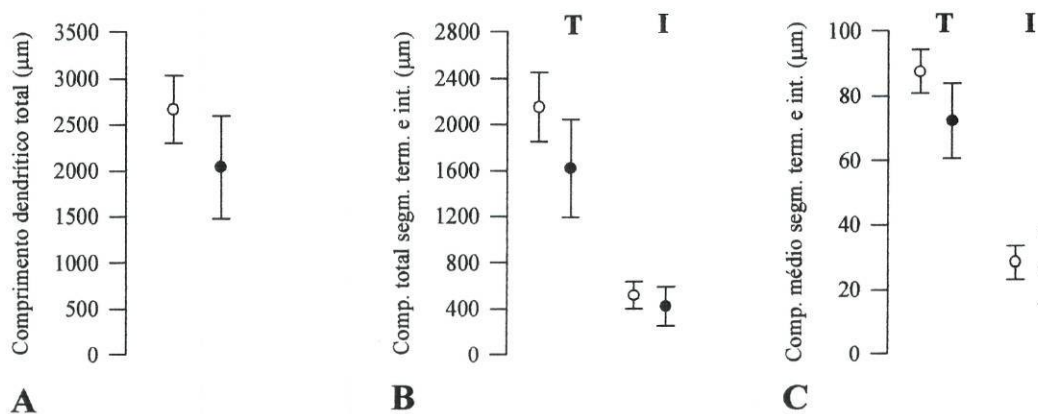


Fig. 16. Representação gráfica dos dados da análise métrica das arborizações dendríticas basais das células piramidais de CA3 obtidos no grupo de controlo (o) e no grupo de SIDA (●). Os símbolos representam as médias e as linhas verticais 1 desvio padrão. A. Comprimento dendrítico total. B. Comprimento total dos segmentos terminais (T) e dos segmentos intermédios (I). C. Comprimento médio dos segmentos terminais (T) e dos segmentos intermédios (I).

Observaram-se valores significativamente menores na SIDA quanto à densidade de ramificação dendrítica no círculo 5 ($P < 0,03$) e discretamente menores no 2 ($P = 0,068$). A densidade de espinhas dendríticas ($P = 0,057$), o comprimento dendrítico total ($P = 0,069$), e o comprimento total ($P = 0,050$) e médio ($P = 0,035$) dos segmentos dendríticos terminais, eram também menores nos casos de SIDA que nos controlos.

Quadro XIII. Resultados da análise estatística dos dados obtidos nas arborizações dendríticas basais das células piramidais de CA3 (ANOVA)

	$F_{(1,8)}$	P		$F_{(1,8)}$	P
Número total de segmentos	3,12	0,116	Densidade de ramificação dendrítica		
Número de terminais por ordem dendrítica			<i>Círculo 1</i>	0,26	0,625
<i>Ordem 1</i>	0,12	0,738	<i>Círculo 2</i>	4,45	0,068
<i>Ordem 2</i>	1,58	0,244	<i>Círculo 3</i>	1,89	0,207
<i>Ordem 3</i>	0,10	0,761	<i>Círculo 4</i>	2,27	0,170
<i>Ordem 4</i>	0,01	0,929	<i>Círculo 5</i>	7,23	0,028 *
<i>Ordem 5</i>	1,19	0,307	<i>Círculo 6</i>	4,00	0,080
<i>Ordem 6</i>	0,46	0,521	<i>Círculo 7</i>	3,08	0,117
<i>Ordem 7</i>	1,27	0,292	<i>Círculo 8</i>	3,93	0,083
<i>Ordem 8</i>	0,36	0,565	<i>Círculo 9</i>	3,09	0,117
Comprimento dendrítico total	4,43	0,069	<i>Círculo 10</i>	2,20	0,176
Comprimento total dos segmentos			<i>Círculo 11</i>	1,65	0,235
<i>Terminais</i>	5,26	0,050 *	<i>Círculo 12</i>	1,39	0,273
<i>Intermédios</i>	1,09	0,328	<i>Círculo 13</i>	1,09	0,327
Comprimento médio dos segmentos			<i>Círculo 14</i>	0,84	0,387
<i>Terminais</i>	6,39	0,035 *	<i>Círculo ≥ 15</i>	0,97	0,355
<i>Intermédios</i>	0,09	0,766	Densidade das espinhas dendríticas	4,94	0,057

* Estatisticamente significativo

Relativamente à análise morfométrica das arborizações dendríticas apicais das células piramidais de CA3 (Figuras 17 e 18), obtiveram-se no grupo de doentes VIH+ valores menores, estatisticamente significativos, quanto ao número total de segmentos dendríticos ($P < 0,03$), ao número de segmentos terminais de ordens 5 a 7 ($P < 0,01$), à densidade de ramificação dendrítica nos círculos 6 a 8 ($P < 0,01$, $< 0,01$ e $< 0,04$, respectivamente), ao comprimento dendrítico total ($P < 0,05$) e ao comprimento total dos segmentos terminais ($P < 0,04$). Os restantes valores não apresentavam diferenças significativas.

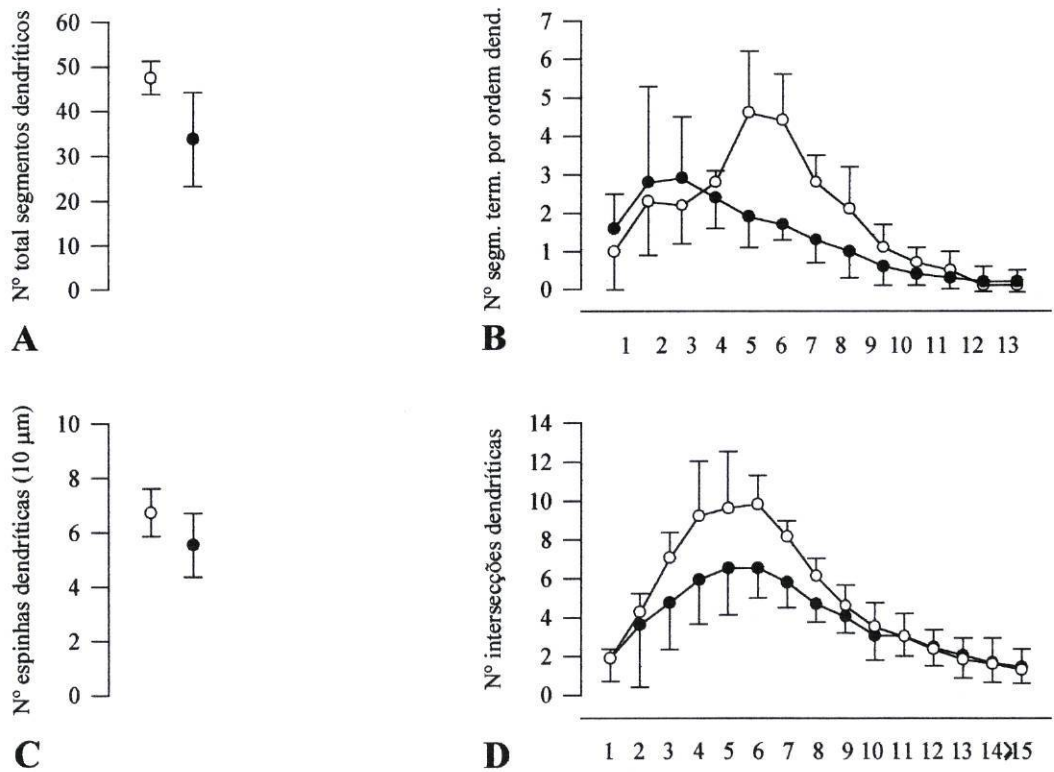


Fig. 17. Representação gráfica dos dados morfométricos obtidos nas arborizações dendríticas apicais das células piramidais de CA3 do grupo de controlo (o) e do grupo de SIDA (●). Os símbolos representam as médias e as linhas verticais 1 desvio padrão. A. Número total de segmentos dendríticos por célula ($P < 0,03$). B. Número de segmentos terminais por ordem dendrítica (ordens 5 a 7: $P < 0,01$). C. Densidade de espinhas dendríticas. D. Densidade de ramificação dendrítica (círculos 6 e 7, $P < 0,01$; círculo 8, $P < 0,04$).

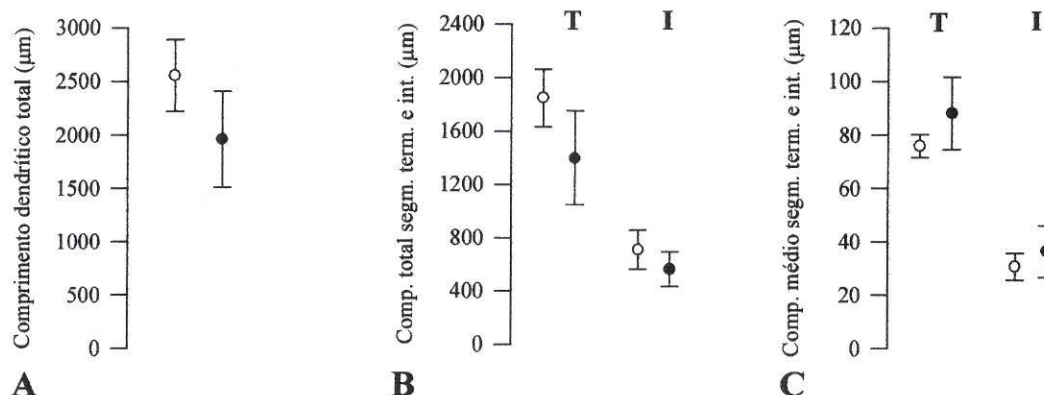


Fig. 18. Representação gráfica dos dados da análise métrica das arborizações dendríticas apicais das células piramidais de CA3 obtidos no grupo de controlo (o) e no grupo de SIDA (•). Os símbolos representam as médias e as linhas verticais 1 desvio padrão. A. Comprimento dendrítico total ($P < 0,05$). B. Comprimento total dos segmentos terminais (T) ($P < 0,04$) e dos segmentos intermédios (I). C. Comprimento médio dos segmentos terminais (T) e dos segmentos intermédios (I).

No Quadro XIV podem ver-se os resultados estatísticos obtidos após aplicação do ANOVA aos dados morfométricos das arborizações dendríticas apicais da pirâmides de CA3.

Quadro XIV. Resultados da análise estatística dos dados obtidos nas arborizações dendríticas apicais das células piramidais de CA3 (ANOVA)

	$F_{(1,8)}$	P		$F_{(1,8)}$	P
Número total de segmentos	7,69	0,024 *	Densidade de ramificação dendrítica		
Número de terminais por ordem dendrítica			<i>Círculo 1</i>	0,01	0,945
<i>Ordem 1</i>	1,04	0,338	<i>Círculo 2</i>	0,19	0,678
<i>Ordem 2</i>	0,18	0,682	<i>Círculo 3</i>	3,36	0,104
<i>Ordem 3</i>	0,58	0,470	<i>Círculo 4</i>	4,19	0,075
<i>Ordem 4</i>	0,90	0,370	<i>Círculo 5</i>	3,43	0,101
<i>Ordem 5</i>	12,01	0,009 *	<i>Círculo 6</i>	12,11	0,008 *
<i>Ordem 6</i>	24,16	0,001 *	<i>Círculo 7</i>	11,91	0,009 *
<i>Ordem 7</i>	13,53	0,006 *	<i>Círculo 8</i>	6,16	0,038 *
<i>Ordem 8</i>	3,29	0,107	<i>Círculo 9</i>	0,31	0,592
<i>Ordem 9</i>	1,35	0,278	<i>Círculo 10</i>	0,35	0,571
<i>Ordem 10</i>	3,27	0,108	<i>Círculo 11</i>	0,01	0,969
<i>Ordem 11</i>	0,97	0,355	<i>Círculo 12</i>	0,03	0,866
<i>Ordem 12</i>	0,36	0,565	<i>Círculo 13</i>	0,11	0,744
<i>Ordem 13</i>	0,15	0,708	<i>Círculo 14</i>	0,01	0,942
			<i>Círculo ≥ 15</i>	0,06	0,813
Comprimento dendrítico total	5,64	0,046 *	Densidade das espinhas dendríticas	3,35	0,104
Comprimento total dos segmentos			Comprimento médio dos segmentos		
<i>Terminais</i>	6,04	0,039 *	<i>Terminais</i>	3,69	0,091
<i>Intermédios</i>	2,72	0,138	<i>Intermédios</i>	1,38	0,274

* Estatisticamente significativo

3.1.2.1.2. *Stratum oriens*: o volume médio do *stratum oriens* de CA3 (Fig. 19) era 16% menor nos casos de SIDA que nos controlos, mas as diferenças não eram significativas ($F_{(1,18)} = 3,59$; $P = 0,074$). O coeficiente de variação das estruturas era maior nos casos de SIDA (26%) que nos controlos (16%).

3.1.2.1.3. *Stratum lacunosum-moleculare*: quanto aos valores do volume determinados nesta camada (Fig. 19), 10% menores na SIDA, não se encontraram diferenças significativas ($F_{(1,18)} = 1,34$; $P = 0,263$). Também nesta estrutura, o CV era maior nos casos de SIDA (24%) que nos controlos (17%).

3.1.2.1.4. *Volume global de CA3*: na Figura 19 apresentam-se os resultados volumétricos totais da região de CA3, calculados com base na soma dos respectivos volumes individuais obtidos em cada camada. Encontrou-se uma diminuição volumétrica da região CA3 do hipocampo ($F_{(1,18)} = 6,25$; $P = 0,022$) dos doentes com SIDA que corresponde a uma redução percentual de 16%.

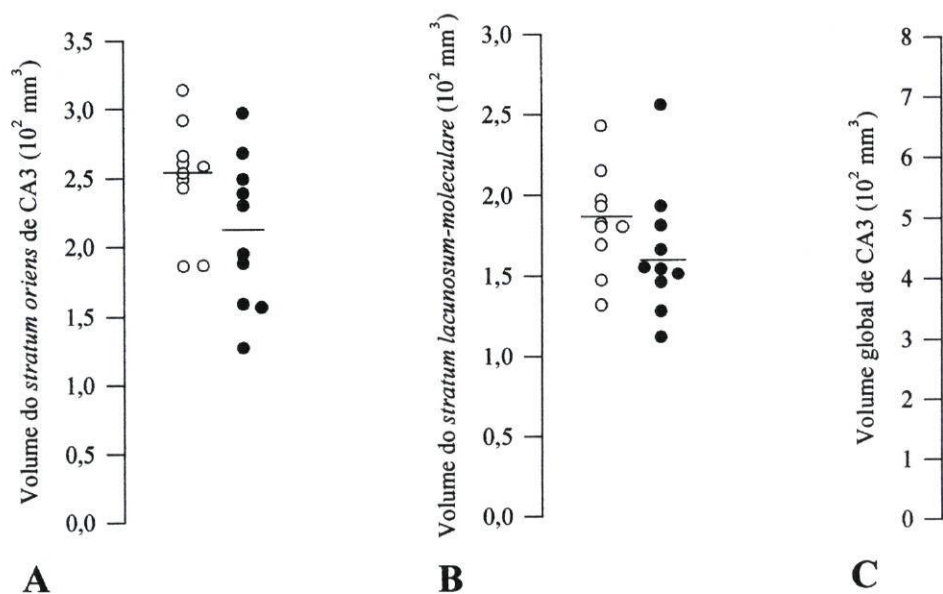


Fig. 19. Representação gráfica dos dados obtidos no *stratum oriens*, no *stratum lacunosum-moleculare* e na região CA3 do grupo de controlo (o) e do grupo de SIDA (•). A. Volume do *stratum oriens*. B. Volume do *stratum lacunosum-moleculare*. C. Volume global de CA3. As linhas horizontais representam as médias.

Em conclusão, na região CA3 do hipocampo dos casos com SIDA, encontrou-se uma apreciável diminuição volumétrica - 16%. Esta redução, embora patente nas diferentes camadas, era estatisticamente significativa apenas na camada de células piramidais (22%). Paralelamente, havia diminuição dos volumes nuclear e somático médios destes neurónios (22% e 31%, respectivamente), mas, curiosamente, com manutenção do seu número total. Simultâneamente, as arborizações dendríticas basais, e sobretudo as apicais, das células piramidais de CA3 mostravam francas alterações quantitativas e métricas. Isto é, não se observou perda neuronal em CA3, mas sim alterações neuríticas, tais como, diminuição do comprimento total e médio dos segmentos dendríticos terminais, do comprimento dendrítico total e redução do número de espinhas dendríticas nas arborizações basais, diminuição do número total de segmentos, do número de terminais de ordens 5 a 7, do comprimento dendrítico total e do comprimento dos segmentos terminais e redução da densidade de ramificação dendrítica nos círculos 6 a 8 nas arborizações apicais, bem como sinais sugestivos de lesão neuronal.

3.1.2.2. Região CA1

3.1.2.2.1. Camada de células piramidais: registaram-se também alterações em CA1 nos casos VIH+ (Fig. 20). Com efeito, os resultados volumétricos evidenciaram valores 13% menores nesse grupo, diferença que o ANOVA mostrou ser significativa ($F_{(1,18)} = 6,00$; $P = 0,025$). Ao invés, nenhuma diferença foi encontrada quanto ao número total de neurónios entre doentes com SIDA e o grupo de controlo ($F_{(1,18)} = 1,82$; $P = 0,194$). Além disso, registou-se também no grupo VIH+, significativa redução quer do volume nuclear médio (16%; $F_{(1,18)} = 15,99$; $P = 0,001$) quer do volume somático médio (30%; $F_{(1,18)} = 73,77$; $P < 10^{-4}$) das pirâmides de CA1. A variabilidade interindividual média do volume, número total de neurónios e volume nuclear e somático médio era de 12%, 8%, 11% e 9%, respectivamente.

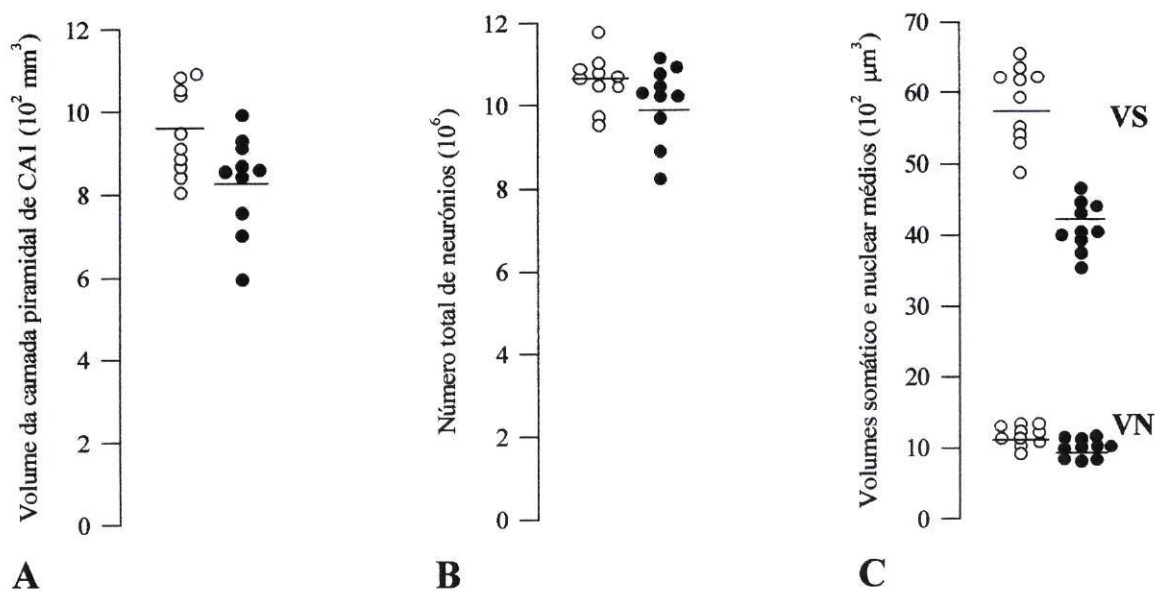


Fig. 20. Representação gráfica dos dados obtidos na camada de células piramidais de CA1 do grupo de controlo (o) e do grupo de SIDA (•). A. Volume da camada. B. Número total de células. C. Volumes nuclear (VN) e somático (VS) médios. As linhas horizontais representam as médias.

Nas Figuras 21 e 22 apresentam-se os resultados da análise quantitativa e métrica das arborizações basais das células piramidais de CA1 e, no Quadro XV, os resultados estatísticos.

Quadro XV. Resultados da análise estatística dos dados obtidos nas arborizações dendríticas basais das células piramidais de CA1 (ANOVA)

	F _(1,8)	P		F _(1,8)	P
Número total de segmentos	0,41	0,269	Densidade de ramificação dendrítica		
Número de terminais por ordem dendrítica			<i>Círculo 1</i>	1,40	0,271
<i>Ordem 1</i>	0,07	0,793	<i>Círculo 2</i>	0,25	0,630
<i>Ordem 2</i>	0,04	0,852	<i>Círculo 3</i>	0,61	0,459
<i>Ordem 3</i>	0,91	0,368	<i>Círculo 4</i>	2,37	0,162
<i>Ordem 4</i>	0,61	0,458	<i>Círculo 5</i>	0,36	0,563
<i>Ordem 5</i>	0,09	0,775	<i>Círculo 6</i>	1,35	0,278
<i>Ordem 6</i>	0,01	0,916	<i>Círculo 7</i>	0,63	0,450
<i>Ordem 7</i>	0,93	0,362	<i>Círculo 8</i>	0,36	0,563
Comprimento dendrítico total	0,01	0,976	<i>Círculo 9</i>	0,02	0,904
Comprimento total dos segmentos			<i>Círculo 10</i>	0,08	0,791
<i>Terminais</i>	0,00	0,957	<i>Círculo 11</i>	0,60	0,462
<i>Intermédios</i>	0,31	0,592	<i>Círculo 12</i>	0,60	0,461
Comprimento médio dos segmentos			<i>Círculo 13</i>	0,41	0,539
<i>Terminais</i>	0,79	0,399	<i>Círculo 14</i>	0,26	0,626
<i>Intermédios</i>	0,21	0,660	<i>Círculo ≥15</i>	0,56	0,474
			Densidade das espinhas dendríticas	37,05	0,0001 *

* Estatisticamente significativo

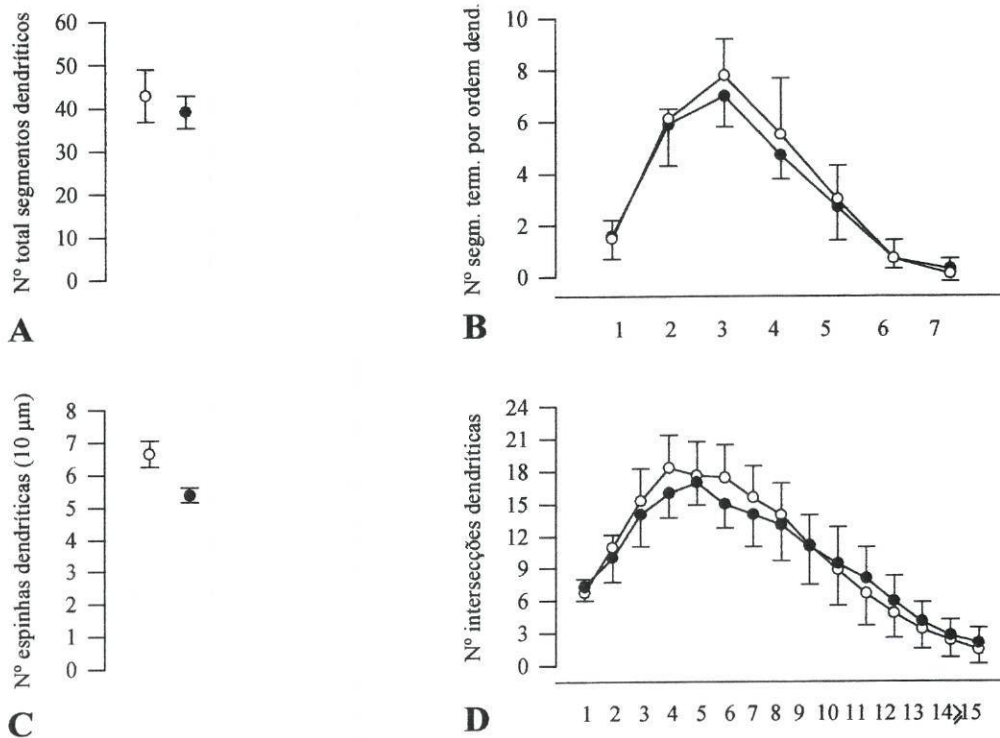


Fig. 21. Representação gráfica dos dados morfométricos obtidos nas arborizações dendríticas basais das células piramidais de CA1 do grupo de controlo (o) e do grupo de SIDA (●). Os símbolos representam as médias e as linhas verticais 1 desvio padrão. A. Número total de segmentos dendríticos por célula. B. Número de segmentos terminais por ordem dendrítica. C. Densidade de espinhas dendríticas ($P < 10^{-4}$). D. Densidade de ramificação dendrítica.

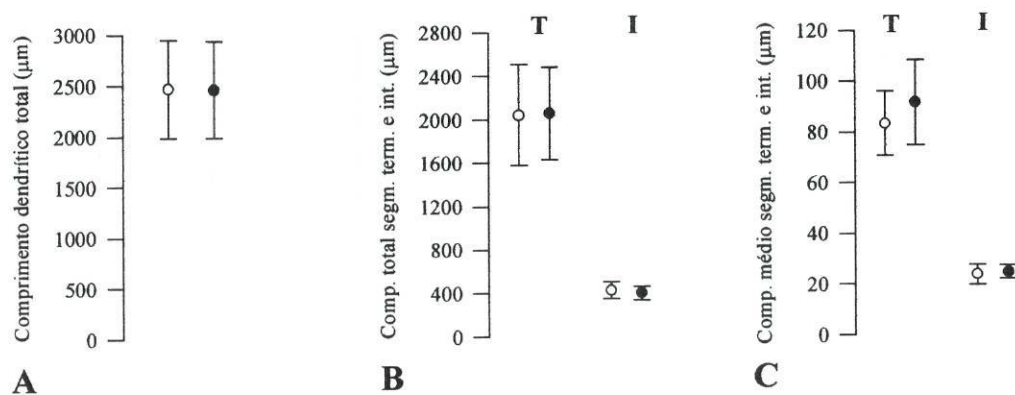


Fig. 22. Representação gráfica dos dados da análise métrica das arborizações dendríticas basais das células piramidais de CA1 obtidos no grupo de controlo (o) e no grupo de SIDA (●). Os símbolos representam as médias e as linhas verticais 1 desvio padrão. A. Comprimento dendrítico total. B. Comprimento total dos segmentos terminais (T) e dos segmentos intermédios (I). C. Comprimento médio dos segmentos terminais (T) e dos segmentos intermédios (I).

A única diferença significativa registada entre os dois grupos, quanto aos dados morfométricos obtidos nas árvores dendríticas basais das pirâmides de CA1, foi uma redução de 13% da densidade de espinhas dendríticas nos casos de SIDA ($P < 10^{-4}$) (Fig. 21).

Quanto às arborizações dendríticas apicais das células piramidais de CA1, cujos resultados da análise quantitativa e métrica se podem observar nas Figuras 23 e 24, o ANOVA mostrou apenas diferenças significativas no comprimento médio dos segmentos terminais ($P < 0,04$) entre os 2 grupos, sendo esse valor menor nos casos de SIDA (Quadro XVI).

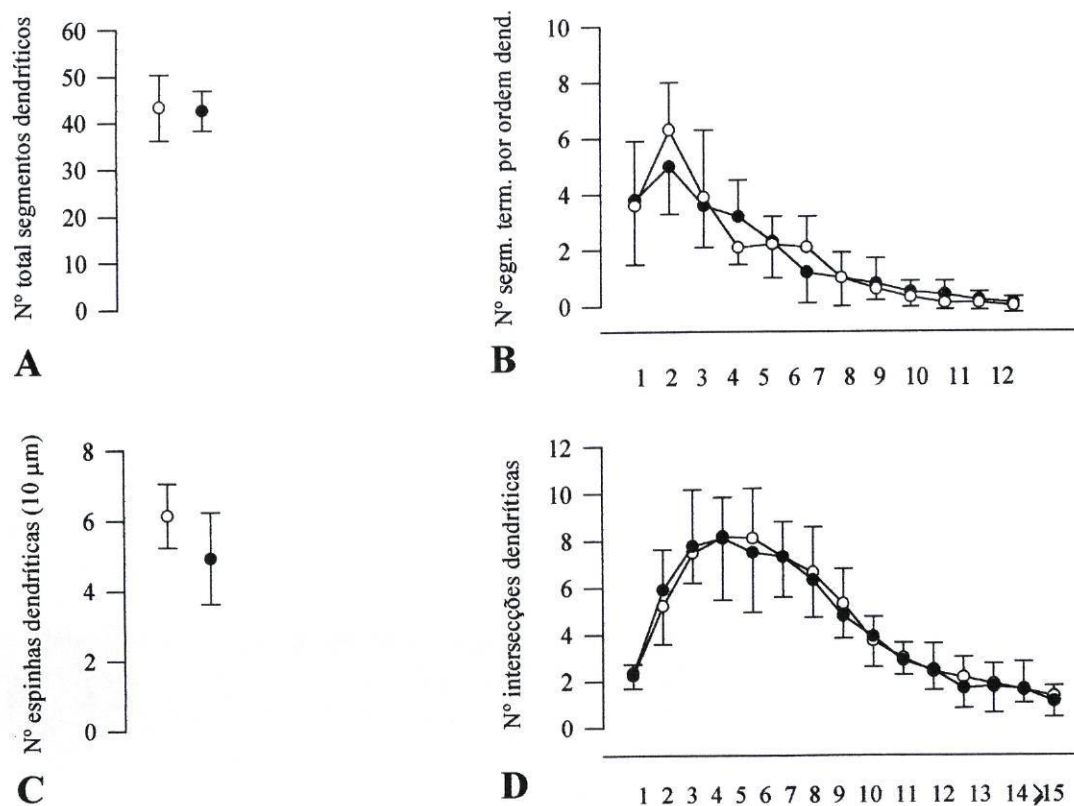


Fig. 23. Representação gráfica dos dados morfométricos obtidos nas arborizações dendríticas apicais das células piramidais de CA1 do grupo de controlo (o) e do grupo de SIDA (•). Os símbolos representam as médias e as linhas verticais 1 desvio padrão. A. Número total de segmentos dendríticos por célula. B. Número de segmentos terminais por ordem dendrítica. C. Densidade de espinhas dendríticas. D. Densidade de ramificação dendrítica.

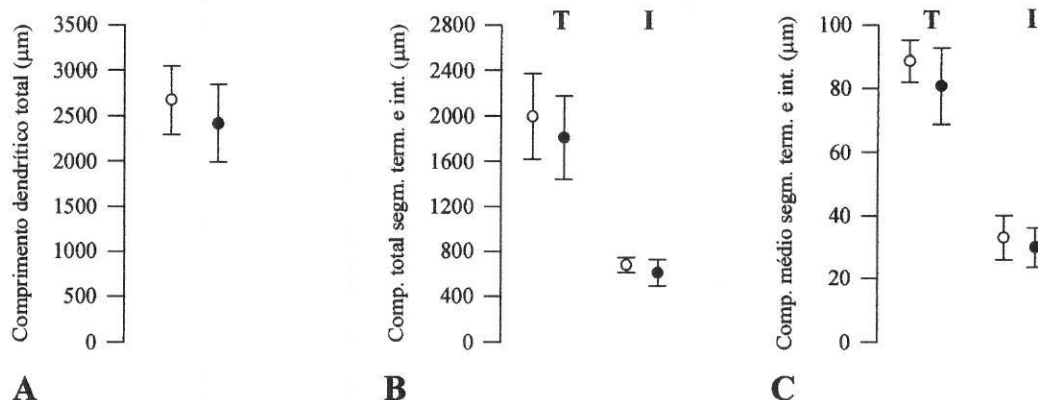


Fig. 24. Representação gráfica dos dados da análise métrica das arborizações dendríticas apicais das células piramidais de CA1 obtidos no grupo de controlo (o) e no grupo de SIDA (●). Os símbolos representam as médias e as linhas verticais 1 desvio padrão. A. Comprimento dendrítico total. B. Comprimento total dos segmentos terminais (T) e dos segmentos intermédios (I). C. Comprimento médio dos segmentos terminais (T) ($P < 0,04$) e dos segmentos intermédios (I).

Quadro XVI. Resultados da análise estatística dos dados obtidos nas arborizações apicais das células piramidais de CA1 (ANOVA)

	$F_{(1,8)}$	P		$F_{(1,8)}$	P
Número total de segmentos	0,04	0,848	Densidade de ramificação dendrítica		
Número de terminais por ordem dendrítica			<i>Círculo 1</i>	0,09	0,777
<i>Ordem 1</i>	0,03	0,862	<i>Círculo 2</i>	0,41	0,539
<i>Ordem 2</i>	1,43	0,266	<i>Círculo 3</i>	0,06	0,810
<i>Ordem 3</i>	0,06	0,809	<i>Círculo 4</i>	0,01	0,960
<i>Ordem 4</i>	2,51	0,152	<i>Círculo 5</i>	0,69	0,431
<i>Ordem 5</i>	0,01	0,912	<i>Círculo 6</i>	0,01	0,985
<i>Ordem 6</i>	1,83	0,213	<i>Círculo 7</i>	0,09	0,777
<i>Ordem 7</i>	0,01	0,950	<i>Círculo 8</i>	0,42	0,534
<i>Ordem 8</i>	0,21	0,659	<i>Círculo 9</i>	0,09	0,773
<i>Ordem 9</i>	1,04	0,338	<i>Círculo 10</i>	0,09	0,788
<i>Ordem 10</i>	2,45	0,157	<i>Círculo 11</i>	0,01	0,942
<i>Ordem 11</i>	2,00	0,195	<i>Círculo 12</i>	0,64	0,446
<i>Ordem 12</i>	1,80	0,217	<i>Círculo 13</i>	0,03	0,861
			<i>Círculo 14</i>	0,01	0,959
			<i>Círculo ≥ 15</i>	0,40	0,547
Comprimento dendrítico total	1,02	0,341	Densidade das espinhas dendríticas	2,96	0,124
Comprimento total dos segmentos			Comprimento médio dos segmentos		
<i>Terminais</i>	0,61	0,457	<i>Terminais</i>	6,83	0,030 *
<i>Intermédios</i>	1,39	0,271	<i>Intermédios</i>	0,53	0,489

* Estatisticamente significativo

3.1.2.2.2. *Stratum oriens*: os resultados do cálculo do volume do *stratum oriens* estão graficamente expressos na Figura 25. Encontraram-se valores 3% maiores nos doentes com SIDA que nos controlos, achado que o ANOVA mostrou não ser significativo ($F_{(1,18)} = 0,22$; $P = 0,644$). O CV das estruturas foi de 16% nos controlos e de 17% nos casos de SIDA.

