

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM HORMÔNIO CORTICOSTERÓIDE SOBRE A SENSIBILIDADE DO CÃO À INFECÇÃO EXPERIMENTAL, VIA INTRAMUSCULAR, COM VÍRUS RÁBICO DE "RUA"¹

SÍLVIO ARRUDA VASCONCELLOS
Professor Assistente Doutor,
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da USP

FUMIO HONMA ITO
Professor Assistente Doutor
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da USP

JOSÉ DE ANGELIS CÔRTEZ
Professor Titular
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da USP

VASCONCELLOS, S.A.; ITO, F.H.; CÔRTEZ, J.A. Influência do tratamento com hormônio corticosteróide sobre a sensibilidade do cão à infecção experimental, via intramuscular, com vírus rábico de "rua". *Rev.Fac.Med.vet.Zootec.Univ.S.Paulo*, 21(1):51-56, 1984.

RESUMO: De 16 cães adultos experimentalmente infectados com o vírus rábico de "rua", via intramuscular, nove receberam hormônio corticosteróide e sete constituíram o grupo controle, sem tratamento hormonal. A dosificação de hormônio consistiu da aplicação diária de 25 miligramas de acetato de delta hidrocortisona em suspensão, via subcutânea, por animal, nos três dias que antecederam e por ocasião da inoculação do vírus. Após um período de observação variável entre 13 e 23 dias da inoculação do vírus, sete dos nove animais do grupo que recebeu hormônio sucumbiram em consequência da raiva, a qual foi confirmada através das provas de imunofluorescência direta e de inoculação intracerebral em camundongos, enquanto que apenas um dos sete animais do grupo controle, manifestou a doença. Decorrido um período de observação variável entre 38 e 88 dias após a inoculação viral, os oito animais remanescentes, dois dos quais tratados com corticosteróide e seis do grupo controle, não apresentaram sinais da raiva e foram sacrificados, mostrando-se negativos nos exames laboratoriais para diagnóstico da raiva, realizados após o sacrifício. A análise estatística dos resultados obtidos revelou que o número de animais mortos em consequência da raiva, durante os períodos de observação adotados, foi significativamente maior para o grupo que recebeu hormônio ($p < 0,05$).

UNITERMOS: Corticosteróides*, Imunossuppressores*, Raiva, cães*

INTRODUÇÃO

Dentre os diferentes métodos disponíveis para o estudo das relações intrínsecas estabelecidas entre parasita e hospedeiro, constata-se crescente interesse pelo emprego de agentes indutores de imunossupressão¹¹, como também pelo desenvolvimento de linhagens de animais naturalmente imunodeficientes¹⁰.

Os hormônios corticosteróides apresentam a capacidade de suprimir tanto a resposta inflamatória inespecífica, como também os processos imunológicos específicos^{4,8}. Esta atividade é atribuída a diversos mecanismos: redução do número de linfócitos e de monócitos, inibição da diapedese de todas as células inflamatórias, alteração da atividade vascular⁴, bloqueio das funções fagocíticas dos macrófagos², ação tóxica sobre as células linfóides, particularmente no timo²², estabilização das membranas dos lisossomos das células imunocompetentes, com consequente alteração do processamento dos antígenos^{21,22} e capacidade de tomar os macrófagos insensíveis ao estímulo das linfocinas²².

Em diferentes espécies de animais infectados experimentalmente com o vírus da raiva: comundongos^{3,5,6}, coelhos²⁴, cobaios^{7,17,18}, hamsters^{7,16,25}, ratos⁷ e gatos²⁵, a administração de hormônio corticosteróide ou adrenocorticotrófico provocou efeitos diversos, conforme a via de aplicação do vírus e o esquema de dosificação do hormônio.

