

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

Avaliação da atividade antiviral do peptídeo P34 e moléculas da classe da 4-tiazolidinona frente a vírus de importância veterinária

Clarissa Caetano de Castro

Pelotas, 2016

Clarissa Caetano de Castro

Avaliação da atividade antiviral do peptídeo P34 e moléculas da classe da 4-tiazolidinona frente a vírus de importância veterinária

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Silvia de Oliveira Hübner

Coorientador: Marcelo de Lima

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C355a Castro, Clarissa Caetano de

Avaliação da atividade antiviral do peptídeo P34 e moléculas da classe da 4-tiazolidinona frente a vírus de importância veterinária / Clarissa Caetano de Castro ; Silvia de Oliveira Hübner, orientadora ; Marcelo de Lima, coorientador. — Pelotas, 2016.

117 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Citotoxicidade. 2. Antiviral. 3. Mecanismo de ação. 4. Herpesviridae. 5. Flaviviridae. I. Hübner, Silvia de Oliveira, orient. II. Lima, Marcelo de, coorient. III. Título.

CDD : 636.089

Clarissa Caetano de Castro

Avaliação da atividade antiviral do peptídeo P34 e moléculas da classe da 4-tiazolidinona frente a vírus de importância veterinária

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 24/03/2016

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Silvia de Oliveira Hübner (Orientadora)
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Geferson Fischer
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Rodrigo Casquero Cunha
Doutor em Ciências Animal pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Marcelo de Lima
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria (Suplente)

Agradecimentos

Ao meu marido Eugênio pelo amor, companheirismo e compreensão, ao meu filho Antônio pelos sorrisos, carinho e amor.

Aos meus queridos pais, Aldair e Paulo, e aos meus irmãos Luciane e Paulo pelo apoio, incentivo e carinho.

À minha orientadora Silvia de Oliveira Hübner pela disposição, sugestões, paciência e pela grandiosa relação de amizade cultivada durante dez anos de orientação.

Ao meu co-orientador Marcelo de Lima pelo apoio, ajuda, incentivo constante e aprendizado durante a realização deste projeto.

Aos professores e funcionários do Laboratório de Virologia e Imunologia Animal (LabVir) da Faculdade de Medicina Veterinária - UFPel: Telmo Vidor, Geferson Fischer, Gilberto D'Avila Vargas, José Carlos Rösler Sandrini, Eliete Sandrini, Enilda Souza de Oliveira, Márcia Rodrigues, Paulo Ricardo Centeno Rodrigues e Cloé Schiavon Pich pela estrutura e atenção a mim destinada.

Aos colegas e amigos do LabVir da Faculdade de Medicina Veterinária - UFPel: Maureen, Fefa, Tony, Cris, Alice e Raulene pelo auxílio nas horas de dificuldade, pelos incentivos e otimismo e, principalmente, pela amizade.

Aos meus colegas, amigos, irmãos Dedé e Fábio, por tudo que me ajudaram, pela convivência, pela amizade sincera e pelo carinho.

À UFPel pela oportunidade de realização do curso de Pós-Graduação em Veterinária.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que colaboraram de alguma forma na execução deste trabalho...

...meu sincero, muito obrigada!

“Tudo que não puder contar como fez, não faça”.
Immanuel Kant

Resumo

Castro, Clarissa Caetano de. **Avaliação da atividade antiviral do peptídeo P34 e moléculas da classe da 4-tiazolidinona frente a vírus de importância veterinária.** 2016. 117f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

A busca de novas substâncias com atividade antiviral levou este estudo a investigar a ação do peptídeo antimicrobiano P34, produzido pelo *Bacillus* sp. P34, frente ao herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e de moléculas sintetizadas da 2-picolilamina e 2-aminoetilpiperidina derivadas da classe da 4-tiazolidinona denominadas V19 (2a), V20 (2b), V23 (2c), V28 (2d), V29 (2e), AK11 (1a), AK16 (1d), AK17 (1e), AK18 (1b) e AK20 (1c) frente a diversos vírus que infectam animais. Inicialmente foram determinadas as concentrações não citotóxicas dos diferentes compostos, em diferentes linhagens celulares, através dos métodos MTT e vermelho neutro. A seguir a atividade antiviral foi avaliada mediante um ensaio de inibição do efeito citopático. Em todos os testes, o título viral em cultivo celular foi comparado ao título viral na presença de cada composto para a determinação do percentual de inibição (PI). O P34 demonstrou um PI de 99,94% e alto índice de seletividade (SI de 22,9). Os testes para identificar o modo de ação indicaram que o peptídeo P34 não atua sobre as células MDBK, ou receptores celulares. Em concentrações citotóxicas o P34 obteve efeito virucida e 100% de inibição viral nos ensaios de redução viral e de penetração. Foi evidenciada total inibição na produção das partículas de BoHV-1 quando as células foram tratadas com o P34 posterior a 8 h de infecção. Houve redução significativa ($p < 0.01$) do título do BoHV-1 na presença do P34 após 8 h de infecção (PI de 90%), chegando a 99,9% de PI após 18 h de tratamento pós-infecção. O P34 inibiu o BoHV-1 tanto no meio extracelular, inibindo a infecção celular, quanto no meio intracelular, após a infecção, impedindo o egresso. Com relação às moléculas derivadas da 4-tiazolidinona a menos tóxica foi a AK 16 (157 µg/mL) nas quatro linhagens de células (RK13, MDCK, CRFK e MDBK) e as mais tóxicas foram as AK11, AK18 e AK20 (19 µg/mL). O PI da molécula AK16 foi de 96,9%, 90,1% e 90,1% contra o EAV, FCV e CPV-2, respectivamente. O composto AK17 mostrou PI de 90,1% contra o EAV, a V20 de 78% contra BVDV, a V28 de 94,4% contra EIV e 78% contra BVDV e a V29 de 94,4% contra CPV-2. As moléculas V20 e V28 foram escolhidas para dar continuidade ao estudo frente ao BVDV. Foram determinados para V20 um SI de 16,8 e de 14,73 para V28. Nos ensaios de inibição da produção de partículas virais, adsorção, competição com receptores celulares, penetração viral e efeito virucida não foram observadas diferenças significativas entre os títulos do BVDV com e sem tratamentos com as moléculas. A associação das moléculas V20 e V28 aumentou de 78 para 82% o PI, não sendo verificada alteração no PI quando as moléculas foram associadas com os

antivirais interferon- α 2b ou ribavirina. Através da determinação da curva de crescimento do BVDV foi evidenciada atuação no período entre 1 a 5 h pós-infecção com o BVDV, sugerindo ação posterior à entrada viral, mas antes do egresso, provavelmente no período de síntese do RNA e enzimas virais. Os resultados demonstram que o peptídeo P34 e os compostos V20 e V28 derivados da 4-tiazolidinona podem ser considerados promissores antivirais contra BoHV-1 e BVDV.

Palavras-chave: citotoxicidade; antiviral; mecanismo de ação; *Herpesviridae*; *Flaviviridae*

Abstract

Castro, Clarissa Caetano de. **Evaluation of the antiviral activity of the P34 peptide and molecules from the class of thiazolidin-4-one against virus veterinary importance.** 2016. 117f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

The search for new substances with antiviral activity has led this study to investigate the action of the antimicrobial peptide P34, produced by *Bacillus* sp. P34 against bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) and of the synthetic molecules 2-picolyamine and 2-aminoethylpiperidine, which are derived from the class of thiazolidin-4-one named V19 (2a), V20 (2b), V23 (2c), V28 (2d), V29 (2e), AK11 (1a), AK16 (1d), AK17 (1e), AK18 (1b) and AK20 (1c) in opposition to several viruses that infect animals. Initially non-cytotoxic concentrations of the different compounds were determined, in different cell lines, through the MTT and neutral red methods. Then, the antiviral activity was evaluated by an assay of the cytopathic effect inhibition. In all tests, the viral titer in cell culture was compared to the viral titer in the presence of each compound to determine the percentage of inhibition (PI). The P34 demonstrated a PI of 99.94% and high selectivity index (SI 22.9). Tests to identify the mode of action indicated that the peptide P34 has no effect on MDBK cells, or cell receptors. In cytotoxic concentrations P34 obtained virucidal effect and 100% inhibition in viral reduction viral and penetration assays. Total inhibition was observed in the production of the BoHV-1 particles when cells were treated with P34 after 8 h of infection. There was a significant reduction ($p < 0.01$) in BoHV-1 titer in the presence of P34 after 8 h of infection (PI 90%), reaching 99.9% PI after 18 h post-infection treatment. P34 inhibited BoHV-1 as extracellularly, inhibiting cell infection, as intracellularly, after infection, preventing its egress. Regarding molecules derived from thiazolidin-4-one the less toxic was AK16 (157 $\mu\text{g/mL}$) in the four cell lines (RK13, MDCK, CRFK and MDBK), and the most toxics were AK11, AK18 and AK20 (19 $\mu\text{g/mL}$). The PI of AK16 molecule was 96.9%, 90.1% and 90.1% against EAV, FCV and CPV-2, respectively. The compound AK17 showed PI of 90.1% against EAV, V20 of 78% against BVDV, V28 of 94.4% against EIV and 78% against BVDV and the V29 of 94.4% against CPV-2. V20 and V28 molecules were chosen to continue the study against BVDV. To V20 and V28 molecules, were determined SI of 16.8 and 14.73, respectively. In assays of inhibition of production of viral particles, adsorption, competing with cellular receptors, viral penetration and virucidal effect no significant differences were observed between titers the BVDV with and without treatment with the molecules. The association of V20 and V28 molecules increased the PI from 78 to 82%, and changes in the PI were not verified when the molecules were associated with antiviral interferon- α 2b and ribavirin. Through the determination of BVDV growth curve, was observed activity in the period between 1 to 5 h post-infection with BVDV, suggesting further action on viral entry, but probably,

before the egress, in the period of RNA synthesis and viral enzymes. The results demonstrate that peptide P34 and compounds V20 and V28 derived from thiazolidin-4-one can be considered as promising antiviral against BoHV-1 and BVDV.

Keywords: cytotoxicity; antiviral; mechanism of action; *Herpesviridae*; *Flaviviridae*

Lista de Figuras

Introdução

Figura 1	Anel aromático 4-tiazolidinona.....	17
Figura 2	Estrutura química da 2-picolilamina (a) e da 2-aminoetilpiperidina (b).....	18

Artigo 1

Figura 1	Effect of P34 on BoHV-1 infection in MDBK cells. P34 was added at a final concentration of 1.2 µg/mL in all experiments. Percentages of inhibition were calculated with respect to control infected cells.....	54
Figura 2	Virucidal effect exerted by P34 at different concentrations on BoHV-1 virions after incubation at 37 °C for 6 h. Titers were compared to the positive control (BoHV-1). All data are the mean ± SD of the independent experiments carried out in triplicate. P-values were determined using Student's t test. *P < 0.01.....	54
Figura 3	Viral growth curve in MDBK cells infected with BoHV-1 at a MOI of 1. Monolayers of cells were treated (open symbol) or non-treated with P34 (closed symbol) for 1, 8, 12 and 18 h and the supernatant submitted to virus titration.....	55

Artigo 2

Figura 1	Estrutura geral das moléculas 4-tiazolidinonas estudadas.....	64
----------	---	----

Artigo 4

Figura 1	Estrutura química das moléculas 4-tiazolidinonas estudadas.....	83
Figura 2	Inibição da replicação do BVDV pelos compostos V20 e V28. Células MDBK foram infectadas ou não com BVDV (100 TCID ₅₀) e expostas a diferentes concentrações das moléculas; 72 h após tratamento foram calculadas a porcentagem de proteção (linha fechado) e citotoxicidade (linha aberta) pelo ensaio de vermelho neutro. (A) Células tratadas com o composto V20. (B) Células tratadas como composto V28.....	86
Figura 3	Efeito das moléculas V20 e V28 sobre o crescimento do BVDV. (A) Curva de crescimento <i>one-step</i> do BVDV. Células MBBK foram infectadas com BVDV a um MOI de 1, nos tempos indicados (1, 3, 5, 7, 9 ou 11 h pós infecção- hpi), foi determinado o título viral (TCID ₅₀ /100 µl). (B) V20 e (C) V28, efeito de diferentes tempos de adição das moléculas sobre a curva de crescimento do BVDV. Células MDBK foram infectadas com MOI de 1 com BVDV e após 1, 3, 5, 7, 9 ou 11 h foi adicionada a molécula V20 ou V28. Após 24 hpi foi determinado o título viral na ausência das moléculas.....	88

Lista de Tabelas

Artigo 3

Tabela 1	Cytotoxic activities of thiazolidinones 1a-e and 2a-e	74
Tabela 2	Thiazolidinones with antiviral activity.....	74

Artigo 4

Tabela 1	Atividade anti-BVDV (PI), citotoxicidade (MNCC), CC ₅₀ , EC ₅₀ e SI dos compostos Vs.....	87
----------	---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

AMPs	Antimicrobial peptides - Peptídeos antimicrobianos
ATCC	American type culture collection
BoHV-1	Bovine herpesvirus type 1 - Herpesvírus bovino tipo 1
BoHV-5	Bovine herpesvirus type 5 - Herpesvírus bovino tipo 5
BVDV	Bovine viral diarrhea virus - Vírus da diarreia viral bovina
CAV-2	Canine adenovirus type 2 - Adenovírus canino tipo 2
CC ₅₀	50% cytotoxic concentration – Concentração citotóxica 50%
CCoV	Canine coronavirus - Coronavírus canino
CDV	Canine distemper virus- Vírus da cinomose canina
CP	Biótipo citopático
CPE	Cytopathic effect – Efeito citopático
CPV-2	Canine parvovirus type 2 - Vírus da parvovirose canina tipo 2
CRFK	Crandell Rees feline kidney - Células Crandell de rim de felino
DM	Doença das mucosas
DMSO	Dimethylsulfoxide - Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid – Ácido desoxirribonucleico
EAV	Equine viral arteritis - Arterite viral equina
EC ₅₀	50% effective concentration – Concentração efetiva 50%
EIV	Equine influenza virus - Vírus da influenza equina

ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – Ensaio imunoenzimático
E-MEM	Eagle's minimal essential medium – Meio essencial mínimo de Eagle
FCV	Feline calicivirus - Calicivírus felino
FHV-1	Feline herpesvirus type 1 - Herpesvírus felino tipo 1
HCV	Hepatitis C vírus - Vírus da hepatite C
HHV-1	Human herpesvirus type 1 - Herpesvírus humano tipo 1
HHV-2	Human herpesvirus type 2 - Herpesvírus humano tipo 2
HIV-1	Human immunodeficiency virus type 1 - Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
IBR	Infectious bovine rhinotracheitis - Rinotraqueíte infecciosa bovina
IFN- α	Interferon alfa
IPB	Infectious balanoposthitis - Balanopostite infecciosa
IPV	Infectious pustular vulvovaginitis - Vulvovaginite pustular infecciosa
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
MDCK	Madin-Darby canine kidney - Células Madin de rim de canino
MDBK	Madin-Darby bovine kidney – Células Madin de rim de bovino
MNCC	Maximun noncytotoxic concentration – Maior concentração não citotóxica
MOI	Multiplicity of infection – Multiplicidade de infecção
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo difeniltetrazólio
NADL	National animal disease laboratory
NCP	Biótipo não-citopático
Nm	Nanômetros
PBS	Phosphate buffered saline – Tampão fosfato-salino
PCR	Polymerase chain reaction - Reação em cadeia da polimerase
PI	Percentages of inhibition – Percentagem de inibição

RBV	Ribavirina
RK13	Rabbit kidney – Células de rim de coelho
RNA	Ribonucleic acid - Ácido ribonucleico
SI	Selectivity index – Índice de seletividade
TCID ₅₀	50% tissue culture infectious dose – Doses infectantes a 50% do tecido celular
TK	Timidina quinase
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
VERO	African green monkey kidney- Células de rim de macaco verde africano
VN	Vírus-neutralização
VSV	Vesicular stomatitis virus - Vírus da estomatite vesicular

Sumário

1 Introdução.....	16
2 Hipótese	19
3 Objetivos	20
3.1 Objetivo Geral.....	20
3.2 Objetivos Específicos	20
4 Revisão da Literatura.....	21
4.1 Peptídeos Antimicrobianos	21
4.2 Peptídeo antimicrobiano P34	26
4.3 4-Tiazolidinonas	27
4.4 Hespervirus bovino tipo 1 (BoHV-1)	29
4.5 Vírus da diarreia viral bovina (BVDV)	33
4.6 Outros vírus	36
4.6.1 Adenovírus canino tipo 2.....	36
4.6.2 Coronavírus canino.....	37
4.6.3 Parvovírus canino tipo 2.....	37
4.6.4 Vírus da cinomose canina	38
4.6.5 Calicivírus felino.....	39
4.6.6 Herpesvírus felino tipo 1.....	40
4.6.7 Herpesvírus bovino tipo 5	41
4.6.8 Vírus da arterite viral equina	42
4.6.9 Vírus da influenza equina	43
5 Artigos.....	44
5.1 Artigo 1.....	44
5.2 Artigo 2.....	60
5.3 Artigo 3.....	70
5.4 Artigo 4.....	79
6 Conclusões	93
Referências	94

1 Introdução

Estudos para o desenvolvimento de fármacos antivirais têm sido realizados com base em substâncias naturais e sintéticas, a fim de determinar e caracterizar compostos que podem inibir o ciclo replicativo viral e, assim, servir como modelos para drogas (CLERCQ, 2004), como por exemplo, os peptídeos antimicrobianos (AMPs) e as moléculas derivadas da classe da 4-tiazolidinona.

Os AMPs vêm ganhando atenção como uma alternativa terapêutica importante no campo da prevenção e tratamento de enfermidades contra um grande número de microrganismos (OYSTON et al., 2009). Cerca de 10% de todo o mercado de fármacos são a base de peptídeos (CRAIK et al., 2013), como por exemplo o fuzeon (enfuvirtida) que atua contra HIV-1 (MATTHEWS et al., 2004).

Os peptídeos podem ser derivados da natureza ou serem produzidos sinteticamente (ZAIU, 2007). Os AMPs oriundos do meio ambiente são produzidos pelos sistemas de defesa de praticamente todas as formas de vida, como bactérias, plantas, espécies invertebradas e vertebradas (JENSSEN et al., 2006). Apresentam uma potente atividade de combater um amplo espectro de microrganismos e células, incluindo: parasitas (PEREIRA et al., 2016), bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (GRAU-CAMPISTANY et al., 2016), fungos (WANG et al., 2016), células tumorais (NGAMBENJAWONG et al., 2016) e vírus (NIGRO et al., 2015). As habilidades para atuar contra infecções virais são direcionadas principalmente para vírus envelopados (VANHEULE et al., 2016), embora tenha sido detectada ação contra alguns vírus não envelopados, como adenovírus (TIAN et al., 2015), calicivírus felino (McDONAGH et al., 2015) e echovírus 6 (PIETRANTONI et al., 2006). A maioria das pesquisas desenvolvidas na área de AMPs com ação antiviral têm sido direcionadas para o HIV-1 e herpesvírus humano tipo 1 e 2 (HHV-1 e HHV-2), agentes causadores de importantes doenças em humanos (SCUDIERO et al., 2010).

Da mesma forma, 4-tiazolidinona é uma molécula importante e versátil que vem ganhando atenção no campo da química medicinal (JAIN et al., 2012). A estrutura química da 4-tiazolidinona, conforme a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), é derivada da tiazolidina, constituída de um heterocíclico que possui em sua estrutura um átomo de enxofre na posição 1, um átomo de nitrogênio na posição 3 e um grupo carbonila na posição 4 (Figura 1). As variações da 4-tiazolidinona são obtidas através de modificações nos sítios de substituição nas posições 2, 3 e 5 do anel, o que leva a um grande número de análogos estruturais que promove modificações físico-químicas e estruturais (lipofílicos, eletrônicos, polares e estéricos) das moléculas (LIESEN et al., 2008).

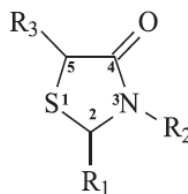


Figura 1. Anel aromático 4-tiazolidinona

A síntese de compostos contendo o anel aromático 4-tiazolidinona é descrita na literatura (ALTINTAS et al., 2005; DANDIA et al., 2006). Em geral, as 4-tiazolidinonas podem ser produzidas através de reações de condensação de três formas: “one-pot”, multicomponentes ou por meio de duas etapas, as quais utilizam três reagentes (um aldeído ou cetona, uma amina ou hidrazina e um ácido mercaptoacético), conforme descrito por Singh et al. (1981).

Esta classe de compostos é de grande interesse científico devido às suas propriedades químicas e atividades biológicas, tais como: antibacteriana e antifúngica (HUSSEIN et al., 2015), antiviral (CIHAN-ÜSTÜNDAĞ et al., 2016), anti-inflamatória, analgésica e antioxidante (ABDELAZEEM et al., 2015; FAIDALLAH et al., 2015), antitumoral e tuberculostático (CIHAN-ÜSTÜNDAĞ et al., 2015), antiparasitário (LIESEN et al., 2010; MUSHTAQUE et al., 2012; MOREIRA et al., 2014), antimalária (RUIZ et al., 2011), anticonvulsivante e antipsicótica (KAUR et al., 2010) e antidiabético (BHOSLE et al., 2014). Alguns compostos sintetizados a partir da 4-tiazolidinona já são comercializados para tratamentos, como: ralitolina

(anticonvulsivo), etozolina (anti-hipertensivo), pioglitazona (hipoglicemia) e tiazolidinona (atividade contra espécies de *Streptomyces*) (TRIPATHI et al., 2014).

Em especial, deve-se ressaltar os estudos de compostos derivados da 4-tiazolidinona com ação inibitória sobre a enzima transcriptase reversa do HIV-1 (SENIYA et al., 2012) e contra a RNA polimerase RNA dependente NS5B do vírus da hepatite C (HCV) (KÜÇÜKGÜZEL et al., 2013), alvos para o desenvolvimento de medicamentos contra essas doenças. Desse modo, os compostos derivados da 4-tiazolidinona merecem destaque visando a síntese de moléculas terapêuticas por meio de substituições nos radicais do anel aromático em busca de uma molécula com afinidade e reatividade com as partículas virais.

Com o intuito de contribuir para descoberta de substâncias com poder antiviral e, também, servir de modelo para tratamentos contra vírus pertencentes à mesma família viral, este estudo avaliou a capacidade de supressão do AMP identificado como P34 caracterizando sua citotoxicidade e o mecanismo de ação sobre herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) em células Madin-Darby bovine kidney (MDBK). No mesmo sentido, foi avaliada a citotoxicidade em diferentes linhagens celulares e a atividade antiviral de moléculas 2-picolilamina e 2-aminoetilpiperidina (Figura 2) derivadas da classe da 4-tiazolidinona frente a diversos vírus de importância veterinária, destacando-se estudos sobre mecanismo de ação das principais moléculas com atividade contra o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em células MDBK.



Figura 2. Estrutura química da 2-picolilamina (a) e da 2-aminoetilpiperidina (b).

Este trabalho será dividido em três partes: a primeira consta a revisão de literatura, a segunda está representada na forma de um artigo expondo a citotoxicidade e mecanismo de ação do AMP P34 frente ao BoHV-1 e a terceira parte relata, na forma de três artigos, as atividades realizadas com as moléculas derivadas da classe da 4-tiazolidinona.

2 Hipótese

O peptídeo antimicrobiano P34 e as moléculas 2-picolilamina e 2-aminoetilpiperidina derivadas da classe da 4-tiazolidinona são antivirais com baixa toxicidade e capacidade para atuar frente o BoHV- 1 e o BVDV, respectivamente.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Determinar a citotoxicidade, a atividade antiviral e o mecanismo de ação do peptídeo antimicrobiano P34 e das moléculas 2-picolilamina e 2-aminoetilpiperidina derivadas da classe da 4-tiazolidinona frente a vírus de importância veterinária.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade do peptídeo antimicrobiano P34 frente à célula MDBK e das moléculas 2-picolilamina e 2-aminoetilpiperidina derivadas da classe da 4-tiazolidinona frente às células CRFK (Crandell rees feline kidney), RK13 (Rabbit kidney), MDCK (Madin-Darby canine kidney) e MDBK através dos ensaios colorimétricos vermelho neutro e/ou MTT.

- Avaliar a atividade antiviral e determinar o mecanismo de ação do peptídeo P34 frente ao BoHV-1.

- Determinar atividade antiviral das moléculas derivadas da classe da 4-tiazolidinona frente ao adenovírus canino tipo 2 (CAV-2), coronavírus canino (CCoV), vírus da parvovirose canina tipo 2 (CPV-2), vírus da cinomose canina (CDV), calicivírus felino (FCV), herpesvírus felino tipo 1 (FHV-1), herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5), arterite viral equina (EAV) e vírus da influenza equina (EIV).

- Avaliar a atividade antiviral e determinar o mecanismo de ação das moléculas derivadas da classe da 4-tiazolidinona frente ao BVDV.

4 Revisão da Literatura

4.1 Peptídeos Antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas de baixo peso molecular com uma vasta atividade inibitória contra microrganismos e células, incluindo: parasitas (PEREIRA et al., 2016), bactérias (GRAU-CAMPISTANY et al., 2016), fungos (WANG et al., 2016), células tumorais (NGAMBENJAWONG et al., 2016) e vírus (NIGRO et al., 2015). Esses peptídeos podem ser derivados da natureza ou sintéticos (ZAIYOU, 2007).

AMPs são isolados de uma grande variedade de espécies de plantas; de invertebrados, como: insetos, aranhas, moluscos e camarões; e de vertebrados, incluindo: peixes, pássaros, anfíbios e mamíferos (JENSSEN et al., 2006). Em animais, esses peptídeos antimicrobianos constituem parte do sistema imune inato (JOHNSTON et al., 2013). Em plantas, proteínas e AMPs formam um sistema de defesa similar à imunidade inata dos animais, protegendo-as de ataques de certos patógenos e pragas (GALLO et al., 2002).

As plantas sintetizam AMPs ricos em resíduos de cisteína que conferem alta estabilidade química, térmica e proteolítica (TAM et al., 2015). Estes peptídeos estão presentes em diversas estruturas, especialmente nas sementes que são vulneráveis aos patógenos durante o período de germinação (GANZ e LEHNER, 2001). Alguns AMPs atuam interrompendo a penetração dos microrganismos dentro das membranas celulares (TAM et al., 2015).

Os invertebrados secretam AMPs principalmente no epitélio do trato digestivo, para combater as infecções. Os artrópodes também produzem AMPs que podem ser secretados e dissolvidos na endolinfa após uma infecção, assim como outros peptídeos que são produzidos constantemente e armazenados em grânulos presentes no interior dos hemócitos, por exemplo, em aranhas, moluscos e camarões (BACHERE et al., 2004).

Os mamíferos secretam na superfície corpórea uma diversidade de AMPs, com destaque para as defensinas que formam uma barreira protetora contra infecções. As defensinas são peptídeos pequenos formados por pontes de cisteínas e categorizadas em três subfamílias (α , β e δ). São expressas por macrófagos, monócitos, células dendríticas e células epiteliais (BOGEFORS et al., 2012). As α - e β -defensinas estão presentes em algumas espécies de vertebrados nas células fagocitárias, as quais possuem grânulos em seu citoplasma, onde armazenam peptídeos e enzimas digestivas. Os grânulos esvaziam seu conteúdo em vacúolos fagocitários em altas concentrações, enquanto outros grânulos secretam seu conteúdo para o fluido extracelular onde matam ou impedem o crescimento de microrganismos (GANZ e LEHNER, 2001).

O AMP magainina sintetizado por anfíbios foi o primeiro desenvolvido para tratamento clínico. Possui uma forte atividade na permeabilização sobre as membranas de bactérias Gram-positivas e negativas, fungos, leveduras e vírus (GARCIA-OLMEDO et al., 1998; ALAN et al., 2004; BULET et al., 2004). Outro peptídeo produzido por anfíbios é a dermasseptina, isolada da pele de rã com ampla atividade antibacteriana, antifúngica (NICOLAS e EL AMRI, 2009), antitumoral e angiostática (VAN ZOGGEL et al., 2012).

Catelicidina é um peptídeo isolado de muitas espécies de mamíferos, tais como ratos, coelhos, ovelhas, cavalos, bovinos e seres humanos. Geralmente este peptídeo é armazenado dentro de grânulos circulantes em células imunitárias e pode ser expresso na superfície mucosa da boca, no tecido pulmonar, no trato genito-urinário e nos queratinócitos da pele em desordens inflamatórias (AGIER et al., 2015).

AMPs produzidos por bactérias, também chamados de bacteriocinas, foram os primeiros a serem isolados e caracterizados (MATTICK e HIRSCH, 1947). Eles são biologicamente ativos, com atividade antimicrobiana contra bactérias, usualmente, estreitamente relacionadas à bactéria produtora (SCHULZ et al., 2003). Existem, ainda, outras substâncias com atividade antimicrobiana que não apresentam todas as características das bacteriocinas, por exemplo, as substâncias tipo-bacteriocina (*bacteriocin-like*). Estas substâncias englobam os compostos antimicrobianos de natureza protéica que ainda não estão completamente definidos ou não cumprem com todas as características de bacteriocinas (DE VUYST e VANDAMME, 1994).