3.1.2.2.3. *Stratum lacunosum-moleculare*: no que se refere aos resultados volumétricos obtidos no *stratum lacunosum-moleculare* (Fig. 25), verificou-se que os valores obtidos nos casos VIH+ eram significativamente menores, com ordem de grandeza de 22%, relativamente aos controlos ($F_{(1,18)} = 12,70$; $P = 0,002$). A variância interindividual das estruturas foi de 14% nos controlos e de 17% nos casos de SIDA.

3.1.2.2.4. *Volume global de CA1*: após a determinação dos volumes das diferentes camadas da região CA1 acima mencionadas, calcularam-se, como aliás acontecera na região CA3 do hipocampo, os volumes globais da região CA1. Os resultados obtidos e que se podem observar na Figura 25 mostraram que na SIDA existia uma redução de 13% no volume global de CA1 ($F_{(1,18)} = 6,87$; $P = 0,017$), estatisticamente significativa.

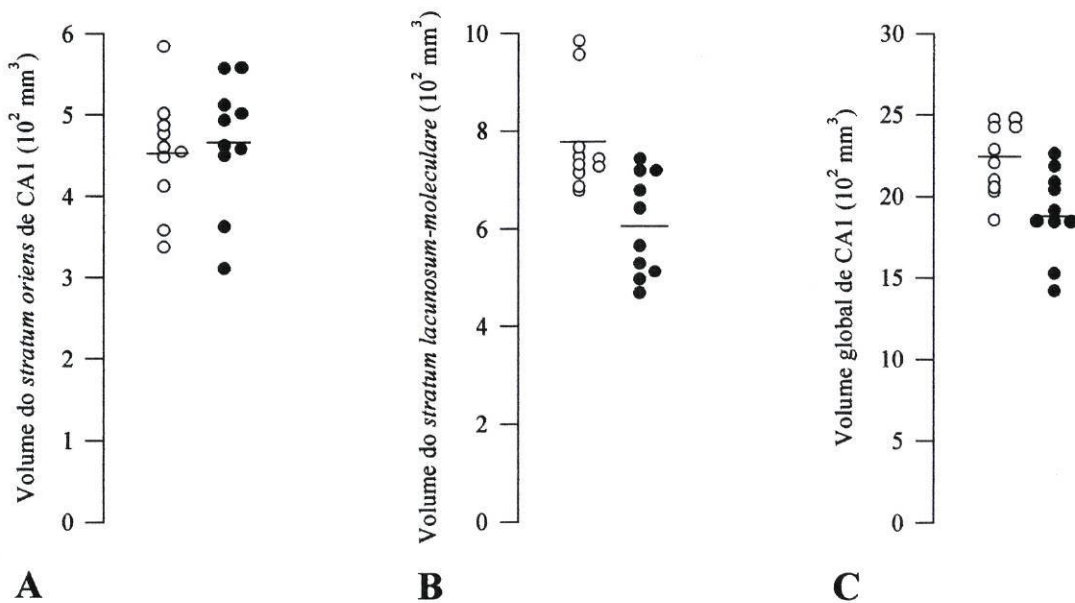


Fig. 25. Representação gráfica dos dados obtidos no *stratum oriens*, no *stratum lacunosum-moleculare* e na região CA1 do grupo de controlo (o) e do grupo de SIDA (●). A. Volume do *stratum oriens*. B. Volume do *stratum lacunosum-moleculare*. C. Volume global de CA1. As linhas horizontais representam as médias.

Em suma, na região CA1 do hipocampo dos casos VIH+ observou-se uma redução volumétrica percentualmente idêntica à registada na fâscia denteada no mesmo grupo, ou seja 13%, para a qual contribui a diminuição dos volumes da camada de células piramidais e do *stratum lacunosum-moleculare* (13 e 22%, respectivamente). Curiosamente, e tal como já acontecera em outras camadas celulares da formação do hipocampo, não se registaram diferenças significativas quanto ao número total de células piramidais de CA1. No entanto, os volumes nuclear médio e somático médio dessas células estavam ambos francamente diminuídos na SIDA (16 e 30%, respectivamente). Encontraram-se também nesta região sinais de degenerescência dendrítica nos casos VIH+, designadamente redução da densidade de espinhas dendríticas nos segmentos terminais das árvores basais e no comprimento médio dos segmentos terminais das árvores apicais.

3.1.3. Volume global da Formação do Hipocampo

Os somatórios dos volumes obtidos nas 3 regiões estudadas da formação do hipocampo permitiram determinar o seu volume global (Fig. 26).

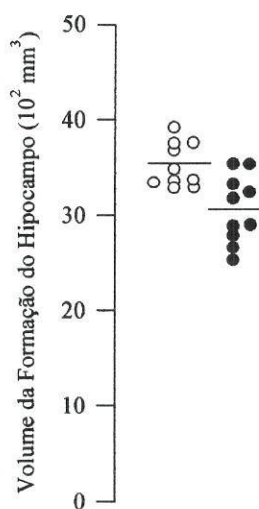


Fig. 26. Representação gráfica dos dados obtidos no volume da formação do hipocampo do grupo de controlo (o) e do grupo de SIDA (●). As linhas horizontais representam as médias.

Verificou-se que os valores do volume da formação do hipocampo eram significativamente menores na SIDA, como era de esperar, sendo a redução de cerca de 13% ($F_{(1,18)} = 12,06$; $P = 0,003$).

3.1.4. Comparação entre os grupos de casos VIH+

Obtiveram-se volumes totais e parcelares da formação do hipocampo bastante semelhantes ($F_{(1,8)} = 0,53$; $P = 0,486$) nos 2 grupos de doentes com SIDA, A e B (B1+B2). No entanto, quando se efectuou a análise estatística dos resultados volumétricos obtidos no grupo de controlo por um lado e de cada um dos subgrupos VIH+, A ou B1+B2, por outro (Quadro XVII), detectaram-se algumas diferenças, face aos resultados anteriormente apresentados nos pontos 3.1.1. e 3.1.2.

Quadro XVII. Resultados da aplicação do teste ANOVA aos valores dos volumes da formação do hipocampo do grupo A e do grupo B1+B2

	Grupo A (n = 4)		Grupo B1+B2 (n = 6)	
	$F_{(1,12)}$	P	$F_{(1,14)}$	P
Fáscia denteada				
Camada de células granulares	13,93	0,003 *	9,31	0,009 *
Hilo	6,45	0,026 *	2,48	0,138
Camada molecular	5,09	0,044 *	0,04	0,840
Total	11,67	0,005 *	2,50	0,136
Região CA3 do hipocampo				
Camada de células piramidais	6,24	0,028 *	6,82	0,021 *
<i>Stratum oriens</i>	7,58	0,018 *	0,82	0,382
<i>Stratum lacunosum-moleculare</i>	0,20	0,665	2,31	0,151
Total	5,62	0,035 *	4,13	0,035 *
Região CA1 do hipocampo				
Camada de células piramidais	2,15	0,168	6,85	0,020 *
<i>Stratum oriens</i>	0,01	0,924	0,41	0,530
<i>Stratum lacunosum-moleculare</i>	10,44	0,007 *	6,88	0,020 *
Total	4,59	0,053 *	5,43	0,035 *
Total da formação do hipocampo	12,27	0,006 *	7,92	0,014 *

Estatisticamente significativo

Com efeito, no grupo A, com 4 doentes sem envolvimento neurológico aparente, encontrou-se, face aos resultados globais, uma maior diminuição de volume de todas as camadas da fáscia denteada, e da região CA3 do hipocampo, ao contrário de CA1 em que só era estatisticamente significativa a redução volumétrica encontrada no *stratum lacunosum-moleculare*. Estas diminuições de volume implicaram por consequência, uma redução volumétrica global da formação do hipocampo neste grupo com ordem de grandeza de 16% e que se verificou ser estatisticamente significativa. Quanto ao grupo B, constituído por 6 casos,

1 do grupo B1 e 5 do B2, os resultados volumétricos eram bastante sobreponíveis aos obtidos quando se considerou o grupo de casos VIH+ como um todo, à excepção do hilo da fásia denteada e da própria fásia denteada na sua globalidade, estruturas onde não se detectaram quaisquer alterações de volume face ao grupo controlo. Encontrou-se neste grupo de doentes, com diversos tipos de envolvimento neurológico, menor redução do volume total da formação do hipocampo (cerca de 11%) em relação aos doentes do grupo A.

Pelo contrário, no tocante aos números totais de neurónios das principais camadas celulares da formação do hipocampo, não havia diferenças estatisticamente significativas entre os doentes VIH+ dos grupos A e B1+B2. No entanto, a comparação entre o grupo de controlo por um lado e cada um dos grupos A e B1+B2 por outro, permitiu detectar uma redução de 13% no número total de células piramidais de CA3 no grupo A (doentes neurologicamente assintomáticos) e que se verificou ser estatisticamente significativa ($F_{(1,12)} = 8,23$; $P = 0,014$).

Quanto aos volumes nuclear e somático médios dos neurónios encontraram-se valores semelhantes em ambos os grupos de doentes VIH+, à excepção do volume nuclear médio das células granulares que era menor nos doentes com infecção directa do sistema nervoso e/ou secundária a agentes oportunistas (grupos B1 e B2), relativamente aos assintomáticos do grupo A ($F_{(1,8)} = 5,70$; $P = 0,044$). No entanto, a comparação entre cada um desses grupos por um lado, e o grupo de controlo por outro, não permitiu detectar quaisquer diferenças.

As diferenças acima apontadas, quanto a volumes, números totais e volumes nuclear e somático dos neurónios, quando se compararam os resultados obtidos nos controlos por um lado, e cada um dos grupos de SIDA por outro, carecem da possibilidade de interpretação correcta, dado o pequeno número de casos do grupo A e do grupo B.

Não se procedeu à comparação inter-grupos de SIDA dos resultados do estudo quantitativo e métrico das arborizações dendríticas, dado o pequeno número de casos estudados (5) em cada grupo.

Em conclusão, estes resultados mostram que a formação do hipocampo de doentes com SIDA, seja qual for o tipo de envolvimento neurológico que apresentem, é sede de importantes alterações citoarquitónicas - atrofia das diferentes subdivisões e diminuição volumétrica dos corpos celulares e núcleos das principais populações neuronais - mas sem concomitante morte celular. Há ainda evidência de degenerescência neurítica generalizada com compromisso dos circuitos hipocampais.

3.2. Estudo do líquido céfalo-raquidiano

3.2.1. Imunidade celular

3.2.1.1. Citologia do líquido céfalo-raquidiano: A contagem celular do LCR, número de células por mm^3 , foi efectuada em 59 casos (Quadro XVIII). Verificou-se que apenas em 15 casos, distribuídos pelos 3 grupos considerados - A, B1 e B2 - existia pleocitose. Ou seja, na maioria dos casos a contagem celular era normal. Através da aplicação do teste de Kruskal-Wallis concluiu-se que não havia diferenças estatisticamente significativas quanto à existência ou não de pleocitose do LCR nos 3 grupos de doentes ($P = 0,568$); no entanto, considerando apenas os 15 casos com pleocitose (Quadro XVIII), verificou-se que a média do número de células era significativamente mais elevada no grupo B2 ($P = 0,027$).

Quadro XVIII. Citologia e citomorfologia do LCR em doentes VIH+

Grupo	Células/ mm^3		Citomorfologia			
	≤ 5	> 5 (Média \pm DP)	Normal	Linfocitária	Neutrofílica	Mista (L+N)
A (n=26)	19	7 (14,7 \pm 19,1)	19	4	0	3 (2*)
B1 (n=11)	9	2 (9 \pm 1,4)	3	5	0	3
B2 (n=22)	16	6 (154 \pm 277,7)	9	6 (2**)	2	5 (3*, 1**)
Total		44 15	31	15	2	11
%		(75) (25)	(53)	(25)	(3)	(19)

* Presença de eosinófilos

** Presença de *criptococcus neoformans*

3.2.1.2. Citomorfologia do líquido céfalo-raquidiano: Embora o número de casos com pleocitose fosse pequeno, observaram-se alterações dos quadros citomorfológicos, designadamente predomínio das células linfocitárias, quase em 50% do número de casos (28 casos) em que se efectuou a identificação e contagem diferencial das células após sedimentação do LCR (Quadro XVIII). A comparação inter-grupos permitiu demonstrar que a frequência de alterações citomorfológicas era significativamente mais elevada nos grupos B1 ou B2 que no grupo A ($P < 0,05$).

3.2.1.3. Subpopulações leucocitárias: Devido à observação de células linfocitárias num apreciável número de sedimentos de LCR, entendeu-se útil proceder à identificação das

subpopulações leucocitárias por citometria de fluxo, sempre que o volume total da amostra de LCR atingisse pelo menos 6 ml. No entanto, por dificuldades inerentes à técnica que requer a presença de células no LCR em número suficiente para incubação com os diferentes anticorpos, apenas se obtiveram resultados em 4 casos (Quadro XIX).

Quadro XIX. Resultados das subpopulações leucocitárias em 4 doentes VIH+

Grupo	Nº	CD45+	CD14+	CD3+	CD4+	CD4+/ CD29+	CD4+/ CD45RA+	CD8+	CD19+	CD20+	CD4+/ CD8+
Sangue											
A	19	99	16	32	11	6	7	30	10	-	0,37
B1	35	100	1	75	13	10	3	57	7	-	0,23
B1	36	100	5	74	49	-	-	25	18	-	1,96
B2	44	99	-	44	3	-	-	39	-	-	0,08
LCR											
A	19	79	2	64	18	-	-	-	22	-	-
B1	35	63	4	-	19	17	16	44	2	-	0,43
B1	36	94	6	53	14	15	-	44	-	15	0,32
B2	44	55	14	34	9	-	-	24	-	-	0,38

Relativamente ao sangue periférico, encontraram-se sempre valores extremamente diminuídos dos linfócitos CD4, como era de esperar, com correspondente inversão da razão CD4/CD8, excepto no caso 36 do grupo B1, com ADC, no qual esse quociente era normal. No que se refere ao LCR observou-se que a população leucocitária não era tão homogénea quanto no sangue, dificultando a análise técnica. De qualquer forma verificou-se que a maior parte das células no LCR eram linfócitos T (CD3) e que havia ligeira tendência ao aumento das subpopulações B. Tal como já acontecera no sangue periférico, também no LCR se encontraram, em todos os casos, valores diminuídos dos linfócitos CD4, com conseqüente redução da razão CD4/CD8. A marcação para as subpopulações dos linfócitos CD4 - CD4⁺CD29⁺, ou células de memória, e CD4⁺CD45RA⁺, ou células "naive", foi conseguida num número tão pequeno de casos que não permite tecer quaisquer considerações.

3.2.2. *Imunidade humoral*

3.2.2.1. *Proteínas totais do líquido céfalo-raquidiano e soro:* As proteínas totais estavam aumentadas na maior parte dos casos VIH+. Com efeito, obtiveram-se concentrações proteicas superiores a 45 mg/100ml em 40 casos, correspondendo a 69% dos casos em que se efectuou

esta determinação (Quadro XX). No entanto, a distribuição dos casos com hiperproteínoorraquia não era homogénea nos 3 grupos, pois o seu número era significativamente menor no grupo A ($P < 0,05$).

Verificou-se ainda que a mediana dos valores das proteínas totais no LCR estava significativamente elevada em relação à mediana dos valores dos casos de controlo (mediana de 55 mg/100 ml na SIDA *versus* 36 mg/100 ml nos casos de controlo; $P < 0,05$) (Quadro XXI); além disso, e quando se analisaram as medianas obtidas em cada grupo de doentes (Quadro XX), observou-se que o aumento da proteinorraquia encontrado no grupo A era significativamente menor do que o encontrado em qualquer um dos outros ($P < 0,05$). Não havia, no entanto, diferenças significativas entre os valores das proteínas totais dos grupos B1 e B2 ($P = 0,928$).

Quadro XX. Resultados das proteínas totais e dos perfis electroforéticos do LCR por grupos de doentes VIH+

Grupo	Proteínas totais (mg %; n=58)			Normal	Perfil electroforético (n=55)		
	≤ 45	> 45	mediana		Transudativo	γ-globulínico	Misto
A	11	13	46	7	4	11 (6*)	0
B1	3	9	72	3	4	3 (2*)	2 (2*)
B2	4	18	71	6	4	8 (5*)	3 (2*)
Total	18	40		16	12	22	5
%	31	69		29	22	40	9

* presença de bandas oligoclonais da globulina γ em 17 casos

3.2.2.2. Electroforese das proteínas

a) Aspecto qualitativo: O perfil electroforético do LCR foi efectuado em 55 casos (Quadro XX) e revelou-se patológico em 39 (71%). Destes, em 12 casos era de tipo transudativo, em 22 casos era de tipo γ-globulínico com ou sem bandas oligoclonais em 13 e 9 casos respectivamente, e nos restantes 5 casos era de tipo misto, isto é, simultaneamente transudativo e γ-globulínico, por vezes com bandas oligoclonais.

Dos perfis patológicos há a salientar o predomínio, em cada grupo, de casos com presença de bandas oligoclonais da globulina γ, associados em 5 deles a disfunção da barreira hemato-encefálica (perfil misto). Verificou-se ainda que o maior número de perfis normais se encontrava no grupo A, como era de esperar, não sendo contudo estatisticamente significativo ($P = 0,163$). Realça-se também o facto de não existirem diferenças estatisticamente

significativas quanto à distribuição dos perfis electroforéticos patológicos pelos 3 grupos ($P = 0,911$, teste de Kruskal-Wallis).

b) Quantificação das fracções electroforéticas: Os valores, relativos e absolutos, das medianas das diferentes fracções electroforéticas do LCR e soro, obtidos nos 43 casos VIH+ em que foi possível a leitura das lâminas por densitometria, bem como os valores obtidos em controlos, encontram-se nos Quadros XXI e XXII, respectivamente. Os valores do Índice Q podem observar-se no Quadro XXI.

Quadro XXI. Análise estatística das concentrações das proteínas totais e dos valores relativos das fracções electroforéticas do LCR e do soro (Teste U Mann-Whitney)

Grupo	LCR							Soro		Índice Q	
	P.T. (mg/100ml)	Pré-A.	Alb.	Glob. $\alpha 1$	Glob. $\alpha 2$	Glob. β	Glob. τ	Glob. γ	P.T. (g/100 ml)		Glob. γ
VIH											
Mediana	55,0	2,1	59,5	6,5	4,8	6,8	3,1	12,5	7,2	22,0	0,60
Percentil 10	26,0	0,2	40,8	1,9	2,6	3,1	1,9	6,3	5,5	12,4	0,33
Percentil 90	125,3	4,8	79,0	9,4	11,0	14,6	5,7	28,3	8,3	38,0	1,10
NORMAIS											
Mediana	36,0	3,9	59,0	5,2	7,8	12,0	3,3	6,3	7,4	18,0	0,35
Percentil 10	23,7	1,9	53,0	2,5	4,6	7,9	1,7	2,3	6,7	12,0	0,11
Percentil 90	44,0	7,7	68,0	6,8	15,0	19,8	4,9	9,4	8,4	28,0	0,69
<i>P</i>	<0,0001	<0,0001	0,780	0,075	<0,003	<0,001	0,920	<0,0001	0,280	<0,010	<0,0001

P.T., proteínas totais; Pré-A., pré-albumina; Alb., albumina; Glob., globulina.

Quadro XXII. Análise estatística dos valores absolutos das fracções electroforéticas do LCR e do soro (Teste U Mann-Whitney)

Grupo	LCR (mg/100 ml)							Soro (g/100 ml)
	Pré-A.	Alb.	Glob. $\alpha 1$	Glob. $\alpha 2$	Glob. β	Glob. τ	Glob. γ	Glob. γ
VIH								
Mediana	1,4	33,0	3,7	3,3	4,5	1,8	7,3	1,7
Percentil 10	0,1	18,0	0,9	1,2	1,4	0,9	2,9	0,8
Percentil 90	3,9	72,4	8,2	7,8	11,5	4,4	23,2	3,1
NORMAIS								
Mediana	1,4	21,5	1,8	3,0	4,3	1,2	2,2	1,3
Percentil 10	0,7	15,2	1,0	1,4	2,7	0,4	0,6	0,7
Percentil 90	2,6	28,9	2,9	5,5	8,0	1,9	3,4	2,2
<i>P</i>	0,950	<0,001	<0,0001	0,480	0,640	<0,001	<0,001	0,065

Pré-A., pré-albumina; Alb., albumina; Glob., globulina.

A electroforese das proteínas do LCR mostrou diversas alterações no grupo VIH+, com destaque para o aumento da globulina γ , cujas medianas dos valores relativos e absolutos eram 2 e 3 vezes superiores às dos normais, respectivamente (Quadros XXI e XXII). A maior parte das outras fracções electroforéticas estavam percentualmente diminuídas, facto particularmente notório nos valores relativos da pré-albumina e das globulinas α_2 e β (Quadro XXI).

No referente aos valores absolutos (Quadro XXII) observou-se que todas as fracções proteicas estavam aumentadas. Salienta-se, em particular, o facto de a globulina τ , proteína tecidular, estar significativamente aumentada em valor absoluto no LCR dos doentes com SIDA. No soro registou-se um aumento dos valores relativos e absolutos da globulina γ mas os valores das proteínas totais e das restantes fracções electroforéticas não eram significativamente diferentes dos valores normais (Quadros XXI e XXII).

A comparação entre os grupos de SIDA quanto aos valores relativos e absolutos das diferentes fracções electroforéticas do LCR não revelou diferenças estatisticamente significativas, à excepção do valor absoluto da pré-albumina cuja mediana estava ligeira mas significativamente diminuída no grupo A (1,24 mg/100 ml) face aos valores obtidos nos grupos B1 (1,35 mg/100 ml) e B2 (1,39 mg/100 ml) ($P < 0,05$). Concomitantemente, observaram-se menores concentrações das proteínas totais do LCR no grupo A, constituído pelos doentes neurologicamente assintomáticos, que nos grupos B1 e B2 ($P < 0,05$). As medianas das proteínas totais séricas e os valores relativos e absolutos da globulina γ sérica eram semelhantes nos 3 grupos de doentes VIH+.

Em 43 casos do grupo VIH+ determinou-se o Índice Q, quociente entre os valores relativos da globulina γ do LCR e do soro (Quadro XXI), e verificou-se que a mediana dos valores obtidos estava significativamente elevada quando comparada com a mediana dos casos normais. De facto, o Índice Q estava aumentado em 29 casos, distribuídos pelos 3 grupos, cujos valores medianos eram semelhantes ($P = 0,938$), traduzindo quebra da BHE em 23 casos ($1 > Q > 0,5$) e síntese intratecal de anticorpos em 6 casos ($Q > 1$), como se pode apreciar através da análise da representação gráfica que se mostra na Figura 27.

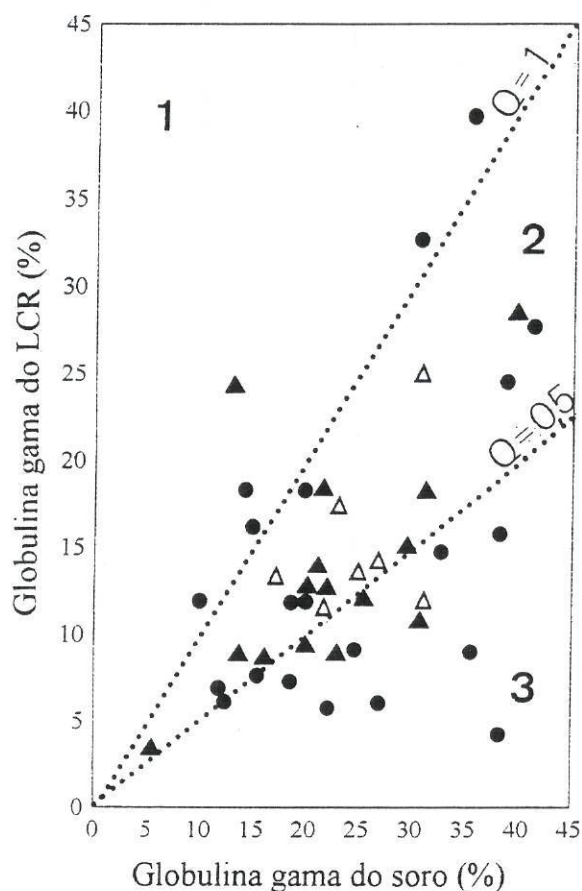


Fig. 27. Correlação entre os valores relativos da globulina γ do LCR e do soro (quociente Q) em 43 doentes VIH+.

Área 1, síntese intratecal de globulina γ .
 Área 2, disfunção da BHE.
 Área 3, normal.

Grupos: A ● ; B1 Δ ; B2 \blacktriangle .

3.2.2.3. *Estudo das imunoglobulinas e avaliação da síntese intratecal:* Em 10 casos determinaram-se as concentrações das imunoglobulinas G, A e M no LCR e no soro, cujos resultados estão expressos no Quadro XXIII.

Quadro XXIII. Valores das imunoglobulinas (n=10) e da fracção C4 do complemento (n=6) em doentes com SIDA (mg/100 ml)

Grupo	LCR			Soro							LCR	Soro
	Nº	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	Índice IgG	IgG soro/ IgG LCR	Índice IgA	C4	C4
A	2	13,8	0,9	-	1843	134	339	1,18	133,6	1,06	0,0	33,9
	3	8,6	1,5	-	2918	1638	176	0,71	339,4	0,22	0,4	22,7
	4	27,2	1,4	-	4915	248	704	0,71	180,7	0,73	0,8	109,0
	10	8,0	1,3	-	3698	158	921	0,66	463,4	2,50		
	15	6,1	1,4	-	1118	206	192	1,18	184,8	1,48		
B1	30	9,6	2,6	-	3481	925	309	0,81	362,6	0,84	0,7	56,0
	31	3,6	1,4	-	3226	602	640	0,55	906,1	1,17	4,2	29,9
B2	40	16,4	3,3	-	1608	424	253	0,98	98,0	0,74	0,4	19,2
	47	10,0	1,4	-	1129	224	434	0,65	113,7	0,46		
	49	6,9	2,9	-	893	683	329	0,54	130	0,29		
Mediana		9,1	1,4	-	2380	336	334	0,71	182,8	0,79	0,6	31,9
Percentil 10		3,8	0,9	-	916	136	178	0,54	99,6	0,23	0,0	19,2
Percentil 90		26,1	3,2	-	4793	1567	899	1,18	861	2,40	2,8	87,8

Como se pode observar, obtiveram-se concentrações elevadas das imunoglobulinas G e A no LCR na maior parte dos doentes com SIDA. Com efeito, a IgG apresentava valores acima do máximo normal (4,5 mg/100 ml) excepto num caso, com mediana de 9,1 mg/100 ml, e a IgA estava aumentada em todos os casos relativamente aos valores considerados normais (353). Além disso, e embora os valores séricos da IgG e da IgA estivessem também elevados na maior parte dos casos, encontrou-se aumento do Índice IgG e do Índice IgA (calculado do mesmo modo que o Índice IgG) em 6 e em 7 casos, respectivamente, tradutor de síntese intratecal de imunoglobulinas; merece aqui realçar que a electroforese do LCR de três casos neurologicamente assintomáticos (casos 2, 10 e 15) apresentava bandas oligoclonais da globulina γ , o que corrobora a existência de síntese intratecal de anticorpos. Recorde-se, neste ponto, o que se disse anteriormente sobre a utilidade do Índice IgG para a avaliação da síntese intratecal (SIT) de imunoglobulinas, em cujo cálculo se introduz a correcção da relação LCR/soro da albumina.

Como era de esperar, encontrou-se diminuição dos quocientes entre a IgG do soro e a IgG do LCR na maioria dos casos (80%), relativamente ao valor normal que é de cerca de 400 (117), reflectindo um incremento proporcionalmente maior da IgG no espaço subaracnoideu que no plasma. No que se refere à IgM, verificou-se que esta imunoglobulina não era doseável no LCR em nenhum caso e que os valores séricos estavam elevados em todos os casos.

3.2.2.4. Determinação da fracção C4 do Complemento: A fracção C4 do Complemento foi doseável em 5 casos no LCR e em 6 casos no soro (Quadro XXIII). Verificou-se que os valores obtidos no LCR eram sempre superiores ao normal (0,3 mg/100 ml), mas os séricos estavam aumentados apenas em dois casos (> 45 mg/100 ml).

3.2.2.5. Avaliação da integridade da barreira hemato-encefálica: A partir dos doseamentos da albumina sérica e do LCR obtidos nos 43 casos em que procedeu à quantificação das fracções electroforéticas, determinou-se, respectivamente, o Índice e o quociente soro/LCR da Albumina (Quadro XXIV). Observou-se aumento significativo da albumina do LCR, com consequente elevação do Índice de Albumina, em 84% dos casos de SIDA, traduzindo disfunção da BHE. Pelo contrário, como era de esperar, o quociente soro/LCR da Albumina (107) estava diminuído nesse grupo.

Quadro XXIV - Análise estatística do Índice e do Quociente da Albumina

Grupo	Albumina LCR (mg/100 ml)	Albumina Soro (g/100 ml)	Índice Alb.	Alb. soro/Alb. LCR
VIH				
Mediana	33,0	2,7	13,0	77,0
Percentil 10	18,0	2,1	5,0	47,8
Percentil 90	72,4	5,5	21,0	200,0
NORMAIS				
Mediana	21,5	3,3	6,8	147,5
Percentil 10	15,2	2,2	4,7	108,7
Percentil 90	28,9	4,1	9,2	213,7
<i>P</i>	< 0,001	0,199	< 0,001	< 0,001

A comparação destes valores entre os diferentes grupos de casos, revelou diferenças estatisticamente significativas apenas entre o grupo A e o B2, quer no referente ao Índice de Albumina que era menor no grupo A (medianas A: 10, B2: 17; $P < 0,01$), quer no referente ao quociente soro/LCR que era maior no grupo A (medianas A: 100; B2: 58,8; $P < 0,01$). Tal achado sugere que a disfunção da barreira, embora presente e significativa mesmo sem sintomatologia do foro neurológico, pode ser todavia mais marcada na presença de infecções do SNC por agentes oportunistas.

3.2.2.6. Avaliação simultânea da função da barreira hematoencefálica e da síntese intratecal de imunoglobulinas: O método gráfico utilizado para esta avaliação, que se pode apreciar na Figura 28, revelou a existência de SIT de IgG e de IgA em 7 doentes VIH+, incluindo os casos neurologicamente assintomáticos.

No caso 40, correspondente a um doente com infecções oportunistas do SNC - toxoplasmose e leucoencefalopatia multifocal progressiva - havia simultaneamente disfunção da BHE.

Nos outros 2 casos do grupo B2, a elevação da IgG e da IgA no LCR era devida apenas a disfunção da BHE.

Os restantes valores, referentes a 1 caso, situavam-se na área considerada normal.

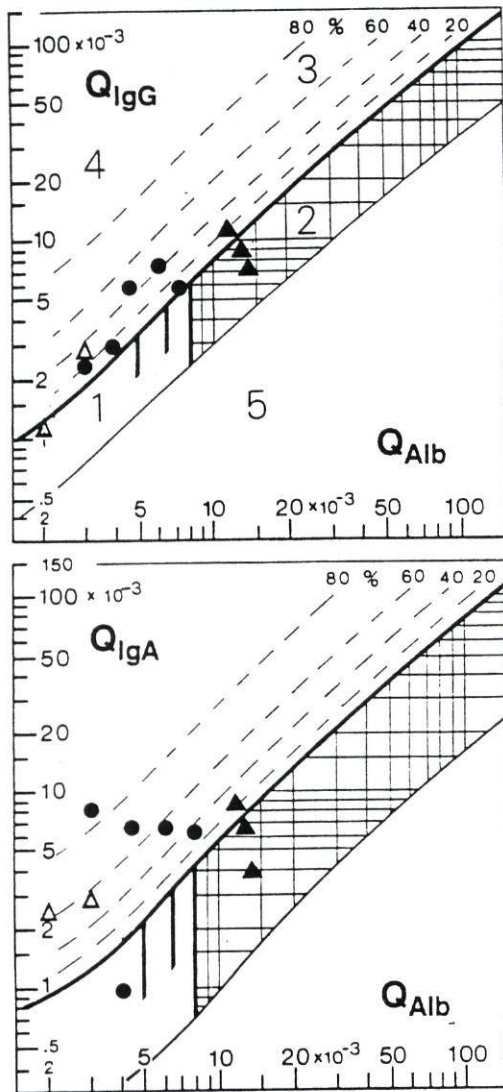


Fig. 28. Método gráfico de Ganrot e Laurell (125) adaptado por Reiber (311).

Diagrama de coordenadas em que Q_{alb} e Q_{IgG} ou Q_{IgA} se representam, respectivamente, em ordenada e em abcissa.