Quando o vírus foi administrado pela via intracerebral^{3,5,24}, o tratamento hormonal não alterou o número de animais mortos em consequência da raiva, no entanto, o emprego de doses diárias de hormônio adrenocorticotrófico a partir da inoculação viral, determinou uma diminuição no período de incubação e um aumento na duração da fase clínica da doença⁵. Quando o vírus foi aplicado pelas vias intraperitoneal³, intramuscular^{6,7,16,17,18} e oral^{19,25}, nos grupos de animais submetidos à aplicação de hormônio corticosteróide ou adrenocorticotrófico, constatou-se: menor duração da fase clínica da doença³, aumento do número de animais mortos em consequência da raiva^{6,7,25}, interferência sobre a distribuição do vírus em diferentes tecidos e humores¹⁶ e ativação de infecção, tida como latente, meses após a aplicação do vírus^{17,18,19}.

O cão doméstico é catalogado como animal moderadamente sensível à infecção rábica¹³, sendo muito mais resistente que a raposa, o coiote, o chacal e o lobo e mais sensível que o gambá^{13,21}. Quanto à influência da faixa etária sobre a sensibilidade à infecção pelo vírus rábico, verifica-se que entre os cães, como também em outras espécies de animais, os indivíduos jovens mostram-se mais sensíveis que os adultos²¹.

Em cães tratados com vírus rábico avianizado, amostra Flury de baixa passagem em ovo embrionado, a administração de hormônio corticosteróide não induziu o aparecimento da raiva⁷, no entanto, não são disponíveis investigações sobre o efeito do tratamento com corticosteróide em cães, experimentalmente infectados, via intramuscular, com vírus rábico de "rua", o que constitui o objetivo do presen-

¹ Trabalho apresentado durante a 1., SEMANA DE VETERINÁRIA da FMVZ/USP. São Paulo, 1982.

te trabalho.

As hipóteses estabelecidas foram as seguintes:

Hipótese de nulidade: o número de cães experimentalmente infectados com vírus rábico, via intramuscular, que venha a sucumbir em consequência da raiva, independe dos animais terem sofrido tratamento com hormônio corticosteróide;

Hipótese alternativa: o número de cães experimentalmente infectados com vírus rábico, via intramuscular, que venha a sucumbir em consequência da raiva é maior entre os tratados com hormônio corticosteróide.

O nível de significância estabelecido para a rejeição da hipótese de nulidade foi de 0,05.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 16 cães sem raça definida, com peso vivo aproximado de oito a dez quilos e idade compreendida entre 12 e 24 meses, criados em condições de isolamento a partir do segundo mês de vida. Estes animais foram divididos, aleatoriamente, em dois grupos experimentais A e B, respectivamente com sete e nove indivíduos.

O sistema biológico empregado para a titulação de vírus e confirmação do diagnóstico da raiva nos materiais colhidos "post mortem", foi representado por comundongos albinos suíços, com peso variando entre 12 e 15 gramas, distribuídos em grupos de oito a dez indivíduos.

O vírus utilizado na infecção experimental consistiu de uma suspensão a 20% (peso/volume) de glândula salivar de cão naturalmente infectado com vírus da raiva, tipificada pela prova de soroneutralização⁹. O preparo e a conservação da suspensão viral seguiram procedimentos referidos por VASCONCELLOS et alii²³. O título infectante deste inóculo efetivado em comundongos apresentou, nos diferentes grupos de cães trabalhados, um valor médio de $10^{2,90} \text{DL}_{50}/0,03$ mililitros.

O diluente empregado no preparo das suspensões de tecido consistiu de água destilada com 2% de soro equino normal, previamente inativado por 30 minutos a 56°C e antibióticos, sendo 1000 unidades de penicilina G potássica e 1,25 miligramas de sulfato de estreptomicina por mililitro.

O tratamento com hormônio corticosteróide foi realizado com a administração, via sub-cutânea, de uma dose diária de 1,0 mililitro de acetato de delta hidrocortisona em suspensão a 2,5% *, por animal, nos três dias que ante-

cederam e por ocasião da inoculação do vírus rábico. Os nove animais do grupo B foram submetidos ao tratamento hormonal e sete outros do grupo A constituíram o grupo controle não tratado.