Klaenhammer (1993) descreve diferentes classes de bacteriocinas. A classe I é composto por bacteriocinas que contêm o aminoácido modificado lantionina, composto pelos lantibióticos e são peptídeos pequenos (<5kDa). Esta classe é subdividida em classe Ia e classe Ib. A classe Ia, inclui a nisina, consiste de peptídeos hidrofóbicos e catiônicos que formam poros na membrana da célula alvo e possuem uma estrutura flexível, quando comparados com estrutura mais rígida dos peptídeos da classe Ib, os peptídeos desta classe são globulares e possuem carga negativa ou não possuem carga (ALTENA et al., 2000).

A classe II denominada de não-lantibióticos é composta por peptídeos pequenos, os quais apresentam peso molecular de até 10 kDa e são resistentes ao calor. Esta categoria se subdivide em três outras classes. A classe IIa é, principalmente, produzida pelas bactérias lácticas e, semelhante à pediocina, com forte atividade contra *Listeria* spp. Na classe IIb estão as bacteriocinas constituídas por dois peptídeos que possuem atividades complementares, ou seja, necessitam de ambos para serem totalmente ativos. A classe IIc foi proposta para separar as bacteriocinas secretadas pelo sistema sec-dependente (NES et al., 1996).

A classe III inclui proteínas termo-sensíveis e de peso molecular acima de 30 kDa e, por último, a classe IV, que inclui os compostos indefinidos de bacteriocinas, envolvendo macromoléculas associadas a lipídeos e/ou carboidratos (CLEVELAND et al., 2001).

As bacteriocinas receberam atenção devido ao seu potencial como conservantes na indústria de alimentos, como probióticos na saúde humana e como agentes terapêuticos contra microrganismos patogênicos, visto que são potencialmente efetivas e não tóxicas ao homem e aos animais (TWOMEY et al., 2002; SCHULZ et al., 2003).

As bacteriocinas produzidas por espécies de *Bacillus* são extensivamente pesquisadas pela importância de um histórico de uso seguro tanto em alimentos quanto na indústria (BIZANI e BRANDELLI, 2002). Os produtos comercializados e que são produzidos por *Bacillus* spp. incluem enzimas, antibióticos, aminoácidos e inseticidas (GEBHARDT, 2002). Alguns peptídeos produzidos por espécies de *Bacillus*, especialmente os lipopeptídeos têm apresentado propriedades antifúngicas, como a ituricina e micosubtilina (GALVEZ et al., 1993). Outros peptídeos apresentam propriedades de biosurfactante, antimicrobiana e antiviral, por exemplo, a surfactina (BARROS et al., 2007).

AMPs apresentam uma grande variedade estrutural, entretanto, é possível agrupá-los em dois conjuntos de estruturas secundárias, as α -hélice e as folha- β (JENSSEN et al., 2006). As estruturas helicoidais ocorrem em grande parte no meio extracelular e são formadas durante a interação do peptídeo com a superfície externa de membranas, pois os peptídeos têm como característica apresentarem conformação randômica em soluções aquosas (YEAMAN e YOUNT, 2003). Os peptídeos estruturados em folha- β , assim como os estruturados em α -hélice, podem apresentar uma grande variação na estrutura primária, mantendo, contudo, uma composição com características anfipáticas. Este tipo de estrutura é formada pelo emparelhamento de cadeias polipeptídicas, podendo formar dois padrões distintos de folha- β : a forma antiparalela e a forma paralela. Na forma antiparalela, as cadeias principais encontram-se em sentidos alternados, enquanto que, no arranjo paralelo, essas cadeias laterais encontram-se dispostas de forma alinhada (DENNISON et al., 2005).

Os mecanismos de ação pelo qual alguns peptídeos permeabilizam as membranas de patógenos ainda não são completamente definidos, e vários têm sido propostos para descrever a interação entre os peptídeos e as bicamadas lipídicas. Alguns AMPs possuem a capacidade de atuar de forma direta ou indireta bloqueando ou inibindo uma etapa no ciclo de vida do microrganismo (ZAIUO, 2007). O efeito generalizado dos peptídeos sobre a membrana do microrganismo dificulta o desenvolvimento de resistência (ZASLOFF, 2002a). Segundo Maget-diana (1999) e Naghmouchi et al. (2007) o mecanismo de ação ocorre, primeiramente, pela atração eletrostática entre os peptídeos (que geralmente possuem carga positiva) e lipídios aniônicos presentes na membrana. Em seguida, a estrutura anfipática dos peptídeos interage com a interface hidrofílica/hidrofóbica presente na superfície das biomembranas.

Zasloff (2002b) e Brodgen (2005) destacam três modelos de mecanismo que aumentam a permeabilidade das biomembranas devido à interação com AMPs. Estes mecanismos podem ser resumidos em: 1) formação de poros organizados por múltiplas unidades de peptídeos organizadas em forma de um barril (*barrel stave model*) ou toróide (*wormhole model*) que atravessa a bicamada lipídica; 2) os peptídeos comportam-se como detergentes, provocando alterações estruturais na membrana, deslocando lipídeos e causando a formação de poros temporários ou mesmo destruindo completamente a membrana (*carpet like model*); 3) os peptídeos interagem com as superfícies das biomembranas provocando distúrbios físicos químicos e o acúmulo de peptídeos (muitas vezes envolvendo a formação de agregados) ocasionando flutuações e instabilidades estruturais locais na bicamada lipídica que resultam na formação de poros transientes.

Lehner (2001) relatou duas hipóteses para explicar como a permeabilização da membrana afeta a viabilidade das bactérias e vírus. Uma baseia-se na perda de energia provocada pelo desequilíbrio e consequente destruição do potencial eletroquímico devido à formação de poros. A outra hipótese seria de que o peptídeo, após danificar a membrana, pode atravessá-la e interferir com funções intracelulares, através de interações com macromoléculas como proteínas e ácidos nucleicos.

Os AMPs com atividade antiviral possuem habilidade para atuar, principalmente, contra vírus envelopados, embora haja estudos descrevendo ação contra alguns vírus não envelopados, como adenovírus, calicivírus felino, echovírus 6 e rotavírus (PIETRANTONI et al., 2006; ELAID et al., 2014; TIAN et al., 2015; MCDONAGH et al., 2015). A atividade antiviral dos AMPs pode ser relacionada de forma extracelular, atuando diretamente sobre o envelope viral (ROBINSON et al., 1998), na adsorção ou penetração viral (BELAID et al., 2002); de forma intracelular ou na liberação da partícula viral (ROBINSON et al., 1998).

Os AMPs podem interagir diretamente com receptores específicos da célula hospedeira (COLE et al., 2002), influenciando na ligação ou entrada do vírus (JENSSEN et al., 2006). Segundo Shieh (1992), alguns peptídeos podem reduzir infecções virais ao interagir com sulfato de heparina, uma das moléculas de glicosaminoglicanos mais importantes encontrada em todos os tipos de tecidos e sobre a superfície celular, capaz de se ligar em pequenos cátions, proteínas, enzimas, fatores de crescimento, citocinas e quimocinas.

O efeito dos AMPs também está relacionado às suas habilidades de inibir a propagação do vírus de uma célula a outra vizinha através de junções estreitas (disseminação célula-a-célula) ou inibir a formação de células gigantes (JENSSEN et al., 2006). Quando os AMPs ficam internalizados nos vacúolos das células hospedeiras podem resultar na estimulação de genes e proteínas, influenciando os mecanismos antivirais da célula hospedeira (BOWDISH et al., 2004), ou podem bloquear a expressão de genes e proteínas virais (WACHINGER et al., 1998).

Novos tratamentos com os AMPs poderiam ser usados em conjunto com as drogas já existentes, como parte de uma terapia combinatória para obter efeitos sinérgicos ou adicionais (JENSSEN et al., 2006). Progressos foram feitos no campo da terapia com peptídeos contra vários patógenos, com destaque para os antivirais contra o HIV-1, o herpesvírus simplex (SCUDIERO et al., 2010), o rotavírus (ELAID et al., 2014), o adenovírus (TIAN et al., 2015), o citomegalovírus humano (LUGANINI et al., 2010) e o vírus da hepatite C (KÜÇÜKGÜZEL et al., 2013), entre outros (McDONAGH et al., 2015; VANHEULE et al., 2016).

4.2 Peptídeo antimicrobiano P34

O peptídeo P34 foi identificado, purificado e caracterizado por Motta et al., (2007a) a partir de uma linhagem de *Bacillus* sp. P34, isolado do conteúdo intestinal de peixes *Leporinus* sp. proveniente do ambiente aquático da bacia amazônica.

Este peptídeo é caracterizado como *bacteriocin-like substance* que inibe bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo microrganismos patogênicos e deteriorantes (MOTTA et al., 2007b). O peptídeo P34 é uma substância antimicrobiana, aniônica, hidrofóbica, tem peso molecular de 1.498,68 Da, é relativamente estável ao aquecimento e sensível a enzimas proteolíticas, sugerindo ser uma molécula lipopeptídica, apresentando atividade em uma faixa de pH de 3,0 a 10 em temperatura entre 25 e 37 °C (MOTTA et al., 2007a). Estas características permitem classificar este peptídeo na classe I, conforme Klaenhamer (1993). Este peptídeo teve sua atividade parcialmente perdida quando tratado com os solventes orgânicos butanol, acetona e metanol, e, também, mostrou-se sensível aos químicos ácido tricloroacético e 2-mercaptoetanol (MOTTA et al., 2007b). A perda total de sua atividade antimicrobiana só foi observada após 15 minutos de autoclavagem a 121°C (MOTTA et al., 2007a).

O modo de ação deste AMP foi avaliado frente a diferentes bactérias, e demonstrou possuir atividade antimicrobiana frente a importantes patógenos e deteriorantes de alimentos como *Listeria innocua*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Erwinia carotovora*, *Aeromonas hydrophila* e *Salmonella Enteridis* (MOTTA et al., 2004). O efeito do P34 sobre *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* demonstrou ser bactericida e bacteriolítico, respectivamente (MOTTA et al., 2007b). Motta et al. (2008) relataram que o P34 é capaz de provocar a formação de poros, perda do conteúdo protoplásmico e lise da bactéria *Listeria monocytogenes*.

Em um estudo realizado por Vaucher et al. (2010) para avaliar a citotoxicidade *in vitro* do P34, tendo o peptídeo nisina como padrão de comparação, foi analisado o comportamento de similaridade entre as substâncias nos testes realizados, indicando baixa toxicidade do peptídeo P34. Ainda, em células VERO (*African green monkey kidney*) quando tratadas com o P34 por 24 h demonstram perda da integridade da membrana plasmática somente quando utilizadas em altas concentrações do peptídeo.

Vaucher et al. (2011) investigaram a imunogenicidade e a toxicidade do P34 *in vivo* em camundongos BALB/c. Em altas concentrações não foram observadas reações de hipersensibilidade ou morte dos animais nas concentrações testadas, mas quando administrado o P34 mais o adjuvante completo de Freund houve um aumento significativo do título de anticorpos quando comparado com a inoculação apenas do P34 nos animais.

Recentemente, Silva et al. (2014) demonstraram que o peptídeo P34 exibe atividade antiviral *in vitro* contra arterite viral equina (EAV) e herpesvirus felino tipo 1 (FHV-1). P34 demonstrou atividade virucida apenas contra o EAV.

4.3 4-Tiazolidinonas

A química orgânica medicinal por meio de planejamentos e modificações moleculares tem contribuído para a maior parte das descobertas de fármacos, observando-se um crescimento considerável de compostos sintéticos, os quais têm sido empregados no combate às diversas doenças (TRIPATHI et al., 2014).

4-tiazolidinonas são compostos derivados dos carbonilados das tiazolidinas e consistem em um anel aromático de cinco membros contendo dois heteroátomos,

um átomo de enxofre na posição 1, um átomo de nitrogênio na posição 3 e um grupo carbonila na posição 4. Seu anel possui vários sítios de substituição, o que leva a um grande número de análogos estruturais. As diferentes atividades biológicas podem ser atribuídas a grupos substituintes nas posições 2, 3 e 5 do anel, onde promovem modificações nos parâmetros físico-químicos e estruturais (lipofílicos, eletrônicos, polares e estéricos) das moléculas (LIESEN et al., 2008).

A síntese de compostos contendo o anel 4-tiazolidinona é relatada na literatura (ANDRES et al., 2000; ALTINTAS et al., 2005; DANDIA et al., 2006). Em geral, as 4-tiazolidinonas podem ser produzidas, com bons rendimentos, através de reações de ciclização descritas por Brown (1961) e Singh et al. (1981). Estas reações envolvem: os ácidos α -haloacéticos ou derivados destes com tiouréias (ST. LAURENT et al., 2004), aciltiossemicarbazidas (BONDE e GAIKWAD, 2004) e tiossemicarbazonas (ERGENÇ et al., 1999); ligação dupla ou tripla conjugada com o grupo carbonila, como anidrido maléico ou acetilenodicarboxilato de dimetila; e compostos que apresentam a função tioamida, como as tiossemicarbazonas (TENÓRIO et al., 2005; LIESEN et al., 2008).

4-tiazolidinonas representam uma classe de compostos de grande interesse por pertencerem a uma classe de substâncias de amplo espectro de atividades biológicas e, ainda, esta classe possibilita agregar várias substâncias para realização da sua síntese. Yang et al. (2016) relataram que compostos contendo hidroxamato atuaram como inibidores da histona desacetilase e evidenciaram melhores efeitos anti-metastáticos quando comparados com o Vorinostat em células A549. DE MONTE et al. (2016) demonstraram que substâncias derivadas de 1,3-tiazolidina-4-onas exerceram atividade anti-candida.

Além destes relatos, outros compostos derivados da classe da 4-tiazolidinona possuem ação antibacteriana (HUSSEIN et al., 2015), antiprotzoária (RUIZ et al., 2011), anti-inflamatória, analgésica e antioxidante (ABDELAZEEM et al., 2015; FAIDALLAH et al., 2015), anticonvulsivante e antipsicótica (KAUR et al., 2010) e antidiabética (BHOSLE et al., 2014).

Algumas substâncias derivadas de 4-tiazolidinona já estão no mercado para tratamentos, incluindo ralitoline (anticonvulsivante), etozoline (anti-hipertensivo), pioglitazona (hipoglicemia) e tiazolidomicina (atividade contra espécies *Streptomyces*) (TRIPATHI et al., 2014).