As curvas hiperbólicas (linhas espessas) representam as linhas de discriminação entre as fracções das imunoglobulinas derivadas do cérebro ou do soro; os valores acima das linhas superiores representam a síntese intratecal de IgG ou de IgA.

As linhas tracejadas indicam a extensão percentual da SIT relativamente à concentração total da imunoglobulina no LCR.

As linhas verticais mostram os limites da variação normais do Q_{alb} conforme a idade - valores de referência:

- $5 \times 10^{-3} \leq 15$ anos
- $6,5 \times 10^{-3}$ 15-40 anos
- 8×10^{-3} 40-60 anos

Áreas:

1. normal
2. disfunção da BHE
3. alterações da BHE associadas a SIT de imunoglobulinas
4. SIT de IgG ou IgA
5. erro metodológico.

Grupos: A ● ; B1, Δ ; B2, ▲ .

3.2.3. Influência da duração da infecção nas alterações do líquido céfalo-raquidiano

A análise estatística entre influência da duração da doença nos principais parâmetros laboratoriais do LCR - número de células/mm³, quadro citomorfológico, concentração das proteínas totais, tipo de perfil electroforético, Índice Q e Índice de Albumina - mostrou, como único resultado estatisticamente significativo, a existência de relação inversamente proporcional entre duração da doença e presença de quadros citomorfológicos anormais ($P < 0,02$).

3.2.4. Comparação entre tipo de vírus e alterações do líquido céfalo-raquidiano

A comparação entre os resultados obtidos nos parâmetros laboratoriais referidos no ponto 3.2.3. e o tipo de vírus, VIH-1 e VIH-2, não revelou qualquer diferença significativa.

Em conclusão, o estudo da imunidade celular e humoral do LCR efectuado em doentes infectados por VIH revelou alterações, independentemente da existência de envolvimento neurológico clínico e do tipo de vírus, tradutoras de activação imunitária intratecal. Das alterações celulares, que se observaram em menos de 50% dos casos, destaca-se o predomínio de células linfocitárias T com diminuição do fenótipo CD4 e inversão da razão CD4/CD8. Muito mais frequentes eram as alterações humorais que a seguir se resumem: elevação do teor das proteínas totais no LCR em 70% dos casos, significativamente maior nos grupos B1 e B2 do que no grupo dos doentes assintomáticos; perfis electroforéticos patológicos em 2/3 dos casos com predomínio dos perfis γ -globulínicos com bandas oligoclonais; aumento dos valores relativos e absolutos da globulina γ no LCR e no soro e do valor absoluto da globulina τ no LCR; síntese intratecal de globulina γ (elevação do Índice Q) e de imunoglobulinas IgG e IgA (elevação dos Índices IgG e IgA) associada ou não a disfunção da barreira hematoencefálica (aumento da albumina no LCR e elevação do Índice de Albumina) na maior parte dos casos estudados, o que se comprovou pela análise dos valores obtidos nos diversos doseamentos e pelo método gráfico; activação do complemento (fracção C4) no LCR.

DISCUSSÃO

Considerações iniciais

A história natural da SIDA e a biologia do vírus VIH têm sido alvo de variadíssimos estudos que surgem a um ritmo alucinante, o que dificulta o acompanhamento judicioso dos avanços científicos alcançados nesta forma tão particular de infecção. Com efeito, domínios investigacionais tão díspares como a virologia, biologia molecular, bioquímica, imunologia, farmacologia, epidemiologia, são aplicados ao estudo desta afecção, nomeadamente no que se refere ao envolvimento do sistema nervoso, com vista a melhor conhecer o vírus e a reacção despertada no hospedeiro. Não admira, então, que seja muitas vezes difícil fazer a sinopse da informação produzida, nomeadamente quando se desconhece em pormenor o território onde os achados têm lugar. Isto significa que, não havendo história sem geografia, são essenciais os conhecimentos estruturais das áreas onde os fenómenos são detectados laboratorialmente. Assim, como aliás já se salientou na Introdução, os estudos estruturais, quer de índole neuropatológica quer de pendor morfofuncional, não têm sido descurados e têm contribuído de modo inequívoco para a clarificação de inúmeras diligias consequentes à vertiginosa rapidez com que surgem os resultados noutros domínios. Mais propriamente, o estudo da morfologia do SNC dos doentes com SIDA, não só tem propiciado avanços no conhecimento dos mecanismos da infecção e das suas consequências, como tem contribuído para alicerçar muitos conhecimentos que fluem de modo desordenado. Compreende-se que tal aconteça, tão grande se torna a necessidade do controlo eficaz da doença, no momento uma das mais mediáticas e que mais desperta o interesse da população. Tendo tudo isto em atenção entendeu-se ser útil proceder no início deste capítulo a uma revisão dos aspectos gerais do vírus VIH e da SIDA, abordando o problema na sequência do que já se disse na Introdução. Tem-se absoluta consciência que se trata de um brevíssimo resumo, indicando-se para os leitores mais interessados fontes bibliográficas que se consideram adequadas para um eventual aprofundamento deste assunto (61, 97, 161, 194, 324, 404, 405).

Vírus VIH e sistema nervoso

Os vírus da imunodeficiência humana (VIH-1 e VIH-2) são vírus não oncogénicos que pertencem à família *Retroviridae*, subfamília *Lentiviridae* (419). Estes vírus acarretam lesão ou lise celular, contrariamente aos vírus oncogénicos que induzem alterações das células infectadas (244). Os retrovírus são vírus ARN de morfologia icosaédrica e constituídos por um invólucro externo e um núcleo central rodeado por um invólucro interior, a nucleocápside, onde se encontram o ácido nucleico, proteínas e enzimas, a mais importante das quais é a polimerase do ADN designada também transcriptase reversa (244, 405). Quando uma célula é infectada, esta enzima cataliza a síntese de um provírus de ADN que se integra no genoma do hospedeiro por acção de uma outra enzima, denominada integrase. O provírus integrado replica-se continuamente nas células infectadas, embora com intensidade variável, condicionando a transcrição do genoma vírico com produção de proteínas e síntese de novos viriões.

Para infectar as células o VIH necessita de receptores, o mais importante dos quais é o antígeno CD4, expresso pelos linfócitos T auxiliares e, em menor grau, também por monócitos, macrófagos, células de Langerhans, células dendríticas dos gânglios linfáticos, células microgliais e da retina. A molécula CD4 liga-se à glicoproteína gp120 da superfície externa do vírus, por sua vez fixada a proteínas transmembranares, designadas gp41, que recobrem o invólucro externo do vírus (221, 405). Verifica-se, no entanto, que a presença do antígeno CD4 não é suficiente para promover a entrada do vírus nas células, uma vez que para haver fusão entre o invólucro do virião e a membrana celular é necessário um receptor secundário, que se admite seja uma protease da superfície celular (41, 405). Sabe-se também que, embora todas as estirpes de VIH-1 e VIH-2 se liguem ao receptor CD4, o mesmo já não acontece quanto ao receptor secundário indutor da fusão, que varia entre esses dois tipos de vírus e até mesmo entre as diferentes estirpes conhecidas do VIH-1 (405). Por outro lado, o antígeno CD4 não é essencial para a entrada intracelular do vírus, visto que há linhas celulares que o não expressam e que podem ser infectadas pelo VIH-1, como se verificou *in vitro* em estudos de culturas de células gliais (54) e neuronais (200). Assim, outras moléculas têm sido investigadas como podendo constituir receptores alternativos ao CD4, menos eficientes é certo, caso do galactosilcerebrosídeo, glicolípido de membrana expresso por células neuronais e astrogliais, moléculas de adesão LFA-1, receptores Fc e receptores do complemento (405).

Após a fusão com a membrana celular, o VIH penetra no interior das células, condicionando a sua destruição por vários mecanismos, incluindo acção directa, formação de sincícios, autofusão e imunológicos como, por exemplo, fenómenos de rejeição mediados por citocinas, entre outros (405).

No que se refere ao tropismo do VIH, está hoje assente que estirpes víricas distintas variam quanto à sua afinidade para os diferentes tipos celulares. Assim, as estirpes víricas isoladas do SNC e do LCR crescem preferencialmente nas linhas macrofágicas, isto é, são macrófago-trópicas, enquanto que as isoladas das células mononucleares sanguíneas se propagam melhor nos linfócitos T, pelo que são designadas linfotrópicas (405). O neurotropismo do VIH, característica geral dos lentivírus, foi demonstrado por diversos estudos, como os que descreveram a presença de ácido nucleico do VIH-1 no cérebro de doentes com SIDA através de hibridização *in situ* (345), a existência de partículas retrovíricas em células gigantes cerebrais e ocasionalmente em astrócitos em estudos ultraestruturais (96), e até do próprio VIH-1 em células endoteliais dos capilares cerebrais. Num caso foi também observada a presença do vírus em astrócitos e neurónios por técnicas de hibridização *in situ* e de imuno-citoquímica (121, 415).

Com efeito, embora os trabalhos iniciais sugerissem que as células da linha macrofágica/microglial fossem o tipo celular predominantemente infectado, estudos posteriores utilizando métodos de hibridização *in situ* demonstraram infecção em 20% dos astrócitos (325) e através de técnicas de PCR foi em seguida descrita a infecção de neurónios (269). Seja como for, continua a acreditar-se que, *in vivo*, as células-alvo da infecção produtiva pelo VIH sejam os monócitos e os macrófagos (106, 129) e não os neurónios (97). Este facto foi corroborado em estudos recentes que mostraram que os neurónios e os oligodendrócitos permanecem livres de vírus (260, 377). Para o desencadear do neurotropismo vários factores estão envolvidos. Estes incluem a própria sequência vírica, o tipo específico de célula infectada (incluindo os receptores por ela expressos), a resposta imunitária particular do hospedeiro e factores ambientais como a presença de infecções oportunistas ou outros estímulos antigénicos (61). Admite-se ainda que variantes do vírus com diferentes tropismos sejam responsáveis por diferentes características da SIDA (405).

O mecanismo exacto de entrada do vírus no cérebro permanece desconhecido. No entanto, mantém-se a hipótese avançada pelos primeiros estudos ultraestruturais, classicamente designada por “cavalo de Tróia”, segundo a qual seriam as células monocitárias infectadas provenientes do sangue periférico que serviriam de veículo de transporte do vírus através da

BHE, para o parênquima cerebral e para o LCR, tal como acontece com o vírus visna (287). Sendo assim, os macrófagos cerebrais infectados com o VIH mais não são do que a mera expansão dessas células monocitárias. Acresce ainda que tais monócitos activados expressam níveis elevados de citocinas pro-inflamatórias, tais como o factor de necrose tumoral α (TNF- α) e a interleucina 1 (IL-1), que induzem a expressão de moléculas de adesão endoteliais no cérebro, mecanismo este facilitador da penetração celular no parênquima cerebral (267). Como alternativa a este mecanismo, admite-se que partículas víricas possam também penetrar livremente através da BHE quando exista aumento da permeabilidade, pelas células endoteliais dos capilares cerebrais, ou mesmo por tráfego normal de linfócitos T infectados, explicando assim a possibilidade de infecção dos astrócitos que parecem ser mais susceptíveis às estirpes linfotrópicas (252). Há ainda a possibilidade de a disseminação hematogénea das células infectadas pelo VIH ocorrer através dos plexos coroideus para o LCR e regiões periventriculares (102), podendo haver mesmo a nível dos plexos coroideus sequestro de células infectadas (11, 332). Foi também lançada uma hipótese de sentido contrário, isto é, uma via “ventrículo-fuga” para a disseminação do VIH, o que permitiria, em parte, explicar a localização predominante das lesões nos gânglios da base, substância branca dos hemisférios e tronco cerebral (94).

Todos estes mecanismos poderão estar envolvidos na capacidade de o tecido cerebral vir a constituir um reservatório de vírus, como foi demonstrado por PCR em casos com alterações neuropatológicas disseminadas (279, 345). Como bem se compreende, todos os factos implicados na neuropatogenia da infecção, isto é, o neurotropismo do vírus VIH, a precocidade de atingimento do SNC e a possibilidade da existência de um reservatório vírico a esse nível, são de extrema importância no curso evolutivo da doença. Com efeito, Schmid e colaboradores (332) propuseram um mecanismo para a patogenia da persistência da infecção pelo VIH, sugerindo que possa haver um fluxo do vírus nos dois sentidos, entre o SNC e os órgãos sistémicos, e que o cérebro constitua um sítio de armazenamento extravascular do vírus capaz de promover a subsequente sementeira do sangue periférico e a reinfeção sistémica. Assim sendo, o SNC seria um santuário para o VIH, facto que acarreta implicações de ordem terapêutica de grande monta, pois, qualquer medida que se pretenda eficaz na erradicação vírica tem logar alcançar o SNC.

Passando agora a comentar o curso evolutivo imunológico da infecção por VIH, sabe-se que na fase precoce, antes ainda da seroconversão, isto é, antes do aparecimento de anticorpos no soro, o vírus propaga-se principalmente nas células mononucleares do sangue periférico, acarretando depleção temporária de linfócitos CD4+ e marcada resposta imunitária celular com estimulação de linfócitos CD8+ (405). Os linfócitos CD8+ são células T citotóxicas que actuam a par da resposta humoral e tentam diminuir a elevada carga vírica, de modo a levar à erradicação da infecção, embora de modo infrutífero. Entra-se depois numa fase assintomática de longa duração, em que o vírus não está propriamente latente mas permanece activo no tecido linfóide, podendo a sua presença ser detectada no plasma, células mononucleares do sangue periférico, cérebro e LCR (405). Este mecanismo patogénico do VIH é bem semelhante ao de outros lentivírus causadores de doenças multissistémicas e encefalopatias persistentes e crónicas nos hospedeiros naturais, caso do vírus visna da encefalopatia do carneiro e dos vírus da artrite e encefalite caprina, da anemia infecciosa equina, da imunodeficiência felina, e os da imunodeficiência dos símios, colectivamente designados por SIV (105, 405). Tipicamente, há um longo período assintomático, seguindo-se, mais tarde, a fase de progressão gradual para a doença sintomática. Deste padrão temporal resultou o termo *lentivírus*, ou *vírus lentos*, dos quais o mais típico é o vírus *visna-maedi* isolado por Sigurdsson (351) que pôs em uso o termo *infecções por vírus lentos*. Mais ainda, existe grande similitude morfológica e genómica entre o vírus *visna* e as estirpes macrófago-trópicas do VIH (130, 368, 405), mas, é com o vírus SIV_{mac}, único lentivírus patogénico dos primatas não humanos, que o VIH é mais parecido (142, 193).

Embora os mecanismos da patogenia da SIDA permaneçam ainda mal conhecidos, há um modelo de história natural da infecção VIH baseado na evolução dos mecanismos imunológicos atrás referida (142). Em jeito de sumário, a infecção aguda primária caracteriza-se pela replicação vírica intensa com altos níveis de viremia e infecção generalizada dos tecidos linfóides. Segue-se um período de relativa quiescência clínica, de duração variável, durante a qual a replicação vírica continua mas é controlada pela resposta imunitária do hospedeiro. O quadro clínico completo da SIDA surge quando a imunodeficiência se torna clinicamente manifesta.

SIDA

As primeiras descrições da doença apareceram em 1981, em diversos trabalhos que alertavam para a ocorrência inesperadamente elevada de sarcoma de Kaposi, pneumonia por *Pneumocystis carinii* e outras infecções por agentes oportunistas, em adultos jovens homossexuais, até então saudáveis, e toxicodependentes que utilizavam drogas por via endovenosa (46, 47, 84, 118, 132, 241, 349); retrospectivamente concluiu-se até que os primeiros casos teriam efectivamente ocorrido em 1978 (46, 47). O achado comum a todos os doentes era um defeito adquirido da imunidade celular que se considerou ser importante na patogenia da afecção, a qual se passou a designar então como Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, SIDA (48). Rapidamente se verificou que a supressão da imunidade celular ocorria após infecção por um retrovírus que se designou como vírus da imunodeficiência humana, VIH, descoberto em 1983 por dois grupos independentes de investigadores (12, 124), demonstrando-se inequivocamente, no ano seguinte, ser este vírus o agente causador da SIDA (292). Todavia, estudos laboratoriais recentes descreveram a ocorrência de partículas víricas com constituição genómica idêntica ao VIH-1 em amostras de soro colhido no final da década de 50 em doentes cujos quadros clínicos foram semelhantes a SIDA (423). A infecção por VIH tem como consequência perda progressiva da função do sistema imunitário, ocorrendo o síndrome completamente estabelecido cerca de 10 anos após a infecção inicial. Em 1987, o CDC (49) definiu a SIDA como doença incapacitante ou que põe a vida em risco, causada pelo vírus VIH, e incluiu a demência, o síndrome de emaciação e certas doenças associadas com imunodeficiência, na lista das afecções que permitem num indivíduo seropositivo colocar o diagnóstico de SIDA.

Em Portugal, o primeiro caso de SIDA foi diagnosticado em 1983. Desde então, até ao fim de 1997, foram notificados ao Centro de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmissíveis do Ministério da Saúde 4.701 casos, devidamente estudados e catalogados com base no tipo de vírus e grupo etário. Destaca-se a maior incidência no sexo masculino, distribuição geográfica, por ordem decrescente de frequência, nos distritos de Lisboa, Porto, Setúbal, maior frequência de VIH-1 (92,3%) e número crescente de jovens infectados por uso de drogas injectáveis e por transmissão heterossexual (58, 277). Ora, tendo em conta o seu longo período de incubação, não deixa de ser inquietante a possibilidade de se vir a assistir no nosso país, nos próximos anos, a uma explosão marcante da SIDA.

Manifestações neurológicas da SIDA

Desde o aparecimento da SIDA que se verificou ser alta a frequência de alterações de carácter neurológico, cuja verdadeira valorização, no entanto, quer quanto à história natural da doença quer quanto à própria clínica neurológica em geral, só veio a ser reconhecida mais tarde (16, 120, 155, 167, 182, 197, 199, 243, 264, 296, 367). Sabe-se, também, que as complicações neurológicas da SIDA podem ocorrer em qualquer fase após a infecção pelo VIH, embora o conhecimento da fase da infecção sistémica pelo VIH seja da maior importância para a sua caracterização (295).

Assim, na fase de infecção aguda ou primária podem ocorrer diversas afecções do sistema nervoso central e periférico, tais como encefalites, leucoencefalopatias, meningites, mielopatias e neuropatias, usualmente com evolução monofásica, mas podendo deixar sequelas, por exemplo de ordem cognitiva, por mecanismo imunopatológico semelhante às encefalites pós- ou para-infecciosas (324).

Na fase seguinte, de latência clínica, a interacção vírus-hospedeiro parece não estar suspensa, apesar da ausência de sintomas e sinais clínicos. Com efeito, existe replicação vírica activa, também a nível do SNC, testemunhado pelas alterações do LCR em doentes assintomáticos. Estas alterações, para além de evidenciarem a infecção em curso através do isolamento do vírus ou detecção do ácido nucleico vírico por PCR (62, 133, 157), traduzem também a resposta imunitária do hospedeiro (37, 80, 89, 90, 92, 122, 123, 136, 217, 234, 235, 246, 314, 315, 397), como a existência de pleocitose, elevação de proteínas e síntese intratecal de imunoglobulinas, conforme se observou no presente estudo de LCR de doentes assintomáticos. Todos estes achados indicam que o SNC é precoce e continuamente exposto ao VIH durante o período clinicamente latente, sendo tentador relacionar esse atingimento precoce com o posterior desenvolvimento da demência associada à SIDA e da encefalite por VIH-1 (296, 348). Nesta fase de latência os doentes podem ser assintomáticos do ponto de vista neurológico ou apresentarem quadros raros de origem autoimune como polineuropatias desmielinizantes e até quadros multifocais evoluindo por surtos e remissões bastante semelhantes à esclerose múltipla (19, 161).

Nas fases mais tardias da SIDA, quando a imunossupressão é maior, surgem as complicações neurológicas mais graves (324). As afecções neurológicas desta fase mais tardia compreendem as infecções oportunistas, das quais as mais frequentes são a toxoplasmose cerebral (197, 218), a meningite criptocócica (426), a leucoencefalopatia multifocal

progressiva (375) e as infecções por vírus do grupo herpes (302) e certas neoplasias do SNC (288), manifestações estas consideradas secundárias à infecção por VIH. Além disso, surgem também na fase tardia da doença quadros atribuídos à própria infecção do sistema nervoso pelo vírus, como tal consideradas directamente provocadas pelo agente, cujas formas mais típicas são a demência e a mielopatia vacuolar (245). Não é raro, até, que o mesmo doente possa ser portador de lesões neurológicas múltiplas, de origem directa ou secundária. Como se pode apreciar, estas diferentes formas de envolvimento neurológico na SIDA estão amplamente exemplificadas nas séries clínicas incluídas nesta dissertação.

Em boa verdade, não é de estranhar a reconhecida susceptibilidade dos doentes com SIDA ao aparecimento dos mais diversos tipos de doenças neurológicas. Em primeiro lugar, basta atender ao facto de o vírus comprometer quer o sistema imunitário sistémico quer as funções imunológicas de determinadas células do SNC (341), acarretando por conseguinte uma falência nos diferentes e complexos passos das respostas imunitárias às infecções. Por outro lado, as alterações autoimunes que se despertam durante o curso da doença também são causadoras de afecções vasculares cerebrais e neuromusculares. Quase se poderá dizer que longe vai o tempo em que o SNC era considerado um órgão imunologicamente privilegiado ... (251). Mesmo sabendo que diferenças há, e consideráveis, entre a resposta dos órgãos imunitários periféricos e a reacção imunitária central, dada a existência da BHE e a falta no SNC de expressão antigénica do sistema *major* de histocompatibilidade (MHC) e de células apresentadoras de antígenos, o certo é que, quando o sistema imunológico está comprometido como acontece na SIDA, a resposta neuroimunológica também está. De entre as manifestações neurológicas atribuídas à infecção directa pelo vírus destaca-se todavia, pela sua importância, e por razões anteriormente referidas, a demência associada à SIDA.

Demência associada à SIDA. Sintomas neuropsiquiátricos

A demência associada à SIDA é um síndrome de características específicas, nunca se tendo observado noutras situações ou sido causado por outro agente. Esta especificidade entre o VIH e o ADC levou a que se relacionasse o quadro demencial com os efeitos directos do vírus no SNC. Contudo, pouco se conhece quanto à natureza da associação entre o vírus e a doença e quanto ao processo subjacente à agressão cerebral. Por todas estas incertezas e pela possibilidade de haver até mais de um mecanismo patogénico, o termo ADC deve ser encarado

como um termo exclusivamente clínico que se refere tão somente a um agrupamento de sintomas e sinais de ordem cognitiva, motora e comportamental. Com base nas características clínicas este síndrome foi considerado como fazendo parte do grupo das demências com envolvimento predominantemente subcortical (65, 264, 296, 300, 413).

Os sintomas mais precoces e mais ablativos são os de índole cognitiva. Há perda de memória, dificuldade em processar a informação de modo rápido ou em efectuar tarefas complexas e, mais tarde, dificuldades de atenção e concentração (120, 264, 294, 296, 345, 367). É também de realçar que, de entre os sintomas cognitivos, se destacam os défices mnésicos, os mais frequentes e os mais graves. Aliás, o mesmo se passava com a esmagadora maioria dos doentes com demência por VIH apresentados neste trabalho (*cf.* Quadros II e VII). Com efeito, embora não se tivesse procedido à especificação exaustiva da sua evolução anamnésica, mas se optasse apenas pela menção de designações mais genéricas, como “alterações demenciais” ou “alterações cognitivas e do comportamento”, era grande a frequência de perturbações da memória mencionadas nos registos clínicos. Por exemplo, na história clínica referente ao doente “C.D.”, as alterações da memória e a lentificação psicomotora eram sintomas relevantes do quadro, embora não fossem sintomas de apresentação. Como resultado da disfunção cognitiva há uma lentificação psicomotora típica que interfere com a vida diária, e posteriormente podem surgir situações de confusão generalizada. Concomitantemente, há alterações do comportamento, como perda de interesse, desânimo, apatia, perda de libido, afastamento de actividades sociais e, por vezes depressão com irritabilidade e perda de controlo emocional (264, 294, 296). Geralmente o juízo crítico está preservado até tarde, mas alguns doentes podem ficar agitados e até maníacos. Além disso, quando se procede à quantificação neuropsicológica, verifica-se que os testes psicométricos mais simples podem ser normais, mas o examinador nota lentidão de resposta e alguma hesitação ou pouca exactidão em testes mais elaborados (264, 294, 296). No estadio final do ADC surge mutismo. A estes sintomas juntam-se alterações motoras, de vária ordem, sempre caracterizadas por lentificação global. Noutros casos há mielopatia vacuolar associada, de forma que os sintomas motores se tornam mais notórios em relação aos cognitivos (263, 294, 296), como também se teve oportunidade de constatar na presente casuística.

Devido à frequência da associação entre sintomas cognitivos e motores e ao envolvimento concomitante do cérebro e da medula espinhal, a Academia Americana de Neurologia e a OMS propuseram a terminologia alternativa de complexo cognitivo/motor associado ao VIH-1, com subcategorias conforme predominam as alterações cognitivas ou

mielopáticas, havendo ainda uma forma *minor* com sintomas mais ligeiros (6). Analisando toda esta panóplia de sintomas, como disfunção cognitiva, alterações do comportamento, emocionais, e até distúrbios do foro sexual, tem cabimento pensar-se que o sistema límbico, nomeadamente a formação do hipocampo, possa estar preferencialmente envolvido no ADC (71, 171, 214, 274, 346, 372). Por outro lado, o envolvimento do neocórtex não parece ser tão marcado, pois o aparecimento de afasias, agnosias e apraxias, sintomas comuns nas demências corticais como a doença de Alzheimer (413), é muito raro na demência da SIDA.

Um outro aspecto importante, no que à prática clínica respeita, é o facto de a frequência de queixas neuropsiquiátricas nos doentes com SIDA, como os sintomas cognitivos e as alterações do estado mental, ser maior do que a frequência da demência por VIH, cujo diagnóstico pressupõe uma evolução progressiva com acréscimo gradual de outros sintomas e sinais. Isto significa que, além da infecção directa pelo vírus, essas alterações se possam também dever a encefalopatias metabólicas ou tóxicas, a infecções oportunistas e até a efeitos adversos da própria terapêutica retroviral (68). Neste particular, o mesmo se verificou em alguns dos casos da presente série, que apresentavam, para além de défices neurológicos focais relacionados com lesões neurológicas secundárias, alterações cognitivas e do comportamento. Na verdade, há séries clínicas que referem os sintomas cognitivos e as alterações da consciência em lugar cimeiro da expressão sintomática da SIDA, com distribuição percentual da ordem dos 70%, acima até das queixas mais correntes na clínica neurológica como as cefaleias, que ocupam nessas séries o segundo lugar (196). Giulian e colaboradores (129) referem que 60% dos doentes com SIDA apresentam disfunção cognitiva e 25% alterações motoras. Mais ainda, esses estudos alertam para a forte possibilidade de, numa doença crónica como esta, a incidência destes sintomas ser subestimada, nomeadamente quando são subtis e ficam mascarados por outros mais graves (196).

As alterações neuropatológicas que se observam nos casos de infecção cerebral pelo VIH são típicas desta afecção (35, 263, 340, 341, 344). As mais clássicas, descritas nos estudos iniciais, que apontavam para o envolvimento predominante da substância branca tornando a doença uma forma de leucoencefalopatia são, de acordo com Navia e colaboradores (263), as seguintes: presença de agrupamentos de células infectadas das linhas monocitária/macrofágica e microglial, acompanhados por vezes de astrócitos activados, linfócitos e plasmócitos, que se dispõem junto aos vasos sanguíneos e se localizam preferencialmente na substância branca, gânglios da base e tronco cerebral; presença de células gigantes multinucleadas, sinciciais, que se consideram o achado mais característico da infecção

por VIH (342), curiosamente a estrutura do SNC onde a infecção é mais produtiva (252); rarefacção da mielina sem características de desmielinização (35), achado este que é o substracto das lesões hiperintensas observadas por ressonância magnética na SIDA (272). Estas descrições estão de acordo com as observações do estudo neuropatológico de alguns dos casos presentes, sendo de destacar que as alterações mais frequentemente observadas foram os nódulos microgliais associados a monócitos e a células gigantes multinucleadas e sinciciais, localizados na substância branca.

Estudos mais recentes demonstraram envolvimento do córtex cerebral com evidência de perda neuronal (99, 179, 238, 239, 276, 416), não havendo todavia acordo entre os autores quanto a esta observação (338), e alterações dendríticas e sinápticas (240, 416). No entanto, apesar das inúmeras descrições neuropatológicas, raramente os estudos foram alicerçados em casos com informação clínica prospectiva adequada, de modo que é ainda críptica a existência de correlação directa entre a clínica e a patologia. Mais ainda, desconhece-se o mecanismo subjacente à perda de neurónios corticais referida nesses estudos (99, 179, 238, 239, 276, 416). Duas hipóteses foram todavia apontadas para explicar a possibilidade de ocorrência de morte neuronal: por infecção directa dos neurónios corticais ou por alteração do ambiente celular (344). Enquadra-se na segunda hipótese a apoptose neuronal descrita por Gelbard e colaboradores (127) em cérebros de crianças com encefalopatia progressiva por VIH-1. Além disso, sabe-se também que as células neuronais *in vitro* são extremamente sensíveis a baixas concentrações de TNF- α , citocina capaz de induzir morte por apoptose (344). Foi então proposto que as citocinas elaboradas quer pelos macrófagos infectados quer pelos astrócitos estimulados ou por ambos desempenhem um papel de relevo na patogenia do ADC (95). No entanto, outros estudos contrariam esta hipótese, já que a haver infecção directa dos neurónios pelo vírus ela é latente e não origina qualquer modificação genética susceptível de despertar morte neuronal (269).

De qualquer modo, a patogenia do ADC ainda é desconhecida, admitindo-se como possíveis causadores de lesão neuronal diversos factores indirectos, caso da libertação local de citocinas e de neurotoxinas por macrófagos activados, atrás mencionada, e de outros factores neurotóxicos a partir das proteínas do VIH (245). As citocinas, por sua vez, podem promover a amplificação da replicação vírica, estimulação dos astrócitos e da produção de metabolitos do ácido araquidónico, e os astrócitos activados podem desempenhar algum papel na modulação e amplificação de libertação de neurotoxinas. Avança-se, por último, que a

estimulação dos receptores do N-metil-D-aspartato (NMDA) com entrada de cálcio para as células possa ser a via final comum da lesão neuronal (129, 208-210).

Formação do hipocampo

A formação do hipocampo consiste numa lâmina curva de córtex filogeneticamente antigo, designado como arquicórtex, que se enrolou de forma peculiar levando-o a parecer-se com um cavalo-marinho, de onde, aliás, o seu nome deriva. Situa-se na zona mais profunda do lobo temporal e, no Homem, está confinada ao pavimento e parede medial do corno inferior do ventrículo lateral. Devido à sua organização trilaminar relativamente simples, bem como às numerosas funções cognitivas que com ela se relacionam, é uma área que tem sido muito estudada do ponto de vista morfofuncional em diversas espécies animais, incluindo o Homem (202, 203, 274, 407, 408, 410, 424).

A formação do hipocampo compreende a fâscia denteada e o hipocampo propriamente dito ou corno de Ammon (CA). Classificações mais abrangentes incluem também o subículo (4, 5, 214). Ao apreciar a evolução desta zona do cérebro na escala filogenética verifica-se que existe uma notável estabilidade entre as espécies quanto à citoarquitettura, histoquímica e padrões de conectividade (406). Registe-se, no entanto, que a similitude não é total. Por exemplo, do ponto de vista citoarquitectónico, a formação do hipocampo dos primatas difere da dos roedores, sendo naqueles as suas subdivisões, nomeadamente o hilo e a região CA1, mais volumosas. Recentemente foram descritas outras diferenças, tais como maior expansão da região CA3 e, conseqüentemente, das conexões das pirâmides de CA3 para as células piramidais de CA1, ou seja, do sistema de colaterais de Schaffer, no Homem (202, 203). Isto levou Lim e colaboradores (202, 203) a sugerir que estas diferenças poderiam justificar as alterações observadas no sistema de memória declarativa humana.

O circuito intrínseco básico da formação do hipocampo é trissináptico, unidireccional, excitatório e tem como principais mediadores o glutamato e o aspartato (7, 8, 214). Inicia-se nas projecções maciças da via perforante do córtex entorrinal para as células granulares da fâscia denteada, local da primeira sinapse (4, 5, 21, 22, 152, 214, 215, 305, 374). A segunda, estabelece-se entre as fibras musgosas, isto é os axónios das células granulares, e as excrescências dendríticas das células piramidais de CA3 (24, 57, 119), enquanto que a última das sinapses deste circuito se faz entre os colaterais de Schaffer, provenientes dos axónios das

pirâmides de CA3, e as células piramidais de CA1 (151, 215, 305, 330). Estas células, por sua vez, enviam axónios para o subículo e córtex entorrinal e ainda para áreas extra-hipocampais através do sistema fimbria/fórnix (4, 5, 214).

É de salientar que, para além dos contactos pertencentes ao circuito mencionado, há ainda projecções do córtex entorrinal para CA3 e CA1 que utilizam o mesmo tipo de mediadores (374, 417, 421) e receptores do tipo NMDA. Outras aferências à formação do hipocampo são as colinérgicas provenientes da região septal e, em muito menor grau, as que têm origem no tronco cerebral: noradrenérgicas do *locus coeruleus*, serotoninérgicas dos núcleos da rafe, histaminérgicas da formação reticular do mesencéfalo rostral e dopaminérgicas da área tegmental ventral e da substância negra (4, 5, 214). Por último, são de mencionar as fibras comissurais provenientes da formação do hipocampo contralateral, curiosamente menos representadas nos primatas que nos roedores (5).