A aplicação de vírus rábico foi efetuada via intramuscular em uma dose de 5,0 mililitros por animal, distribuídos conforme o seguinte: 2,0 mililitros em cinco pontos ao longo de uma linha imaginária situada entre as tuberosidades coxais, 2,0 mililitros em quatro pontos na região da cernelha e 0,5 mililitros entre as falanges de cada um dos membros posteriores.

A partir da aplicação de vírus os animais foram mantidos em jaulas individuais, verificando-se diariamente a ocorrência de sinais clínicos sugestivos da raiva. Os cães que apresentaram sintomas de raiva foram observados até à morte natural. Nos animais em que não se constatou sinal clínico de raiva, o sacrifício foi realizado após um espaço de tempo variável de 38 a 88 dias da inoculação viral.

Os animais mortos naturalmente e aqueles sacrificados foram necropsiados, colhendo-se fragmentos de sistema nervoso central, os quais foram submetidos às provas usuais para diagnóstico laboratorial da raiva⁹ — reação de imunofluorescência direta aplicada à raiva e técnica de inoculação intracerebral em camundongos.

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada pelo teste exato de FISHER, segundo SIEGEL¹⁵.

RESULTADOS

Os resultados obtidos estão condensados nas tabelas apresentadas a seguir.

Na Tab. 1 apresenta-se conforme o número de identificação do animal, a condição de ter sido tratado ou não com hormônio corticosteróide, a duração do período de observação, a condição do óbito, e o resultado das provas para diagnóstico da raiva, realizadas "post mortem".

A observação desta tabela revela que após um período de tempo compreendido entre 13 e 23 dias de inoculação experimental com vírus rábico, sete dos nove animais do tratamento B sucumbiram em consequência da raiva; os outros dois animais deste grupo não apresentaram qualquer alteração clínica até o 46º dia pós-inoculação, ocasião em que foram sacrificados, apresentando resultado negativo nos exames laboratoriais para diagnóstico da raiva. Relativamente ao grupo controle (tratamento A), apenas o cão de número 6 morreu em consequência da raiva, 21 dias após a inoculação experimental do vírus. Os demais integrantes deste grupo foram sacrificados em períodos de tempo

* Hidrocortancil suspensão injetável 2,5% — Laboratório Silva Araújo Roussel S.A.

pós-inoculação, variáveis entre 38 a 88 dias, apresentando em todos os casos resultados negativos nas provas laboratoriais para diagnóstico da raiva, realizadas após a morte.

Na Tab. 2 os animais trabalhados são classificados simultaneamente segundo a condição de receberem ou não tratamento com hormônio corticosteróide e o resultado dos exames laboratoriais para raiva, realizados após a morte.

A análise estatística dos valores observados na Tab. 2, pelo teste de duas proporções para populações independentes — Teste exato de FISHER, segundo SIEGEL¹⁵ — leva à rejeição da hipótese de nulidade para um nível de significância de 0,05. Aceita-se, portanto, a hipótese alternativa, segundo a qual a proporção de animais mortos em consequência da raiva foi superior no grupo tratado com hormô-

TABELA 1 — Cães experimentalmente infectados com vírus rábico de "rua", via intramuscular, segundo o tratamento, a duração do período de observação expresso em dias, a condição do óbito e o resultado do exame para diagnóstico da raiva. São Paulo, 1984.

Tratamento	Nº do Animal	Período de observação (dias)	Condição do óbito	Resultado Provas diagnóstico raiva
	10	20	Nat.	Positivo
	11	19	Nat.	Positivo
	12	23	Nat.	Positivo
	13	22	Nat.	Positivo
	14	46	Sacr.	Negativo
B	15	46	Sacr.	Negativo
	16	13	Nat.	Positivo
	17	14	Nat.	Positivo
	19	17	Nat.	Positivo
	06	21	Nat.	Positivo
	07	44	Sacr.	Negativo
	08	88	Sacr.	Negativo
A	09	74	Sacr.	Negativo
	20	55	Sacr.	Negativo
	21	38	Sacr.	Negativo
	22	55	Sacr.	Negativo

B= grupo que recebeu hormônio corticosteróide.