A atividade antiviral exercida por substâncias derivadas de 4-tiazolidinona foram descritas contra diversos vírus, tanto de genoma RNA quanto DNA. Cihan-Üstündağ et al. (2016) descreveram que substâncias tiossemicarbazonas indolico agiram contra o vírus de coxsackie, o vírus sindbis e o vírus sincicial respiratório. Manvar et al. (2016) evidenciaram que compostos tiadiazol inibiram a RNA-polimerase RNA-dependente NS5 do vírus da dengue. Seniya et al. (2012) citam a ação inibitória do 3-(2-aminoetil)-5-(2-tienilmetileno)-1,3-tiazolidina-2,4-diona sobre a enzima transcriptase reversa do HIV-1. Küçükgül et al. (2013) relatam ação do 2-heteroarilo-imino-5-arilideno-4-tiazolidinonas contra RNA-polimerase RNA-dependente NS5B do vírus da hepatite C. Jadav et al. (2015) citam a atuação dos arilo-alquilideno derivados do 1,3-tiazolidina-4-ona contra a protease do vírus chikungunya.

Estudos realizados pelo grupo de pesquisa do Dr. Cunico, no Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, visam sintetizar moléculas contendo o anel 4-tiazolidinona com intuito de contribuir na descoberta de modelos terapêuticos. Kunzler et al. (2013) e Marques et al. (2014) relataram atividade antifúngica desta classe contendo as amina 2-aminoetilpiperidina e 2-picolilamina, respectivamente. Bosenbecker et al. (2014) evidenciaram, também, que derivados da amina 2-picolilamina demonstraram ação antioxidante.

4.4 Hespervirus bovino tipo 1 (BoHV-1)

Herpesviridae forma uma família grande composta por três subfamílias denominadas *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammapherpesvirinae*. Os vírions desta família são compostos por DNA, nucleocapsídeo icosaédrico e envelope lipoprotéico, onde estão inseridas dez glicoproteínas denominadas gB, gC, gD, gE, gH, gI, gL, gG, gK e gM (MUYLKENS et al., 2007). Cada uma delas diferencia-se em sua propriedade antigênica, molecular e função biológica nos processos de interação com a célula hospedeira e de replicação (SCHWYZER e ACKERMANN, 1996). Entre o envelope e o nucleocapsídeo encontra-se o tegumento, uma substância amorfa que possui proteínas com funções regulatórias. Os herpesvírus codificam diversas enzimas, como a timidina quinase (TK) e a DNA polimerase, que são alvos para fármacos antivirais (COEN e RICHMAN, 2007).

Os *Alphaherpesvirinae* estão representados pelo HHV-1 e pelos principais herpesvírus de importância veterinária, incluindo o BoHV-1. Entre os *Betaherpesvirinae* estão importantes patógenos humanos, como o citomegalovírus. Nos *Gammapherpesvirinae* estão inseridos o herpesvírus humano tipo 4 e o Epstein-Barr vírus, entre outros.

Os herpesvírus possuem alta incidência e a capacidade de estabelecer infecções latentes que podem ser reativadas quando ocorre imunossupressão (VOGEL et al., 2003), a propriedade mais relevante do ponto de vista de controle da doença (ROCK et al., 1994).

O ciclo replicativo do herpesvírus bovino se inicia com a ligação aos receptores da membrana plasmática das células-alvo. As principais glicoproteínas envolvidas no processo de adsorção viral são a gC e gB que se ligam com os receptores de sulfato de heparina, seguidos da gD que interage com outros receptores de forma estável. Outras glicoproteínas interagem como coadjuvantes na adsorção, contudo seus efeitos são essenciais para o processo de entrada viral (CAMPADDELLI-FIUME et al., 2000). A penetração requer a fusão do envelope viral com a membrana plasmática e depende da ação das gB, gD, gH e gL (SPEAR et al., 1993). A transição entre o processo de adsorção e penetração é muito rápida e ocorre em poucos minutos. Após a fusão, o nucleocapsídeo é transportado ao núcleo através de microtúbulos celulares e o genoma é liberado. No núcleo, os processos de transcrição iniciam logo após a sua penetração e são regulados por três classes de RNA mensageiro (mRNA) denominadas *immediate early* (IE ou α), *early* (E ou β) e *late* (L ou γ) que são transcritas pela RNA polimerase II (RNA pol II) celular (ROIZMANN et al., 2007).

A replicação do genoma e a montagem do nucleocapsídeo ocorrem no núcleo das células infectadas. As fitas de DNA sintetizadas são encapsidadas pela interação de proteínas de clivagem/empacotamento com sinais específicos de empacotamento presentes no fim dos genomas virais (ROIZMAN, 2001).

O capsídeo contendo o material genético migra através da membrana nuclear para tornar-se envelopado. A liberação final do vírion envelopado da célula ocorre em vesículas exocíticas sendo a seguir liberado como vírus infeccioso livre. Em células permissivas aos herpesvírus todo o processo de replicação viral leva cerca de 18 a 20 h (ROIZMAN, 2001).

O BoHV-1 é um dos agentes mais importante em bovinos por produzir altas perdas econômicas diminuindo os índices produtivos e reprodutivos (FRANCO et al., 2012). Este agente etiológico é associado com diversas manifestações clínicas, incluindo aborto, doença sistêmica em bezerros, enfermidade respiratória (rinotraqueíte infecciosa bovina ou IBR), genital (vulvovaginite pustular infecciosa ou IPV e balanopostite infecciosa ou IPB) e, eventualmente, neurológica (KAHRS et al., 2001; SILVA et al., 2007).

Buscando associações entre genótipos e sinais clínicos, as amostras de BoHV-1 foram subsequentemente divididas em subtipos (BoHV-1.1 e BoHV-1.2). O subtipo 2 ainda está subdividido em BoHV-1.2a e BoHV-1.2b. O BoHV-1.1 é isolado de animais com problemas respiratórios, infertilidade e abortamento; BoHV-1.2a e BoHV-1.2b são isolados, principalmente, de casos de IPV e IPB, mas já foram encontrados em animais com problemas respiratórios (D'ARCE et al., 2002).

As evidentes perdas reprodutivas podem ser observadas por falhas na concepção, baixas taxas de fecundação e elevadas taxas de serviço por concepção. As vacas prenhes que se infectarem durante o primeiro e o segundo trimestres de gestação, resultará em morte fetal e aborto pela intensa replicação viral nos fetos (ALFIERI et al., 1998). Todavia, quando os bezerros são infectados na fase final da gestação ou logo após o nascimento é mais comum ocorrer a forma sistêmica no recém-nascido. Esta forma se caracteriza por infecção aguda com surgimento de lesões necróticas nas mucosas dos tratores respiratório e digestivo. Neste caso, os bezerros nascem mortos ou bastante debilitados, podendo vir a morrer em poucas horas (ROCHA, 1999).

A transmissão da enfermidade ocorre por contato direto entre os animais portadores do BoHV-1 com os suscetíveis ou indiretamente, seja por aerossóis, ingestão de águas contaminadas ou fômites. O embrião e o feto podem infectar-se pela via transplacentária (DEL FAVA et al., 2002). A infecção é facilmente transmitida porque grandes quantidades de vírus são excretadas nas secreções respiratórias, oculares e genitais (KAHRS, 2001).

Após a infecção do animal, durante a fase aguda ocorre replicação viral nas células epiteliais da porta de entrada, especialmente na mucosa do trato respiratório ou na mucosa genital, causando necrose e apoptose nessas células (MUYLKENS et al., 2007). Existem dois mecanismos pelos quais o BoHV-1 pode infectar a célula: quando o vírus se liga aos receptores das células hospedeiras por meio de

glicoproteínas específicas do envelope, conseguindo, dessa forma, penetrar nas células; ou quando partículas virais conseguem passar diretamente para uma célula vizinha, evitando a ação dos anticorpos neutralizantes (MUYLKENS et al., 2007).

A latência ocorre quando o vírus penetra nas terminações nervosas periféricas locais e por via axonal retrógrada atinge os sítios de latência, principalmente neurônios do gânglio trigêmeo e sacral, onde o nucleocapsídeo permanece no núcleo da célula hospedeira em forma não infecciosa ou latente, sem produção de progênie viral (ENGELS e ACKERMANN, 1996). O vírus pode ser reativado quando os animais são expostos a fatores predisponentes estressantes, que diminuem a resistência imunológica, como tratamento com glicocorticóides, parição, transporte ou outras enfermidades (VOGEL et al., 2003).

Os testes sorológicos mais utilizados no diagnóstico detectam anticorpos específicos por meio de técnicas de vírus-neutralização (VN) ou pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). O isolamento do BoHV-1 em cultivo celular é considerado o método padrão de diagnóstico direto (TAKIUCHI et al., 2001). O diagnóstico também pode ser obtido por meio da imunofluorescência, imunoperoxidase, hibridização e reação em cadeia de polimerase (PCR) (ALFIERI et al., 1998).

Pesquisadores visam investigar a atividade antiviral de compostos com intuito de desenvolver drogas eficazes. Recentemente, Lisov et al. (2015) relatam atuação do ácido 2,5 di-hidroxibenzóico (conjugado sintético) contra o BoHV-1 durante a adsorção viral. Zhu et al. (2015) demonstraram que a *Curcuma longa* L. (Curcumina) agiu sobre as partículas virais do BoHV-1 no processo de entrada do vírus nas células MDBK. Espada et al. (2015) evidenciaram ação virucida e atuação na fase de adsorção viral de *Trichilia catigua* (Catuaba, planta nativa brasileira) sobre o BoHV-1 e HHV-1.

Não há tratamento específico para os animais infectados com o herpesvírus bovino e os medicamentos antivirais comercializados para humanos que, também, são utilizados em animais, principalmente, de pequeno porte já demonstram falhas pela resistência de alguns vírus frente a esses fármacos (GALDIERO et al., 2013). Assim, são necessários mais estudos em busca de antivirais que possam ser utilizados na terapia contra os herpesvirus, visto que estes se comportam de forma semelhante, a mesma droga testada para os animais pode vir a servir de modelo para os humanos.

4.5 Vírus da diarreia viral bovina (BVDV)

O BVDV é classificado na família *Flaviviridae* e no gênero *Pestivirus* (RIDPATH e FLORES, 2007). A família *Flaviviridae* abriga vários vírus de importância em saúde humana e animal. Todos os vírus dessa família compartilham similaridades com relação à organização genômica, estrutura e ciclo replicativo. São vírions pequenos, envelopados, que contêm uma molécula de RNA linear de polaridade positiva (RIDPATH, 2005).

A família *Flaviviridae* é dividida nos gêneros *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*. O *Flavivirus* é constituído pelos vírus da febre amarela, vírus da dengue, vírus do Nilo Ocidental, das encefalites japonesa e do Saint Louis causadores de importantes zoonoses. O *Hepacivirus* tem como único membro o vírus da hepatite C (HCV) patógeno exclusivo de humanos (RIDPATH e FLORES, 2007). Os *Pestivirus* inclui o vírus da peste suína clássica, o BVDV e o vírus da fronteira, os quais infectam exclusivamente animais (RIDPATH, 2005).

BVDV é considerado, em todo o mundo, um dos patógenos mais importantes de bovinos (RIDPATH e FLORES, 2007), sendo associada à queda no ganho de peso, redução na produção de leite, retardo no crescimento e mortalidade, causando grandes perdas econômicas para a pecuária em todo mundo.

Os isolados de campo circulantes do BVDV são classificados em três espécies, BVDV 1, BVDV 2 e BVDV 3. Além disso, de acordo com a característica biológica de produzir ou não efeito citopatogênico em cultivo celular, os isolados do BVDV podem ser classificados em biótipo citopático (CP) e biótipo não-citopático (NCP) (GOYAL, 2005).

As consequências e severidade da infecção aguda pelo BVDV dependem de uma série de fatores que incluem a idade, a cepa viral, o biótipo, as condições imunológica e reprodutiva do animal e a ocorrência de infecções secundárias (RIDPATH e FLORES, 2007). As manifestações clínicas são desde infecções inaparentes, doenças respiratória e digestiva, doença das mucosas, aborto, teratogenia, doença debilitante crônica e imunodepressão (LUNARDI et al., 2008).

Quando a infecção pelo BVDV ocorre em fêmeas prenhes, o vírus é capaz de atravessar a placenta e infectar o feto (FLORES et al., 2005). As consequências da infecção fetal são determinadas pela fase da gestação em que a fêmea é infectada, biótipo (CP/NCP) e pela estirpe do vírus (FLORES et al., 2005; LIEBLER-TENORIO,

2005). Na primo-infecção por BVDV em novilhas logo após inseminação artificial ou monta natural, diminuem as taxas de concepção por uma dificuldade de fixação do embrião ao útero, ou mesmo que essa fixação ocorra pode haver morte embrionária e perda precoce de gestação, sendo o embrião reabsorvido (EVERMANN e BARRINGTON, 2005). Se a infecção ocorrer em fêmea gestante não imune, o vírus tem a capacidade de atravessar a barreira transplacentária e invadir o feto e, dependendo do seu estágio de desenvolvimento pode ocorrer reabsorção embrionária, atraso no crescimento fetal, morte fetal, abortos, defeitos congênitos, como má formação no sistema nervoso central, deficiências oculares ou então o nascimento de bezerros infectados para toda a vida e sem manifestações clínicas, chamados de persistentemente infectados (LIEBLER-TENORIO, 2005; GROOMS et al., 2006). Mas se a infecção ocorrer no último terço de gestação (após os 150 dias) pode haver resposta imunológica e eliminação do vírus pelo feto (GOYAL, 2005).

Os animais persistentemente infectados tem maior probabilidade de contraírem outras doenças, por isso tem menor tempo de vida, sendo que é frequente a morte antes dos 2 anos de idade. Além disso, podem desenvolver a doença das mucosas se forem infectados simultaneamente por cepa citopatogênica homóloga (FLORES et al., 2005). A doença das mucosas é uma enfermidade gastroentérica fatal, e desencadeada quando um animal persistentemente infectado (portador de um BVDV-NCP) sofre infecção concomitante com BVDV-CP antigenicamente semelhante. O BVDV-CP que determina o desenvolvimento da doença das mucosas (DM) geralmente se origina do BVDV-NCP do próprio animal por mutações, portanto nos animais que desenvolvem a DM, os dois vírus (NCP e CP) estão presentes (RIDPATH e FLORES, 2007). A DM afeta animais entre os 6 meses e os 2 anos de idade, possui baixa morbidade e mortalidade próxima dos 100% (FLORES et al., 2005).

Os animais infectados eliminam o vírus pelas mucosas nasal, ocular e bucal, assim como pelas fezes (SCHUCH, 2006), sendo que o BVDV também já foi isolado de fluidos uterinos e leite. A transmissão do vírus esta associada ao contato direto de animais suscetíveis com os portadores do BVDV (GROOMS et al., 2006; SCHUCH, 2006). Outras formas de infecção são por meio da ingestão ou da inalação do vírus. Os vírus liberados na forma de aerossóis encontram-se suspensos no ar e podem manter a infecciosidade em distâncias entre 1,5 metros a 10 metros (GROOMS et al., 2006). Ainda, pode ocorrer a difusão do BVDV pelos

fômites, inseminação artificial, transferência de embriões e vacinas contaminadas (MOENNIG e PLAGEMANN, 1992).