Para além das populações neuronais descritas, existem na formação do hipocampo numerosos interneurónios inibitórios GABAérgicos, localizados nos *strata oriens* e *alveus* do hipocampo e, maioritariamente, no hilo, a cujo nível estabelecem conexões recíprocas e complexas com o corpo celular e os dendritos proximais das células granulares. Em resumo, os interneurónios hipocampais desempenham importante papel modulador no circuito trissináptico (4, 5, 214, 257). Como consequência, a actividade final desta região do córtex decorre da interacção de circuitos excitatórios e inibitórios. A título de exemplo, foi sugerido por Sloviter (365) que a perturbação funcional das células em cesto induzida por crises epilépticas poderá causar desinibição das células granulares e, logo, estar implicada na fisiopatologia do estado de mal epiléptico.

O papel desempenhado pela formação do hipocampo na aprendizagem e na memória é conhecido desde os anos 50. Com efeito, pouco tempo após o trabalho pioneiro de Miller e Penfield (254) sobre a localização das funções mnésicas no cérebro dos mamíferos, Scoville e Milner (336) descreveram que a região medial do lobo temporal, incluindo a formação do hipocampo, está envolvida em funções mnésicas no Homem.

Resumidamente, pode definir-se “aprendizagem” como o processo neural que torna os animais capazes de se adaptarem ao meio ambiente através do recurso à experiência anterior de forma a permitir ajustamentos do seu comportamento, e “memória” como o processo neural pelo qual a experiência adquirida através da aprendizagem é armazenada, permanecendo acessível quando necessária (346). Por sua vez, a aquisição da memória pode dividir-se em diversas fases. Com efeito, existe um processo inicial de obtenção de informação, ao qual se

segue a memória de curta duração e depois um processo de consolidação, um e outro dependentes da formação do hipocampo. A fase seguinte, de armazenamento da informação, também designada por memória de longa duração, requer a consolidação da aprendizagem, processo que é frágil e facilmente manipulável por um curto lapso de tempo após a experiência inicial (346). A última fase de aquisição da memória diz respeito à evocação da informação.

Desde os estudos de Olton e Papas (273), sabe-se que o hipocampo está selectivamente envolvido na posse da informação pertinente apenas durante um breve período de tempo, a “memória de trabalho” ou “memória de curta duração”, e não da informação que vai permanecer constante, a “memória de longa duração”. Assim, o hipocampo não está envolvido com a natureza espacial ou não da informação, mas sim no modo como essa informação é processada na memória. No entanto, é de realçar que muitas teorias têm sido avançadas sobre o papel exacto da formação do hipocampo nestas funções cognitivas. Por exemplo, O’Keefe e Nadel (270) defendem a “teoria do mapa espacial”, sugerindo que o hipocampo está especificamente envolvido na aprendizagem e memória espaciais, enquanto Teyler e colaboradores (382, 383) propõem, na “teoria da indexação da memória”, que o hipocampo promove o armazenamento de um mapa de localização de outras regiões cerebrais. Pode referir-se de forma simplificada que a formação do hipocampo integra a informação que provem das regiões parahipocampais com a previamente existente, processa combinações de estímulos multimodais de acordo com o contexto comportamental em que os mesmos ocorreram e, por último, promove a consolidação da memória (214, 372).

No que diz respeito à base neurofisiológica da memória, os estudos existentes sugerem que esta se fundamenta no fenómeno de *long-term potentiation* (LTP), que consiste no aumento estável e relativamente duradouro da eficácia sináptica, através de vias mono-sinápticas, resultante da estimulação tetânica das fibras aferentes. Estudos experimentais demonstraram que o LTP facilita a aprendizagem, pois os animais a ele submetidos adquirem respostas mais rapidamente e cometem menos erros (346). Por sua vez, a plasticidade das redes neuronais, isto é, a modificação das suas propriedades como resposta à experiência passada, embora seja uma característica geral do SNC, é especialmente proeminente na formação do hipocampo bem como nos outros componentes do sistema límbico (214). A formação do hipocampo tem ainda um outro tipo de plasticidade, de natureza estrutural ou histológica, que tem como base factores de crescimento nervoso, descritos também pela primeira vez nesta região (63, 265), que são muito importantes nos mecanismos reparadores de resposta às agressões.

Finalmente, salienta-se que muitos dos conhecimentos sobre a organização citoarquitectónica e as funções da formação do hipocampo têm sido adquiridos através quer da observação de doentes que apresentam perturbações da memória quer da realização de estudos experimentais. Assim, pôde concluir-se que a destruição do lobo temporal interessando a formação do hipocampo acarreta perda de memória para factos recentes (ou memória imediata) e para factos ocorridos entre a data da lesão e a memória presente (1, 327), não afectando a memória para factos remotos (346). Todavia, em estudos experimentais em que foram realizadas lesões selectivas da formação do hipocampo não se observaram essas alterações, mas sim hiperactividade e incapacidade de inibição da resposta motora (32, 163, 170), o que levou Isaacson (163) a sugerir que, no Homem, as funções da formação do hipocampo sejam distintas das de outras espécies animais. Além disso, diversas descrições de doentes com amnésia têm permitido o estabelecimento de correlações clínico-patológicas, ao mostrar que as regiões CA3 e CA1 do hipocampo estão particularmente envolvidas. Do que se referiu, são exemplos a doença de Alzheimer (162, 410), a amnésia pós-isquémica (313, 425) e a epilepsia generalizada grave (70, 399). Com efeito, o doente descrito por Zola-Morgan e colaboradores (425), que tinha sofrido um episódio de isquemia global, apresentava lesão bilateral de CA1 e amnésia anterógrada grave. Rempel-Clower e colaboradores (313), por sua vez, descreveram 3 doentes com lesões bilaterais da formação do hipocampo de diferente magnitude e com diversos graus de amnésia anterógrada e retrógrada, o que lhes permitiu concluir que a gravidade da amnésia depende da localização e extensão da lesão hipocampal podendo tal lesão acarretar também amnésia retrógrada limitada no tempo.

Líquido céfalo-raquidiano

O LCR origina-se a nível dos plexos coroideus por um processo misto que envolve filtração inicial do sangue através da parede dos capilares e, em seguida, secreção pelo epitélio coroideu (73, 74). Há também, em menor grau, produção extracoroideia de LCR a partir do parênquima cerebral por via transependimária (74, 110, 253), que detém inegável importância fisiopatológica. Com efeito, em consequência da possibilidade de passagem de substâncias directamente do parênquima cerebral para o LCR, este fluido coloca em contiguidade o espaço intersticial que rodeia as células do SNC com os espaços ventricular e subaracnoideu.

A passagem de substâncias do compartimento extracerebral para o intracerebral não se faz livremente. Com efeito, existem barreiras, as mais importantes das quais são a BHE e a barreira sangue-LCR, que regulam essa actividade, facilitando quer a entrada dos metabolitos necessários para o SNC quer a remoção de outros desnecessários ou tóxicos, desta forma protegendo as células e o neurópilo de substâncias que possam afectar o seu metabolismo ou a sua actividade funcional (110). Verifica-se, todavia, que existe uma certa independência funcional entre a barreira sangue/LCR, ao nível dos plexos coroideos, e a verdadeira BHE *stricto sensu*. Assim, enquanto a primeira é essencialmente uma barreira de filtração para moléculas hidrofílicas, a segunda é facilmente atravessada não por essas, mas sim por moléculas lipofílicas. Em última análise, a composição do LCR reflecte o estado funcional da barreira sangue/LCR e não o da BHE, bem como as alterações ocorridas na região justaventricular do parênquima cerebral, a partir da qual há difusão livre de proteínas do espaço extracelular (108).

No que se refere às proteínas, é de salientar que a sua transferência segue as leis da difusão em função do tamanho molecular, o que significa que a exclusão de moléculas grandes se correlaciona mais de perto com o volume hidrodinâmico que com o seu peso (107). Esta discriminação dependente do tamanho molecular confere selectividade à barreira sangue/LCR. Consequentemente, há maiores quocientes LCR/sangue e atinge-se mais rapidamente o equilíbrio entre os dois fluidos para moléculas mais pequenas como a da albumina que para moléculas maiores como as das imunoglobulinas. Isto explica a existência de maior concentração de albumina que de globulina γ no LCR normal, comparativamente com as respectivas concentrações séricas. Quando há diminuição da velocidade de fluxo de LCR há aumento de influxo de proteínas a partir do sangue e surge disfunção da barreira sangue/LCR (312).

Fisiologicamente, a BHE permite a passagem de pequenas quantidades de albumina e de IgG do sangue para o espaço ventricular, bem como de algumas células leucocitárias, designadamente linfócitos T e monócitos (110). Estas células, ao transitar reciprocamente entre o SNC e a periferia, mantêm uma forma de imunovigilância a nível central. Com efeito, considera-se que a BHE ou, mais propriamente, os plexos coroideos têm função imunológica, dado o rápido aparecimento no SNC de linfócitos T e de células plasmocitárias produtoras de imunoglobulinas em doenças neurológicas inflamatórias (110). Além disso, foi também demonstrado por Nathanson e Chun (261) que os plexos coroideos são capazes de apresentar

os antígenos estranhos aos linfócitos T auxiliares provenientes da periferia, o que permite explicar a possibilidade de reconhecimento imunológico no SNC na ausência de sistema linfático a esse nível (110).

Como facilmente se compreende, em consequência do envolvimento precoce do SNC pelo VIH durante a fase primária há alteração das barreiras e resposta inflamatória intratecal, o que acarreta modificações da composição do LCR. Mais ainda, o atingimento preferencial de zonas cerebrais profundas, periventriculares, que foi até relacionado com a possível infecção do SNC pelo vírus a partir do LCR (94), mais probabilidades apresenta de induzir alterações da sua composição. Resumidamente, a presença de antígenos víricos expressos à superfície das células infectadas, em associação com moléculas do MHC, induz nos linfócitos T resposta imunitária intratecal, com libertação de citocinas, factores quimiotácticos e moléculas de adesão o que atrai mais células imunitárias da periferia (393). Esta resposta celular inicia-se por células T activadas, macrófagos e neutrófilos e, mais tarde, chegam linfócitos B activados que se transformam em plasmócitos produtores de anticorpos no SNC (174). Tal processo reflecte-se, no LCR, por aumento inicial do número de leucócitos, despertar de síntese intratecal de imunoglobulinas, presença de bandas oligoclonais e aumento das proteínas totais (devida à disfunção da BHE e à síntese intratecal de anticorpos), alterações todas elas bem demonstradas no presente trabalho. Por seu turno, a replicação intratecal do vírus reflecte-se por níveis elevados de antígeno p24 e de ácidos nucleicos víricos. Mais tarde, a progressão da doença acarreta aumento da resposta inflamatória, incluindo síntese de citocinas, neopterina, β_2 -microglobulina, ácido quinolínico e prostaglandinas. Por outro lado, quando há infecção por agentes oportunistas, os exames culturais e serológicos do LCR são positivos. Finalmente, na fase mais tardia da SIDA há declínio da resposta imunitária com diminuição do número de leucócitos e de IgG no LCR apesar do aumento da estimulação antigénica (234).

Material

Conforme se verificou, os 20 indivíduos infectados pelo vírus VIH-1 de quem se colheu a formação do hipocampo haviam falecido no estadio mais avançado da SIDA. Por essa razão não se procedeu à distribuição dos casos pelos estadios clínicos da doença segundo a

classificação revista em 1993 do CDC/OMS (50), mas sim segundo a sintomatologia neurológica e psiquiátrica e as lesões encontradas no estudo neuropatológico. Assim sendo, o primeiro grupo de casos que se designou por A e que inclui os doentes assintomáticos apenas do ponto de vista neurológico, não apresenta qualquer correspondência com a categoria A da classificação acima citada, uma vez que, como é óbvio, todos eles referiam sintomas de doenças sistémicas associadas à SIDA. Por outro lado, a subdivisão que se fez nos casos com sintomas neuropsiquiátricos (grupo B) nos subgrupos B1 e B2, pode parecer um pouco artificial uma vez que todos os doentes do subgrupo B1 apresentavam demência associada à SIDA a par de outras lesões secundárias do sistema nervoso. No entanto, crê-se que essa subdivisão se justifica pelo impacto patogénico que os quadros neurológicos devidos a lesão directa pelo VIH despertam. Mas, o que sem dúvida mais importa é que a grande maioria dos doentes do grupo B apresentavam sintomas demenciais (36%), défices motores (14%) ou ambos (43%); isto é, cerca de 80% dos doentes com envolvimento neurológico manifesto tinham alterações cognitivas.

Cabe nesta altura esclarecer os motivos pelos quais se considerou que todos os doentes VIH+, mesmo assintomáticos, tinham, do ponto de vista patogénico, um processo lesional comum do SNC provocado pela infecção vírica, que se designou genericamente por “encefalopatia por VIH”. Nesta acepção, o termo “encefalopatia” não deve ser confundido com o quadro nosológico inicialmente designado como demência associada à SIDA (264), encefalopatia da SIDA (345), ou encefalopatia por VIH (120), e agora denominado complexo cognitivo/motor associado à SIDA (6). Com efeito, razões de diversa ordem explicam esta orientação, porventura controversa. Em primeiro lugar atendeu-se às características da biologia do vírus: o VIH tem como alvos quer o sistema imunitário quer o sistema nervoso e a infecção deste é precoce, constante e persistente (28, 315, 332, 340). Em segundo lugar considerou-se que a própria evolução da nomenclatura da SIDA aponta para uma maior abrangência sintomática, já que a designação de encefalopatia por VIH (120) foi desviada do plano clínico para o neuropatológico e a designação nosológica mais recente, complexo cognitivo/motor associado à SIDA, integra agora, para além dos clássicos achados demenciais, também sintomas motores (6). Por último, não é de mais realçar a frequência das queixas neuropsiquiátricas nas diversas expressões sintomáticas da SIDA (129, 146, 169, 196, 197, 218, 243, 245, 264, 288, 290, 296, 302, 375, 426) pondo de algum modo em causa classificações tão confinadas. Acresce que, se é ponto assente que a infecção do sistema

nervoso pelo VIH é constante e persistente, também é indiscutível que a expressão clínica desse processo interactivo pode ser muito variável podendo explicar, por exemplo, a ausência de sintomas neurológicos nalguns dos presentes casos. Mecanismos da responsabilidade quer do vírus, relativas à sua capacidade de mutação com aparecimento de novas estirpes adaptativas, quer da resposta imunitária do hospedeiro acabam, em última análise, por talhar esta feição clínica.

Das formações do hipocampo pertencentes aos 20 casos com SIDA, apenas 10 foram aproveitadas para o estudo estereológico e, tal como oportunamente referido, este material foi processado simultaneamente com o do grupo de controlo. Os resultados mostraram que os dois grupos analisados eram homogéneos em termos de distribuição etária, peso do cérebro e lapso de tempo decorrido entre óbito e autópsia, o que facilitou a análise comparativa dos mesmos, tanto no que se refere aos estudos estereológicos como às quantificações realizadas em material impregnado pelo método de Golgi. É de salientar que o número de neurónios impregnados pelo método de Golgi visualizáveis em boas condições era relativamente reduzido, pelo que a amostragem não foi tão grande quanto seria de aconselhar. Esta dificuldade foi sentida sobretudo nas células granulares, mas, apesar disso, foi possível constituir dois grupos de 5 casos cada, nos quais o número de neurónios impregnados era satisfatório e a preservação das suas árvores dendríticas era de boa qualidade.

No referente ao estudo de LCR, que se efectuou a par com o estudo de amostras de sangue periférico, não houve selecção de casos tendo sido possível estudar também o LCR de doentes infectados pelo VIH-2, identificado em 12 casos (20% desta amostra). Na altura da colheita do LCR os doentes encontravam-se em diversas fases evolutivas da doença e o seu estadiamento efectuou-se segundo a penúltima classificação do CDC/OMS (49), dada a extensão temporal desta série. Apesar da possibilidade real de se distribuírem os casos pelos diversos estadios clínicos da SIDA, decidiu-se dividir os doentes em 3 grupos - A, B1 e B2 - de modo a facilitar o estabelecimento de correlações entre os achados laboratoriais e os dados neurológicos. Todos os doentes tinham em comum o facto de terem apresentado durante o curso clínico sintomas neurológicos ou síndrome febril que obrigou ao despiste de infecção do sistema nervoso. Saliente-se que em 5 casos a punção lombar foi efectuada para rastreio de neurosífilis, complicação neurológica cada vez mais frequente na SIDA (15, 173, 175, 176).

Morfometria

Utilizaram-se neste trabalho métodos estereológicos recentemente descritos (140, 141, 373) e que actualmente se usam por rotina no Instituto de Anatomia (227, 228, 323). Por respeitarem a realidade tridimensional das estruturas em análise, as técnicas usadas permitiram obter estimativas *unbiased* quer do volume das diferentes camadas da formação do hipocampo quer do número total e volume médio dos seus neurónios. Verificou-se que as técnicas de amostragem utilizadas nas determinações dos volumes e dos números totais de neurónios, bem como na selecção dos campos de observação onde se procedia quer à contagem quer à medição dos volumes dos neurónios, foram suficientemente precisas, já que a variância introduzida pelas estimativas estereológicas, avaliada através dos coeficientes de erro, representava apenas uma pequena parte das variâncias interindividuais observadas. Com efeito, nas estimativas de volumes das diferentes camadas da formação do hipocampo, a variância biológica oscilava entre o valor mínimo de 73% (camada de células piramidais de CA1) e o máximo de 93% (*stratum oriens* de CA1) da variância observada; apenas na camada de células piramidais e no *stratum lacunosum-moleculare* de CA3 a influência da variação interindividual era menor, representando 42% e 57% da variância global observada, respectivamente. Já nas estimativas do número total de neurónios e dos volumes neuronais a variância biológica era mais uniforme mas continuava a representar, respectivamente, 83% a 91%, e 87% a 93% das variâncias interindividuais observadas. Estes achados indicam que os procedimentos de amostragem utilizados foram em geral satisfatórios, embora nas estimativas do volume da camada de células piramidais e do *stratum lacunosum-moleculare* de CA3 o coeficiente de erro se pudesse ter reduzido com contagem de maior número de pontos, e sugerem que a variação interindividual se poderia vir a atenuar com a inclusão de um maior número de casos.

Por outro lado, deve ser salientado que os valores obtidos relativamente aos volumes das diferentes subdivisões da formação do hipocampo se podem considerar sobreponíveis aos valores reais, uma vez que se verificou não ser significativa a retracção tecidular decorrente do processamento histológico. Este último achado vem dar razão ao facto, geralmente aceite, que os tecidos cerebrais incluídos em glicolmetacrilato não sofrem virtualmente qualquer retracção (27), o que leva até alguns autores a nem sequer procederem à sua determinação quando utilizam este tipo de inclusão (227, 228). É de realçar ainda o interesse de se ter procedido à estimativa dos volumes das camadas não celulares da formação do hipocampo, o que permitiu

obter dados até hoje não descritos na literatura e também apreciar de forma indirecta o que se passava com o neurópilo, ou seja, com os prolongamentos celulares.

Quanto à técnica estereológica que se utilizou para calcular o número total de neurónios, não é de mais salientar que se trata do método mais rigoroso para o efeito. De facto, há outros estudos anteriores que descreveram estimativas *unbiased* dos números totais de neurónios na formação do hipocampo humano efectuadas em material proveniente de necrópsias de indivíduos sem patologia neurológica (361, 407, 408, 410), mas em todos os casos as determinações foram efectuados através da multiplicação do volume das camadas celulares pela densidade numérica dos neurónios. Ora, este trabalho é o primeiro em que se utiliza o *fractionator* óptico no cálculo dos números totais de neurónios hipocampais em material humano. Ao comparar os valores obtidos neste estudo com os da literatura, verificou-se que as estimativas eram da mesma ordem de grandeza, mas que a variação interindividual do número total de neurónios era menor que a referida por outros, em todas as subdivisões da formação do hipocampo. Contudo, os valores médios obtidos nas estimativas dos números de neurónios hilares e piramidais de CA3 são aqui menores, facto para o qual não se tem explicação cabal, uma vez que os critérios utilizados na definição das regiões hipocampais e no desenho dos limites das camadas celulares se podem considerar sobreponíveis, atendendo a que as estimativas dos volumes e os respectivos coeficientes de erro encontrados são semelhantes aos referidos por outros (361, 408).

Além disso, não existem, até à data, estudos dirigidos às alterações estruturais da formação do hipocampo na SIDA baseados em números totais das células e os escassos trabalhos publicados basearam-se na determinação de densidades numéricas (239, 316, 370). Mais ainda, não se observou gliose no exame histopatológico de rotina em material corado pela hematoxilina ácida fosfotúngstica nem no estudo imuno-histoquímico, o que sem dúvida reforça o rigor dos valores obtidos, uma vez que os números encontrados nos grupos com SIDA não estão sobrevalorizados por perfis gliais eventualmente contados erroneamente como neuronais. Com efeito, tem sido apontado que a gliose pode ser um factor de *bias* nos resultados obtidos com métodos quantitativos, nomeadamente por ser muitas vezes difícil a distinção entre os neurónios de menores dimensões e as células gliais maiores (113, 258, 278, 309). Contudo, o facto de se utilizarem critérios de distinção celular bem definidos e de não se terem contado as células que suscitavam dúvidas, aliado à aparente ausência de gliose, permite concluir que o número de células não neuronais eventualmente contadas nos *disectors* como neurónios é desprezável.

Neste estudo, para além do cálculo do número total de neurónios hipocampais, procedeu-se também à determinação dos volumes médios, nuclear e somático, dos neurónios das principais subdivisões da formação do hipocampo humano. Com esta finalidade, utilizou-se o *nucleator* (138, 140). De acordo com os princípios deste método, os neurónios nos quais se procedeu à estimativa dos volumes foram seleccionados através de *disectors*; deste modo, todos os neurónios, independentemente do seu tamanho, forma e orientação, tiveram idêntica probabilidade de serem medidos, o que muito contribuiu para o aumento de precisão das estimativas. Por último, salienta-se que também estes resultados não foram influenciados por retracção ou edema tecidual induzidos pelos procedimentos histológicos pois, como acima referido, o factor de retracção tecidual era desprezável.

Para aprofundar a análise dos neurónios das principais subdivisões da formação do hipocampo foram estudadas as suas arborizações dendríticas impregnadas pelo método de Golgi. Este método de impregnação pela prata tem-se revelado de grande eficácia ao possibilitar a definição da forma e arranjo espacial das árvores dendríticas em material humano e experimental (10, 39, 40, 281-285, 378-380). O método de Golgi, no entanto, possui várias limitações, também sentidas neste trabalho, já que, por um lado, impregna um reduzido número de células e, por outro, frequentemente impregna os neurónios apenas parcialmente. Os parâmetros morfométricos estudados, semelhantes aos referidos noutros estudos (10, 40, 76, 395), são os que melhor caracterizam a extensão e a organização sequencial no espaço dos diversos segmentos dendríticos.

Cabe aqui realçar a importância do tipo de informações obtidas através do estudo citoarquitectónico da totalidade dos neurónios da formação do hipocampo que o método de Golgi possibilita, sem o qual este trabalho ficaria muitíssimo incompleto. Com efeito, é do conhecimento geral que nos dendritos se encontra 90% da superfície receptora dos neurónios (166, 329) e há evidência que quer a forma quer a organização das superfícies receptoras neuronais são cruciais para a transmissão sináptica e integração de estímulos (160). No que se refere a material humano, são bem conhecidos os contributos que os estudos das arborizações dendríticas da formação do hipocampo têm trazido para o esclarecimento morfofuncional das alterações cognitivas de determinadas doenças degenerativas e demenciais, de que se salientam os estudos efectuados no envelhecimento e na doença de Alzheimer (76, 112, 114-116, 145).

DISCUSSÃO GLOBAL DOS RESULTADOS

Neste trabalho descrevem-se as alterações citoarquitectônicas da formação do hipocampo na encefalopatia por VIH com recurso aos métodos estereológicos mais recentes e à impregnação pelo método de Golgi. Tanto quanto foi possível detectar é a primeira vez que se procede a um estudo desta índole. De modo genérico, a análise dos resultados obtidos na formação do hipocampo de doentes com SIDA mostrou haver redução global do volume desta zona do cérebro, manutenção dos números totais dos seus neurónios, atrofia nuclear e somática dos neurónios e degenerescência dendrítica da maior parte das populações neuronais estudadas. Paralelamente, observou-se no LCR de doentes seropositivos evidência de activação neuroimunológica celular e humoral e sinais que corroboram a presença de degenerescência da substância branca.

Mais detalhadamente, e no que respeita ao estudo das variações volumétricas, registou-se uma diminuição média de 13% do volume global da formação do hipocampo nos indivíduos com SIDA, a qual, surpreendentemente, era mais acentuada nos casos neurologicamente assintomáticos do grupo A que nos do grupo B, constituído por doentes com sintomas demenciais e diversas complicações neurológicas. Esta redução de volume repartia-se de forma relativamente homogénea pelas principais subdivisões estudadas, com excepção dos casos do grupo A onde era mais acentuada na fâscia denteada e na região CA3 do hipocampo que no grupo B. Contudo, desconhece-se o significado destas diferenças de magnitude quanto ao grau de atrofia hipocampal existente entre os grupos de casos VIH+, permanecendo a dúvida se o pequeno número de casos estudado não poderá estar na base do achado. No entanto, as alterações volumétricas da formação do hipocampo estão em desacordo com um outro estudo estereológico (275) dirigido à avaliação da atrofia cerebral na SIDA. Estudaram estes autores material de autópsia proveniente de doentes com diversos quadros neurológicos associados à SIDA e observaram redução significativa do volume no neocórtex, nos núcleos centrais e na substância branca dos hemisférios, mas não no arquicórtex. Tais resultados eram observáveis em todos os grupos de doentes que estudaram e eram independentes da existência clínica de demência (275). É aqui de referir que a presença de atrofia cerebral generalizada em doentes VIH-1+ tem sido também descrita em trabalhos de índole neurorradiológica (67, 92, 128, 144, 198, 304, 414), pelo que se pode, até certo ponto, assumir que a atrofia da formação do hipocampo registada no presente trabalho se enquadra nesse conjunto de observações.

A corroborar esse achado, está o facto de se ter encontrado no LCR de doentes VIH+, valores absolutos significativamente elevados de uma proteína parcialmente tecidular designada por tau (τ), que na electroforese migra entre as globulinas β e γ , a qual, como se referiu anteriormente, resulta da actividade da neuraminidase tecidular normalmente presente no SNC sobre a transferrina sérica e aparece exclusivamente no LCR (190). Ora, embora o aumento da proteína τ não seja específico de qualquer doença neurológica em particular, admite-se com grande probabilidade que reflecta processos de atrofia do SNC, em especial da substância branca (354), pelo que é bem plausível que a sua elevação na SIDA possa ter também o mesmo significado. Curiosamente, e feitas as devidas ressalvas, é de referir que, muito embora não se tenha no presente trabalho procedido à estimativa do volume cerebral global por métodos estereológicos, o certo é que não se registaram quaisquer diferenças entre as médias dos pesos dos cérebros obtidas nos dois grupos de casos, SIDA e controlo, apesar desse valor ser ligeiramente menor no primeiro. Estes resultados estão de acordo com Navia e colaboradores (263), que encontraram valores médios do peso do cérebro normais em adultos com ADC, e com Oster e colaboradores (275) que, para além do mesmo tipo de achado, também não observaram qualquer correlação entre o peso e o volume dos cérebros de doentes VIH+.

Em contraste com a escassez de estudos no ADC, a determinação dos volumes da formação do hipocampo tem sido largamente efectuada no envelhecimento e em diversas doenças degenerativas de índole demencial, em particular na doença de Alzheimer, quer através de volumetria por ressonância magnética cerebral (75, 178, 186) quer através de estudos estereológicos semelhantes ao efectuado no presente trabalho (361). Em ambas as situações tem sido observada atrofia hipocampal, embora muito mais marcada na doença de Alzheimer, que foi possível correlacionar com o grau das alterações cognitivas, nomeadamente de índole mnésica, que os referidos doentes apresentam (75). Assim sendo, é de crer que a atrofia da formação do hipocampo que se encontrou na encefalopatia por VIH possa ser relacionável com as perturbações cognitivas características da afecção e possa mesmo ocorrer independentemente da existência de sintomas clínicos, tal como Oster e colaboradores observaram noutras regiões cerebrais estudadas em doentes com SIDA (275).

Quando se analisaram discriminadamente os volumes de cada uma das camadas das principais subdivisões da formação do hipocampo constatou-se, porém, que a redução dos volumes globais dessas subdivisões na encefalopatia por VIH era devida quase exclusivamente

à diminuição do volume das camadas celulares. Este achado levou a que se pensasse poder tal situação advir de morte neuronal. No entanto, não se encontrou morte neuronal, mas sim diminuição considerável dos volumes nucleares e somáticos dos neurónios de todas as populações estudadas, o que permite explicar a atrofia das camadas celulares.

A apreciação detalhada da importância e magnitude da morte neuronal na formação do hipocampo pressupõe, como anteriormente explicitado, a estimativa do número total de neurónios. Esta estimativa é de uma relevância morfofuncional que importa realçar, uma vez que, em última análise é a variação do número total de neurónios de uma região cerebral o mais poderoso indicador da sua afectação funcional. Pode-se, assim, dizer que são de enfatizar as afecções que acarretam alterações numéricas de populações neuronais, dado o reflexo que têm nas funções cognitivas dependentes desses neurónios. Ou seja, a morte neuronal no cérebro adulto, seja qual for a região cerebral considerada, acarreta alterações funcionais, a maior parte das vezes graves em virtude da impossibilidade de divisão celular pós-natal nos primatas. Já nas situações em que se verificam alterações degenerativas de índole neurítica é mais fácil a compensação através de fenómenos de reorganização plástica neuronal e, logo, a existência de alguma compensação funcional também.

Neste estudo observou-se manutenção do número total de neurónios da formação do hipocampo no grupo de casos com SIDA. Ressalva-se, no entanto, o facto de se ter encontrado diminuição de 13% das células piramidais de CA3 no grupo A, diferença esta que era significativa por comparação com os controlos mas não com o grupo B. Tal como acontecia com as determinações volumétricas, não existe uma explicação clara para esta diferença entre os grupos de SIDA. A ausência de morte neuronal na SIDA observada estereologicamente, foi corroborada pelo estudo imuno-histoquímico realizado, que mostrou idênticos padrões de marcação para a ubiquitina na SIDA e nos controlos, quer na formação do hipocampo quer também no córtex préfrontal (resultados não publicados). A ubiquitina é uma proteína induzida nas células como resposta ao stress citológico e que está envolvida na degradação das proteínas anormais, actuando como co-factor da proteólise não lisosómica dependente do ATP (56, 147, 308) e também no sistema lisosómico (81), funções que genericamente se designam por ubiquinação das proteínas. A sua detecção está descrita no envelhecimento e em diversas doenças neurológicas de que sobressai a demência de Alzheimer, onde se encontra elevada quer no tecido cerebral quer no LCR (180, 185). A ausência de morte de neurónios na formação do hipocampo de doentes com SIDA não é um achado tão

inesperado quanto seria de supor, mesmo tendo em conta os trabalhos que a descreveram a nível neocortical (99, 101, 179, 276, 403, 416), uma vez que o vírus não parece ter uma actividade citopatogénica sobre os neurónios (34), nem mesmo provocar lise dos astrócitos ou dos oligodendrócitos (296). Além disso, há outros autores que não encontraram morte neuronal neocortical na SIDA (338), à semelhança do que aqui se refere.

Tem sido também apontada a possibilidade de a morte neuronal neocortical ocorrer só nas fases mais tardias da infecção (28). Conquanto não se disponha de qualquer evidência a nível hipocampal de um fenómeno deste tipo, pode pôr-se a dúvida se tal poderia, de facto, acontecer. Se assim fosse, era lógico admitir que a detecção de morte neuronal hipocampal poderia ficar condicionada pela duração da doença. Nesse sentido, ganharia maior importância a coexistência de outros processos, eventualmente agudos, que levam à morte do doente mais cedo, por um lado e, por outro, os mecanismos idiossincráticos da interacção vírus/hospedeiro, ou, por outras palavras, o resultado da interacção entre adaptabilidade mutante do vírus e adaptabilidade imunitária do hospedeiro. A amostra trabalhada não permite, todavia, aprofundar estas conjecturas.

Ainda no que diz respeito à morte neuronal no neocórtex, não é de mais referir que, dos trabalhos existentes, apenas um se baseou em estimativas de números totais de neurónios (276). Seja como for, é justo salientar que essas descrições trouxeram dados importantes para a compreensão da patogenia da doença tendo posto em causa a localização fundamentalmente subcortical das lesões (264, 296, 300) e levantaram a hipótese do atingimento dos neurónios de forma indirecta, já que não parecem ser células-alvo de infecção directa pelo agente. Pelo contrário, a ausência de morte de neurónios na formação do hipocampo, a par das alterações neuríticas que se adiante se apresentarão, corroboram a integração da encefalopatia pelo VIH no grupo das demências subcorticais, dando razão às primeiras descrições (264, 296, 300).

A observação da inexistência de morte neuronal hipocampal na SIDA é, assim, um dado neuropatológico novo, embora seja justo referir um estudo estereológico prévio efectuado na formação do hipocampo com base na determinação de densidades numéricas, no qual foi encontrada morte neuronal na doença de Huntington mas não na SIDA (370). Curiosamente, já num outro estudo de base imuno-citoquímica e morfométrica no qual se determinaram densidades numéricas apenas de neurónios parvalbumina positivos hipocampais (239), foi registada marcada diminuição dessa população neuronal na região CA3. A manutenção do número de neurónios nas populações celulares que integram o circuito excitatório trissináptico da formação do hipocampo não deixa de ser surpreendente, face à

evidência de atingimento electivo desta região cerebral em indivíduos infectados por VIH observado por técnicas imuno-citoquímicas de detecção de células microgliais positivas para a proteína do invólucro vírico gp41 (316).