A= grupo controle sem hormônio corticosteróide.

Nat. = óbito natural

Sacr. = óbito por sacrifício

QUADRO 1 — Antígenos utilizados na reação de soroaglutinação microscópica, segundo o sorogrupo, sorotipo e cepa de origem.

SOROGRUPO	SOROTIPO	CÊPA DE ORIGEM
Icterohaemorrhagiae	icterohaemorrhagiae	RGA
Icterohaemorrhagiae	copenhageni	M20
Canicola	canicola	Hond Utrecht IV
Pomona	pomona	Pomona
Grippotyphosa	grippotyphosa	Moskva V
Tarassovi	tarassovi	Perepelicin
Australis	australis	Ballico
Bataviae	bataviae	Van tinem
Ballum	castellonis	Castéllon 3
Hebdomadis	wolffi	3705
Panama	panama	CZ 214 K
Pyrogenes	pyrogenes	Salinem
Javanica	javanica	Veldrat bataviae 46
Autumnalis	autumnalis	Akiyami A
Cynopteri	butembo	Butembo
Andamana	andamana	CH 11
Shermani	shermani	LT 821
Celledoni	whitcombi	Whitcomb

nio corticosteróide.

DISCUSSÃO

Após um período de observação médio de 19 dias, a partir da inoculação experimental com vírus rábico de "rua", via intramuscular, sete dos nove animais do grupo B, tratados com hormônio corticosteróide, adoeceram e vieram a sucumbir em consequência da raiva. No mesmo período, apenas um dos sete animais do grupo A (controle) contraiu a doença, vindo conseqüentemente a sucumbir. Decorrido um período de observação médio de 56 dias, a partir de aplicação do vírus, os oito animais restantes, dois dos quais do grupo B e portanto tratados com hormônio corticosteróide, e seis do grupo A (controle), não apresentaram sinais clínicos da raiva e foram sacrificados, sendo negativos os resultados dos exames laboratoriais para diagnóstico da raiva, realizados após o sacrifício.

O período de incubação da raiva canina apresenta valores médios situados entre 21 a 56 dias^{20,21}. Admite-se que as causas responsáveis pela duração do espaço de tempo compreendido entre a exposição e o início da sintomatologia da raiva sejam as seguintes: a amostra de vírus e a dose infectante, o grau de inervação do local da mordedura, sua profundidade e extensão e também a distância entre a região de penetração do vírus e o sistema nervoso central^{13,20}.

Considerando-se que no presente trabalho, todos os animais eram adultos, estavam livres de imunidade específi-

ca contra o vírus da raiva, foi utilizada a mesma amostra de vírus, com aproximadamente a mesma dose infectante segundo idêntica sistemática, é lícito supor-se que o período de incubação devesse ter sido próximo em todos os animais.

No entanto, constatou-se que em oito animais, dos quais apenas dois tratados com corticosteróide, não foi observado sinal clínico da raiva, como também não se demonstrou a presença do vírus nos materiais colhidos após a morte, mesmo após um prazo de tempo de aproximadamente o dobro utilizado para a observação dos animais com óbito em consequência da raiva.

Deste modo, embora não seja possível excluir-se a possibilidade de que alguns dos animais negativos ainda viessem a manifestar a raiva, pode-se concluir que o tratamento hormonal com corticosteróide foi pelo menos responsável pela diminuição do período de incubação da doença.

Saliente-se que a probabilidade calculada pelo teste de FISHER¹⁵, de que a diferença entre as proporções 7/9 (77,77%) e 1/7 (14,28%), representando respectivamente os valores observados para casos de raiva entre os tratados por corticosteróide e casos de raiva entre os não tratados por corticosteróide, ser obra do acaso é de 2,0%, restando por-

tanto, 98,0% de oportunidade que a causa seja realmente o tratamento hormonal.