A replicação do genoma e a produção da progênie viral ocorrem inteiramente no citoplasma da célula hospedeira. A penetração dos vírions nas células ocorre por endocitose, após a interação entre proteínas do envelope viral e receptores da membrana plasmática. Acontece a fusão do envelope com a membrana endossomal, o capsídeo dissocia-se e o genoma é liberado no citoplasma. A replicação do genoma envolve a síntese de uma nova molécula de RNA que posteriormente será encapsulado e as novas partículas virais aparecem em vacúolos no citoplasma. Sua liberação ocorre pela fusão dessas vesículas com a membrana plasmática (BROWNLIE, 1990; RIDPATH, 2005). O pico máximo de liberação dos vírions ocorre entre 12 e 42 horas após a infecção. Cada célula é capaz de produzir de 100 a 1.000 novos vírions, e as primeiras partículas são liberadas 10 horas após a infecção celular (DENG e BROCK, 1993).

O BVDV pode ser um contaminante de produtos biológicos devido ao uso de soro fetal bovino durante cultivo celular (ERICKSON et al., 1991). Além disso, também já foram relatadas contaminações de preparações de interferon (HARASAWA e MIZUSAWA, 1995) e vacinas (HARASAWA, 1994).

A sorologia é uma ferramenta auxiliar importante para o diagnóstico da doença (CHASE et al., 2004). O método sorológico de diagnóstico indireto mais utilizado para determinar anticorpos contra o BVDV é a vírus-neutralização (GOYAL, 1995). O teste de ELISA é outro método sorológico eficiente que apresenta alta especificidade e sensibilidade, porém com desvantagem de ser qualitativo e não possibilitar uma titulação de anticorpos como a VN (CHASE et al., 2004).

No Brasil não há programas oficiais para controle e ou erradicação do BVDV, e, embora existam vacinas disponíveis, o vírus mantém-se endêmico na população. O tratamento com drogas anti-BVDV pode ser inviável em grandes populações bovinas, contudo, compostos que atuem especificamente contra o vírus podem ser uma alternativa adequada em determinadas ocasiões (PAESHUYSE et al., 2006). Nesse sentido, a disponibilidade de um antiviral seria altamente benéfica para o tratamento de linhagens celulares contaminadas (DURANTEL et al., 2004), na produção de embriões *in vitro* (STRINGFELLOW et al., 2005), para tratamento de animais reprodutores ou de alto valor genético ou, ainda, para tratamento de animais silvestres em cativeiro. Ainda podemos considerar a redução ou mesmo o

impedimento da transmissão do vírus em animais tratados, o que evitaria o sacrifício de um grande número de animais saudáveis em programas de erradicação instituídos (PAESHUYSE et al., 2006).

Além disso, o BVDV é considerado um modelo substituto ao vírus da hepatite C (HCV) para avaliação de potenciais antivirais e estudos de mecanismos de ação das drogas (BUCKWOLD et al., 2003; OKAMATO et al., 2009). Ambos compartilham a mesma organização estrutural e o BVDV é fácil de cultivar, há clones moleculares facilmente disponíveis para estudos genéticos (BUCKWOLD et al., 2003). Vários inibidores do HCV já foram descritos usando o BVDV como modelo (STUYVER et al., 2003; SUN et al., 2003; PAESHUYSE et al., 2006).

4.6 Outros vírus

4.6.1 Adenovírus canino tipo 2

O adenovírus canino tipo 2 (*canine adenovirus type 2*, CAV-2) pertence à família *Adenoviridae* e ao gênero *Mastadenovirus*. Os vírions são hexagonais, icosaédricos, sem envelope e com genoma DNA de fita dupla (YOON et al., 2010). O CAV-2 é antigenicamente relacionado ao adenovírus canino tipo 1, responsável pela hepatite infecciosa canina (HU et al., 2001). Os dois vírus induzem sorologia e proteção cruzada (BUONAVOGLIA et al., 2008). A distribuição do CAV-2 é mundial, apresenta baixa mortalidade e alta morbidade (BUONAVOGLIA e MARTELLA, 2007; DECARO et al., 2008).

Este vírus é um dos agentes envolvidos na traqueobronquite infecciosa canina ou tosse dos canis que é uma enfermidade geralmente multifatorial, envolve outros vírus e, também, algumas bactérias (MORAES e COSTA, 2007). A via de infecção deste vírus é oro-nasal, por meio do contato direto como saliva, urina ou fezes contaminadas e o seu alvo são células epiteliais não ciliares da traqueia, brônquios, cavidade nasal, faringe e amígdalas, podendo inclusive ser encontrado nos linfonodos retrofaríngeos ou brônquicos ou, ainda, no estômago e no intestino (BUONAVOGLIA e MARTELLA, 2007; BULUT et al., 2013).

A infecção ocasiona lesões no epitélio respiratório, inflamação aguda e perda das funções dos cílios das vias aéreas. As manifestações clínicas envolvem descarga nasal e ocular, tonsilite, traqueíte, bronquite, faringite e, eventualmente,

broncopneumonia (MORAES e COSTA, 2007; BUONAVOGLIA e MARTELLA, 2007).

4.6.2 Coronavírus canino

O coronavírus canino (*canine coronavirus*, CCoV) é classificado na família *Coronaviridae*, subfamília *Coronavirinae* e gênero *Alphacoronavirus*. Este vírus possui o genoma RNA não segmentado de fita simples e sentido positivo, é envelopado, pleomórfico e arredondado com até 220 nm de diâmetro (MASTERS, 2006). O nome coronavírus é derivado do latim *corona* que significa coroa, esta morfologia se deve as glicoproteínas estruturais localizadas na superfície viral (HOLMES e LAI, 1996).

O CCoV é classificado em dois genótipos o CCoV-1 e o CCoV-2 (DECARO e BUONAVOGLIA, 2008). A coronavirose entérica canina é uma doença infecciosa cosmopolita, que ocorre de forma endêmica, com elevadas morbidade e mortalidade em cães jovens (ZAPPULLI et al., 2008). A principal via de infecção é a oral, sendo as fezes e os fômites contaminados as fontes de disseminação do vírus. O CCoV é eliminado nas fezes por até duas semanas pós-infecção e alguns estudos demonstram que este período pode se prolongar por até 180 dias (BRANDÃO et al., 2012).

Em neonatos, o CCoV replica-se primariamente nas extremidades dos vilos do intestino delgado, causando uma infecção lítica seguida por descamação e encurtamento dos vilos, causando diarreia em 18 a 72 horas pós-infecção, além de ocasionar vômitos, letargia e anorexia (DECARO e BUONAVOGLIA, 2008). Ainda, já foi demonstrado que o CCoV potencializa dramaticamente a severidade de infecções pelo parvovírus canino (PRATELLI et al., 1999).

4.6.3 Parvovírus canino tipo 2

O parvovírus canino tipo 2 (*canine parvovirus type 2*, CPV-2) pertence à família *Parvoviridae* e gênero *Parvovirus*, caracteriza-se por ser um vírus pequeno (20 a 25 nm), esférico, com capsídeo icosaédrico, possui uma molécula de DNA linear de fita simples como genoma (MORAES; COSTA, 2007). A sua dependência por células com alta divisão mitótica, faz com que afetem, preferencialmente, órgãos

que apresentam células em multiplicação, por exemplo, da medula óssea, embrionárias e das criptas intestinais (MORAES e COSTA, 2012).

Estes vírus são extremamente estáveis no ambiente, podendo manter sua infectividade durante meses em determinadas condições, sendo relativamente resistentes aos desinfetantes, pois são vírus não envelopados (MARULAPPA e KAPIL, 2009). O CPV-2 possui três variantes antigênicas CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c. As diferenças entre as duas primeiras variantes são mínimas, o que confere uma boa proteção cruzada (MORAES e COSTA, 2012). A terceira variante diferencia-se das outras por apresentar substituições dos aminoácidos Asn e Asp pelo Glu na posição 426 da proteína VP2 do capsídeo (HONG et al., 2007; BUONAVOGLIA et al., 2001).

Os filhotes, entre 6 semanas e 6 meses, sem vacinação são os mais propensos ao desenvolvimento da gastroenterite hemorrágica pelo CPV, porém cães de qualquer idade, gênero ou raça podem ser acometidos. Algumas raças de cães de médio e grande porte, como Doberman, Labrador, Pastor Alemão, Pit Bull e Rottweiler podem ser mais suscetíveis e vir a desenvolver uma doença mais grave quando infectados (MORAIS e COSTA, 2012).

A principal via de infecção é pela via oro-nasal pelas fezes, fômites e/ou ambientes contaminados (MORAES e COSTA, 2012). A replicação inicial do vírus ocorre nos tecidos linfóides da orofaringe dois dias após infecção. Em seguida, uma intensa viremia é observada em até cinco dias pós-infecção, disseminando o vírus para outros tecidos: medula óssea, tecido linfóide e intestino delgado (McCANDLISH, 2001). A evolução clínica após a exposição ao CPV-2 depende do grau de imunidade materna, da virulência da cepa viral, da dose infectante do vírus e da defesa imunológica do hospedeiro. A principal manifestação é a gastroenterite (MORAES e COSTA, 2012). A perda do epitélio intestinal permite a penetração de bactérias e outros agentes na circulação sanguínea, o que contribui para o agravamento dos sinais clínicos (MORAES e COSTA, 2012).

4.6.4 Vírus da cinomose canina

O vírus da cinomose canina (*canine distemper vírus*, CDV) pertence à família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae* e gênero *Morbillivirus*. Este vírus é envelopado, pleomórfico, relativamente grande, variando de 150 a 250 nm, o

genoma viral consiste de uma fita de RNA não segmentada de polaridade negativa (VAN REGENMORTEL et al., 2000).

O CDV é um importante patógeno de distribuição mundial, endêmico e responsável por altas taxas de mortalidade (APPEL e SUMMERS, 1999). Já foi descrito nos animais das famílias: *Canidae* (cão doméstico, raposa, dingo, coiote, lobo e chacal); *Mustelidae* (furão, vison, doninha, marta, cangambá, texugo e lontra); *Procyonidae* (guaxinim, panda, jupará e quati) e *Felidae* (exóticos) (BIRCHARD e SHERDING, 2008).

A principal via de transmissão viral ocorre por contato direto entre os animais infectados e os suscetíveis pela exposição a aerossóis provenientes de secreções e excreções oculares, respiratórias, digestivas e urinárias (MARTELLA, ELIA et al., 2008). A transmissão transplacentária também pode ocorrer, mas é menos frequente (BIRCHARD e SHERDING, 2008).

A incidência é mais alta em animais entre os 60 e 90 dias de idade, período em que diminui a taxa de anticorpos maternos. Porém, cães adultos não vacinados e não expostos ao vírus são comumente afetados e desenvolvem a doença (CORREA e CORREA, 1992).

A manifestação clínica da infecção depende do título viral, da estirpe viral infectante, da idade e do perfil imunológico do animal (APPEL, 1969). Os sinais são multissistêmico, manifestados por doenças epiteliais que geralmente precedem ou ocorrem simultaneamente as doenças neurológicas (KOUTINAS et al., 2002). Além disso, este vírus causa imunossupressão nos animais acometidos, tornando-os suscetível a uma série de infecções secundárias (BLIXENKRONE-MOLLER et al., 1993). Na infecção transplacentária, os cães desenvolvem sinais neurológicos durante as 4-6 primeiras semanas de vida e dependendo do estágio da gestação em que se der a infecção podem ocorrer abortos, natimortos ou neonatos vivos fracos (KRAKOWKA et al., 1977).

4.6.5 Calicivírus felino

O calicivírus felino (*feline calicivirus*, FCV) pertence à família *Caliciviridae* e ao gênero *Vesivirus*. Caracterizado por ser um vírus pequeno, não envelopado, ter um capsídeo esférico e possuir o genoma RNA de fita simples e polaridade positiva (RADFORD et al., 2009; LAIRMORE, 2011).

O FCV é um agente patogênico contagioso e amplamente difundido entre a população felina mundial (RADFORD et al., 2007). Responsável por enfermidades do trato respiratório superior (STILES, 2013) e, ainda, pode ocasionar poliartrite e lesões na cavidade oral, como as úlceras (GOULD e PAPASOULIOTIS, 2013). Considerado de elevada morbidade e de baixa mortalidade, contudo em animais mais jovens quando ocorre o agravamento pela pneumonia a taxa de mortalidade aumenta (PESAVENTO et al., 2008).

A transmissão ocorre pelo contato direto através de secreções infectadas eliminadas das cavidades orais, nasais e oculares, e de forma indireta por meio de fômites contaminados (SYKES, 2013). A maioria dos gatos com infecção aguda excreta o vírus durante cerca de 30 dias após a contaminação e acaba eliminando o vírus de forma espontânea. Porém, alguns gatos podem desenvolver uma infecção persistente (estado de portador), caracterizada por alojar o vírus na nasofaringe e excretar de uma forma quase contínua, sendo uma fonte constante de infecção para outros animais suscetíveis (RADFORD et al., 2007).

4.6.6 Herpesvírus felino tipo 1

O herpesvírus felino tipo 1 (*feline herpesvirus type 1*, FHV-1) pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus*, é constituído por DNA fita dupla, capsídeo icosaédrico e envelope. Apresenta distribuição cosmopolita e produz uma doença conhecida como rinotraqueíte viral felina (FRANCO et al., 2012).

Embora animais de qualquer idade possam ser acometidos, a doença se manifesta de forma mais severa e com maior frequência em filhotes e em animais debilitados (MARQUES et al., 2008). O FHV-1 apresenta alta morbidade e baixa mortalidade, porém em filhotes de até seis meses de idade que não recebem colostro materno em quantidades adequadas a mortalidade é maior (STILES, 2000).

A principal forma de transmissão do vírus é a partir das secreções orais, nasais e oculares de felinos infectados. Os fômites, também são uma via de infecção viral importante em gatis (GOULD, 2011; GRACE, 2011). O FHV-1 preferencialmente infecta as células mucoepiteliais das tonsilas, da conjuntiva, da mucosa nasal e do epitélio corneano (GOULD, 2011). A replicação viral ocorre, predominantemente, na mucosa do septo nasal, turbinados, nasofaringe e tonsilas, e em outros tecidos

como conjuntiva, pulmão, linfonodos mandibulares e faríngeos e porção superior da traqueia. No sistema nervoso, o vírus dissemina-se ao longo dos nervos sensoriais, até atingir os neurónios, em particular o gânglio trigeminal (THIRY et al., 2009; GRACE, 2011).

Todos os animais que sobrevivem à infecção aguda se tornam portadores do vírus em estado de latência e podem voltar a eliminar o vírus de maneira intermitente durante episódios de reativação, causados por estresse ou pelo uso de corticoides, permitindo a transmissão do vírus a outros animais (THIRY et al., 2009; FRANCO et al., 2012).