Finalmente, é de salientar que a ausência de morte neuronal hipocampal na encefalopatia por VIH abre perspectivas menos sombrias quanto ao evoluir da infecção cerebral, pois permite aduzir que a disfunção cognitiva que os doentes apresentam possa não ser irreversível, facto, aliás, comprovado pelos dados clínicos. Com efeito, de há muito se sabe que a demência associada à SIDA é, em parte, passível de correcção com a terapêutica retrovítica (31, 334) e, mais recentemente, diversos ensaios clínicos com agentes neuroprotectores têm demonstrado a sua eficácia como terapêutica auxiliar (208, 211). Deste último grupo destacam-se os antagonistas dos canais de cálcio, como a nimodipina, que bloqueiam a neurotoxicidade induzida pelas proteínas víricas, os antagonistas das citocinas, os antioxidantes e os bloqueadores dos receptores NMDA, como a memantina (208, 211). Ora, estas possibilidades terapêuticas são muitíssimo relevantes na presente situação e mais serão se, como se espera, a curto prazo se puder vir a dominar a doença e conseguir uma recuperação funcional recorrendo à marcada plasticidade neuronal.

A comparação do quadro de encefalopatia por VIH com outras situações clínicas que comprometem as funções cognitivas, nomeadamente as que foram alvo de estudos estereológicos do córtex, incluindo a formação do hipocampo, foi realizada para avaliar a existência, ou não, de paralelismo no que se refere à quantificação das populações neuronais. Simic e colaboradores (361) encontraram redução significativa do número total de neurónios na camada de células piramidais da região CA1 do hipocampo e no subículo no decurso do envelhecimento, directamente proporcional à idade, enquanto que na demência de Alzheimer, forma de demência cortical, observaram redução significativa de neurónios na fásia denteada e no subículo. Este padrão regional selectivo de perda neuronal, diferente no envelhecimento normal e na doença de Alzheimer, tinha já sido descrito por outros que encontraram diminuição significativa do número total de neurónios na região CA1 do hipocampo nesta afecção (410). Na doença de Huntington, considerada também uma demência subcortical, foi descrita perda selectiva dos grandes neurónios piramidais das camadas III, V e VI do córtex préfrontal, permanecendo em aberto se a morte neuronal é de causa intrínseca ou, pelo contrário, devida a degenerescência retrógrada dos neurónios que se projectam para o núcleo caudado, local da lesão primária (369). Também a nível neocortical há descrições de perda neuronal com padrão regional selectivo na doença de Alzheimer (33, 72, 230, 231), enquanto

outros não a observaram nas camadas II e III do córtex préfrontal (286, 326) ou mesmo a nível cortical global (309). Neste último estudo, no qual foram utilizadas novas técnicas estereológicas, foi encontrada atrofia cortical significativa devido à redução da espessura do manto cortical, mas sem morte neuronal (309). Finalmente, é de realçar que na doença de Alzheimer e no envelhecimento foi ainda descrita atrofia neuronal, na ausência de morte celular, no neocórtex (309, 376). Em resumo, é de referir que, pese embora a existência de alguns relatos de morte neuronal nas demências, muitos outros estudos revelam manutenção das populações neuronais.

Resultados sobreponíveis aos descritos na doença de Alzheimer e no envelhecimento (309, 376) foram encontrados na encefalopatia por VIH, pois embora se não tivesse observado morte neuronal, havia em todas as populações celulares da formação do hipocampo redução significativa dos volumes nucleares e somáticos, à excepção das células do hilo que apenas apresentavam retracção dos corpos celulares. Além disso, a diminuição volumétrica era de maior magnitude nos corpos celulares das células piramidais das regiões CA3 e CA1 do hipocampo do que nos respectivos núcleos. Também era considerável nos núcleos das células granulares da fascia denteada (28%) e de menor grandeza, embora estatisticamente significativa, nos corpos celulares das células hilares (16%). A diminuição volumétrica das células hilares, embora de menor grau é certo, não deixa também de se poder revestir de importância funcional já que estes interneurónios, como atrás se disse, são alvo de aferências extra-hipocampais várias e de colaterais das fibras musgosas, inibindo os dendritos das células granulares e desempenhando assim papel de relevo na modulação hilar da informação (4, 5, 257).

Esta diminuição generalizada do volume das células hipocampais na SIDA, é sugestiva da existência de sofrimento celular e pode ser explicada pela acção de factores tóxicos que, actuando directamente a nível neuronal, induzem alterações nos normais mecanismos metabólicos neuronais, como o demonstram numerosos modelos experimentais (9, 225). Não se pode deixar também de considerar a possibilidade da diminuição volumétrica encontrada ser consequência de redução da síntese de factores neurotróficos (206, 385), numerosos a nível hipocampal (98), resultante de uma diminuição da produção de factores tróficos de origem glial (319, 422). Sabe-se que a formação do hipocampo tem níveis elevados de neurotrofinas, moléculas proteicas indispensáveis à diferenciação e sobrevivência neuronais, das quais se salientam o NGF (*nerve growth factor*), o BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) e as três

neurotrofinas NT3, NT4 e NT5 (206, 385). Mais propriamente, são as células piramidais do hipocampo e as células hilares e granulares da fâscia denteada que manifestam a expressão do ARN mensageiro do NGF, enquanto que a do ARN mensageiro do BDNF é mais evidente nas células piramidais de CA3 e nas células granulares da fâscia denteada (98).

De entre os factores implicados na explicação da patogenia do sofrimento celular na SIDA, destacam-se o gp120, a proteína Tat do VIH, o TNF- α e outras citocinas como a IL-1, certos neurotransmissores como o glutamato e os receptores NMDA, libertados ou estimulados pelo próprio vírus VIH e pelas células microgliais e macrofágicas por ele infectadas, considerados neurotóxicos (82, 100, 209, 259). Apontam-se diversos mecanismos de acção quer a nível neuronal, através da promoção do aumento intracelular de cálcio, quer astrocitário, pelo comprometimento da libertação do factor de crescimento nervoso, razões pelas quais esses factores têm sido apontados como responsáveis pela lesão neuronal na demência associada à SIDA e base de suporte da mesma na ausência de infecção directa neuronal pelo VIH (82, 100, 209, 259). Este mecanismo foi já referido por outros para explicar a lesão das células parvalbumina+ na região CA3 do hipocampo de doentes VIH+ (239). Vale a pena referir que a entrada de cálcio para as células é considerada a via final comum de um grupo variado de afecções neurológicas agudas e crónicas que induzem lesão neuronal, mecanismo inespecificamente designado por excitotoxicidade (103). Neste contexto, é pertinente mencionar os estudos que revelam a possibilidade de os factores de crescimento exercerem também uma acção protectora sobre as populações neuronais da formação do hipocampo. Há estudos *in vitro* que demonstraram que o NGF e o BDNF protegem os neurónios hipocampais dos efeitos excitotóxicos provocados pelo excesso de glutamato (53) ou consequentes a défices de glicose (52), e, estudos *in vivo* que evidenciaram que esses factores de crescimento impedem a morte das células piramidais de CA1 na hipoxia por isquemia cerebral transitória (347). Essa actividade neuroprotectora do NGF e do BDNF foi atribuída à sua capacidade de intervenção na estabilização da homeostasia do cálcio intracelular (52, 53). Outros estudos mostraram ainda que o NGF exógeno aumenta os níveis de enzimas anti-oxidantes e impede a produção de radicais livres (266).

Seja qual for o mecanismo de base, e como corolário, é de supôr que, apesar de não existir perda neuronal, essas alterações celulares venham a comprometer de modo importante os aspectos funcionais da formação do hipocampo.

Não há na literatura estudos dirigidos à determinação dos volumes das células da formação do hipocampo na SIDA. No entanto, em estudos experimentais efectuados com o vírus da imunodeficiência dos símios (SIV), que provoca nos macacos uma doença com características clínicas e neuropatológicas similares às da infecção por VIH no Homem (318, 343), obtiveram-se resultados semelhantes aos agora apresentados, embora não tenham sido determinados volumes neuronais, mas sim indicadores dos mesmos. Com efeito, Luthert e colaboradores (219) encontraram uma diminuição marcada dos diâmetros médios das células piramidais do hipocampo, detectada cerca de 3 meses após a infecção, não acompanhada de morte neuronal significativa.

A nível neocortical há alguns estudos dirigidos à apreciação das alterações de tamanho dos neurónios piramidais na SIDA, cujos resultados são díspares. Everall e colaboradores (101), utilizando material incluído em parafina, que induz um alto coeficiente de retracção tecidular, e o *nucleator*, observaram aumento do volume neuronal médio cortical em doentes com SIDA, assintomáticos ou demenciados, estatisticamente significativo apenas na região occipital. Pelo contrário, Ketzler e colaboradores (179) e Weis e colaboradores (403), em estudos baseados em áreas de perfis neuronais, não encontraram diferenças apreciáveis entre o grupo de controlo e o de SIDA, este último incluindo material obtido em doentes com um leque variado de manifestações neurológicas.

Como se pode verificar, e tal como se referiu atrás, a retracção somática que se observou em todas as populações celulares hipocampais estudadas permite explicar a diminuição significativa de volumes encontrada precisamente nas camadas onde os seus corpos celulares estão situados. Ora, tendo em atenção tais achados, mais imperioso se tornou ainda o estudo das arborizações dendríticas dos neurónios hipocampais. Com efeito, para além das estimativas do volume e do número total de neurónios da formação do hipocampo, a avaliação do grau de envolvimento dendrítico era essencial para aquilatar o estado dos circuitos hipocampais na encefalopatia por VIH, uma vez que os dendritos constituem uma parte muito significativa da superfície receptora neuronal. Secundariamente, obter-se-iam informações que poderiam esclarecer o grau de participação do compartimento dendrítico na redução volumétrica da formação do hipocampo.

Encontraram-se alterações dendríticas em todas as regiões da formação do hipocampo estudadas. Todavia, no que diz respeito à fásia denteada, não se observou qualquer indicação de degenerescência dendrítica nas células granulares, ao contrário do que está descrito na

demência de Alzheimer (76, 114, 115). Com efeito, na demência de Alzheimer foi encontrada uma diminuição do comprimento dendrítico total e do comprimento médio dos segmentos dendríticos das células granulares, mas o número de segmentos dendríticos estava aumentado, o que traduz a existência de uma resposta proliferativa antes das fases terminais da doença (76, 114, 115). Verificou-se que o grupo VIH+ apresentava também um discreto aumento do número de segmentos dendríticos das células granulares face aos controlos, da ordem dos 9%, sendo pertinente levantar a questão se, porventura, a inclusão de mais casos poderia tornar este achado significativo e tradutor de um processo de reorganização, à semelhança do que se referiu. Acresce ainda que, também na SIDA, se observaram outros dados a favor de uma provável reorganização, como por exemplo um discreto aumento do número de segmentos terminais de ordem centrífuga “média”, isto é, aqueles que presumivelmente constituem o maior contingente de segmentos terminais, já que os segmentos dendríticos que terminam em ordens mais elevadas são em menor número e apresentam maior variabilidade (145), a par de ligeiro aumento de densidade dendrítica nas regiões mais proximais.

Já nas células em cesto do hilo, havia marcado empobrecimento das árvores dendríticas nos casos VIH+, à custa da redução do comprimento dendrítico total e do número de segmentos dendríticos. Por sua vez, os segmentos terminais eram mais compridos e havia redução da densidade de ramificação nas regiões mais proximais. Estas alterações são relevantes visto que as células em cesto são um dos inúmeros interneurónios hilares descritos por Amaral (2) e identificados pela sua morfologia e localização própria a este nível. São neurónios GABAérgicos, tal como aliás acontece com 60% dos neurónios hilares (339, 366, 420), e estão localizados perto da camada de células granulares, estabelecendo contactos inibitórios sobre os corpos celulares e os troncos dendríticos das células dessa camada. Curiosamente, estes interneurónios são inervados por terminais GABAérgicos e por fibras de associação glutamatérgicas, pelo que desempenham um papel importante na dispersão e modulação da informação (5). Também nas células hilares é de realçar a possibilidade de se desenhar um processo de reorganização, valorizando o aumento do comprimento médio dos segmentos terminais do grupo VIH+, próximo do nível de significância. Além disso, as alterações métricas atrás referidas fizeram-se sentir muito mais nos segmentos terminais que nos intermédios, segmentos onde as alterações degenerativas dendríticas e os fenómenos reorganizativos têm lugar privilegiado (145, 158).

Mas, foi nas células piramidais da região CA3 do hipocampo que mais profundas alterações dendríticas se observaram. Com efeito, as arborizações basais, para onde projectam

fibras de associação, mostravam marcada diminuição do comprimento dendrítico total e médio dos segmentos terminais ainda que com manutenção da densidade de ramificação. Mais ainda, nas arborizações apicais desses neurónios detectou-se uma redução do número total de segmentos e do número de segmentos terminais de ordem centrífuga “média”, diminuição da extensão dendrítica total principalmente à custa da redução do comprimento total dos segmentos terminais, e diminuição da densidade de ramificação dendrítica. À semelhança do que acontecia com as células em cesto do hilo, observou-se que o comprimento médio dos segmentos terminais das arborizações apicais de CA3 era 17% maior no grupo VIH+, variação que se verificou estar próxima do nível de significância e que poderá dever-se a mecanismos compensatórios consequentes às alterações degenerativas dendríticas descritas. Estas alterações indicam um atingimento preferencial da região CA3 do hipocampo na SIDA, que se faz sobretudo sentir nas porções distais e médias das árvores apicais, alvo das aferências provenientes do córtex entorrinal e de fibras septais e comissurais.

As alterações observadas são tanto mais importantes quanto se sabe que a região CA3 ocupa proporcionalmente na espécie humana, quando comparada com a dos roedores, uma maior extensão em relação às outras regiões da formação do hipocampo (203). Lim e colaboradores (203) entendem ser admissível que o referido aumento da região CA3 no Homem possa desempenhar um papel importante no circuito excitatório trissináptico, permitindo à formação do hipocampo assumir, como já se disse, um papel mais influente na consolidação da memória, o que é corroborado pelas descrições de doentes que sofreram lesões selectivas de CA3 e CA1 e apresentam amnésia (70, 162, 313, 410, 425). No entanto, estes resultados estão em total desacordo com o descrito na demência de Alzheimer, onde a região CA3 está electivamente poupada havendo manutenção da organização dendrítica das células piramidais (114, 116). O facto de o atingimento dendrítico ser mais marcado nas arborizações apicais do que nas basais, e até obedecer a determinados padrões topográficos, sugere que, para além de regressão intrínseca das células piramidais de CA3, possa haver um grau de deaferenciação mais marcado destas células a nível apical, à semelhança do descrito no subículo na demência de Alzheimer (112).

Já em CA1 as alterações dendríticas eram bem mais escassas do que em CA3, pois apenas se observou redução do comprimento médio dos segmentos terminais das arborizações apicais, que recebem colaterais das fibras perforantes oriundas do córtex entorrinal. Estes resultados diferem dos descritos na demência de Alzheimer, situação em que existem marcadas

alterações degenerativas dendríticas nas arborizações basais e apicais das pirâmides de CA1 (114, 145).

Quanto à existência de reorganização dendrítica pode dizer-se que se vislumbraram alguns sinais da sua existência, conforme se referiu pontualmente para as células granulares, hilares e piramidais de CA3, embora qualquer um desses achados carecesse de significado estatístico. Por tal motivo, não é prudente afirmar categoricamente que existem mecanismos compensatórios de crescimento dendrítico na encefalopatia por VIH. Tal facto pode dever-se à inexistência de morte neuronal nas populações estudadas. Com efeito, no cérebro adulto a reestruturação dendrítica ocorre preferencialmente como resposta compensatória à morte neuronal e não se vislumbra de forma marcada em regiões cerebrais que têm uma população neuronal numericamente inalterada (60). Acredita-se que a morte neuronal possa deixar sem alvo os aferentes que nelas terminam e, por outro lado, induzir gliose com consequente aumento da expressão glial de factores neurotróficos, como o factor de crescimento nervoso (145). Acresce também a possibilidade de reorganização, embora em menor grau, quando há degenerescência das arborizações dendríticas, por mecanismos em tudo idênticos aos anteriormente referidos. Ora, tendo em conta as alterações dendríticas que se observaram na SIDA, não é descabido pensar que possam ocorrer também, de forma ténue é certo, fenómenos de reorganização. Mais ainda, tem sido também apontada a possibilidade de as árvores dendríticas se reorganizarem com manutenção do seu comprimento dendrítico (145), o que foi sugerido por Purves e Hadley (301) ao demonstrarem a capacidade de diferentes neuritos do mesmo neurónio adulto evidenciarem crescimento e degenerescência, simultaneamente.

Na literatura há descrições de alterações dendríticas neocorticais na SIDA (177, 238-240, 416), cujas características se assemelham às observadas noutras infecções víricas do SNC como a doença de Creutzfeldt-Jakob (188), o Kuru (181) e o Scrapie (156). Tais observações levaram Masliah e colaboradores (240) a considerar a existência de patologia primária dos dendritos na SIDA, em contraste com outras doenças neurodegenerativas, nas quais a lesão primária é pré-sináptica (237). Esses autores (240) sugerem ainda que a lesão dendrítica primária na SIDA se deva a efeitos neurotóxicos de factores víricos e microgliais, conforme atrás se referiu, susceptíveis de induzir alterações funcionais inicialmente reversíveis, com ocorrência, mais tardia, de morte neuronal. Esta hipótese é corroborada por estudos experimentais efectuados em cérebros de ratos infectados por gp120 (150), que descreveram alterações distróficas dos dendritos, as quais podiam ser prevenidas por tratamento com

peptídeo T, inibidor das citocinas derivado do gp120 e semelhante ao *vasoactive intestinal peptide*, VIP, que bloquearia o TNF- α . Um padrão semelhante de distrofia neurítica foi observada também em culturas de células ganglionares da retina e de neurónios hipocampais do Rato submetidas a concentrações subletais de NMDA ou de glutamato (209). Todas estas situações patológicas são dependentes do influxo de cálcio para os neurónios e mediadas pela activação dos receptores NMDA, mecanismos que, como se disse, se admitem estar na base da neurotoxicidade do VIH. Mais ainda, crê-se que o gp120 actue sinergisticamente com os aminoácidos excitatórios que actuam nos receptores NMDA, como o glutamato, podendo ainda sensibilizar directa ou indirectamente os neurónios aos seus efeitos letais. Além disso, foram detectadas concentrações elevadas de ácido quinolínico, um agonista dos receptores NMDA, no LCR de doentes com SIDA (148, 149).

As observações de degenerescência dendrítica nas situações acima referidas levaram Lipton (209) a considerar ser pertinente incluir, nos parâmetros utilizados para apreciar a lesão neuronal relacionada com a gp120 e a excitotoxicidade, a pesquisa de alterações mais subtis que a morte celular, uma vez que as alterações citoarquitónicas neuronais acarretam importantes consequências funcionais. As alterações dendríticas que agora se descreveram a nível da formação do hipocampo na SIDA podem assim adicionar-se às que foram observadas no neocórtex de doentes seropositivos (177, 238-240, 416).

Nos casos VIH+ encontrou-se ainda perda de espinhas dendríticas nalgumas populações neuronais, curiosamente mais marcada nas que mantinham a organização geral e a extensão das suas árvores dendríticas preservadas. Com efeito, havia marcada redução da densidade das espinhas dendríticas nos segmentos distais e proximais das células granulares da fascia denteada, o que é um achado da maior importância dado que é sobre as espinhas dendríticas destas células que as aferências entorrinais, comissurais e septais estabelecem cerca de 85% das suas sinapses (4, 79). Pelo contrário, nos interneurónios hilares e nas células piramidais de CA3, onde a degenerescência dendrítica era mais acentuada, não se encontrou perda significativa do número de espinhas, embora nas arborizações basais de CA3 os resultados sugiram a existência de redução da sua densidade. Havia ainda perda significativa de espinhas dendríticas nos segmentos terminais das arborizações basais de CA1, onde fazem sinapse fibras comissurais e septais (5).

A perda de espinhas dendríticas e alterações dendríticas na SIDA foram descritas no córtex frontal por Masliah e colaboradores (238, 240) e correlacionadas com a presença

abundante de gp41 no neocórtex e na substância branca dos hemisférios, o que sugere que a presença do VIH possa ser responsável, directa ou indirectamente, por essas alterações (238). Em estudos experimentais efectuados em macacos infectados com SIV, foi também encontrada perda de espinhas dendríticas corticais (256) que Luthert e colaboradores (219) relacionaram com a retracção somática neuronal.

Ora, a perda de espinhas dendríticas tem seguramente repercussões funcionais e estruturais marcadas, não fossem as espinhas o componente pós-sináptico mais exuberante no contexto da superfície receptora. Para além disso, há evidência que as espinhas dendríticas possam constituir um sistema de armazenamento da memória remota e também se admite que possam desempenhar um papel neuroprotector ao isolar as células das consequências deletérias da entrada de cálcio quando este se liberta por pulsos durante a actividade sináptica (337). Não admira pois que tenha sido encontrada perda de espinhas em várias afecções que se caracterizam funcionalmente por declínio cognitivo progressivo, por exemplo nos neurónios piramidais do hipocampo na demência de Alzheimer e no Síndrome de Down (76, 109, 298, 381), e a nível neocortical na demência de Pick (44).

Como anteriormente se mencionou, não há na literatura estudos sobre as arborizações dendríticas hipocampais na encefalopatia por VIH. Noutras situações em que há perturbação cognitiva, como na doença de Alzheimer e no envelhecimento, salientam-se os estudos, já referidos (76, 112, 114-116, 145), que tão bem ilustram o compromisso dos circuitos hipocampais, envolvidos na aprendizagem e na memória, subjacente ao quadro demencial. Há, pois, evidência suficiente para admitir que os mecanismos citoarquitectónicos hipocampais que estão na base do processo demencial na SIDA possam ser diferentes dos que ocorrem na doença de Alzheimer. Por outras palavras, enquanto que na doença de Alzheimer existe degenerescência dendrítica marcada nas células granulares (76, 114, 115) e nas células piramidais da região CA1 (114, 145), na SIDA as alterações dendríticas mais marcadas foram encontradas nas células hilares e nas células piramidais da região CA3. Pelo contrário, na doença de Alzheimer, a região CA3 está electivamente poupada (114, 116) e há sinais inequívocos de resposta proliferativa nas células granulares, antes das fases terminais da doença (76, 114, 115).

Conforme se expôs de modo exaustivo, na formação do hipocampo de doentes com SIDA são de realçar as alterações a nível dos corpos celulares e, de modo mais evidente ainda, a nível dos neuritos, como o atestam os estudos Golgi e a análise do volume das diferentes subdivisões. Estes achados demonstram, de modo inequívoco, ser a substância branca um dos

principais alvos na encefalopatia por VIH e estão, aliás, de acordo com o facto de a substância branca dos hemisférios ser uma das localizações predominantes das lesões cerebrais provocadas pelo VIH (94).

Percebe-se sem dificuldade que as alterações degenerativas do cérebro em geral, ou da formação do hipocampo em particular, se possam repercutir rapidamente no LCR, não só por razões topográficas mas também porque é comumente aceite, como se expôs anteriormente, poder o parênquima cerebral induzir alterações na composição do LCR.

Atendendo a essas razões, bem como ao facto de o VIH ser simultaneamente linfotrópico e neurotrópico, lançou-se mão de uma série de estudos de LCR efectuados em doentes infectados por VIH, em diferentes estadios da doença, de forma a analisar o comportamento imunitário do SNC nesta infecção. Com efeito, é lícito pensar-se que possa existir reciprocidade entre as alterações verificadas na formação do hipocampo e as encontradas no LCR, pois, se por um lado se pode inferir que os neurónios hipocampais sofrem precocemente os efeitos neurotóxicos da infecção vírica, atendendo às suas relações íntimas e extensas com os ventrículos, por outro, é também óbvio que a infecção e consequentes alterações do parênquima cerebral se reflectem no LCR também precocemente.

A primeira ilacção que se pôde obter foi o facto de o LCR apresentar alterações celulares e/ou humorais em 92% dos casos, incluindo todos aqueles que se encontravam nos estadios I e II (casos nº 8, 12, 29, 59, 60). Estes achados estão de acordo com os trabalhos pioneiros nesta área que descreveram o atingimento do LCR em seropositivos assintomáticos (90, 136, 217, 234, 235, 246) e alertaram para o envolvimento precoce do SNC na infecção por VIH (246, 315). Com efeito, apenas em 5 casos dos 3 grupos de doentes VIH+ estudados neste trabalho o LCR era inteiramente normal, o que correspondia a um valor percentual de 8%, semelhante ao encontrado por Spina-França e colaboradores (212, 371). Logo, pode afirmar-se com toda a clareza que a existência de alterações do LCR na infecção por VIH, mesmo em estadios precoces, é a regra e não a excepção.

As alterações dos parâmetros cito-proteicos encontradas, como a ligeira pleocitose, o predomínio linfoplasmocitário, a elevação moderada das proteínas totais, a existência de bandas oligoclonais da globulina γ e a síntese intratecal de imunoglobulinas, enquadram-se nos registos existentes na literatura, nomeadamente com os dados obtidos em séries extensas de

doentes VIH+, que abrangem, tal como esta, desde doentes seropositivos assintomáticos até aos que apresentam infecções oportunistas do SNC (36, 37, 66, 80, 110, 136, 195, 212, 217, 220, 246, 248, 295, 307, 371). Mais ainda, a duração da doença não parece influenciar a resposta neuroimunitária, o que também está de acordo com outros estudos (246), embora a ocorrência de alterações citomorfológicas fosse significativamente mais elevada nos casos de menor duração da infecção. Este último achado pode ser explicado pelo facto de se tratarem de fases mais agudas quando é despertada a reacção celular, pré-humoral, isto é, o primeiro braço effector do sistema imune (108, 217, 317).

No que diz respeito à imunidade celular, é de realçar a existência, na grande maioria dos casos, de alterações citomorfológicas, sobretudo nos doentes que apresentavam sintomas neurológicos. Havia ainda concordância entre o predomínio de linfócitos reactivos e plasmócitos aí observados e o discreto aumento das subpopulações B existente no LCR (fenótipos linfocitários CD19 e CD20). Em alguns casos observavam-se também eosinófilos, achado não referido na literatura, denotando uma reacção de hipersensibilidade sustentada de carácter alérgico na base do processo imunitário em curso (320). Neste contexto, não deixa de merecer alguma reflexão o facto de os eosinófilos poderem ter efeitos neurotóxicos (85) e serem deletérios para o hospedeiro em caso de reacção de hipersensibilidade crónica (38, 418). Finalmente, quando se analisaram as subpopulações leucocitárias, verificou-se que a inversão da razão CD4/CD8 encontrada no LCR em 3 casos reflectia o que se passava no sangue periférico, tal como habitualmente referido (232, 247), enquanto que num outro doente com demência da SIDA tal inversão apenas existia no LCR. Este último achado está de acordo com os dados obtidos por Elovaara e Muller (88) num estudo efectuado em doentes infectados por VIH-1, embora em estadios anteriores, que os levou a sugerir que a resposta linfocitária possa ocorrer mais cedo no SNC que à periferia. Daqui decorre a possibilidade de nem sempre haver repercussão directa entre os acontecimentos imunológicos que se verificam a nível do SNC e do sistema imunitário periférico (88).

Quanto às alterações da resposta imunitária humoral, mais frequentes até que as celulares, é de realçar a presença de bandas oligoclonais da globulina γ , com aumento considerável do seu teor e aumento da concentração das imunoglobulinas IgG e IgA. Confirmou-se, assim, a hipótese já esperada tendo em conta a resposta celular, da existência de

síntese intratecal de imunoglobulinas em grande número de seropositivos independentemente do tipo de envolvimento neurológico, facto aliás amplamente divulgado na literatura (37, 136, 213, 246). Encontrou-se também disfunção da BHE na maior parte dos casos, com índices de albumina LCR/soro de maior grandeza nos doentes com envolvimento neurológico, tal como já acontecera quanto ao teor das proteínas totais. Estes achados estão de acordo com os dados da literatura (364), sobretudo com McArthur e colaboradores (248) que encontraram aumento significativamente maior do índice de albumina e do valor das proteínas totais no LCR em doentes com ADC relativamente a doentes seropositivos não demenciados, conquanto outros parâmetros, como a presença do antigénio p24, fossem semelhantes.

Poderia então, com alguma pertinência, pensar-se que o aumento dos valores absolutos da globulina γ no LCR e das concentrações das imunoglobulinas se deveria à disfunção da BHE. Todavia, o padrão oligoclonal da globulina γ registado em vários casos e a apreciação do significado da elevação da IgG e da IgA mediante indicadores fiáveis (Índice IgG e método de Reiber), permitem afirmar a ocorrência de síntese intratecal de anticorpos na infecção por VIH. Com efeito, as bandas oligoclonais da globulina γ , quando aparecem exclusivamente no LCR, reflectem a síntese de imunoglobulinas dentro do neuroeixo (131) e, logo, a presença de processos patológicos de carácter imune no sistema nervoso (110). Refira-se, a propósito, que cada banda é sintetizada por um único clone de células plasmocitárias e dirigida contra um antigénio específico, pelo que a sua presença indica existência de activação plasmocitária intratecal (364). O aparecimento de bandas oligoclonais foi descrito em diversas doenças infecciosas crónicas (390) de que se destacam a neurosífilis (400), a panencefalite esclerosante subaguda (358) e a SIDA (136, 217), tendo sido correlacionadas, nas doenças víricas, com a persistência do vírus no cérebro (183).

Todavia, é nas doenças inflamatórias e desmielinizantes de base autoimune, como a esclerose múltipla, doença por excelência da substância branca e sem antigénio específico conhecido (110, 386), que a sua presença é mais característica e frequente (104, 110), podendo atingir quase 100% dos casos (387) e a sua manutenção relativamente constante (401). Não é, pois, descabido sugerir que na encefalopatia por VIH, no curso evolutivo da qual também ocorrem alterações autoimunes como o atestam certos dados clínicos e neuropatológicos já extensamente referidos, as bandas oligoclonais possam ser também em parte dirigidas contra auto-antígenos e correlacionar-se com as alterações da substância branca encontradas no presente trabalho. Aliás, esta observação é corroborada pelos dados de

Grimaldi e colaboradores (136) obtidos em doentes seropositivos assintomáticos que lhes permitiram demonstrar que grande parte das bandas oligoclonais no LCR não são dirigidas contra o gp120 ou o antigénio p24 do VIH, mas sim representam anticorpos inespecíficos sintetizados por disfunção imunitária.

Quanto à síntese intratecal de IgG, e uma vez que não se procedeu ao doseamento da IgG específica anti-VIH, é lícito pensar-se que outros agentes infecciosos, que não o VIH, possam ter despertado produção de anticorpos específicos, por exemplo nos casos que apresentavam infecções oportunistas, como neurosífilis (398) ou toxoplasmose (220). No entanto, é de crer que nos grupos A e B1 tal não se verificou, pois o estudo analítico exaustivo de rotina levado a cabo nestes doentes não demonstrou a presença de outros agentes. Encontrou-se também aumento da síntese intratecal de IgA em alguns casos, incluindo doentes assintomáticos, cujo significado permanece ainda desconhecido na SIDA (307), afecção na qual foi também descrita a presença de IgA em imunocomplexos (165, 201). Com efeito, esse achado foi considerado inicialmente como um indicador de activação policlonal das células B (189) e, mais tarde, da existência de infecções oportunistas no SNC (312, 317).

Outro testemunho da resposta humoral na SIDA foi a activação do factor C4 do complemento, fundamentalmente a nível do sangue periférico, pese embora o pequeno número de casos estudado. A síntese de C4 pelos macrófagos foi demonstrada por Bentley e colaboradores (14), pelo que a sua elevação na SIDA pode ser explicada pela intensa activação dessas células. Embora este achado seja raro e de significado desconhecido na SIDA, poderia ter como finalidade promover a neutralização vírica (303). Todavia, a activação do complemento pode também acarretar efeitos deletérios no hospedeiro, ao causar lesões tecidulares graves pela activação de autoanticorpos e deposição de imunocomplexos (392).

Ora, decorre da apreciação geral destas alterações neuroimunitárias o seu carácter inespecífico, com aparecimento de quadros similares do LCR noutras infecções lentas por vírus do SNC, de que se destaca a panencefalite esclerosante subaguda (358). Curiosamente, foi encontrada nesta afecção marcada degenerescência dendrítica no córtex préfrontal (283, 284) e evidência de fusão de membranas celulares entre células infectadas (280), mas inexistência de morte neuronal (321). Já na doença de Creutzfeldt-Jakob, antigamente atribuída a “agente não convencional” e agora à existência de príões (299), não estão descritas alterações inflamatórias nem nunca se isolaram príões no LCR.

Por último, merecem destaque especial outro tipo de alterações da composição proteica encontradas no LCR dos doentes com SIDA, que têm sido relacionadas, não com disfunção imunitária mas sim com processos degenerativos centrais, nomeadamente da substância branca, já anteriormente mencionados. Com efeito, no grupo VIH+ havia elevação da globulina β_2 , também designada por tau (τ), a par de descida da concentração da outra fracção da globulina β . No entanto, outras alterações associadas ao denominado “perfil degenerativo”, como a elevação da pré-albumina e a diminuição relativa da globulina γ , que o permitem considerar o reflexo da persistência das características do LCR ventricular a nível lombar (190, 354), não eram aparentes na SIDA. Tal facto não é de estranhar, tendo em conta não só a ausência de marcada degenerescência mas também a possibilidade de existir, pelo menos parcialmente, um efeito de “sobreposição” provocado pela resposta neuroimunitária ao agente infeccioso. A título de exemplo, quanto a este último aspecto, refira-se que a disfunção da BHE acarreta diminuição da pré-albumina e que a estimulação da produção de anticorpos no espaço subaracnoideu induz elevação da globulina γ .