A marcante atuação dos hormônios corticosteróides sobre o número de animais mortos em consequência da raiva contraída experimentalmente via periférica, foi também verificada por ENRIGHT et alii⁶, em camundongos, quando do emprego de baixas doses de vírus, sendo no entanto ine-

xistente quando da utilização de doses elevadas. Com base nesta constatação pode-se aventar que na presente investigação as doses de vírus utilizadas tenham variado dentro de faixa que permitisse a clara evidênciação da ação hormonal sobre o estabelecimento da doença.

Com base no conhecimento da ocorrência de um aumento fisiológico nas concentrações de esteróides endógenos quando da exposição de animais a condições ambientais de desconforto, competição e tensão²², pode-se aventar que tais situações contribuam para a manifestação da raiva natural. De fato a existência de efeito sinérgico sobre a sensibilidade de animais de laboratório à infecção pelo vírus da raiva, quando privados de água ou alimentos, bem como se submetidos a baixas temperaturas, foi experimentalmente comprovada¹.

Tendo em vista que os hormônios corticosteróides afetam a atividade dos diferentes mecanismos de defesa orgânica, tanto nos processos específicos como naqueles não específicos^{8,12,14}, os resultados obtidos permitem a conclusão de que, nas condições do presente estudo, a administração de hormônio corticosteróide influenciou o estabelecimento da raiva em cães experimentalmente inoculados,

via intramuscular, com vírus rábico de "rua".

VASCONCELLOS, S.A.; ITO, F.H.; CÔRTEZ, J.A. The effect of corticosteroid administration in dogs experimentally infected with street rabies virus through the intramuscular rout. *Rev. Fac.Med.vet.Zootec.Univ.S.Paulo*, 21(1):51-56, 1984.

SUMMARY: Sixteen dogs (1-2 years old and 8-10 kg) were used. Nine of them were individually treated with 25 milligrams/day of hydrocortison acetate through the subcutaneous route three days before and on the day of rabies virus inoculation. Seven dogs were used as controls being not treated with hormone. Results showed that eight animals presented signs of rabies and died from 13 to 23 days after challenge, all of them were positive for rabies tested by the immunofluorescence and mouse inoculation tests; only one of these dogs belonged to the control group. The remaining eight animals without signs of the disease (six of them not treated with hormone), were sacrificed from 38 to 88 days after the virus challenge being observed that they were negative for the same rabies laboratory tests described above. Thus the number of dogs positive for rabies were significantly higher in animals treated with corticosteroid hormone.

UNITERMS: Corticosteroids*, Dogs; Immunosuppressive agents*, Rabies*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - BACZYUSKI, Z. Effect of non specific factors on the course of fixed rabies virus infection. I. Inadequate supply of drinking water. II. Starvation. III. Cold. *Pol. Arch. weteryn.*, 20: 33-53, 1977.
- 2 - BIER, O.G.; MOTA, I.; SILVA, W.D.; VAZ, N.M. *Imunologia básica e aplicada*. 2.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1977. 383p.
- 3 - BRYGOO, E.R. & DODIN, A. Action de la cortisone sur l'évolution de la rage chez la souris. *Ann. Inst. Pasteur*, 92: 282-6, 1957.
- 4 - CASEY, W.J. & McCALL, C.E. Suppression of the cellular interactions of delayed hypersensitivity by corticosteroid. *Immunology*, 21: 225-31, 1971.
- 5 - COLOSI, A.D. Modification del "test" biologico y su utilidad en el diagnostico de rabia. *Rev. Med. vet.*, Buenos Aires, 42: 117-26, 1961.
- 6 - ENRIGHT, J.B.; FRANTI, C.E.; FRYE, F.L.; BEHYMER, D.E. The effects of corticosteroids on rabies in mice. *Canad. J. Microbiol.*, 16: 667-75, 1970.
- 7 - ENRIGHT, J.B.; GOGGIN, J.E.; FRYE, F.L. FRANTI, C.E.; BEHYMER, D.E. Effects of corticosteroids on rabies virus infectious in various animal species. *J. Amer.vet. med. Ass.*, 156:765-9, 1970.
- 8 - GABRIELSEN, A.E. & GOOD, R.A. Chemical suppression of adaptative immunity. *Advanc. Immunol.*, 7:91-229, 1967.
- 9 - KAPLAN, M.M. & KOPROWSKI, H. *La rabia: técnicas de laboratório*. 3.ed. Ginebra, Organizacion Mundial de la Salud, 1976. 389p. (Serie de monografias, 23)
- 10 - KAPLAN, M.M.; WIKTOR, T.J.; KOPROWSKI, H.