As manifestações clínicas relacionadas à infecção estão relacionadas as alterações: inespecíficas, do trato respiratório superior e oculares. As infecções bacterianas são comuns e provocam à eliminação de secreção nasal mucopurulenta. A gravidade dos sinais clínicos difere entre os animais infectados pelo grau de virulência das diferentes estirpes (GOULD, 2011).

4.6.7 Herpesvírus bovino tipo 5

O herpesvírus bovino tipo 5 (*bovine herpesvirus type 5*, BoHV-5) pertencem à família *Herpesviridae*, subfamília *Alfaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus* (ROIZMANN et al., 1992). Apresenta uma fita dupla linear de DNA que está envolta por capsídeo icosaédrico, tegumento e envelope (MUYLKENS et al., 2007; ROIZMANN e PELLETT, 2007). Este vírus afeta normalmente bovinos jovens (até oito meses de idade) e é responsável pela doença denominada encefalite herpética bovina (D'ARCE et al., 2002).

As principais vias de eliminação viral são pelas secreções respiratórias, oculares e genitais. A infecção ocorre pela transmissão horizontal por inalação de aerossóis e fômites contaminados, pela cópula ou inseminação artificial, pela transferência de embriões e através da transmissão vertical que pode ocorrer em qualquer fase da gestação (MARS et al., 2000; SILVA et al., 2007).

As principais portas de entrada do vírus são pelas mucosas dos tratos respiratório e genital e pelo epitélio conjuntival (ENGELS e ACKERMANN, 1996). Após a penetração no organismo, a replicação primária do vírus ocorre nas células epiteliais e submucosas e no tecido conjuntivo (PASTORET et al., 1982). A infecção sistêmica acontece quando as partículas virais invadem linfonodos, vasos linfáticos e

o sangue, causando uma viremia que se dissemina pelo organismo até as terminações nervosas dos ramos maxilar e mandibular do nervo trigêmeo que é a rota mais provável para a infecção do sistema nervoso central, e consequentemente o desenvolvimento da meningoencefalite (ENGELS e ACKERMANN 1996). Além disso, o vírus pode estabelecer latência em seu hospedeiro o que torna o animal portador pelo resto da vida e a reativação e excreção do vírus podem ocorrer em situações de estresse (PASTORET et al., 1985; VOGUEL et al., 2003; FRANCO et al., 2012).

4.6.8 Vírus da arterite viral equina

O vírus da arterite viral equina (*Equine viral arteritis*, EAV) pertence à família *Arteriviridae* e ao gênero *Arterivirus*. Este vírus é pequeno (50 a 70 nm) possui um nucleocapsídeo icosaédrico envolto por um envelope contendo projeções de glicoproteínas virais e apresenta um genoma de RNA fita simples de sentido positivo (DEL PIERO, 2000).

A arterite viral equina é uma enfermidade de caráter cosmopolita e acomete todos os equídeos (PAWESKA et al., 1997), é caracterizada por lesões inflamatórias nos pequenos vasos sanguíneos, especialmente nas arteríolas durante a fase aguda da infecção. Causa sérios prejuízos econômicos devido a perdas diretas decorrentes de quadros respiratórios a abortamentos e quadros fatais, além de restrições internacionais para o tráfego e comercialização de animais e sêmen (TIMONEY e MCCOLLUM, 1996).

A epidemiologia da doença depende de fatores relacionados ao hospedeiro, ao ambiente e ao próprio vírus, dentre estes fatores destacam-se: a variação de patogenicidade das cepas isoladas a campo, as vias de transmissão, a persistência de animais portadores e o estado imune do hospedeiro (TIMONEY e MCCOLLUM, 1997). A transmissão ocorre de forma direta por secreções respiratórias de animais agudamente infectados e, também a partir da urina, fezes, secreções vaginais, fetos abortados e membranas placentárias; pela via venérea por meio de secreções de garanhões agudamente ou cronicamente infectados e, ainda, de forma indireta por fômites contaminados (TIMONEY e MCCOLLUM, 1997; HOLYOAK et al., 2008).

Nos machos, o vírus é mantido nos órgãos sexuais acessórios, principalmente na ampola dos ductos deferentes e é eliminado constantemente pelo

sêmen. Nas fêmeas, quando infectadas durante a gestação pode ocorrer abortamento ou mortalidade neonatal, porém quando infectadas no terço final podem transmitir o vírus para o feto (GLASER et al., 1997). O vírus não é teratogênico, mas o potro infectado congenitamente pode desenvolver uma rápida, progressiva e fulminante pneumonia intersticial e enterite fibronecrótica.

No Brasil, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento instituiu, a partir de 2008, medidas zoonos sanitárias específicas para arterite viral equina visando a proteção do país contra esta doença.

4.6.9 Vírus da influenza equina

O vírus da influenza equina (*Equine influenza vírus*, EIV) pertence à família *Orthomyxoviridae* e ao gênero *Influenzavirus A*. Este vírus possui genoma RNA segmentado de fita simples e polaridade negativa, e são envelopados. Apresenta dois subtipos o H7N7 e o H3N8. (WRIGHT et al., 2007). Acomete equídeos de todas as idades, é altamente contagioso, causa perda dos cílios da superfície epitelial, estase do muco e consequente predisposição às infecções bacterianas secundárias levando a quadros clínicos mais graves (FLORES, 2007).

A infecção ocorre por via respiratória e a disseminação entre os animais é de forma epidêmica, mediante condições de aglomerações, como em exposições, competições e vendas dos equídeos (OLUSA et al., 2010). Ambos os subtipos costumam causar sintomas parecidos, como tosse, febre, depressão, perda de apetite, dores musculares, traqueobronquite, pneumonia secundária e, consequentemente, queda de performance física (GERBER, 1969; TIMONEY, 1996). O H3N8 causa uma doença mais severa por sua característica epiteliotrópica e o H7N7 ocasiona uma doença mais branda. Porém, a severidade dos sintomas varia de acordo com a imunidade do animal, virulência e estirpe viral, manejo e condições ambientais (FLORES, 2007).

5 Artigos

5.1 Artigo 1

Activity of the antimicrobial peptide P34 against bovine herpesvirus type 1

**Castro, C.C.; Silva, D.S.; Lima, M.; Fischer, G. Vargas, G.A.; Costa, G.A.;
Brandelli, A.; Motta, A.S.; Hübner, S.O.**

Submetido à revista Virus Research

Activity of the antimicrobial peptide P34 against bovine herpesvirus type 1

Clarissa C. de Castro^{a,*}, Débora S. e Silva^a, Marcelo de Lima^a, Geferson Fischer^a, Gilberto D'Avila Vargas^a, Gêssica A. Costa^b, Adriano Brandelli^c, Amanda S. da Motta^b, Silvia O. Hübner^a

^aDepartamento de Veterinária Preventiva, Laboratório de Virologia e Imunologia Animal, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, s/nº, Zip Code: 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

^bInstituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Sarmiento Leite, nº 500, Prédio 12101, Zip Code: 90050-170, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^cDepartamento de Ciência de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, nº 9500, Prédio 43212, Zip Code: 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

*Corresponding author at: Departamento de Veterinária Preventiva, Laboratório de Virologia e Imunologia Animal, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, s/nº, Zip Code: 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

E-mail address: clarissac.decastro@gmail.com (C.C. de Castro)*, debyinha_scopel@hotmail.com (D.S. e Silva), mdelima.ufpel@gmail.com (M. de Lima), geferson.fischer@gmail.com (G. Fischer), gdavilavargas@gmail.com (G.D.Vargas), gessica.a.costa@gmail.com (G.A. Costa), abrand@ufrgs.br (A. Brandelli), asmcons@ig.com.br (A.S. da Motta), silviaohubner@gmail.com (S.O. Hübner).

ABSTRACT

Peptide P34 is produced by the *Bacillus* sp. P34 with a previously demonstrated antimicrobial activity. In this study, the antiviral potential of P34 and the mechanism of action against bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) were investigated *in vitro*. P34 exhibited low toxicity, high selectivity index (22.9) and a percentage of inhibition of up to 100% in MDBK cells. Results from antiviral assays indicated that P34 did not interact with cell receptors, but it was able to inhibit the viral penetration immediately after pre-adsorption. Virucidal effect was observed but only in cytotoxic concentrations of the peptide. In addition, BoHV-1 growth curve in MDBK cells in the presence of P34 revealed a significant reduction in virus titer only after 8 h post-infection, also suggesting an important role at late stages of the replicative cycle. Taken together, the data showed that the antimicrobial peptide P34 may be considered as a potential novel inhibitor of herpesviruses *in vitro* and must encourage further investigation of its antiherpetic activity in animal models as well as against a wide spectrum of viruses.

Keywords: Antiviral activity; Growth kinetics; Herpesvirus; MDBK cells; Peptide P34.

1. Introduction

Many naturally occurring peptides have been isolated from vertebrates and invertebrates and extensively studied with respect to their antimicrobial activity (Zaiou, 2007). P34 is an

antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. P34 isolated from the fish Piau-com-pinta (*Leporinus* sp.) found in the Brazilian Amazon basin (Motta et al., 2007a).

The antimicrobial activity of P34 was characterized as a fengycin-like substance (Motta et al., 2007a) with a broad inhibitory effect against Gram-negative and Gram-positive bacteria such as *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* (Motta et al., 2007b). Further characterization of P34 by infrared spectroscopy and mass spectra showed the hydrophobic nature of the peptide. This antimicrobial peptide has a molecular mass of 1,456 Da and it is relatively heat-stable and sensitive to proteolytic enzymes (Motta et al., 2007b). Additionally, a screening aimed at identifying its activity against viruses of veterinary importance demonstrated that P34 exhibited antiviral activity against feline herpesvirus type 1 (FHV-1) and equine arteritis virus (EAV) (Silva et al., 2014).

Despite the massive research efforts for the development of new compounds or even the enhancement of efficacy of the traditional chemical molecules, there are only a few drugs currently licensed for the treatment of herpesviruses. Resistance of human herpesviruses (HHV) to acyclovir has been widely reported and cidofovir and foscarnet - the other two drugs usually used for HHV therapy - are both nephrotoxic and their use restricted to confirmed cases of acyclovir resistance (Galdiero et al., 2013).

A promising alternative for the development of new compounds with anti-herpetic activity and to overcome the side effects and resistance to the current therapies would be the search for antiviral peptides. Particularly, antimicrobial peptides can exert a broad spectrum of activity on infectious agents; they can be highly specific and effective and even biodegraded by peptidases, which limit their accumulation and results in lower toxicity (Galdiero et al., 2013). Several reports have shown the antiviral potential of synthetic and naturally occurring peptides against different viruses such as HHV-1 and HHV-2, human immunodeficiency virus (HIV), vesicular stomatitis virus (VSV), influenza A virus,

cytomegalovirus, adenovirus, rotavirus and other viruses (Daher et al., 1986; Carriel-Gomes et al., 2007; Basu et al., 2009).

The objective of this study was to investigate the antiviral potential and the *in vitro* mechanism of action of the antimicrobial peptide P34 against bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1).

2. Materials and methods

2.1. Peptide P34, virus and cells

The antimicrobial peptide P34 was produced as previously described (Motta et al., 2007b) and protein concentration measured by the Lowry method (Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's Modification, Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MI, USA). P34 was stored in small aliquots at -20 °C until use.

The Los Angeles (LA) strain of BoHV-1 was used in all assays. The virus was propagated and titrated in Madin Darby Bovine Kidney cells (MDBK, NBL-1– ATCC® Number: CCL22™, Manassas, USA). Cells were cultured in Eagle's Essential Medium (E-MEM; Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, USA) supplemented with fetal bovine serum (Gibco, USA), enrofloxacin (Bayer, Brazil), amphotericin B (Cristália, Brazil), penicillin (Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, USA) and streptomycin (Vetec, Brazil) and kept at 37 °C and 5% CO₂ atmosphere.

2.2. Cytotoxicity assays

Different concentrations of P34 (1.0 to 5.5 µg/mL) were added onto confluent monolayers of MDBK cells and the cellular viability was assessed after 72 h of incubation by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) method and neutral

red assay as described elsewhere (Mosmann, 1983; Borenfreund and Puerner, 1985). The absorbance at 540 nm was measured in a microplate reader (TP-READER NM, Thermo Plate). The percentage of cell viability was calculated by $AT/AC \times 100$; where AT and AC indicate the absorbance of treated and control cells, respectively (Vaucher et al., 2010). The 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) was defined as the concentration that caused 50% of reduction in dye uptake. All cytotoxic assays were performed in triplicate.

2.3. Antiviral assays

Antiviral activity was analysed by comparing the virus titres reached on P34 treated and non-treated MDBK cells and results were expressed in terms of percentage of inhibition (PI) using antilogarithm values of $TCID_{50}$, as follows: $PI = [1 - (T \text{ antilogarithm} / C \text{ antilogarithm})] \times 100$. The P34 concentration which inhibited the cytopathic effect (CPE) by 50% was defined as the 50% effective concentration (EC_{50}) and the selectivity index (SI) was determined as the ratio between CC_{50} and EC_{50} . Each one of the antiviral assays was performed in triplicate and virus titers were expressed as 50% tissue culture infectious dose per 100 μ L ($TCID_{50}/100\mu$ L).

2.3.1. Cytopathic effect (CPE) inhibition assay

BoHV-1 was inoculated onto confluent monolayers of MDBK cells in the presence or absence of the non-toxic concentration of P34 (1.2 μ g/mL) and viral titers were determined 48 h and/or 72 h post infection (hpi).

2.3.2. Virus yield reduction assay

Confluent monolayers of MDBK cells were inoculated with 100 $TCID_{50}$ of BoHV-1 and incubated for 1 h at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere. After a washing step to remove non-

adsorbed viral particles, the cells were incubated or not with the non-toxic concentration of P34, as previously described by Luganini et al. (2010). After incubation for 24 and 48 h, microplates were frozen, thawed, and the supernatant submitted to virus titration.

2.3.3. Effect of P34 on pre-treated cells

Monolayers of MDBK cells were incubated with a non-toxic concentration of P34 during 6 and 24 h at 37 °C. After this period, treated cells were washed with E-MEM and a titration with BoHV-1 was performed. Viral titer was determined after 72 h and compared with controls (BoHV-1 titration on non-treated cells).

2.3.4. Effect of P34 on cell receptors for BoHV-1

BoHV-1 (100 TCID₅₀) or P34 (1.2 µg/mL) were added onto confluent monolayers of MDBK cells for 1 h at 37°C. After washing with phosphate buffered saline (PBS), 100 TCID₅₀ of BoHV-1 was inoculated onto cells treated with P34 followed by incubation for 1 h at 37 °C. E-MEM was added onto cells inoculated with virus. After 48 h of incubation, all microplates were submitted to freeze-thaw cycles with subsequent titration of the supernatant.