Essas alterações na concentração das globulinas β traduzem, como se disse, aumento da actividade neuraminidásica cerebral e, logo, aumento da degradação da transferrina, isto é, reflectem alterações tecidulares do SNC (190, 333, 335). Conquanto não haja uma correlação específica entre o aumento da proteína τ e doenças neurológicas de base degenerativa (110), é de realçar que essa alteração, a par das outras que caracterizam o perfil degenerativo, foi descrita na hidrocefalia infantil (354) e noutras doenças degenerativas. Neste último grupo, verificou-se que a frequência das referidas alterações no LCR era significativamente maior nas situações em que havia maior atingimento da substância branca, como as ataxias hereditárias, do que nas doenças do neurónio motor, na doença de Parkinson e nas demências (resultados não publicados do Laboratório do Serviço de Neurologia e Neurocirurgia). Quanto às demências, merece especial referência, por razões já apontadas, a doença de Alzheimer, em que, caracteristicamente, o LCR é normal ou mostra apenas ligeira elevação do teor de proteínas totais (110), isto é, não apresenta síntese intratecal de IgG nem bandas oligoclonais (90), mas sim foi descrita elevação intratecal dos níveis da proteína Tau, elemento constituinte das tranças neurofibrilares, que se considera um marcador bioquímico da doença (172).

Em resumo, no que se refere às alterações degenerativas do LCR encontradas na SIDA, relacionáveis com o enriquecimento de proteínas a nível ventricular, crê-se haver boas razões para estabelecer a sua relação com a atrofia da substância branca observada.

CONCLUSÕES

1. Na encefalopatia por VIH encontraram-se marcadas alterações citoarquitectónicas na formação do hipocampo. Destacam-se a atrofia neuronal e a degenerescência dendrítica, não acompanhadas de morte neuronal. As alterações regressivas contribuem para explicar as alterações demenciais da encefalopatia por VIH, uma vez que qualquer uma delas induz alterações funcionais a nível dos circuitos neuronais da formação do hipocampo. Assim,
2. Tendo como base a estrutura do circuito trissináptico da formação do hipocampo, é de salientar:
 - a) As alterações morfológicas na sua origem, ao nível da fásia denteada, onde há redução do número de espinhas dendríticas das células granulares e consequente redução da superfície receptora neuronal, o que condiciona a informação veiculada do córtex entorrinal. Em segundo lugar, a neuromodulação das eferências granulares, feita através de interneurónios hilares, encontra-se também afectada, dadas as alterações observadas nestas células.
 - b) Ao nível do hipocampo, no segundo elo do circuito, são relevantes as alterações das pirâmides de CA3, ou seja, dos neurónios que são alvo das fibras perforantes, das fibras de associação intrínsecas e comissurais e, muito particularmente, das fibras musgosas. Por último, a degenerescência dendrítica em CA1 acarreta disfunção ao nível do terceiro elo do circuito, ou seja, ao nível da sua principal zona de projecção extra-hipocampal.É assim de crer que o processamento da informação a nível do circuito trissináptico e da transmissão da informação processada a outras áreas do cérebro através de numerosas vias eferentes nomeadamente a subicular/entorrinal e a fimbria/fornix estejam seriamente afectados e contribuam para alterar os mecanismos básicos da aprendizagem e da memória. Também,
3. Se encontraram, no estudo bioquímico do LCR, sinais de atrofia da substância branca, achado que de algum modo se correlaciona com a observação do atingimento preferencial de componentes do neurópilo e realça a hipótese dos síndromes demenciais serem basicamente do tipo subcortical. Mais ainda,

4. Detectaram-se indicadores de activação imunitária, celulares e humorais, no LCR, que apontam para o envolvimento constante e persistente do sistema nervoso em doentes infectados por VIH-1 ou por VIH-2, mesmo assintomáticos. Quando se procurou correlacionar as alterações do LCR com a clínica, concluiu-se que a pleocitose e a disfunção da BHE eram mais frequentes em doentes com sintomatologia neurológica, enquanto a presença de bandas oligoclonais da globulina γ , a síntese intratecal de imunoglobulinas e a activação do complemento, foram observadas independentemente da existência de envolvimento neurológico. Por último,

5. Não havendo morte neuronal, e uma vez que as alterações das árvores dendríticas e a atrofia dos neurónios hipocampais são lesões potencialmente reversíveis, é legítimo especular que possam ocorrer fenómenos de reorganização estrutural, o que pode vir a ser um processo determinante no evoluir clínico destes doentes.

RESUMO E CONCLUSÕES

SUMMARY AND CONCLUSIONS

O Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), acompanha-se, na maioria dos casos, por complicações do foro neurológico, quer devidas à acção directa, neurotóxica, do vírus da imunodeficiência humana (VIH), quer secundárias a neoplasias e infecções por agentes oportunistas. Das primeiras, a mais frequente é o complexo cognitivo/motor associado à SIDA, que se correlacionou com o aparecimento de atrofia cerebral, embora permaneçam controversos o tipo e a extensão de sofrimento neuronal. Estudos recentes, quantitativos, mostraram perda apreciável de neurónios corticais, enquanto outros, usando técnicas de quantificação tradicionais, não encontraram morte celular na formação do hipocampo (FH). Dada a frequência de aparecimento de sintomas cognitivos nos doentes seropositivos entendeu-se relevante estudar a FH, região do cérebro que desempenha papel importante no processamento das informações cognitivas, nomeadamente a aprendizagem e a memória. Para apreciar o comportamento imunológico do sistema nervoso, órgão considerado santuário do sistema imune e possível reservatório de vírus, estudou-se concomitantemente o líquido céfalo-raquidano (LCR) de doentes VIH+. O estudo morfométrico da FH efectuou-se em material necrótico proveniente de 2 grupos de adultos do sexo masculino: 10 infectados por VIH-1 e 10 indivíduos com média etária semelhante, cujo material se usou como controlo. Utilizaram-se métodos estereológicos *unbiased*, nomeadamente o *disector* óptico e o *fractionator*, para determinar os números totais de neurónios das principais subdivisões da FH: camada de células granulares e hilo da fâscia denteada e camada de células piramidais das regiões CA3 e CA1 do hipocampo. Através do princípio de Cavalieri determinaram-se os volumes de cada subdivisão, que incluiu também as camadas não celulares. Recorrendo ao *nucleator*, determinaram-se os volumes nuclear e somático médios das mesmas populações neuronais. Para aprofundar a caracterização citoarquitectónica da FH, foram estudadas, qualitativa e quantitativamente, as arborizações dendríticas neuronais pelo método de Golgi. Complementou-se a análise da FH com técnicas imuno-histoquímicas para melhor avaliação da degenerescência neuronal (ubiquitina) e gliose (GFAP). Encontrou-se uma significativa diminuição de volume de todas as subdivisões da FH nos doentes com SIDA, mas sem morte neuronal concomitante. No entanto, os volumes nuclear e somático médios neuronais eram sempre menores nesse grupo. Além disso, observaram-se importantes alterações dendríticas na SIDA em todas as arborizações estudadas, mas mais notórias nas células hilares em cesto e nas pirâmides de CA3, e redução do número de espinhas dendríticas nas células granulares e nas arborizações basais das pirâmides de CA3 e CA1. O estudo imuno-histoquímico mostrou idênticos padrões de marcação para a ubiquitina e para a GFAP. A análise do LCR revelou alterações celulares e humorais, independentemente da existência de envolvimento neurológico clínico, tradutoras de activação imunitária intratecal, bem como sinais de atrofia da substância branca. As marcadas alterações citoarquitectónicas da FH que se encontraram na encefalopatia por VIH contribuem para explicar as alterações demenciais, uma vez que, qualquer uma delas, seguramente acarreta uma disfunção dos circuitos neuronais. Mais propriamente, observaram-se alterações em todos os elos do circuito trissináptico da FH, o que permite aduzir que o processamento da informação a esse nível, esteja seriamente afectado, comprometendo os mecanismos básicos da aprendizagem e da memória. Não havendo morte neuronal, e uma vez que as lesões encontradas são potencialmente reversíveis, há possibilidade de ocorrer reorganização estrutural, factor relevante especialmente se continuarem a surgir avanços na terapêutica retrovírica.

The Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) presents, in most of the cases, neurological complications due either to the direct neurotoxic effect of the human immunodeficiency virus (HIV) or secondary to neoplasms and opportunistic infections. Among the former, the most frequent is the AIDS-associated cognitive/motor complex, which has been correlated to the appearance of cerebral atrophy, although the type and extent of neuronal suffering remain a controversial issue. Recent quantitative studies have shown a remarkable loss of neocortical neurons, while others, using traditional quantification techniques, have not found cell death in the hippocampal formation (HF). Taking into account the frequency of cognitive symptoms in AIDS-patients we decided to study the HF in this condition, as this region plays an important role in the processing of the cognitive information, namely in learning and memory. To evaluate the immunological behavior of the central nervous system, which is considered a sanctuary organ of the immune system and a possible virus reservoir, the cerebrospinal fluid (CSF) of seropositive patients was also studied. The morphometric study of the HF was performed in necropsic material from 2 groups of male adults: 10 infected by HIV-1 and 10 age-matched individuals, whose material was used as control. Unbiased stereological methods, namely the optical disector and the fractionator, were used to estimate the total number of neurons from the major HF subdivisions: granule cell layer and hilus of the dentate fascia and pyramidal cell layers of CA3 and CA1 regions of the hippocampus. The volumes of each subdivision, including the non-cellular layers, were calculated by applying the Cavalieri's principle. The mean neuronal nuclear and somatic volumes from the same neuronal populations were measured by the nucleator. Besides, in order to appreciate the HF cytoarchitectonical characteristics, the neuronal dendritic arborizations of those cells were qualitative and quantitatively studied using the Golgi method. This study was extended at the immunohistochemical level to better evaluate the neuronal degenerations (ubiquitine) and the gliosis (GFAP). We found a significant volumetric reduction in all HF subdivisions in AIDS-patients, but without cell death. Nevertheless, the neuronal mean nuclear and somatic volumes were always lower in that group. Besides, important dendritic changes were observed in AIDS in all arborizations studied; these changes were more apparent in hilar basket cells and in CA3 pyramids. A reduction of the dendritic spine density in the granule cells and in the basal arborizations of the CA3 and CA1 pyramids was found. The immunohistochemical study did not reveal any changes between AIDS patients and controls. The CSF analysis showed cellular and humoral abnormalities, irrespective of the clinical appearance of neurological involvement, traducing intrathecal immune activation, as well as signs of white matter atrophy. The marked HF cytoarchitectonical changes found in HIV encephalopathy contribute to explain the demential features, as each of them, surely leads to dysfunction of HF neuronal circuitry. In fact, changes in all loops of the HF trisynaptic circuit were observed, which allow us to conclude that the information processing might be seriously affected compromising the basic mechanisms of learning and memory. Taking into account the maintenance of neuron numbers and the fact that the lesions found are potentially reversible, the occurrence of structural reorganization is thus possible, which deserves to be stressed due to the advances in retroviral therapeutics.

BIBLIOGRAFIA

1. Alvarez-Royo, P., Clower, R.P., Zola-Morgan, S., Squire, L.R. (1991) Stereotaxic lesions of the hippocampus in monkeys: determination of surgical coordinates and analysis of lesions using magnetic resonance imaging. *J. Neurosci. Methods*, 38:223-232.
2. Amaral, D.G. (1978) A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 182:851-914.
3. Amaral, D.G., Dent, J.A. (1981) Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J. Comp. Neurol.*, 195:51-86.
4. Amaral, D.G., Witter, M.P. (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31:571-591.
5. Amaral, D.G., Witter, M.P. (1995) Hippocampal formation. Em: *The Rat Nervous System*. Editor: Paxinos, G. Academic Press. P.443-493.
6. American Academy of Neurology (1991) Nomenclature and research case definitions for neurologic manifestations of human immunodeficiency virus-type 1 (HIV-1) infection: report of a working group of the American Academy of Neurology AIDS Task Force. *Neurology*, 41:778-785.
7. Andersen, P., Holmqvist, B., Voorhoeve, P.E. (1966) Entorhinal activation of dentate granule cells. *Acta Physiol. Scand.*, 66:448-460.
8. Andersen, P., Bliss, V.P., Skrede, K.K. (1971) Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Exp. Brain Res.*, 13:222-238.
9. Andrade, J.P., Madeira, M.D., Paula-Barbosa, M.M. (1995) Effects of long-term malnutrition and rehabilitation on the hippocampal formation of the adult rat. A morphometric study. *J. Anat.*, 187:379-393.
10. Andrade, J.P., Castanheira-Vale, A.J., Paz-Dias, P.G., Madeira, M.D., Paula-Barbosa, M.M. (1996) The dendritic trees of the neurons from the hippocampal formation of protein-deprived adult rats. A quantitative Golgi study. *Exp. Brain Res.*, 109:419-433.
11. Bagasra, O., Lavi, E., Bobroski, L., Khalili, K., Pestaner, J.P., Tawadros, R., Pomerantz, R.J. (1996) Cellular reservoirs of HIV in the central nervous system of infected individuals: identification by the combination of *in situ* polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *AIDS*, 10:573:585.
12. Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blis, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rosenbaun, W., Montagnier, L. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk of acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220:868-871.
13. Bendok, B., Berger, J.R., Levy, R.M. (1997) Acquired immunodeficiency syndrome and the nervous system; fifteen years of progress: an overview to the second edition of *AIDS and the Nervous System*. Em: *AIDS and the Nervous System* (2^a Ed.). Editores: Berger, J.R., Levy, R.M. Philadelphia, Lippincot-Raven. P.1-11.
14. Bentley, C., Zimmer, B., Hadding, U. (1981) The macrophage as a source of complement components. Em: *Lymphokynes*, Vol.4. New York, Academic Press. P.197-230.
15. Berger, J.R. (1991) Neurosyphilis in human immunodeficiency virus type 1-seropositive individuals. A prospective study. *Arch. Neurol.*, 48:700-702.
16. Berger, J.R., Resnick, L. (1987) HTLV-III/LAV-related neurological disease. Em: *AIDS: Modern Concepts and Therapeutic Challenges*. Editor: Broder S. New York, Marcel Dekker. P.263-283.

17. Berger, J.R., Moskowitz, L., Fischl, M., Kelley, R.E. (1984) The neurologic complications of AIDS; frequently the initial manifestation. *Neurology*, 34 (supl.1):134-135.
18. Berger, J.R., Moskowitz, L., Fischl, M., Kelley, R.E. (1987) Neurologic disease as the presenting manifestation of acquired immunodeficiency syndrome. *South Med. J.*, 80:683-686.
19. Berger, J.R., Shermata, W.A., Resnick, L., Atherton, S., Fletcher, M.A., Norenberg, M. (1989) Multiple sclerosis-like illness occurring with human immunodeficiency virus infection. *Neurology*, 39:324-329.
20. Beyne, P., Lisovoski, F., Got, L., Ayache, P., Delacoux, E. (1995) La beta-2-microglobuline du liquide céphalorachidien en neurologie. *Presse Med.*, 24:1071-1074.
21. Blackstad, T.W. (1956) Commissural connections of the hippocampal region in the rat with special reference to their mode of termination. *J. Comp. Neurol.*, 105:417-537.
22. Blackstad, T.W. (1958) On the termination of some afferents to the hippocampus and fascia dentata: an experimental study in the rat. *Acta Anat.*, 35:202-214.
23. Blackstad, T.W., Kjaerheim, A. (1961) Special axo-dendritic synapses in the hippocampal cortex: electron and light microscopic studies on the layer of mossy fibers. *J. Comp. Neurol.*, 117:133-159.
24. Blackstad, T.W., Brink, K., Hem, J., Jeune, B. (1970) Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat: an experimental study with silver impregnation methods. *J. Comp. Neurol.*, 138:433-450.
25. Boni, J., Emmerich, B.S., Leib, S.L., Wiestler, O.D., Schupbach, J., Kleihues, P. (1993) PCR identification of HIV-1 DNA sequences in brain tissue of patients with AIDS encephalopathy. *Neurology*, 43:1813-1817.
26. Braak, H., Braak, E. (1985) Golgi preparations as a tool in neuropathology with particular reference to investigations of the human telencephalic cortex. *Prog. Neurobiol.*, 25:93-139.
27. Brændgaard, H., Evans, S.M., Howard, C.V., Gundersen, H.J.G. (1990) The total number of neurons in the human neocortex unbiasedly estimated using optical disectors. *J. Microsc.*, 157:285-304.
28. Brew, B., Portegies, P. (1997) A practical guide to the pathogenesis and treatment of HIV CNS infection. HIV Clinical Management Series. International Medical Press. Manchester, Caxton Press Ltd. P.1-11.
29. Brew, B.J., Bhalla, R.B., Fleisher, M., Paul, M., Khan, A., Schwartz, M.K., Price, R.W. (1989) Cerebrospinal fluid β_2 -microglobulin in patients infected with human immunodeficiency virus. *Neurology*, 39:830-834.
30. Brew, B.J., Dunbar, N., Pemberton, L., Kaldor, J. (1996) Predictive markers of AIDS dementia complex: CD4 cell count and cerebrospinal fluid concentrations of β_2 -microglobulin and neopterin. *J. Infect. Dis.*, 174:294-298.
31. Brouwers, P., Moss, H., Wolters, P., Eddy, J., Ballis, F., Poplack, D.G., Pizzo, P.A. (1990) Effect of continuous-infusion zidovudine therapy on neuropsychologic functioning in children with symptomatic human immunodeficiency virus infection. *J. Pediatr.*, 117:980-985.
32. Brown, J.S., Kaufman, P.G., Marco, L.A. (1969) The hippocampus and response perseveration in the cat. *Brain Res.*, 12:86-98.
33. Brun, A., Englund, E. (1981) Regional pattern of degeneration in Alzheimer's disease: neuronal loss and histopathological grading. *Histopathology*, 5:549-564.
34. Brunet, P., Bolgert, F., Pierrot-Deseilligny, C. (1988) L' infection du système nerveux par le virus du déficit immunitaire humain acquis. *Rev. Neurol.*, 144:317-326.
35. Budka, H. (1991) Neuropathology of human immunodeficiency virus infection. *Brain Pathol.*, 1:163-175.
36. Buffet, R., Agut, H., Huraux, J.M. (1991) Étude du virus de l'immunodéficience humaine dans le liquide céphalorachidien. Intérêt et limites. *La Presse Médicale*, 20:1124-1128.
37. Bukasa, K.S.S., Sindic, C.J.M., Bodeus, M., Burtonboy, G., Laterre, C., Sonnet, J. (1988) Anti-HIV antibodies in the CSF of AIDS patients: a serological and immunoblotting study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 51:1063-1068.
38. Butterworth, A.E., David, J.R. (1981) Eosinophil function. *N. Engl. J. Med.*, 304:154-156.

39. Cadete-Leite, A., Tavares, M.A., Uylings, H.B.M., Paula-Barbosa, M.M. (1988) Granule cell loss and dendritic regrowth in the hippocampal dentate gyrus of the rat after chronic alcohol consumption. *Brain Res.*, 473:1-14.
40. Cadete-Leite, A., Tavares, M.A., Alves, M.C., Uylings, H.B.M., Paula-Barbosa, M.M. (1989) Metric analysis of hippocampal granule cell dendritic trees after alcohol withdrawal in rats. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.*, 13:837-840.
41. Callebaut, C., Krust, B., Jacotot, E., Hovanessian A.G. (1993) T cell activation antigen, CD26, as a cofactor for entry of HIV in CD4- cells. *Science*, 262:2045-2050.
42. Carne, C.A., Smith, A., Elkington, S.G., Preston, F.E., Tedder, R.S., Sutherland, S., Daly, H.M., Craske, J. (1985) Acute encephalopathy coincident with seroconversion for anti-HTLV-III. *Lancet*, 1:1206-1208.
43. Casabona, J., Sanchez, E., Graus, F., Abós, J., Segura, A. (1991) Trends and survival for AIDS patients presenting with indicative neurologic diseases. *Acta Neurol. Scand.*, 84:51-55.
44. Catalá, I., Ferrer, I., Galofré, E., Fábregues, I. (1988) Decreased numbers of dendritic spines on cortical pyramidal neurons in dementia. A quantitative Golgi study on biopsy samples. *Hum. Neurobiol.*, 6:255-259.
45. Cavalieri, B. (1966) *Geometria degli indivisibili*. Torino: Unione Tipografico Editrice.
46. Centers for Disease Control (1981) *Pneumocystis pneumonia* - Los Angeles. *MMWR*, 30:250-252.
47. Centers for Disease Control (1981) Kaposi's sarcoma and *Pneumocystis pneumonia* among homosexual men - New York City and California. *MMWR*, 30:305-308.
48. Centers for Disease Control (1982) Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) update in United States. *MMWR*, 32:309-311.
49. Centers for Disease Control (1987) Revision of the CDC surveillance case definition for acquired immunodeficiency syndrome. *MMWR*, 36 (supl. 1S):1-15.
50. Centers for Disease Control and Prevention (1992) 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR*, 41: RR-18:1-29.
51. Centers for Disease Control and Prevention (1993) Recommendations for HIV testing services for inpatients and outpatients in acute-care hospital settings. *MMWR*, 42 (RR-2):1-6.
52. Cheng, B., Mattson, M.P. (1991) NGF and bFGF protect rat hippocampal and human cortical neurons against hypoglycemic damage by stabilizing calcium homeostasis. *Neuron*, 7:1031-1041.
53. Cheng, B., Mattson, M.P. (1994) NT3 and BDNF protect CNS neurons against metabolic/excitotoxic insults. *Brain Res.*, 640:56-67.
54. Chiodi, F., Fuerstenberg, S., Gidlund, M., Asjo, B., Fenyo, E.M. (1987) Infection of brain-derived cells with human immunodeficiency virus. *J. Virol.*, 61:1244-1247.
55. Chiodi, F., Sonnerborg, A., Albert, J., Gaines, H., Norkrans, G., Hagberg, L., Asjo, B., Strannegard, O., Fenyo, E.M. (1988) Human immunodeficiency virus infection of the brain. I. Virus isolation and detection of HIV specific antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with varying clinical conditions. *J. Neurol. Sci.*, 85:245-257.
56. Ciechanover, A. (1993) The ubiquitin-mediated proteolytic pathway. *Brain Pathol.*, 3:67-75.
57. Claiborne, B.J., Amaral, D.G., Cowan, W.M. (1986) A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.*, 246:435-458.
58. Comissão Nacional de Luta Contra a SIDA (1997) *Epidemiologia. Informação SIDA*, 2:24.
59. Coleman, P.D., Riesen, A.H. (1968) Environmental effects on cortical dendritic fields. I. Rearing in the dark. *J. Anat.*, 102:363-374.
60. Coleman, P.D., Flood, D.G. (1986) Dendritic proliferation in the aging brain as a compensatory repair mechanism. Em: *Progress in brain research*, Vol. 70. Editores: Swaab, D.F., Fliers, E., Mirmiran, M., Van Gool, W.A., Van Haaren, F. Amsterdam, Elsevier Science (Biomedical Division). P:227-237.
61. Conant, K.E., Monaco, M.G., Major, E.O. (1997) The biology and tropism of human immunodeficiency virus-1 in the nervous system. Em: *AIDS and the Nervous System* (2ª Ed). Editores: Berger, J.R., Levy, R.M. Philadelphia, Lippincot-Raven. P.39-58.

62. Conrad, A.J., Schmid, P., Syndulko, K., Singer, E.J., Nagra, R.M., Russell, J.J., Tourtellotte, W.W. (1995) Quantifying HIV-1 RNA using the polymerase chain reaction on cerebrospinal fluid and serum of seropositive individuals with and without neurologic abnormalities. *J. Acq. Imm. Defic. Synd. Hum. Retrovirol.*, 10:425-435.
63. Crutcher, K.A., Collins, F. (1982) In vitro evidence for two distinct hippocampal growth factors. Basis of neuronal plasticity? *Science*, 217:67-68.
64. Cruz-Orive, L.M., Weibel, E.R. (1990) Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *Am. J. Physiol.*, 258:L148-156.
65. Cummings, J.L., Benson, D.F. (1984) Subcortical dementia: review of an emerging concept. *Arch. Neurol.*, 41:874-879.
66. Cupler, E.J. (1997) Acquired immunodeficiency syndrome. Em: *Neuroimmunology for the Clinician*. Editores: Rolack, L.A., Harati, Y. New York, Butterworth-Heinemann. P.393-418.
67. Dal Pan, G.J., McArthur, J.H., Aylward, E., Selnes, O.A., Nance-Sproson, T.E., Kumar, A.J., Mellits, E.D., McArthur, J.C. (1992) Patterns of cerebral atrophy in HIV-1-infected individuals: results of a quantitative MRI analysis. *Neurology*, 42:2125-2130.
68. Dal Pan, G.J., McArthur, J.C., Harrison, M.J.G. (1997) Neurological symptoms in human immunodeficiency virus infection. Em: *AIDS and the Nervous System (2^a Ed.)*. Editores: Berger, J.R., Levy, R.M. Philadelphia, Lippincot-Raven. P.141-172.
69. Dalakas, M.C., Illa, I., Pezeshkpour, G.H., Laukaitis, J.P., Cohen, B., Griffin, J.L. (1990) Mitochondrial myopathy caused by long-term zidovudine therapy. *N. Engl. J. Med.*, 322:1098-1105.
70. Dam, A.M. (1980) Epilepsy and neuronal loss in the hippocampus. *Epilepsia*, 21:617-629.
71. Damasio, A.R. (1992) *Neuroscience: Integrative functions*. Raven Press.
72. Davies, C.A., Mann, D.M.A., Sumpter, P.Q., Yates, P.O. (1987) A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.*, 78:151-164.
73. Davson, H. (1967) *Physiology of the Cerebrospinal Fluid*. London, Churchill Livingstone.
74. Davson, H., Welch, K., Segal, M.B. (1987) *The Physiology and Pathophysiology of the Cerebrospinal Fluid*. New York, Churchill Livingstone. P.1013.
75. De Leon, M.J., George, A.E., Golomb, J., Tarshish, C., Convit, A., Kluger, A., DeSanti, S., McRae, T., Ferris, S.H., Reisberg, B., Ince, C., Rusinek, H., Bobinski, M., Quinn, B., Miller, D.C., Wisniewski, H.M. (1997) Frequency of hippocampal formation atrophy in normal aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, 18:1-11.
76. De Ruiter, J.P., Uylings, H.B.M. (1987) Morphometric and dendritic analysis of fascia dentata granule cells in human aging and senile dementia. *Brain Res.*, 402:217-229.
77. Delpech, B., Lichtblau, F. (1972) Étude quantitative des immunoglobulines G et de l'albumine du liquide céphalo-rachidien. *Clin. Chim. Acta*, 37:15-23.
78. Denning, D.W., Anderson, J., Rudge, P., Smith, H. (1987) Acute myelopathy associated with primary infection with human immunodeficiency virus. *Br. Med. J.*, 294:143-144.
79. Desmond, N.L., Levy, W.B. (1985) Granule cell dendritic spine density in the rat hippocampus varies with spine shape and location. *Neurosci. Lett.*, 54:219-224.
80. Diederich, N., Ackermann, R., Jurgens, R., Ortseifen, M., Thun, F., Schneider, M., Vukadinovic, I. (1988) Early involvement of the nervous system by human immune deficiency virus (HIV). *Eur. Neurol.*, 28:93-103.
81. Doherty, F., Osborn, N.U., Wassel, J.A., Heggie, P.E., Laszlo, L., Mayer, R.J. (1989) Ubiquitin-protein conjugates accumulate in the lysosome system of fibroblasts treated with cysteine proteinase inhibitors. *Biochem. J.*, 263:47-55.
82. Dubois-Dalq, M., Altmeyer, R., Chiron, M., Wilt, S. (1995) HIV interactions with cells of the nervous system. *Current Opinion Neurobiol.*, 5:647-655.
83. Dufresne, J.-J. (1972) *Cytologie pratique du liquide céphalo-rachidien*. Bâle, Documenta Geigy. P.19.
84. Durack, D.T. (1981) Opportunistic infections and Kaposi's sarcoma in homosexual men. *N. Engl. J. Med.*, 305:1465-1467.

85. Durack, D.T., Mark Sumi, S., Klebanoff, S.J. (1979) Neurotoxicity of human eosinophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:1443-1447.
86. Dyken, P.R. (1975) Cerebrospinal fluid cytology: practical clinical usefulness. *Neurology*, 25:210-217.
87. Eayrs, T.J. (1955) The cerebral cortex of normal and hypothyroid rats. *Acta Anat.*, 25:160-183.
88. Elovaara, I., Muller, K.M. (1993) Cytoimmunological abnormalities in cerebrospinal fluid in early stages of HIV-1 infection often precede changes in blood. *J. Neuroimmunol.*, 44:199-204.
89. Elovaara, I., Iivanainen, M., Valle, S.L., Suni, J., Tervo, T., Lahdevirta, J. (1987) CSF protein and cellular profiles in various stages of HIV infection related to neurological manifestations. *J. Neurol. Sci.*, 78:331-342.
90. Elovaara, I., Seppala, I., Poutiainen, E., Suni, J., Valle, S.-L. (1988) Intrathecal humoral immunologic response in neurologically symptomatic and asymptomatic patients with human immunodeficiency virus infection. *Neurology*, 38:1451-1456.
91. Elovaara, I., Iivanainen, M., Poutiainen, E., Valle, S.-L., Weber, T., Suni, J., Lahdevirta, J. (1989) CSF and serum β 2-microglobulin in HIV infection related to neurological dysfunction. *Acta Neurol. Scand.*, 79:81-87.
92. Elovaara, I., Poutiainen, E., Raininko, R., Valanne, L., Virta, A., Valle, S.L., Lahdevirta, J., Iivanainen, M. (1990) Mild brain atrophy in early HIV infection: the lack of association with cognitive deficits and HIV-specific intrathecal immune response. *J. Neurol. Sci.*, 99:121-136.
93. Eng, L.F., Ghirnikar, R.S. (1994) GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol.*, 4:229-237.
94. Epstein, L.G. (1988) Human immunodeficiency virus (HIV) brain infection in infants and children. *Em: Virus Infections and the Developing Nervous System*. Editores: Johnson, R.T., Lyon, G. Netherlands, Kluwer Academic. P.57-67.
95. Epstein, L.G., Gendelman, H.E. (1993) Human immunodeficiency virus type 1 infection of the nervous system: pathogenetic mechanisms. *Ann. Neurol.*, 33:429-436.
96. Epstein, L.G., Sharer, L.R., Cho, E.S., Meyenhofer, M., Navia, B.A., Price, R.W. (1985) HTLV-III/LAV-like retrovirus particles in the brains of patients with AIDS encephalopathy. *AIDS Res.*, 1:447-454.
97. Epstein, L.G., Gendelman, H.E., Lipton, S.A. (1997) Human immunodeficiency virus-1 neuropathogenesis. *Em: AIDS and the Nervous System (2^a Ed.)*. Editores: Berger, J.R., Levy, R.M. Philadelphia, Lippincot-Raven. P. 59-76.
98. Ernfors, P., Wetmore, C., Olson, L., Persson, H. (1990) Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron*, 5:511-526.
99. Everall, I.P., Luthert, P.J., Lantos, P.L. (1991) Neuronal loss in the frontal cortex in HIV infection. *Lancet*, 337:1119-1121.
100. Everall, I.P., Luthert, P.J., Lantos, P.L. (1993) A review of neuronal damage in human immunodeficiency virus infection: its assessment, possible mechanism and relationship to dementia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 52:561-566.
101. Everall, I.P., Luthert, P.J., Lantos, P.L. (1993) Neuronal number and volume alterations in the neocortex of HIV infected individuals. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 56:481-486.
102. Falangola, M.F., Hanly, A., Galvao-Castro, B., Petito, C.K. (1995) HIV infection of human choroid plexus: a possible mechanism of viral entry into the CNS. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 54:497-503.
103. Farooqui, A.A., Horrocks, L.A. (1991) Excitatory amino acid receptors, neuronal membrane phospholipid metabolism and neurological disorders. *Brain Res. Rev.*, 16:171-191.
104. Farrell, M.A., Kaufmann, J.C., Gilbert, J.J. (1985) Oligoclonal bands in multiple sclerosis: clinical-pathological correlation. *Neurology*, 35:212-215.
105. Fauci, A.S. (1988) The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science*, 239:617-622.
106. Fauci, A.S., Rosenberg, Z.F. (1994) Immunopathogenesis. *Em: Textbook of AIDS Medicine*. Editores: Broder, S., Merigan Jr., T.C., Bolognesi, D. New York, Williams and Wilkins. P.55-75.