- Pathogenesis of rabies in immunodeficient mice. *J. Immunol.*, 114: 1761-5, 1975.
- 11 – NATHANSON, N. & COLE, G.A. Immunosuppression and experimental virus infection of the nervous system. *Advanc. Virus Research*, 16: 397-448, 1970.
- 12 – NORTH, R.J. The action of cortisone acetate on cell mediated immunity to infection. *J. exp. Med.*, 134: 1485-1500, 1971.
- 13 – ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. *Comite de expertos de la O.M.S. en rabia. 6. informe. Ginebra, 1973. 56p. (Serie de informes técnicos, 523)*
- 14 – RYTEL, M.W. & KILBOURNE, E. The influence of cortisone on experimental viral infection. VIII. Suppression by cortisone of interferon formation in mice infected with Newcastle disease virus. *J. exp. Med.*, 123: 767-75, 1966.
- 15 – SIEGEL, S. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences.* New York, Mc Graw Hill, 1956. 312p.
- 16 – SIMS, R.A.; ALLEN, R.; SULKIN, S.E. Influence of lipogenesis on growth of rabies virus in brown adipose tissue of experimentally infected hamsters. *J. Infect. Dis.*, 117: 360-70, 1967.
- 17 – SOAVE, O.A. Reactivation of rabies virus in a guinea pig with adrenocorticotropic hormone. *J. Infect. Dis.*, 110: 129-31, 1962.
- 18 – SOAVE, O.A.; JOHNSON, H.N.; NAKAMURA, K. Reactivation of rabies virus infection with adrenocorticotropic hormones. *Science*, 133: 1360-1, 1961.
- 19 – SVRCEK, S. & VRTIAK, O.J. Peroral infection in lyssa. II. The activation of latent infection by the administration of hydrocortison. *Folia vet.*, 14(3/4): 51-6, 1971.
- 20 – TIERKEL, E.S. Neurotropic viral diseases. Rabies. In: VAN DER HOEDEN, J. *Zoonoses.* Amsterdam, Elsevier, 1964. p.313-45.
- 21 – TIERKEL, E.S. Canine rabies. In: BAER, G.M. *The natural history of rabies.* New York, Academic Press, 1975. p.123-36, v.2.
- 22 – TIZARD, E.R. *An introduction to veterinary immunology.* Philadelphia, W.B. Saunders, 1977. 367p.
- 23 – VASCONCELLOS, S.A.; CORTES, J.A.; NILSSON, M.R.; ITO, F.H.; ENRIQUEZ ROZAS, C.E. Diagnóstico "in vivo" da raiva em cães experimentalmente infectados. Emprego do teste de córnea e isolamento de vírus por inoculação intracerebral de saliva em camundongos. *Rev.Fac. Med.vet.Zootec.Univ.S.Paulo*, 15:75-86, 1978.
- 24 – VEERARAGHAVAN, N. & BALASUBRAMANIAN, A. A note on the action of ACTH in rabies. *Ind.Jour.med.Res.*, 42: 9-12, 1954.
- 25 – VRTIAK, O.J. & SVRCEK, S. Peroral infection in lyssa. I. The influence of the scarification of the mucous membrane of the oral cavity and the administration of hydrocortison on the origination of the clinical forms of lyssa. *Folia vet.*, 14(3/4): 43-50, 1970.

Recebido para publicação em: 27/01/84
Aprovado para publicação em: 20/06/84