2.3.5. Viral penetration assay

Confluent monolayers of MDBK cells grown in 96-well plates were inoculated with 100 TCID₅₀ of BoHV-1 and adsorbed for 2 h at 4 °C as previously described by Hu and Hsiung (1989) with modifications. After removing the medium containing unbound virus, 1.2 µg/mL of P34 was added during viral entry into the cells, at 37 °C for 10 min. MDBK cells were then washed with neutralization buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0.5 M glycine, pH 3.0) for 1 min to inactivate non-penetrated viruses. After

washing twice with PBS, E-MEM was added onto cells and after 72 h of incubation at 37 °C the microplates were submitted to freeze-thaw cycles and the supernatant was titrated.

2.3.6. P34 virucidal effect

BoHV-1 was incubated with P34 (non-cytotoxic concentration) for 6 h at 4 °C and 20 °C and, for 6, 12 and 24 h at 37 °C. Aliquots of BoHV-1 were also mixed with P34 in concentrations of 55 µg/mL and 275 µg/mL during 6 h at 37 °C. A viral suspension with E-MEM without P34 was used as positive control. The presence of residual infectious virus was evaluated by titration on confluent monolayers of MDBK cells.

2.3.7. Effect of P34 on BoHV-1 growth curve in MDBK cells

Confluent monolayers of MDBK cells were infected with BoHV-1 with a multiplicity of infection (MOI) of 1. After adsorption for 1 h at 37 °C, cells were then washed with E-MEM and treated or not with P34 (1.2 µg/mL) for 1, 8, 12 and 18 h. Supernatants of infected cells, treated or not with P34 at different time points were collected and kept at -70 °C for titration.

2.4. Statistical analysis

Statistical analysis were performed using a two-tailed Student's t-test and values were considered significant when $p < 0.01$.

3. Results

3.1. Cytotoxicity assays

A CC_{50} of 2.29 $\mu\text{g/mL}$ was determined by MTT and neutral red assays. Toxicity of the peptide on MDBK cells was not observed at concentrations $\leq 1.2 \mu\text{g/mL}$, and it was used in all the antiviral assays. The average EC_{50} of the peptide P34 was 0.1 $\mu\text{g/mL}$.

3.2. Antiviral assays

The percentages of inhibition (PI) observed with P34 in the different antiviral assays are summarized in Fig. 1. Antiviral activity of the peptide P34 against BoHV-1 was initially evaluated using a CPE inhibition assay. This assay allowed us to observe a significant reduction on the virus titers between untreated infected cultures and those cultures treated with P34. The viral reduction observed was from $10^{5.05} \text{TCID}_{50}$ to $10^{1.75} \text{TCID}_{50}$, resulting in a PI of 99.94%. Such significant percentage of inhibition was also confirmed by the SI detected (22.9).

In the virus yield assay, the BoHV-1 titers obtained were $10^{2.34} \text{TCID}_{50}$ after 24 h and 10^4TCID_{50} after 48 h of incubation. However, in the presence of P34, no viral titer was detected, as demonstrated by the absence of CPE (PI of 100%). When a pre-treatment of MDBK cells with P34 for 6 or 24 h was performed, a reduction of viral titer was not detected (PI of 0%).

The assay performed in order to verify the possibility of interaction with receptors by P34 on MDBK cells, indicated that the peptide was not capable of blocking or interact with BoHV-1 receptors. The addition of 100 TCID_{50} of the virus on MDBK cells resulted in a titer of $10^{2.70} \text{TCID}_{50}$ after 48h of incubation. When the peptide was incubated for 1h before the inoculation of 100 TCID_{50} of the virus, it was obtained a similar titer ($10^{2.4} \text{TCID}_{50}$).

To further evaluate the antiviral mode of action of P34, a viral penetration assay was carried out. Results have indicated that peptide P34 inhibited totally virus penetration when

added on cell monolayers immediately after pre-adsorption at 4 °C, whereas $10^{1.5}$ TCID₅₀ of BoHV-1 was detected in the absence of the peptide (Fig. 1).

In order to determine whether P34 might directly inactivate BoHV-1 virions, a viral suspension was incubated along with the peptide under different conditions of temperature and time. Results of these experiments showed that the virus titer was not reduced after treatment with 1.2 µg/mL (Fig. 1). However, when the peptide was used in the cytotoxic concentrations of 55 µg/mL and 275 µg/mL, the viral titer decreased from $10^{3.75}$ to $10^{1.5}$ TCID₅₀ ($p < 0.01$) or no viral titer was detected, respectively (Fig. 2).

Analyzing the BoHV-1 growth curve in MDBK cells (Fig. 3) it was possible to observe a significant reduction in the titer after 8 h post-BoHV-1 infection (PI = 90%). After 12 and 18 h of treatment, PIs of 99% and 99.9% were detected, respectively ($p < 0.01$). Based on these preliminary results, P34 was added 8 hpi in MDBK cells in order to verify the activity of P34 at late stages of the BoHV-1 replication cycle. Viral titration was performed after 24 h of incubation at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. When the peptide was added only 8 hpi, results indicated the absence of detectable viral titer in the supernatant of treated cells. On the other hand, 10^3 TCID₅₀ of BoHV-1 was detected in the positive controls (data not shown).

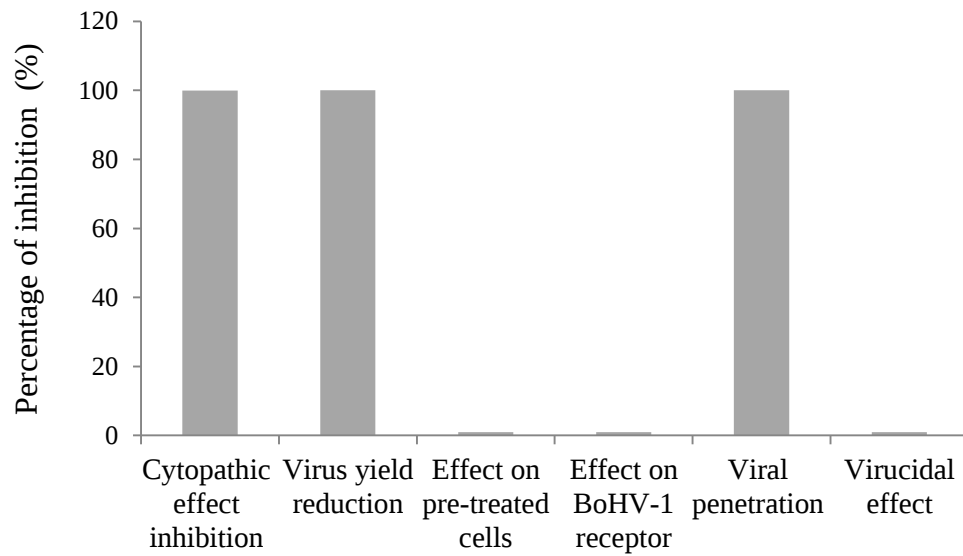


Fig. 1. Effect of P34 on BoHV-1 infection in MDBK cells. P34 was added at a final concentration of 1.2 $\mu\text{g/mL}$ in all experiments. Percentages of inhibition were calculated with respect to control infected cells.

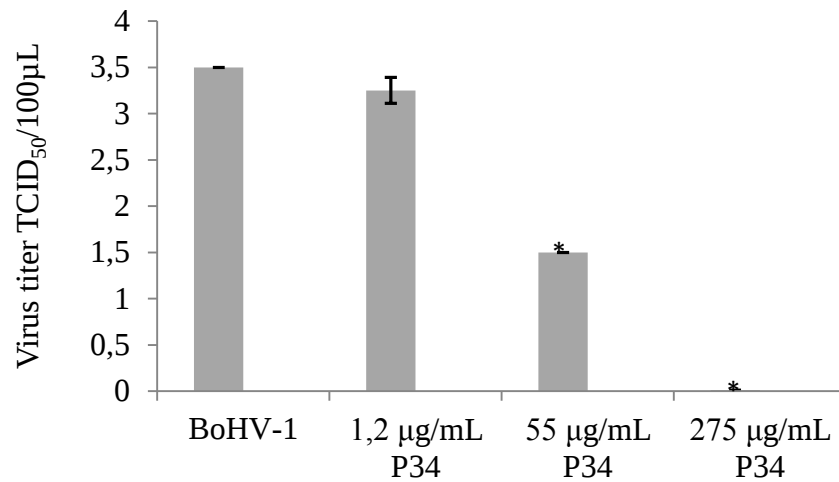


Fig. 2. Virucidal effect exerted by P34 at different concentrations on BoHV-1 virions after incubation at 37 °C for 6 h. Titers were compared to the positive control (BoHV-1). All data are the mean $\pm$ SD of the independent experiments carried out in triplicate. P-values were determined using Student's t test. *P < 0.01

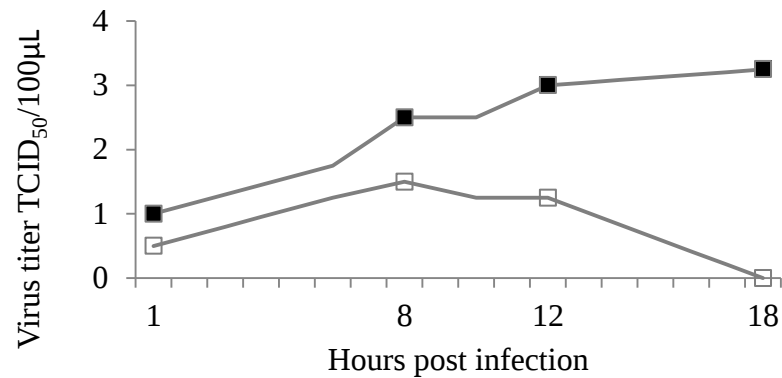


Fig. 3. Viral growth curve in MDBK cells infected with BoHV-1 at a MOI of 1. Monolayers of cells were treated (open symbol) or non-treated with P34 (closed symbol) for 1, 8, 12 and 18 h and the supernatant submitted to virus titration.

4. Discussion

Antimicrobial peptides have been gaining attention as important therapeutic intervention alternatives in the field of disease prevention and care against a variety of microorganisms (Oyston et al., 2009). There are about 100 peptide-based drugs in the market, constituting about 10% of the entire drug market (Craik et al., 2013).

In the present study, we evaluated the antiviral potential and the *in vitro* mechanism of action of the antimicrobial peptide P34 against BoHV-1. Overall, presented low toxicity (1.2 µg/mL) and a SI of 22.9, indicating a great potential to be used as a therapeutic drug, once it has a reliable security margin (Al-Khayat and Ahmad, 2012). Despite the absence of virucidal effect of P34 at nontoxic concentrations (Fig. 2), a percent of inhibition up to 100% was detected in specific antiviral assays, thus confirming the antiviral potential of P34 *in vitro*. Such high percentages of inhibition of the BoHV-1 replication were observed in the cytopathic effect inhibition assay, virus yield reduction assay and viral penetration assay as showed in Fig. 1.

However, it is important to take into account that a virucidal effect was observed when P34 was incubated with BoHV-1 at higher concentrations (55 $\mu\text{g/mL}$ and 275 $\mu\text{g/mL}$), as shown in Fig. 2. In spite of the toxicity of these concentrations for MDBK cells, these results suggest an ability of P34 to adhere and/or destabilize the viral envelope. Due to the lipophilic and hydrophobic features of P34, the mechanism of action may be explained by interaction of the peptide with the viral envelope and subsequent interference or even blockage of the viral binding to host cell receptors.

The antiviral activity exerted by peptides often appears to be a result of a direct effect on the viral envelope or by interference with different stages of the viral replication cycle (Wachsman et al., 2003; Jenssen et al., 2006). In the assays to determine the mechanism of action of P34 *in vitro*, we observed that the peptide most likely does not act on receptors present in MDBK cells since BoHV-1 replicated efficiently even after the cell treatment with the peptide. Next, a virus yield reduction assay was performed as a preliminary investigation of the effects of P34 on the viral replication cycle in MDBK cells. Results showed PI of 100% after 24 and 48 h of treatment immediately after viral infection.

Additionally, it was observed a complete inhibition of the viral infectivity in the presence of P34 in the adsorption/penetration phases in comparison with the controls. Considering the low toxicity of the P34 for MDBK cells and the significant inhibition of BoHV-1 *in vitro*, we investigated the step of BoHV-1 replication cycle targeted by the P34. To better understand the mechanism of action, a viral growth curve was performed in the presence of P34 in order to address whether the peptide would still inhibit the virus after the binding step or in a post-infection stages of the BoHV-1 replication cycle in MDBK cells. Results showed a PI of 90% after 8 hpi and 99.9% after 12 h and 18 hpi, respectively (Fig. 3). These data indicated P34 activity at late stages of the BoHV-1 replication cycle in MDBK

cells, most likely interfering with the acquisition of the envelope and/or blocking the egress of the viral particles.

Taken together, the results showed that peptide P34 may act in different steps of the BoHV-1 replication in MDBK cells. According to the obtained data, we suggest that P34 exerts activity in the adsorption/penetration and assembly/egress stages of the viral particle, possibly through interactions with phospholipids and/or viral proteins. Even though the results presented here are promising, further investigations must be performed to unravel the molecular basis for the exact antiviral mechanism of action of P34. In conclusion, the data presented here indicate that the peptide P34 may be considered as a potential novel inhibitor of herpesvirus infection and may encourage additional investigation of its potential antiherpetic activity in animal models.

Acknowledgements

We are grateful to Capes and CNPq for the financial support.

References

- Al-Khayat, Z.A., Ahmad, A.M., 2012. Antiviral activity of enviroxime against poliovirus and rubellavirus in tissue culture. *Ibnosina J Med BS*. 4, 9-12.
- Basu, D., Walkiewicz, M.P., Frieman, M., Baric, R.S., Auble, D.T., Engel, D.A., 2009. Novel influenza virus NS1 antagonists block replication and restore innate immune function. *J. Virol.* 83, 1881-1891.
- Borenfreund, E., Puerner, J.A., 1985. A simple quantitative procedure using monolayer culture for toxicity assays (HTD/NR-90). *J Tissue Cult Methods*. 9, 7-9.