107. Felgenhauer, K. (1974) Protein size and cerebrospinal fluid composition. *Klin. Wschr.*, 52:158-1164.
108. Felgenhauer, K. (1995) The filtration concept of the blood-CSF-barrier as basis for the differentiation of CSF proteins. Em: *New Concepts of a Blood-Brain-Barrier*. Editores: Greenwood, J., Begley, D.J., Segal, M.B., Lightman, S. London. Plenum Press. P.209-217.
109. Ferrer, I., Gullotta, F. (1990) Down's syndrome and Alzheimer's disease: Dendritic spine counts in the hippocampus. *Acta Neuropathol.*, 79:680-685.
110. Fishman, R.A. (1992) *Cerebrospinal Fluid in Diseases of the Nervous System* (2^a ed.). Editor: Saunders, W.B. Philadelphia. P. 23-42.
111. Fitch, J.M., Juraska, J.M., Washington, L.W. (1989) The dendritic morphology of pyramidal neurons in the rat hippocampal CA3 area. I. Cell types. *Brain Res.*, 479:105-114.
112. Flood, D.G. (1991) Region-specific stability of dendritic extent in normal human aging and regression in Alzheimer's disease. II. Subiculum. *Brain Res.*, 540:83-95.
113. Flood, D.G. (1994) Thoughts on no neocortical neuronal loss but loss of volume in AD. *Neurobiol. Aging*, 15:363-365.
114. Flood, D.G., Coleman, P.D. (1990) Hippocampal plasticity in normal aging and decreased plasticity in Alzheimer's disease. Em: *Understanding the Brain Through the Hippocampus*. Progress in brain research. Vol.83. Editores: Storm-Mathisen, J., Zimmer, J., Ottersen, O.P. Amsterdam, Elsevier. P.435-444.
115. Flood, D.G., Buell, S.J., Horwitz, G.J., Coleman, P.D. (1987) Dendritic extent in human dentate gyrus granule cells in normal aging and senile dementia. *Brain Res.*, 402:205-216.
116. Flood, D.G., Guarnaccia, M., Coleman, P.D. (1987) Dendritic extent in human CA2-3 hippocampal pyramidal neurons in normal aging and senile dementia. *Brain Res.*, 409:88-96.
117. Fossan, G.O. (1977) The transfer of IgG from serum to CSF, evaluated by means of a naturally occurring antibody. *Eur. Neurol.*, 15:231-236.
118. Friedman-Kien, A.E., Laubenstein, L.J., Rubinstein, P., Buimovic-Klein, E., Marmor, M., Stahl, R., Spigland, I., Kim, K.S., Zolla-Pazner, S. (1982) Disseminated Kaposi's sarcoma in homosexual men. *Ann. Intern. Med.*, 96:693-700.
119. Gaarskjaer, F.B. (1978) Organization of the mossy fiber system of the rat studied in extended hippocampi. II. Experimental analysis of fiber distribution with silver impregnation methods. *J. Comp. Neurol.*, 178:73-88.
120. Gabuzda, D.H., Hirsch, M.S. (1987) Neurologic manifestations of infection with human immunodeficiency virus: clinical features and pathogenesis. *Ann. Intern. Med.*, 107:383-391.
121. Gabuzda, D.H., Ho, D.D., de la Monte, S.M., Hirsch, M.S., Rota, T.R., Sobel, R.A. (1986) Immunohistochemical identification of HTLV-III antigen in brains of patients with AIDS. *Ann. Neurol.*, 20:289-295.
122. Gallo, P., Piccino, M.G., DeRossi, A., Pagni, S., Amadori, A., Chieco-Bianchi, L., Tavolato, B. (1990) Free light chains of immunoglobulins in the cerebrospinal fluid of human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *J. Neuroimmunol.*, 26:229-238.
123. Gallo, P., Laverda, A.M., DeRossi, A., Pagni, S., Del-Mistro, A., Cogo, P., Piccino, M.G., Plebani, A., Tavolato, B., Chieco-Bianchi, L. (1991) Immunological markers in the cerebrospinal fluid of HIV1 infected children. *Acta Paediatr. Scand.*, 80:659-666.
124. Gallo, R.C., Sarin, P.S., Gelmann, E.P., Robert-Guroff, M., Richardson, E. (1983) Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220:865-867.
125. Ganrot, K., Laurell, C.B. (1974) Measurement of IgG and albumin content of cerebrospinal fluid and its interpretation. *Clin. Chem.*, 20:571-576.
126. Gopen, P. (1982) Neurological complications now characterizing many AIDS victims. *JAMA*, 248:2941-2942.
127. Gelbard, H.A., James, H.J., Sharer, L.R., Petty, S.W., Saitop, Y., Kazee, A.M., Blumberg, B.M., Epstein, L.G. (1995) Apoptotic neurons in brains from paediatric patients with HIV-1 encephalitis and progressive encephalopathy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 21:208-217.

128. Gelman, B.B., Guinto, F.C.Jr. (1992) Morphometry, histopathology, and tomography of cerebral atrophy in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Neurol.*, 32:31-40.
129. Giulian, D., Vaca, K., Noonan, C.A. (1990) Secretion of neurotoxins by mononuclear-phagocytes infected with HIV-1. *Science*, 250:1593-1595.
130. Gonda, M.A., Wong-Staal, F., Gallo, R.C., Clements, J.E., Narayan, O., Gilden, R.V. (1985) Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus. *Science*, 227:173-177.
131. Goodman, J.C. (1997) Laboratory testing for neuroimmunologic diseases. Em: Neuroimmunology for the Clinician. Editores: Rolak, L.A., Harati, Y. New York, Butterworth-Heinemann. P.57-75.
132. Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A., Saxon, A. (1981) *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men. Evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.*, 305:1425-1431.
133. Goudsmit, J., Paul, D.A., Lange, J.M.A., Speelman, H., Der Noordaa, J.V., Van Der Helm, H.J., De Wolf, F., Epstein, L.G., Krone, W.J.A., Wolters, E.C., Oleske, J. M., Coutinho, R.A. (1986) Expression of human immunodeficiency virus antigen (HIV-Ag) in serum and cerebrospinal fluid during acute and chronic infection. *Lancet*, 26:177-180.
134. Goudsmit, J., Wolters, E.C., Bakker, M., Smit, L., Van Der Noordaa, J., Hische, E.A.H., Tutuarima, J.A., Van Der Helm, H.J. (1986) Intrathecal synthesis of antibodies to HTLV-III in patients without AIDS or AIDS related complex. *Br. Med. J.*, 292:1231-1234.
135. Griffin, D.E., McArthur, J.C., Cornblath, D.R. (1991) Neopterin and interferon-gamma in serum and cerebrospinal fluid of patients with HIV-associated neurological disease. *Neurology*, 41:69-74.
136. Grimaldi, L.M.E., Castagna, A., Lazzarin, A., Pristerá, R., Bianchi, G., Moroni, M., Roos, R.P. (1988) Oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid and serum during asymptomatic human immunodeficiency virus infection. *Ann. Neurol.*, 24:277-279.
137. Gundersen, H.J.G. (1977) Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *J. Microsc.*, 111:219-223.
138. Gundersen, H.J.G. (1988) The nucleator. *J. Microsc.*, 151:3-21.
139. Gundersen, H.J.G. Jensen, E.B. (1987) The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J. Microsc.*, 147:229-263.
140. Gundersen, H.J.G., Bagger, P., Bendtsen, T.F., Evans, S.M., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J.R., Pakkenberg, B., Sorensen, F.B., Vesterby, A., West, M.J. (1988) The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sample intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*, 96:857-881.
141. Gundersen, H.J.G., Bendtsen, T.F., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J.R., Pakkenberg, B., Sorensen, F.B., Vesterby, A., West, M.J. (1988) Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*, 96:379-394.
142. Hahn, B.H. (1994) Viral genes and their products. Em: Textbook of AIDS Medicine. Editores: Broder, S., Merigan Jr., T.C., Bolognesi, D. New York, Williams and Wilkins. P.21-43.
143. Hainfellner, J.A, Budka, H. (1997) Neuropathology of human immunodeficiency virus related opportunistic infections and neoplasms. Em: AIDS and the Nervous System (2^a Ed.). Editores: Berger, J.R., Levy, R.M. Philadelphia, Lippincot-Raven. P.481-516.
144. Hall, M., Whaley, R., Robertson, K., Hamby, S., Wilkins, J., Hall, C. (1996) The correlation between neuropsychological and neuroanatomic changes over time in asymptomatic and symptomatic HIV-1-infected individuals. *Neurology*, 46:1697-1702.
145. Hanks, S.D., Flood, D.G. (1991) Region-specific stability of dendritic extent in normal human aging and regression in Alzheimer's disease. I. CA1 of hippocampus. *Brain Res.*, 540:63-82.
146. Harrison, M.J.G., McArthur, J.C. (1995) AIDS and Neurology. Edinburgh, Churchill Livingstone.
147. Hershko, A., Ciechanover, A. (1982) Mechanisms of intracellular protein breakdown. *Annu. Rev. Biochem.*, 51:335-364.

148. Heyes, M.P., Brew, B., Martin, A., Markey, S.P., Price, R.W., Bhalla, R.B., Salazar, A. (1991) Cerebrospinal fluid quinolinic acid concentrations are increased in acquired immune deficiency syndrome. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 249:687-690.
149. Heyes, M.P., Brew, B.J., Martin, A., Price, R.W., Salazar, A.M., Sidtis, J.J., Yergey, J.A., Mouradien, M.M., Sadler, A.E., Keilp, J., Rubinow, D., Markey, S.P. (1991) Quinolinic acid in cerebrospinal fluid and serum in HIV1 infection: relationship to clinical and neurological status. *Ann. Neurol.*, 29:202-209.
150. Hill, J.M., Mervis, R.F., Avidor, R., Moody, T.W., Brenneman, D.E. (1993) HIV envelope protein-induced neuronal damage and retardation of behavioral development in rat neonates. *Brain Res.*, 603:222-233.
151. Hjorth-Simonsen, A. (1973) Some intrinsic connections of the hippocampus in the rat: an experimental analysis. *J. Comp. Neurol.*, 147:145-162.
152. Hjorth-Simonsen, A., Jeune, B. (1972) Origin and termination of the hippocampal perforant path in the rat, studied with silver impregnation. *J. Comp. Neurol.*, 144:215-232.
153. Ho, D.D., Rota, T.R., Schooley, R.T., Kaplan, J.C., Allan, J.D., Groopman, J.E., Resnick, L., Felsenstein, D., Andrews, C.A., Hirsch, M.S. (1985) Isolation of HTLV-III from cerebrospinal fluid and neural tissues of patients with neurologic syndromes related to the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 313:1493-1497.
154. Ho, D.D., Sarngadharan, M.G., Resnick, L., diMarzo-Veronese, F., Rota, T.R., Hirsch, M.S. (1985) Primary human T-lymphotropic virus type III infection. *Ann. Intern. Med.*, 103:880-883.
155. Ho, D.D., Pomerantz, R.J., Kaplan, J.C. (1987) Pathogenesis of infection with human immunodeficiency virus. *N. Engl. J. Med.*, 317:278-286.
156. Hogan, R.N., Baringer, J.R., Prusiner, S.B. (1987) Scrapie infection diminishes spines and increases varicosities of dendrites in hamsters: a quantitative Golgi analysis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 46:461-473.
157. Hollander, H.R., Lewy, J.A. (1987) Neurological abnormalities and recovery of human immunodeficiency virus from cerebrospinal fluid. *Ann. Intern. Med.*, 106:692-695.
158. Hollingworth, T., Berry, M. (1975) Network analysis of dendritic fields of pyramidal cells in neocortex and Purkinje cells in the cerebellum of the rat. *Phil. Trans. R. Soc. London, Ser. B.* 270:227-264.
159. Horner, C.H. (1993) Plasticity of the dendritic spine. *Prog. Neurobiol.*, 41:281-321.
160. Horwitz, B. (1981) Neuronal plasticity: how changes in dendritic architecture can affect the spread of postsynaptic potentials. *Brain Res.*, 224:412-418.
161. Houff, S.A. (1997) Neuroimmunology of human immunodeficiency virus infection. *Em: AIDS and the Nervous System* (2^a Ed.). Editores: Berger, J.R., Levy, R.M. Philadelphia, Lippincot-Raven. P.77-122.
162. Hyman, B.T., Van Hoesen, G.W., Damasio, A.R., Barnes, C.L. (1984) Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science*, 225:1168-1170.
163. Isaacson, R.L. (1982) *The Lymbic System* (2^a Ed.). New York, Plenum Press. P.327.
164. Ishizuka, N., Cowan, W.M., Amaral, D.G. (1995) A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.*, 362:17-45.
165. Jackson, S., Dawson, L.M., Kotler, D.P. (1988) IgA 1 is the major immunoglobulin component of immune complexes in the acquired immune deficiency syndrome. *J. Clin. Immunol.*, 8:64-68.
166. Jacobs, B., Scheibel, A.B. (1993) A quantitative dendritic analysis of Wernicke's area in humans. I. Lifespan changes. *J. Comp. Neurol.*, 327:83-96.
167. Janssen, R.S. (1992) Epidemiology of human immunodeficiency virus infection and the neurologic complications of the infection. *Semin. Neurol.*, 12:10-17.
168. Janssen, R.S. (1997) Epidemiology and neuroepidemiology of human immunodeficiency virus infection. *Em: AIDS and the Nervous System* (2^a Ed.). Editores: Berger, J.R., Levy, R.M. Philadelphia, Lippincot-Raven. P.13-38.

169. Janssen, R.S., Cornblath, D.R., Epstein, L.G., McArthur, J.C., Price, R.W. (1989) Human immunodeficiency virus (HIV) infection and the nervous system: report from the American Academy of Neurology AIDS Task Force. *Neurology*, 39:119-122.
170. Jarrard, L.E. (1980) Selective hippocampal lesions and behavior. *Physiol. Psychol.*, 8:198-206.
171. Jarrard, L.E. (1986) Selective hippocampal lesions and behavior. Implications for current research and theorizing. Em: *The Hippocampus*, Vol. 4. Editores: Isaacson, R.L., Pribram, K.H. New York, Plenum Press. P. 93-126.
172. Jensen, M., Basun, H., Lannfelt, L. (1995) Increased cerebrospinal fluid tau in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.*, 186:189-191.
173. Johns, D.R., Tierney, M., Felsenstein, D. (1987) Alteration in the natural history of neurosyphilis by concurrent infection with the human immunodeficiency virus. *N. Engl. J. Med.*, 316:1569-1571.
174. Johnson, R. (1982) *Viral infections of the Nervous System*. New York, Raven Press.
175. Katz, D.A., Berger, J.R. (1989) Neurosyphilis in acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Neurol.*, 46:895-898.
176. Katz, D.A., Berger, J.R., Duncan, R.C. (1993) Neurosyphilis. A comparative study of the effects of infection with human immunodeficiency virus. *Arch. Neurol.*, 50:243-246.
177. Kaufmann, W.E. (1992) Cerebrocortical changes in AIDS. *Lab. Invest.*, 66:261-264.
178. Kaye, J.A., Swihart, T., Howieson, D., Dame, A., Moore, M.M., Karnos, T., Camicioli, R., Ball, M., Oken, B., Sexton, G. (1997) Volume loss of the hippocampus and temporal lobe in healthy elderly persons destined to develop dementia. *Neurology*, 48:1297-1304.
179. Ketzler, S., Weis, S., Haug, H., Budka, H. (1990) Loss of neurons in the frontal cortex in AIDS brains. *Acta Neuropathol.*, 80:92-94.
180. Kim, H., Gearing, M., Mirra, S.S. (1995) Ubiquitin-positive CA2/3 neuritis in hippocampus coexist with cortical Lewy bodies. *Neurology*, 45:1768-1770.
181. Klatzo, I., Gajdusek, D.C., Zigas, V. (1959) Pathology of Kuru. *Lab. Invest.*, 8:799-802.
182. Koppel, B.S., Wormser, G.P., Tuchman, A.J., Maayan, S., Hewlett, D., Daras, M. (1985) Central nervous system involvement in patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Acta Neurol. Scand.*, 71:337-353.
183. Kostulas, V.K. (1985) Oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid: methodological and clinical aspects. *Acta Neurol. Scand.*, 72:1-112.
184. Kroustrup, J.P., Gundersen, H.J.G. (1983) Sampling problems in a heterogeneous organ: quantitation of relative and total volume of pancreatic islets by light microscopy. *J. Microsc.*, 132:43-55.
185. Kudo, T., Iqbal, K., Ravid, R., Swaab, D.F., Grundke-Iqbal, I. (1994) Alzheimer disease: correlation of cerebrospinal fluid and brain ubiquitin levels. *Brain Res.*, 639:1-7.
186. Laakso, M.P., Partanen, K., Riekkinen Jr., P., Lehtovirta, M., Helkala, E.-L., Hallikainen, M., Hanninen, T., Vainio, P., Soininen, H. (1996) Hippocampal volumes in Alzheimer's disease, Parkinson's disease with and without dementia, and in vascular dementia: an MRI study. *Neurology*, 46:678-681.
187. Laguna, F., Adrados, M., Ortega, A., Gonzalez-Lahoz, J.M. (1992) Tuberculous meningitis with acellular cerebrospinal fluid in AIDS patients. *AIDS*, 6:1165-1167.
188. Landis, D., Williams, R.S., Masters, C.L. (1981) Golgi and electronmicroscopic studies of spongiform encephalopathy. *Neurology*, 31:538-544.
189. Lane, H.C., Masur, H., Edgar, L.C., Whalen, G., Rook, A.H., Fauci, A.S. (1983) Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 309:453-458.
190. Laterre, E.C. (1965) *Les Protéines du Liquide Céphalo-rachidien a l'État Normal et Pathologique*. Bruxelles, Arscia.
191. Laterre, E.C., Heremans, J.F. (1963) A note on proteins apparently "specific" for cerebrospinal fluid. *Clin. Chim. Acta*, 8:220-226.

192. Laterre, E.C., Collewaert, A., Heremans, J.F., Sfaello, Z. (1970) Electrophoretic morphology of gamma-globulins in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis and other diseases of the nervous system. *Neurology*, 20:982-990.
193. Letvin, N.L., Daniel, M.D., Sehgal, P.K., Desrosiers, R.C., Hunt, R.D., Waldron, L.M., MacKey, J.J., Schmidt, D.K., Chalifoux, L.V., King, N.W. (1985) Induction of AIDS-like disease in macaque monkeys with T-cell tropic retrovirus STLV-III. *Science*, 230:71-73.
194. Levy, J.A. (1993) Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol. Rev.*, 57:183-289.
195. Levy, J.A., Shimabukuro, J., Hollander, H., Mills, J., Kaminsky, L. (1985) Isolation of AIDS-associated retroviruses from cerebrospinal fluid and brain of patients with neurological symptoms. *Lancet*, 2:586-588.
196. Levy, R.M., Bredesen, D.E. (1988) Central nervous system dysfunction in acquired immunodeficiency syndrome. In: *AIDS and the Nervous System*. Editores: Rosenblum, M.L., Levy, R.M., Bredesen, D.E. New York, Raven Press. P.29-63.
197. Levy, R.M., Bredesen, D.E., Rosenblum, M.L. (1985) Neurological manifestations of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): experience at UCSF and review of the literature. *J. Neurosurg.*, 62:475-495.
198. Levy, R.M., Rosenbloom, S., Perrett, L.V. (1986) Neuroradiological findings in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): a review of 200 cases. *Am. J. Neuroradiology*, 7:833-839.
199. Levy, R.M., Janssen, R.S., Bush, T.J., Rosenblum, M.L. (1988) Neuroepidemiology of acquired immunodeficiency syndrome. *J. Acq. Imm. Defic. Synd.*, 1:31-40.
200. Li, X.L., Moudgil, T., Vinters, H.V., Ho, D.D. (1990) CD4-independent, productive infection of a neuronal cell line by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.*, 64:1383-1387.
201. Lightfoot, M.M., Folks, T.M., Sell, K.W. (1984) Analysis of immune complex components isolated from serum of AIDS patients. *Fed. Proc.*, 43:1921.
202. Lim, C., Blume, H.W., Madsen, J.R., Saper, C.B. (1997) Connections of the hippocampal formation in humans: I. The mossy fiber pathway. *J. Comp. Neurol.*, 385:325-351.
203. Lim, C., Mufson, E.J., Kordower, J.H., Blume, H.W., Madsen, J.R., Saper, C.B. (1997) Connections of the hippocampal formation in humans: II. The endfolial fiber pathway. *J. Comp. Neurol.*, 385:352-371.
204. Lindsay, R.D., Scheibel, A.B. (1976) Quantitative analysis of dendritic branching pattern of granular cells from human dentate gyrus. *Exp. Neurol.*, 52:295-310.
205. Lindsay, R.D., Scheibel, A.B. (1981) Quantitative analysis of the dendritic branching pattern of granule cells from adult rat dentate gyrus. *Exp. Neurol.*, 73:286-297.
206. Lindsay, R.M., Wiegand, S.J., Altar, C.A., DiStefano, P.S. (1994) Neurotrophic factors: from molecule to man. *Trends Neurosci.*, 17:182-190.
207. Ling, E.A., Paterson, J.A., Privat, A., Mori, S., Leblond, C.P. (1973) Investigation of glial cells in semithin sections. I. Identification of glial cells in the brain of young rats. *J. Comp. Neurol.*, 149:43-72.
208. Lipton, S.A. (1991) HIV-related neurotoxicity. *Brain Pathol.*, 1:193-199.
209. Lipton, S.A. (1992) Models of neuronal injury in AIDS: another role for the NMDA receptor? *Trends Neurosci.*, 15:75-79.
210. Lipton, S.A. (1993) Human immunodeficiency virus-infected macrophages, gp120, and N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity. *Ann. Neurol.*, 33:227-228.
211. Lipton, S.A., Gendelman, H.E. (1995) Dementia associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 332:934-940.
212. Livramento, J.A., Machado, L.R., Spina-França, A. (1989) Anormalidades do líquido cefalorraqueano em 170 casos de AIDS. *Arq. Neuropsiquiatr.*, 47:326-331.
213. Lolli, F., Colao, M.G., De-Maio, E., Di-Pietro, M., Galli, E., Grippo, A., Mazzotta, F., Pinto, F. (1990) Intrathecal synthesis of anti-HIV antibodies in AIDS patients. *J. Neurol. Sci.*, 99:281-289.
214. Lopes da Silva, F.H., Witter, M.P., Boeijinga, P.H., Lohman, A.M. (1990) Anatomical organization and physiology of the limbic cortex. *Physiol. Rev.*, 70:453-511.

215. Lorente de Nó, R. (1934) Studies on the structure of cerebral cortex. II Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neurol.*, 46:113-177.
216. Lowe, J., Mayer, R.J., Landon, M. (1993) Ubiquitin in neurodegenerative diseases. *Brain Pathol.*, 3:55-65.
217. Luer, W., Poser, S., Weber, T., Jurgens, S., Eichenlaub, D., Pohle, H.D., Felgenhauer, K. (1988) Chronic HIV encephalitis - I. Cerebrospinal fluid diagnosis. *Klin Wschr.*, 66:21-25.
218. Luft, B.J., Conley, F., Remington, J.S. (1983) Outbreak of central nervous system toxoplasmosis in Western Europe and North America. *Lancet*, 2:783-784.
219. Luthert, P.J., Montgomery, M.M., Dean, A.F., Cook, R.W., Baskerville, A., Lantos, P.L. (1995) Hippocampal neuronal atrophy occurs in rhesus macaques following infection with simian immunodeficiency virus. *Neuropathol. Applied Neurobiol.*, 21:529-534.
220. Machado, L.R., Livramento, J.A., Spina-França, A. (1992) Neurotoxoplasmosis and AIDS. Cerebrospinal fluid analysis in 96 patients. *Arq. Neuropsiquiatr.*, 50:497-507.
221. Maddon, P.J., Dalglish, A.G., McDougal, J.S., Clapham, P.R., Weiss, R.A., Axel, R. (1986) The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell*, 47:333-348.
222. Madeira, M.D., Lieberman, A.R. (1995) Sexual dimorphism in the mammalian limbic system. *Prog. Neurobiol.*, 45:275-333.
223. Madeira, M.D., Cadete-Leite, A., Andrade, J.P., Paula-Barbosa, M.M. (1991) Effects of hypothyroidism upon the granular layer of the dentate gyrus in male and female adult rats: a morphometric study. *J. Comp. Neurol.*, 314:171-186.
224. Madeira, M.D., Sousa, N., Paula-Barbosa, M.M. (1991) Sexual dimorphism in the mossy fiber synapses of the rat hippocampus. *Exp. Brain Res.*, 87:537-545.
225. Madeira, M.D., Sousa, N., Lima-Andrade, M.T., Calheiros, F., Cadete-Leite, A., Paula-Barbosa, M.M. (1992) Selective vulnerability of the hippocampal pyramidal neurons to hypothyroidism in male and female rats. *J. Comp. Neurol.*, 322:501-518.
226. Madeira, M.D., Sousa, N., Cadete-Leite, A., Lieberman, A.R., Paula-Barbosa, M.M. (1993) The supraoptic nucleus of the adult rat hypothalamus displays marked sexual dimorphism which is dependent on body weight. *Neuroscience*, 52:497-513.
227. Madeira, M.D., Sousa, N., Santer, R.M., Paula-Barbosa, M.M., Gundersen, H.J.G. (1995) Age and sex do not affect the volume, cell numbers, or cell size of the suprachiasmatic nucleus of the rat: an unbiased stereological study. *J. Comp. Neurol.*, 361:585-601.
228. Madeira, M.D., Andrade, J.P., Lieberman, A.R., Sousa, N., Almeida, O.F.X., Paula-Barbosa, M.M. (1997) Chronic alcohol consumption and withdrawal do not induce cell death in the suprachiasmatic nucleus, but lead to irreversible depression of peptide immunoreactivity and mRNA levels. *J. Neurosci.*, 17:1302-1319.
229. Mancini, G., Carbonara, A.O., Heremans, J.F. (1965) Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, 2:235-254.
230. Mann, D.M.A., Yates, P.O., Marcyniuk, B. (1985) Some morphometric observations on cerebral cortex and hippocampus in presenile Alzheimer's disease, senile dementia of Alzheimer type and Down's syndrome in middle age. *J. Neurol. Sci.*, 69:139-159.
231. Mann, D.M.A., Yates, P.O., Marcyniuk, B. (1986) A comparison of nerve cell loss in cortical and subcortical structures in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 49:310-312.
232. Margolick, J.B., McArthur, J.C., Scott, E.R., McArthur, J.H., Cohn, S., Farzadegan, H., Polk, B.F. (1988) Flow cytometric quantitation of T cell phenotypes in cerebrospinal fluid and peripheral blood of homosexual men with and without antibodies to human immunodeficiency virus, type I. *J. Neuroimmunol.*, 20:73-81.
233. Marques de Sá, J.P. (1993) Análise de Dados. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.
234. Marshall, D.W., Brey, R.L., Cahill, W.T., Heuw, R.W., Zajac, R.A., Boswell, R.N. (1988) Spectrum of cerebrospinal fluid findings in various stages of human immunodeficiency virus infection. *Arch. Neurol.*, 9: 954-958.

235. Marshall, D.W., Brey, R.L., Butzin, C.A., Lucey, D.R., Abbadessa, S.M., Boswell, R.N. (1991) CSF changes in a longitudinal study of 124 neurologically normal HIV-1 infected U.S. Air Force personnel. *J. Acq. Imm. Defic. Synd.*, 4:777-781.
236. Masliah, E., Terry, R.D. (1993) The role of synaptic proteins in the pathogenesis of disorders of the central nervous system. *Brain Pathol.*, 3:77-85.
237. Masliah, E., Terry, R.D., DeTeresa, R.M., Hansen, L.A. (1989) Immunohistochemical quantification of the synapse-related protein synaptophysin in Alzheimer disease. *Neurosci. Lett.*, 103:234-239.
238. Masliah, E., Achim, C.L., Ge, N., deTeresa, R., Terry, R.D., Wiley, C.A. (1992) Spectrum of human immunodeficiency virus-associated neocortical damage. *Ann. Neurol.*, 32:321-329.
239. Masliah, E., Ge, N., Achim, C.L., Hansen, L.A., Wiley, C.A. (1992) Selective neuronal vulnerability in HIV encephalitis. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 51:585-593.
240. Masliah, E., Ge, N., Morey, M., DeTeresa, R., Terry, R.D., Wiley, C.A. (1992) Cortical dendritic pathology in human immunodeficiency virus encephalitis. *Lab. Invest.*, 66:285-291.
241. Masur, H., Michelis, M.A., Greene, J.B., Onorato, I., Vande Stouwe, R.A., Holzman, R.S., Wormser, G., Brettman, L., Lange, M., Murray, H.W., Cunningham-Rundles, S. (1981) An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia. Initial manifestations of cellular immune dysfunction. *N. Engl. J. Med.*, 305:1431-1438.
242. Matheron, G. (1971) The theory of regionalized variables and its application. *Les Cahiers du Centre de Morphologie Mathematique de Fontainebleau*, N° 5. Paris, Ecole Nationale Superieure des Mines de Paris.
243. McAllister, R.H., Hems, M.V., Harrison, M.J.G., Newman, S.P., Connolly, S., Fowler, C.J., Fell, M., Durrance, P., Manji, H., Kendall, B.E., Valentine, A.R., Weller, I.V.D., Adler, M. (1992) Neurological and neuropsychological performance in HIV seropositive men without symptoms. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 55:143-148.
244. McArthur, J.C., Johnson, R.T. (1988) Primary infection with human immunodeficiency virus. *Em: AIDS and the Nervous System*. Editores: Rosenblum, M.L., Levy, R.M., Bredesen, D.E.. New York, Raven Press. P.183-201.
245. McArthur, J.C., Selnes, O.A. (1997) Human immunodeficiency virus-associated dementia. *Em: AIDS and the nervous system (2^a Ed.)*. Editores: Berger, J.R., Levy, R.M. Philadelphia, Lippincott-Raven. P.527-568.
246. McArthur, J.C., Cohen, B.A., Farzedegan, H., Cornblath, D.R., Selnes, O.A., Ostrow, D., Johnson, R.T., Phair, J., Polk, B.F. (1988) Cerebrospinal fluid abnormalities in homosexual men with and without neuropsychiatric findings. *Ann. Neurol.*, 23 (suppl.) S34-S37.
247. McArthur, J.C., Sipos, E., Cornblath, D.R., Welch, D., Chupp, M., Griffin, D.E., Johnson, R.T. (1989) Identification of mononuclear cells in CSF of patients with HIV infection. *Neurology*, 39:66-70.
248. McArthur, J.C., Nance-Sproson, T.E., Griffin, D.E., Hoover, D., Selnes, O.A., Miller, E.N., Margolick, J.B., Cohen, B.A., Farzadegan, H., Saah, A. (1992) The diagnostic utility of elevation in cerebrospinal fluid β_2 -microglobulin in HIV-1 dementia. *Neurology*, 42:1707-1712.
249. McArthur, J.C., Hoover, D.R., Bacellar, H., Miller, E.N., Cohen, B.A., Becker, J.T., Graham, N.M.H., McArthur, J.H., Selnes, O.A., Jacobson, L.P., Visscher, B.R., Concha, M., Saah, A. (1993) Dementia in AIDS patients: incidence and risk factors. *Neurology*, 43:2245-2252.
250. McLendon, R.E., Bigner, D.D. (1994) Immunohistochemistry of the glial fibrillary acidic protein: basic and applied considerations. *Brain Pathol.*, 4:221-228.
251. Medawar, P.B. (1948) Immunity to homologous grafted skin. III. The fate of skin homografts transplanted in the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br. J. Exp. Pathol.*, 29:58-69.
252. Michaels, J., Sharer, L.R., Epstein, L.G., (1988) Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of the nervous system: a review. *Immunodef. Rev.*, 1:71-104.
253. Milhorat, T.H. (1972) *Hydrocephalus and the Cerebrospinal Fluid*. Baltimore, Williams and Wilkins. P.42.

254. Miller, G.A., Penfield, W. (1956) The magic number seven plus or minus two: some limits on our capacity for processing information. *Psychol. Rev.*, 63:81-97.
255. Monteyne, P., Sindic, C.J. (1995) The diagnosis of tuberculous meningitis. *Acta Neurol. Belg.*, 95:80-87.
256. Montgomery, M., Luthert, P., Taffs, F., Lantos, P. (1993) Dendritic spine abnormalities in *Cynomolgus* monkeys infected with simian immunodeficiency virus. *Clin. Neuropathol.*, 12:S5-6.
257. Mott, D.D., Turner, D.A., Okazaki, M.M., Lewis, D.V. (1997) Interneurons of the dentate-hilus border of the rat dentate gyrus: morphological and electrophysiological heterogeneity. *J. Neurosci.*, 17:3990-4005.
258. Mufson, E.J., Benzing, W.C. (1994) Lack of neocortical nerve cell loss in Alzheimer's disease: reality or methodological artifact. *Neurobiol. Aging*, 15:361-362.
259. Nath, A., Geiger, J. (1998) Neurobiological aspects of human immunodeficiency virus infection: neurotoxic mechanisms. *Prog. Neurobiol.*, 54:19-33.
260. Nath, A., Power, C., Geiger, J.D. (1996) Interactions of the human immunodeficiency virus with astrocytes. *Perspectives in Drug Discovery and Design*, 5:30-42.
261. Nathanson, J.A., Chun, L.L. (1989) Immunological function of the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:1684-1688.
262. Navia, B.A., Jordan, B.D., Cho, E.S., Petito, C.K., Price, R.W. (1985) AIDS dementia: clinical pathological analysis. *Neurology*, 35 (suppl.1):145.
263. Navia, B.A., Cho, E.S., Petito, C.K., Price, R.W. (1986) The AIDS dementia complex: II. Neuropathology. *Ann. Neurol.*, 19:525-535.
264. Navia, B.A., Jordan, B.D., Price, R.W. (1986) The AIDS dementia complex: I. Clinical features. *Ann. Neurol.*, 19:517-524.
265. Nieto-Sampedro, M., Lewis, E.R., Cotman, C.W., Manthorpe, M., Skaper, S.D., Barbin, G., Longo, F.M., Varon, S. (1982) Brain injury causes a time-dependent increase in neuronotrophic activity at the lesion site. *Science*, 217:860-861.
266. Nistico, G., Ciriolo, M.R., Fiskin, D., Iannone, M., DeMartino, A., Rotilio, G. (1992) NGF restores decrease in catalase activity and increases superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in the brain of aged rats. *Free Rad. Biol. Med.*, 12:177-181.
267. Nottet, H.S., Persidsky, Y., Sasseville, V.G., Nukuna, A.N., Bock, P., Zhai, Q.H., Sharer, L.R., McComb, R.D., Swindells, S., Soderland, C., Gendelman, H.E. (1996) Mechanisms for transendothelial migration of HIV infected monocytes in to the brain. *J. Immunol.*, 156:1284-1295.
268. Novati, R., Castagna, A., Morsica, G., Vago, L., Tambussi, G., Ghezzi, S., Gervasoni, C., Bisson, C., d'Arminio-Monforte, A., Lazzarin, A. (1994) Polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* DNA in the cerebrospinal fluid of AIDS patients with focal brain lesions. *AIDS*, 8:1691-1694.
269. Nuovo, G.J., Gallery, F., MacConnell, P., Braun, A. (1994) *In situ* detection of polymerase chain reaction-amplified HIV-1 nucleic acids and tumor necrosis factor-alpha RNA in the central nervous system. *Am. J. Pathol.*, 144:659-666.
270. O'Keefe, J., Nadel, L. (1979) The hippocampus as a cognitive map. *Behav. Brain Sci.*, 2:478-533.
271. Oehmichen, M. (1976) *Cerebrospinal Fluid Cytology. An Introduction and Atlas.* Philadelphia, Saunders. P.9.
272. Olsen, W.L., Longo, F.M., Mills, C.M., Norman, D. (1988) White matter disease in AIDS: findings at MR imaging. *Radiology*, 169:445-448.
273. Olton, D.S., Papas, B.C. (1979) Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia*, 17:669-682.
274. Olton, D.S., Becker, J.T., Handelmann, G.E. (1979) Hippocampus, space and memory. *Behav. Brain Sci.*, 2:313-366.
275. Oster, S., Christoffersen, P., Gundersen, H.J.G., Nielsen, J.O., Pakkenberg, B., Pedersen, C. (1993) Cerebral atrophy in AIDS: a stereological study. *Acta Neuropathol.*, 85:617-622.
276. Oster, S., Christoffersen, P., Gundersen, H.J.G., Nielsen, J.O., Pedersen, C., Pakkenberg, B. (1995) Six billion neurons lost in AIDS. A stereological study of the neocortex. *APMIS*, 103:525-529.

- 277.Paixão, M.T. (1997) Epidemiologia: problema global. *Informação SIDA*, 1:24.
- 278.Pakkenberg, B., Gundersen, H.J.G (1997) Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age. *J. Comp. Neurol.*, 384:312-320.
- 279.Pang, S., Koyanagi, Y., Miles, S., Wiley, C., Vinters, H.V., Chen, I. (1990) High levels of unintegrated HIV-1 DNA in brain tissue of AIDS dementia patients. *Nature*, 343:85-89.
- 280.Paula-Barbosa, M.M., Cruz, C. (1981) Nerve cell fusion in a case of subacute sclerosing panencephalitis. *Ann. Neurol.* 9:400-403.
- 281.Paula-Barbosa, M.M., Cardoso, R.M., Faria, R., Cruz, C. (1978) Multivesicular bodies in cortical dendrites of two patients with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.*, 36:259-264.
- 282.Paula-Barbosa, M.M., Cardoso, R.M., Guimarães, M.L., Cruz, C. (1980) Dendritic degeneration and regrowth in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.*, 45:129-134.
- 283.Paula-Barbosa, M.M., Ruela, C., Faria, R., Cruz, C. (1980) Cerebral cortex dendritic degeneration in subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). *Neurology*, 30:7-11.
- 284.Paula-Barbosa, M.M., Tavares, M.A., Saraiva, A.A. (1980) Dendritic abnormalities in patients with subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). A Golgi study. *Acta Neuropathol.*, 52:77-80.
- 285.Paula-Barbosa, M.M., Tavares, M.A., Ruela, C., Barroca, H. (1983) The distribution of stellate cell descending axons in the rat cerebellum: a Golgi and combined Golgi-electron microscopical study. *J. Anat.*, 137:757-764.
- 286.Paula-Barbosa, M.M., Saraiva, A., Tavares, M.A., Borges, M.M., Verwer, R.W.H. (1986) Alzheimer's disease: maintenance of neuronal and synaptic densities in frontal cortical layers II and III. *Acta Neurol. Scand.*, 74:404-408.
- 287.Peluso, R., Haase, A., Stowring, L., Edwards, M., Ventura, P. (1985) A Trojan horse mechanism for the spread of visna virus in monocytes. *Virology*, 147:231-236.
- 288.Penn, I. (1990) Principles of tumor immunity: immunocompromised patients. *AIDS Updates*, 3:1-4.
- 289.Pereira, S., Sá, M.J., Vieira, S., Silva, C.A. (1989) Cytoproteic CSF findings in 33 MS patients: usefulness for diagnosis. *Acta Neurol. Scand.*, 79:170-172.
- 290.Petty, R.K., Kennedy, P.G. (1992) The neurological features of HIV-positive patients in Glasgow - a retrospective study of 90 cases. *Q. J. Med.*, 82:223-234.
- 291.Piette, A.M., Tusseau, F., Vignon, D., Chapman, A., Parrot, G., Leibowitch, J., Montagnier, L. (1986) Acute neuropathy coincident with seroconversion for anti-LAV/HTLV-III (letter). *Lancet*, 1:852.
- 292.Popovic, M., Sarngadharan, M.G., Read, E., Gallo, R.C. (1984) Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*, 224:497-500.
- 293.Powderly, W.G., Cloud, G.A., Dismukes, W.E., Saag, M.S. (1994) Measurement of cryptococcal antigen in serum and cerebrospinal fluid: value in the management of AIDS-associated cryptococcal meningitis. *Clin. Infect. Dis.*, 18:789-792.
- 294.Price, R.W., Brew, B.J. (1988) The AIDS dementia complex. *J. Infect. Dis.*, 158:1079-1083.
- 295.Price, R.W., Worley, J.M. (1994) Neurological complications of HIV-1 infection and AIDS. Em: *Textbook of AIDS Medicine*. Editores: Broder, S., Merigan Jr., T.C., Bolognesi, D. New York, Williams and Wilkins. P.489-505.
- 296.Price, R.W., Brew, B., Sidtis, J., Rosenblum, M., Scheck, A.C., Cleary, P. (1988) The brain in AIDS: central nervous system HIV-1 infection and AIDS dementia complex. *Science*, 239:586-592.
- 297.Price, R.W., Brew, B., Rosenblum, M. (1989) The AIDS dementia complex and HIV-1 brain infection: a pathogenetic model of virus-immune interactions. Em: *Immunologic Mechanisms in Neurologic and Psychiatric Disease*. Editor: Waksman, B.H. New York, Raven Press. P.269-290.
- 298.Probst, A., Basler, V., Bron, B., Ulrich, J. (1983) Neuritic plaques in senile dementias of Alzheimer type: a Golgi analysis in the hippocampal region. *Brain Res.*, 268:249-254.
- 299.Prusiner, S.B. (1994) Prions causing neurodegenerative diseases of humans and animals. Em: *Neurodegenerative Diseases*. Editores: Jolles, G., Stutzmann, J.M. London, Academic Press. P.23-80.

300. Pumarola-Sune, T., Navia, B.A., Cordon-Cardo, C., Cho, E-S., Price, R.W. (1987) HIV antigen in the brains of patients with the AIDS dementia complex. *Ann. Neurol.*, 21:490-496.
301. Purves, D., Hadley, R.D. (1985) Changes in the dendritic branching of adult mammalian neurones revealed by repeated imaging *in situ*. *Nature*, 315:404-406.
302. Quinann, G.V., Masur, H., Rook, A.H., Armstrong, G., Frederick, W.R., Epstein, J., Manischewitz, J., Macher, A.M., Jackson, L., Ames, J., Smith, H.A., Parker, M., Pearson, G.R., Parrillo, J., Mitchell, C., Strauss, S.E. (1984) Herpesvirus infections in the acquired immune deficiency syndrome. *JAMA*, 252:72-77.
303. Radwan, A.I., Crawford, T.B. (1974) The mechanism of neutralization of sensitized equine arteritis virus by complement components. *J. Gen. Virol.*, 25:229-237.
304. Raininko, R., Elovaara, I., Virta, A., Valanne, L., Haltia, M., Valle, S.L. (1992) Radiological study of the brain at various stages of human immunodeficiency virus infection: early development of brain atrophy. *Neuroradiology*, 34:190-196.
305. Ramón y Cajal, S. (1911) *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*. Vol. II. Paris, Maloine.
306. Ramón y Cajal, S., Castro, F. (1972) Métodos para la demostración de la morfología de las neuronas/procederes de Golgi y sus variantes. Em: *Elementos de Técnica Micrográfica del Sistema Nervioso* (2ª Ed.). Editor: Salvat, S.A. Mallorca. Barcelona. P:63-80.
307. Reboul, J., Schuller, E., Pialoux, G., Rey, M.A., Lebon, P., Allinquant, B., Brun-Vezinet, F. (1989) Immunoglobulins and complement components in 37 patients infected by HIV-1 virus: comparison of general (systemic) and intrathecal immunity. *J. Neurol. Sci.*, 89:243-252.
308. Rechsteiner, M. (1987) Ubiquitin-mediated pathways for intracellular proteolysis. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 3:1-30.
309. Regeur, L., Jensen, G.B., Pakkenberg, H., Evans, S.M., Pakkenberg, B. (1994) No global neocortical nerve cell loss in brains from patients with senile dementia of Alzheimer's type. *Neurobiol. Aging*, 15:347-352.
310. Reiber, H. (1980) The discrimination between different blood-CSF barrier dysfunctions and inflammatory reactions of the CNS by a recent evaluation graph for the protein profile of cerebrospinal fluid. *J. Neurol.*, 224:89-99.
311. Reiber, H. (1995) Cerebrospinal fluid analysis. *Lab. Med.*, 19:444-462.
312. Reiber, H. (1996) Evaluation of blood cerebrospinal fluid barrier function and quantification of the humoral immune response within the central nervous system. Em: *Cerebrospinal Fluid Analysis in Multiple Sclerosis*. Editores: Thompson, E.J., Trojano, M., Livrea, P. Milano, Springer-Verlag. P.51-72.
313. Rempel-Clover, N.L., Zola, S.M., Squire, L.R., Amaral, D.G. (1996) Three cases of enduring memory impairment after bilateral damage to the hippocampal formation. *J. Neurosci.*, 16:5233-5255.
314. Resnick, L., diMarzo-Veronese, F., Schupbach, J., Tourtellotte, W.W., Ho, D.D., Muller, F., Shapshak, P., Vogt, M., Groopman, J.E., Markham, P.D., Gallo, R.C. (1985) Intra-blood-brain-barrier synthesis of HTLV-III specific IgG in patients with neurologic symptoms associated with AIDS or AIDS-related complex. *N. Engl. J. Med.*, 313:1498-1504.
315. Resnick, L., Berger, J.R., Shapshak, P., Tourtellotte, W.W. (1988) Early penetration of the blood-brain-barrier by HIV. *Neurology*, 38:9-14.
316. Reyes, E., Mohar, A., Mallory, M., Miller, A., Masliah, E. (1994) Hippocampal involvement associated with human immunodeficiency virus encephalitis in Mexico. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 118:1130-1134.
317. Rieckmann, P., Weber, T., Felgenhauer, K. (1990) Class differentiation of immunoglobulin containing cerebrospinal fluid cells in inflammatory diseases of the central nervous system. *Klin. Wschr.*, 68:12-17.
318. Ringler, D.J., Hunt, R.D., Desrosiers, R.C., Daniel, M.D., Chalifoux, L.V., King, N.W. (1988) Simian immunodeficiency virus-induced meningoencephalitis: natural history and retrospective study. *Ann. Neurol.*, 23 (suppl.): S101-107.

319. Rudge, J.S., Alderson, R.F., Pasnikowski, E., McClain, J., Ip, N.Y., Lindsay, R.M. (1992) Expression of ciliary neurotrophic factor and neurotrophins - nerve growth factor, brain-derived neurotrophin factor and neurotrophin 3 - in cultured rat hippocampal astrocytes. *Eur. J. Neurosci.*, 4:459-471.
320. Sá, M.J., Silva, C.A., Cruz, C. (1986) Clinical and CSF cyto-proteic findings in 23 patients with CSF eosinophilia. *Acta Neurol. Scand.*, 73:279-282.
321. Sá, M.J., Madeira, M.D., Cruz, C., Paula-Barbosa, M.M. (1995) Morphometric study of the frontal cortex in subacute sclerosing panencephalitis. *Acta Neurol. Scand.*, 92:225-230.
322. Sá, M.J., Vaz, R., Cruz, C. (1995) Cerebrospinal fluid cytomorphologic findings in 41 intracranial tumors: a retrospective review. *Arq. Neuropsiquiatr.*, 53:218-226.
323. Sá, M.J., Pereira, A., Paula-Barbosa, M.M., Madeira, M.D. (1998) Anatomical asymmetries in the human hippocampal formation. *Acta Stereol. (no prelo)*.
324. Saag, M.S. (1994) Natural history of HIV-1 disease. Em: *Textbook of AIDS Medicine*. Editores: Broder, S., Merigan Jr., T.C., Bolognesi, D. New York, Williams and Wilkins. P.45-53.
325. Saito, Y., Sharer, L.R., Epstein, L.G., Michaels, J., Mintz, M., Louder, M., Golding, K., Cvetkovich, T.A., Blumberg, B.M. (1994) Overexpression of *nef* as a marker for restricted HIV-1 infection of astrocytes in postmortem pediatric central nervous system tissues. *Neurology*, 44:474-481.
326. Saraiva, A.A. (1986) O Córtex Pré-frontal na Doença de Alzheimer. Aspectos Morfológicos. Tese de Doutoramento. Faculdade de Medicina do Porto.
327. Sass, K.J., Sass, A., Westerveld, M., Lencz, T., Novelly, R.A., Kim, J.H., Spencer, D.D. (1992) Specificity in the correlation of verbal memory and hippocampal neuron loss: dissociation of memory, language, and verbal intellectual ability. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.*, 14:662-672.
328. Sayk, J. (1954) Ergebnisse neuer liquor-cytologischer Untersuchungen mit dem Sedimentier kammer-verfahren. *Arzt. Wschr.*, 9:1042.
329. Schadé, J.P., Baxter, C.F. (1960) Changes during growth in the volume and surface area of cortical neurons in the rabbit. *Exp. Neurol.*, 2:158-178.
330. Schaffer, K. (1892) Beitrag zur histologie der Ammonhorn-formation. *Arch. Mikr. Anat.*, 39:611-632.
331. Schinko, H., Tshabitscher, H. (1957) Der γ -quocient als ausdruck der relation liquor zu serum γ -globulin. *Wie. Klin. Wschr.*, 69:705-713.
332. Schmid, P., Conrad, A., Syndulko, K., Singer, E.J., Handley, D., Li, X., Tao, G., Fahy-Chandon, B., Tourtellotte, W.W. (1994) Quantifying HIV proviral DNA using the polymerase chain reaction on cerebrospinal fluid and blood of seropositive individuals with and without neurologic abnormalities. *J. Acq. Imm. Defic. Synd.*, 7:777-788.
333. Schmidt, R.M. (1987) *Der Liquor Cerebrospinalis*. Vol. 1 e 2. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag. P.1078.
334. Schmitt, F.A., Bigley, J.W., McKinnis, R., Logue, P.E., Evans, R.W., Drucker, J.L., and the AZT collaborative working group. (1988) Neuropsychological outcome of zidovudine (AZT) treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. *N. Engl. J. Med.*, 319:1573-1578.
335. Schultze, H.E., Heremans, J.F. (1966) *Molecular Biology of the Human Proteins*. Vol. I. Amsterdam, Elsevier. P.732-761.
336. Scoville, W.B., Milner, B. (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 20:11-21.
337. Segal, M. (1995) Dendritic spines for neuroprotection: a hypothesis. *Trends Neurosci.*, 18:468-471.
338. Seilhean, D., Duyckaerts, C., Vazeux, R., Bolgert, F., Brunet, P., Katlama, C., Gentilini, M., Hauw, J.J. (1993) HIV-1-associated cognitive/motor complex: absence of neuronal loss in the cerebral neocortex. *Neurology*, 43:1492-1499.
339. Seress, L., Ribak, C.E. (1983) GABAergic cells in the dentate gyrus appear to be local circuit and projection neurons. *Exp. Brain Res.*, 50:173-182.
340. Sharer, L.R. (1992) Pathology of HIV infection of the central nervous system: a review. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 51:3-11.

341. Sharer, L.R. (1994) Pathology of HIV-1 infection of the central nervous system. Em: HIV, AIDS and the Brain. Editores: Price, R.W., Perry, S.W. New York, Raven Press. P.133-145.
342. Sharer, L.R., Cho, E.S., Epstein, L.G. (1985) Multinucleated giant cells and HTLV-III in AIDS encephalopathy. *Hum. Pathol.*, 16:760.
343. Sharer, L.R., Baskin, G.B., Cho, E.-S., Murphey-Corb, M., Blumberg, B.M., Epstein, L.G. (1988) Comparison of simian immunodeficiency virus and human immunodeficiency virus encephalitides in the immature host. *Ann. Neurol.*, 23 (suppl.). S108-112.
344. Sharer, L.R., Saito, Y., Blumberg, B.M. (1997) Neuropathology of human immunodeficiency virus-1 infection of the brain. Em: AIDS and the Nervous System (2^a Ed.). Editores: Berger, J.R., Levy, R.M. Philadelphia, Lippincott-Raven. P.461-480.
345. Shaw, G.M., Harper, M.E., Hahn, B.H., Epstein, L.G., Gajdusek, D.C., Price, R.W., Navia, B.A., Petito, C.K., O'Hara, C.J., Groopman, J.E., Cho, E.S., Oleske, J.M., Wong-Staal, F., Gallo, R.C. (1985) HTLV-III infection in brains of children and adults with AIDS encephalopathy. *Science*, 227:177-181.
346. Shen, Y., Specht, S.M., De Saint Ghislain, I., Li, R. (1994) The hippocampus: a biological model for studying learning and memory. *Prog. Neurobiol.*, 44:485-496.
347. Shigeno, T., Mima, T., Takakura, K., Graham, D.I., Kato, G., Hashimoto, Y., Furukawa, S. (1991) Amelioration of delayed neuronal death in hippocampus by nerve growth factor. *J. Neurosci.*, 11:2914-2919.
348. Sidtis, J.J., Price, R.W. (1990) Early HIV-1 infection and the AIDS dementia complex. *Neurology*, 40:323-326.
349. Siegal, F.P., Lopez, C., Hammer, G.S., Brown, A.E., Kornfeld, S.J., Gold, J., Hassette, J., Hirschman, S.Z., Cunningham-Rundles, C., Adelsberg, B.R., Parham, D.M., Siegal, M., Cunningham-Rundles, S., Armstrong D. (1981) Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. *N. Engl. J. Med.*, 305:1439-1444.
350. Siegel, S. (1975) Estatística Não-Paramétrica (para as ciências do comportamento). São Paulo, McGraw-Hill. P.106-218.
351. Sigurdsson, B. (1954) Maedi, a slow progressive pneumonia of sheep: an epizootiological and a pathological study. *Br. Vet. J.*, 110:225-270.
352. Silva, C.A. (1978) Alterações electroforéticas das proteínas do líquido céfalo-raquidiano nas doenças inflamatórias do sistema nervoso central. *Rev. Port. Doenç. Infecç.*, 1:419-425.
353. Silva, C.A. (1986) Contribuição para o Estudo das Manifestações da Reacção Imunológica no Sistema Nervoso Central. Tese de Doutoramento. Faculdade de Medicina do Porto.
354. Silva, C.A., Sá, M.J. (1978) Electrophoretic pattern of cerebrospinal fluid proteins in non-neoplastic infantile hydrocephalus. *Acta Neurol. Scand.*, 57:317-328.
355. Silva, C.A., Sá, M.J., Cruz, C. (1976) Polineuropatia idiopática subaguda: apresentação de um caso com hiperproteinorraquia e globulina gama oligoclonal. *J. Méd.*, 90:109-114.
356. Silva, C.A., Sá, M.J., Cruz, C. (1977) Tetanus antibody production in serum and cerebrospinal fluid in the rabbit and correlated histopathological features in the central nervous system. *J. Neurol. Sci.*, 33:213-227.
357. Silva, C.A., Rio, M.E., Maia-Gonçalves, A., Pereira, S., Palmeira, M., Brito, R., Cruz, C. (1980) Oligoclonal gamma-globulin of cerebrospinal fluid in neurobrucellosis. *Acta Neurol. Scand.*, 61:42-48.
358. Silva, C.A., Rio, M.E., Cruz, C. (1981) Protein patterns of the cerebrospinal fluid of 30 patients with subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). *Acta Neurol. Scand.*, 63:255-266.
359. Silva, C.A., Rio, M.E., Cruz, C. (1985) Local immunoglobulin synthesis and blood-brain barrier assessment in subacute sclerosing panencephalitis. *Eur. Neurol.*, 24:128-133.
360. Silva, C.A., Rio, M.E., Cruz, C. (1986) Homeostatic mechanisms for CSF proteins in SSPE. Em: Subacute Sclerosing Panencephalitis: A Reappraisal. Editores: Bergamini, F., Defanti, C.A., Ferrante, P. Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division). P.357-359.

361. Simic, G., Kostovic, I., Winblad, B., Bogdanovic, N. (1997) Volume and number of neurons of the human hippocampal formation in normal ageing and Alzheimer's disease. *J. Comp. Neurol.*, 379:482-494.
362. Simpson, D.M., Wolfe, D.E. (1991) Neuromuscular complications of HIV infection and its treatment. *AIDS*, 5:917-926.
363. Simpson, D.M., Tagliatti, M. (1995) Nucleoside analogue-associated peripheral neuropathy in human immunodeficiency virus infection. *J. Acq. Imm. Defic. Synd. Hum. Retrovir.* 9:153-161.
364. Singer, E.J., Syndulko, K., Tourtellotte, W.W. (1997) Neurodiagnostic testing in human immunodeficiency virus infection (cerebrospinal fluid). Em: *AIDS and the Nervous System* (2ª Ed.) Editores: Berger, J.R., Levy, R.M. Philadelphia, Lippincot-Raven. P.255-278.
365. Sloviter, R.S. (1987) Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science*, 235:73-76.
366. Sloviter, R.S., Nilaver, G. (1987) Immunocytochemical localization of GABA-, cholecystokinin-, vasoactive intestinal polypeptide-, and somatostatin-like immunoreactivity in the area dentata and hippocampus of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 256:42-60.
367. Snider, W.D., Simpson, D.M., Nielsen, S., Gold, J.W.M., Metroka, C.E., Posner, J.B. (1983) Neurological complications of acquired immune deficiency syndrome: analysis of 50 patients. *Ann. Neurol.*, 14:403-418.
368. Sonigo, P., Alizon, M., Staskus, K., Klatzmann, D., Cole, S., Danos, O., Retzel, E., Tiollais, P., Haase, A., Wain-Hobson, S. (1985) Nucleotide sequence of visna lentivirus: relationship to the AIDS virus. *Cell*, 42:369-382.
369. Sotrel, A., Paskevich, P.A., Kiely, D.K., Bird, E.D., Williams, R.S., Myers, R.H. (1991) Morphometric analysis of the prefrontal cortex in Huntington's disease. *Neurology*, 41:1117-1123.
370. Spargo, E., Everall, I.P., Lantos, P.L. (1993) Neuronal loss in the hippocampus in Huntington's disease: a comparison with HIV infection. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 56:487-491.
371. Spina-França, A., Livramento, J.A., Machado, L.R., Bacheschi, L.A., Nóbrega, J.P.S. (1987) Líquido cefalorraqueano na síndrome de imunodeficiência adquirida. Análise de 50 casos. *Arq. Neuropsiquiatr.*, 45:412-418.
372. Squire, L.R. (1986) Mechanisms of memory. *Science*, 232:1612-1619.
373. Sterio, D.C. (1984) The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J. Microsc.*, 134:127-136.
374. Steward, O., Scoville, S.A. (1976) Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 169:347-370.
375. Stoner, G.L., Ryschkewitsch, C.F., Walker, D.L., Webster, H.D. (1986) JC papovavirus large tumor (T)-antigen expression in brain tissue of acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and non-AIDS patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 23:2271-2275.
376. Swaab, D.F., Hofman, M.A., Lucassen, P.J., Salehi, A., Uylings, H.B.M. (1994) Neuronal atrophy, not cell death, is the main hallmark of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, 15:369-371.
377. Takahashi, K., Wesselingh, S.L., Griffin, D.E., McArthur, J.C., Johnson, R.T., Glass, J.D. (1996) Localization of HIV in human brain using polymerase chain reaction *in situ* hybridization and immunocytochemistry. *Ann. Neurol.*, 39:705-711.
378. Tavares, M.A., Paula-Barbosa, M.M. (1982) Alterações neuronais no córtex cerebral no alcoolismo crônico. Estudo com o método de Golgi em material de autópsia. *O Médico*, 102:107-113.
379. Tavares, M.A., Paula-Barbosa, M.M., Pontes, C., Saraiva, A.A. (1981) Cortical dendritic abnormalities in three patients with Alzheimer's disease. A Golgi study. *Morfologia Normal e Patológica*, 5:81-86.
380. Tavares, M.A., Paula-Barbosa, M.M., Gray, E.G. (1983) Dendritic spine plasticity and chronic alcoholism in rats. *Neurosci. Lett.*, 42:235-238.

381. Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., Katzman, R. (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.*, 30:572-580.
382. Teyler, T.J. (1985) The role of hippocampus in memory: a hypothesis. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 9:377-389.
383. Teyler, T.J., DiScenna, P. (1986) The hippocampal memory indexing theory. *Behav. Neurosci.*, 100:147-154.
384. Thiel, G. (1993) Synapsin I, synapsin II and synaptophysin: marker proteins of synaptic vesicles. *Brain Pathol.*, 3:87-95.
385. Thoenen, H. (1991) The changing scene of neurotrophic factors. *Trends Neurosci.* 14:165-170.
386. Thompson, E.J. (1995) Cerebrospinal fluid. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 59:349-357.
387. Tourtellotte, W.W., Walsh, M.J. (1984) Cerebrospinal fluid profile in multiple sclerosis. Em: *The Diagnosis of Multiple Sclerosis*. Editores: Poser, C.M., Paty, D.W., Scheinberg, L. New York, Thieme-Stratton Inc. P.165-178.
388. Tracey, I., Carr, C.A., Guimarães, A.R., Worth, J.L., Nacia, B.A., Gonzalez, R.G. (1996) Brain choline-containing compounds are elevated in HIV-positive patients before the onset of AIDS dementia complex. *Neurology*, 46:783-788.
389. Trommald, M., Jensen, V., Andersen, P. (1995) Analysis of dendritic spines in the rat CA1 pyramidal cells intracellularly filled with a fluorescent dye. *J. Comp. Neurol.*, 353:260-274.
390. Trotter, J.L., Rust, R.S. (1989) Human cerebrospinal fluid immunology. Em: *The Cerebrospinal Fluid*. Editores: Herndon, R.M., Brumback, R.A. Boston, Kluwer Academic Publishers. P.179-226.
391. Tucker, T. (1989) Central nervous system AIDS. *J. Neurol. Sci.*, 89:119-133.
392. Tyor, W.R. (1997) Fundamentals of immunology. Em: *Neuroimmunology for the Clinician*. Editores: Rolak, L.A., Harati, Y. Washington, Butterworth-Heinemann. P.3-33.
393. Tyor, W.R., Glass, J.D., Griffin, J.W., Becker, P.S., McArthur, J.C., Bezman, L., Griffin, D.E. (1992) Cytokine expression in the brain during the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Neurol.*, 31:349-360.
394. Uemura, E., Carriquiry, A., Kliemann, W., Goodwin, J. (1995) Mathematical modeling of dendritic growth in vitro. *Brain Res.*, 671:187-194.
395. Uylings, H.B.M., Ruiz-Marcos, A., Van Pelt, J. (1986) The metric analysis of three-dimensional dendritic tree patterns: a methodological review. *J. Neurosci. Methods*, 18:127-151.
396. Uylings, H.B.M., Van Eden, C.G., Hofman, M.A. (1986) Morphometry of size/volume variables and comparison of their bivariate relations in the nervous system under different conditions. *J. Neurosci. Methods.*, 18:19-37.
397. Van Wielink, G., McArthur, J.C., Moench, T., Farzadegan, H., McArthur, J.H., Johnson, R., T., Saah, A. (1990) Intrathecal synthesis of anti-HIV IgG: correlation with increasing duration of HIV1 infection. *Neurology*, 40:816-819.
398. Vardtal, F., Vandvik, B., Michaelsen, T.E., Loe, K., Norrby, E. (1982) Neurosyphilis: intrathecal synthesis of oligoclonal antibodies to *Treponema pallidum*. *Ann. Neurol.*, 11:35-40.
399. Victor, M., Agamanolis, D. (1990) Amnesia due to lesions confined to the hippocampus: a clinical-pathologic study. *J. Cogn. Neurosci.*, 2:246-257.
400. Vieira, S., Sá, M.J., Silva, C.A. (1987) Neurosífilis - aspectos clínicos e laboratoriais de 13 casos. *J. Méd.*, 123:687-691.
401. Walsh, M.J., Tourtellotte, W.W., Potvin, A.R., Potvin, J.H. (1983) The cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. Em: *Multiple Sclerosis: Pathology, Diagnosis and Management*. Editores: Hallpike, J.F., Adams, C.W., Tourtellotte, W.W. Baltimore, Williams and Wilkins. P.275-358.
402. Weber, T., Beck, R., Stark, E., Gerhards, J., Korn, K., Haas, J., Luer, W., Jahn, G. (1994) Comparative analysis of intrathecal antibody synthesis and DNA amplification for the diagnosis of cytomegalovirus infection of the central nervous system in AIDS patients. *J. Neurol.*, 241:407-414.
403. Weis, S., Haug, H., Budka, H. (1993) Neuronal damage in the cerebral cortex of AIDS brains: a morphometric study. *Acta Neuropathol.*, 85:185-189.
404. Weiss, R.A. (1993) How does HIV cause AIDS? *Science*, 260:1283-1289.

405. Weiss, R.A. (1994) The virus and its target cells. Em: Textbook of AIDS Medicine. Editores: Broder, S., Merigan Jr., T.C., Bolognesi, D. New York, Williams and Wilkins. P.15-20.
406. West, M.J. (1990) Stereological studies of the hippocampus: a comparison of the hippocampal subdivisions of diverse species including hedgehogs, laboratory rodents, wild mice and men. Em: Understanding the Brain Through the Hippocampus. Editores: Storm-Mathisen, J., Zimmer, J., Ottersen, O.P. Progress in brain research. Vol. 83. Amsterdam, Elsevier. P.13-36.
407. West M.J. (1993) Regionally specific loss of neurons in the aging human hippocampus. *Neurobiol. Aging.*, 14:287-293.
408. West, M.J., Gundersen, H.J.G. (1990) Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J. Comp. Neurol.*, 296:1-22.
409. West, M.J., Slomianska, L., Gundersen, H.J.G. (1991) Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat. Rec.*, 231:482-497.
410. West, M.J., Coleman, P.D., Flood, D.G., Troncoso, J.C. (1994) Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet*, 344:769-772.
411. West, M.J., Ostergaard, K., Andreassen, O.A., Finsen B. (1996) Estimation of the number of somatostatin neurons in the striatum: an *in situ* hybridization study using the optical fractionator method. *J. Comp. Neurol.*, 370:11-22.
412. White, M.H., Armstrong, D. (1994) Cryptococcosis. *Infect. Dis. Clin. North. Am.*, 8: 383-398.
413. Whitehouse, P.J. (1986) The concept of subcortical and cortical dementia: another look. *Ann. Neurol.*, 19:1-6.
414. Whiteman, M.L., Post, M.J., Sklar, E.M. (1997) Neuroimaging of acquired immunodeficiency syndrome. Em: AIDS and the Nervous System (2^a Ed.) Editores: Berger, J.R, Levy, R.M. Philadelphia, Lippincot-Raven. P.297-382.
415. Wiley, C.A., Schrier, R.D., Nelson, J.A., Lampert, P.W., Oldstone, M.A.B. (1986) Cellular localization of human immunodeficiency virus infection within the brains of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:7089-7093.
416. Wiley, C.A., Masliah, E., Morey, M. Lemere, C., DeTeresa, R.D., Grafe, M., Hansen, L., Terry, R. (1991) Neocortical damage during HIV Infection. *Ann. Neurol.*, 29:651-657.
417. Witter, M.P., Griffioen, A. W., Jorritsma-Byham, B., Krijnen, J.L.M. (1988) Entorhinal projections to the hippocampal CA1 region in the rat: an underestimated pathway. *Neurosci.Lett.*, 85:193-198.
418. Wladislavosky-Waserman, P., Frigas, E. (1982) Algunas funciones del eosinófilo en la enfermedad. *Rev. Invest. Clín.*, 34:361-367.
419. Wong-Staal, F., Gallo, R.C. (1985) Human T-lymphotropic retroviruses. *Nature*, 317:395-403.
420. Woodson, W., Nitecka, L., Ben-Ari, Y. (1989) Organization of the GABAergic system in the rat hippocampal formation: a quantitative immunocytochemical study. *J. Comp. Neurol.*, 280:254-271.
421. Yeckel, M.F., Barrionuevo, G., Berger, T.W. (1988) In vivo electrophysiological evidence for monosynaptic input from the entorhinal cortex to pyramidal cell regions of the hippocampus. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 14:246.
422. Yoshida, K., Gage, F.H. (1991) Fibroblast growth factors stimulate nerve growth factor synthesis and secretion by astrocytes. *Brain Res.*, 538:118-126.
423. Zhu, T., Korber, B.T., Nahmias, A.J., Hooper, E., Sharp, P.M., Ho, D.D. (1998) An african HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature*, 391:594-597.
424. Zimmer, J., Laurberg, S., Sunde, N. (1983) Neuroanatomical aspects of normal and transplanted hippocampal tissue. Em: Neurobiology of the Hippocampus. Editor: Seifert, W.E. New York, Academic Press. P.39-64.
425. Zola-Morgan, Squire, L.R., Amaral, D.G. (1986) Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J. Neurosci.*, 6:2950-2967.
426. Zuger, A., Louie, E., Holzman, R.S., Simberkoff, M.S., Rahal, J.J. (1986) Cryptococcal disease in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Diagnostic features and outcome of treatment. *Ann. Intern. Med.*, 104:234-240.