- Carriel-Gomes, M.C., Kratz, J.M., Barracco, M.A., Bach  re, E., Barardi, C.R.M., Simoes, C.M.O., 2007. *In vitro* antiviral activity of antimicrobial peptides against herpes simplex virus 1, adenovirus, and rotavirus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 102, 469-472.
- Craik, D.J., Fairlie, D.P., Liras, S., Price, D., 2013. The future of peptide-based drugs. *Chem Biol Drug Des*. 81, 136-147.
- Daher, K.A., Selsted, M.E., Lehrer, R.I., 1986. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J Virol*. 60, 1068-1074.
- Galdiero, S., Falanga, A., Tarallo, R., Russo, L., Galdiero, E., Cantisani, M., Morelli, G., Galdiero, M., 2013. Peptide inhibitors against herpes simplex virus infections. *J Pept Sci*. 19, 148-158.
- Hu, J.M., Hsiung, G.D., 1989. Evaluation of new antiviral agents: I. *In vitro* perspectives. *Antiviral Res*. 11, 217-232.
- Jenssen, H., Hamill, P., Hancock, R.E.W., 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 19, 491-511.
- Luganini, A., Giuliani, A., Pirri, G., Pizzuto, L., Landolfo, S., Gribaudo, G., 2010. Peptide-derivatized dendrimers inhibit human cytomegalovirus infection by blocking virus binding to cell surface heparan sulfate. *Antiviral Res*. 85, 532-540.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65, 55-63.
- Motta, A.S., Cannavan, F.S., Tsai, S.M., Brandelli, A., 2007a. Characterization of a broad range antibacterial substance from a new *Bacillus* species isolated from Amazon basin. *Arch Microbiol*. 188, 367-375.
- Motta, A.S., Lorenzini, D.M., Brandelli, A., 2007b. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by a novel *Bacillus* sp. isolated from the Amazon basin. *Curr Microbiol*. 54, 282-286.

- Oyston, P.C., Fox, M.A., Richards, S.J., Clark, G.C., 2009. Novel peptide therapeutics for treatment of infections. *J Med Microbiol.* 58, 977-987.
- Silva, D.S., Castro, C.C., Silva, F.S., Sant'anna, V., Vargas, G.A., Lima, M., Fischer, G., Brandelli, A., Motta, A.S., Hübner, S.O., 2014. Antiviral activity of a *Bacillus* sp.P34 peptide against pathogenic viruses of domestic animals. *Braz J Microbiol.* 45, 1089-1094.
- Vaucher, R.A., Teixeira, M.L., Brandelli, A., 2010. Investigation of the cytotoxicity of antimicrobial peptide P40 on eukaryotic cells. *Curr Microbiol.* 60, 1-5.
- Wachsman, M.B., Castilla, V., Holgado, A.P.R., Torres, R.A., Sesma, F., Coto, C.E., 2003. Enterocin CRL35 inhibits late stages of HSV-1 and HSV-2 replication *in vitro*. *Antiviral Res.* 58, 17-24.
- Zaiou, M., 2007. Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *J Mol Med.* 85, 317-329.

5.2 Artigo 2

Atividade antiviral de 4-tiazolidinonas derivadas da 2-picolilamina contra o vírus da diarreia viral bovina

Castro, C. C.; Silva, D. S.; Bareño, V. D. O.; Lima, M.; Cunico, W.; Hübner, S. O.

Submetido e aceito para publicação na revista Science and Animal Health

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE COMPOSTOS DERIVADOS DA 2-PICOLILAMINA DA CLASSE DA 4-TIAZOLIDINONA CONTRA O VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA

CASTRO, Clarissa Caetano de ¹;

SILVA, Débora Scopel e ¹;

BAREÑO, Valéria Dias de Oliveira ²;

LIMA, Marcelo de ³;

CUNICO, Wilson ⁴;

HÜBNER, Silvia de Oliveira ³.

Recebido: 20/11/2015

Aceito: 15/01/2016

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Veterinária da UFPEL, ²Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Química Tecnológica e Ambiental da FURG, ³Professor Doutor do Departamento de Veterinária Preventiva da UFPEL ⁴Professor Doutor do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da UFPEL.

RESUMO

Dentre as propriedades biológicas das moléculas derivadas da classe da 4-tiazolidinona, a atividade antiviral tem atraído a atenção dos pesquisadores. Neste estudo, foi determinada a citotoxicidade e a atividade antiviral de cinco compostos derivados da 2-picolilamina da classe da 4-tiazolidinona (V19, V20, V23, V28 e V29) frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em células MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*). A atividade antiviral foi determinada pela comparação entre os títulos obtidos pelo método de diluição limitante na presença ou ausência de cada molécula. As moléculas V20 e V28 na maior concentração não citotóxica foram capazes de inibir a produção das partículas virais, reduzindo os títulos virais quando comparadas com o controle, e resultaram em um percentual de inibição de 78% ($p < 0,01$) contra o BVDV. As moléculas V20 e V28 foram consideradas não tóxicas nas concentrações 0,063 mg/mL e 0,07 mg/mL, respectivamente, quando avaliadas através do ensaio de vermelho neutro como método de determinação da viabilidade celular. Os outros compostos avaliados (V19, V23 e V29) não demonstraram atividade contra o BVDV e foram tóxicas acima de 0,078 mg/mL. Em conclusão, os compostos V20 e V28 derivados da 2-picolilamina da classe da 4-tiazolidinona apresentaram atividade antiviral frente ao BVDV, o que os tornam alvos para mais estudos visando elucidar seus mecanismos de ação antiviral.

Palavras-chave: Tiazolidinonas. Citotoxicidade. Atividade antiviral.

INTRODUÇÃO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é responsável por importantes perdas na produção de carne e leite. A enfermidade é considerada uma das principais doenças que acometem bovinos (LINDBERG, 2003). O BVDV causa diversas manifestações clínicas em bovinos, que podem ser reunidas em quatro formas principais: doença aguda leve (gastrentérica e respiratória), doença aguda severa (gastrentérica, respiratória e hemorrágica), doença das mucosas (DM) e BVD crônica. Entretanto, as maiores consequências causadas por esse agente relacionam-se com prejuízos de ordem reprodutiva, como abortos e infertilidade. A infecção durante um determinado período do desenvolvimento fetal também pode estabelecer o nascimento de animais persistentemente infectados, os quais se mantêm em viremia durante toda a vida e são importantes fontes de disseminação do vírus (FLORES et al., 2005). Além disso, o BVDV pode ser um contaminante de produtos biológicos como o soro fetal bovino, utilizado no cultivo de linhagens celulares (ERICKSON et al., 1991). No Brasil não há programas oficiais para controle e/ou erradicação do BVDV e, embora existam vacinas disponíveis, o vírus mantém-se endêmico na população (PAESHUYSE et al., 2006).

O tratamento com compostos que atuem especificamente contra o vírus pode ser uma alternativa adequada em determinadas ocasiões (PAESHUYSE et al., 2006). A disponibilidade de um antiviral pode ser altamente benéfico para o tratamento de linhagens celulares contaminadas (DURANTEL et al., 2004), na produção de embriões *in vitro* (STRINGFELLOW et al., 2005), tratamento de animais reprodutores ou de alto valor genético, ou ainda, para tratamento de animais silvestres em cativeiro (PAESHUYSE et al., 2006).

As moléculas derivadas da classe da 4-tiazolidinona são substâncias heterocíclicas que se destacam devido a sua vasta aplicação no campo medicinal (JAIN et al., 2012). Há descrições de propriedades antibacteriana e antifúngica (EL-GABY et al., 2009); antiviral contra o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) (TRIPHATI et al., 2014), o vírus da hepatite C (HCV) (LEMM et al., 2010), o vírus da dengue (DENV) (NITSCHKE et al., 2013) e o vírus chikungunya (CHICK-V) (JADAV et al., 2015); anti-inflamatória e analgésica (ELEFTHRIOU et

al., 2012); antitumoral (GUDUDURU et al., 2004); anticonvulsivante e antipsicótica (KAUR et al., 2010).

Neste sentido, este trabalho analisou a citotoxicidade e o potencial antiviral de cinco substâncias derivadas da 2-picolilamina da classe da 4-tiazolidinona frente ao vírus da diarreia viral bovina em células MDBK (*Madin-Darby bovine kidney*).

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo Celular e Vírus

Células MDBK (ATCC® Number: CCL22™, USA) foram cultivadas em meio essencial mínimo (E-MEM, Sigma Aldrich, USA) suplementado com soro fetal bovino (Gibco, USA), penicilina (Sigma-Aldrich, USA), estreptomicina (Vetec, Brasil), enrofloxacin (Bayer, Brasil) e anfotericina B (Cristália, Brasil) a 37 °C em uma estufa contendo 5% de CO₂. A cepa NADL citopática do BVDV foi fornecida pelo Setor de Virologia/Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os estoques do vírus foram preparados e as alíquotas mantidas a -70 °C até o momento do uso.

Síntese das Moléculas

Foram utilizadas, neste estudo, cinco moléculas derivadas da 2-picolilamina da classe da 4-tiazolidinona. Os compostos foram obtidos de acordo com a metodologia recentemente descrita pelo grupo de pesquisa do Dr. Cunico (MARQUES et al., 2014). A estrutura das moléculas denominadas V19, V20, V23, V28 e V29 estão demonstradas na Figura 1. Cada molécula foi diluída em dimetilsulfóxido (Synth®, Brasil) e estocada à temperatura ambiente até o momento da utilização.

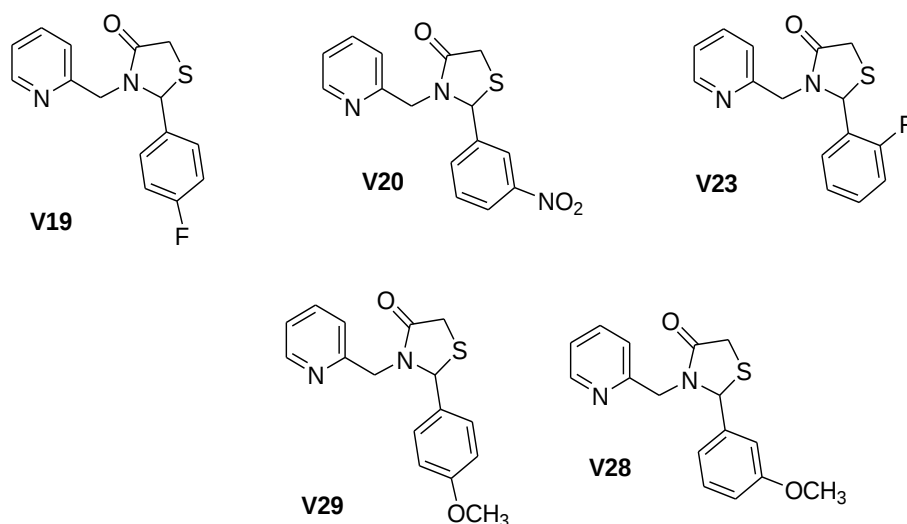


Figura 1- Estrutura geral das moléculas 4-tiazolidinonas estudadas.

Avaliação da Citotoxicidade

O ensaio foi realizado em microplacas de poliestireno com 96 cavidades, em quadruplicada, e repetido três vezes. Após 24 horas de confluência celular foram adicionadas diferentes concentrações das moléculas (0,63 a 0,0063 mg/mL). As viabilidades celulares foram avaliadas pela observação microscópica diária das alterações morfológicas das células e mensuradas pelo ensaio vermelho neutro (BORENFREUND; PUERNER, 1984) após 72 horas de incubação. A porcentagem de células viáveis foi calculada mediante a fórmula $AT/AC \times 100$, sendo AT e AC a absorbância dos tratados e a absorbância dos controles, respectivamente (VAUCHER et al., 2010). As leituras das densidades ópticas foram quantificadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. Foram consideradas concentrações não tóxicas as que permitiram uma viabilidade celular maior que 90% quando comparada com o controle (células não tratadas). A partir do ensaio foi determinada a maior concentração não citotóxica (MNCC) de cada molécula.

Avaliação da Atividade Antiviral

A avaliação da atividade antiviral das moléculas foi realizada comparando a diferença entre o título viral nas células não tratadas e tratadas com os compostos nas concentrações não citotóxicas e expressa pelo percentual de inibição viral (PI). O PI foi calculado pela fórmula: $PI = [1 - (\text{antilog do título do tratado} / \text{antilog do título do controle})] \times 100$ (NISHIMURA et al.,

1977). Os títulos virais foram calculados pelo método de diluição limitante (BEHRENS e KÄRBER, 1935) e expressos como dose infectante a 50% do tecido celular em 100 μ L (TCID₅₀/100 μ L) após 72 horas de incubação a 37 °C. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Análise Estatística

O teste t de Student foi realizado para comparar os títulos virais com ou sem tratamento. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,01$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As toxicidades das moléculas derivadas da 2-picolilamina da classe da 4-tiazolidinona em células MDBK foram variáveis. Foram consideradas como não tóxicas as concentrações utilizadas que não resultaram em alterações nas células quando visualizadas no microscópio invertido e que obtiveram viabilidade superior a 90% quando analisadas pelo ensaio do vermelho neutro. As moléculas V19, V23 e V29 foram tóxicas acima de 0,078 mg/mL (91% de viabilidade celular) e as concentrações não tóxicas das moléculas V20 e V28 foram acima de 0,063 mg/mL e 0,07 mg/mL, respectivamente (92% de viabilidade celular). Essas concentrações foram utilizadas para avaliar atividade anti-BVDV.

A partir das titulações realizadas e posterior análise estatística foi observada uma inibição na produção de partículas virais na presença das moléculas V20 e V28 quando comparadas com o controle (ausência das moléculas). As duas moléculas reduziram os títulos virais de $10^{3,25}$ para $10^{2,6}$ TCID₅₀/100 μ L, resultando em um PI de 78% ($p < 0,01$). As moléculas V19, V23 e V29 não exerceram atividade sobre o BVDV, visto que não houve diferença entre os títulos virais na presença destas substâncias quando comparadas com o controle.

Estudos utilizando as mesmas moléculas avaliadas no presente trabalho demonstraram atividade antioxidante (BOSENBECKER et al., 2014) e antifúngica (MARQUES et al., 2014). Outros pesquisadores já descreveram resultados promissores de atividade antiviral de algumas substâncias derivadas das tiazolidinonas. Tripathi et al. (2014) relataram ação inibidora do análogo 2',6'-di-halofenil-tiazolidinona sobre a enzima transcriptase reversa do

HIV-1. Foi determinada ação do composto BMS-824 (derivado da tiazolidinona, com o radical fenilacetamida), sobre a proteína NS5A do vírus da hepatite C (LEMM et al., 2010). Nitsche et al. (2013) evidenciaram a inibição da protease do DENV pela adição do grupo 5-arilideno-tiazolidinona. Recentemente, Jadav et al. (2015) citam a ação da molécula arilalquilideno-tiazolidinona sobre a protease nsp2 do CHICK-v. No presente trabalho não foi determinado o mecanismo de ação das moléculas V20 e V28 sobre o BVDV, mas novos estudos serão realizados visando elucidar os mecanismos de ação dos antivirais e a identificação das etapas da infecção nas quais ocorrem a ação das moléculas.

CONCLUSÃO

As substâncias V20 e V28 derivadas da 2-picolilamina da classe da 4-tiazolidinona demonstraram atividade antiviral frente o BVDV, evidenciando a necessidade de novos estudos para determinar o mecanismo de ação.

EVALUATION OF ANTIVIRAL ACTIVITY OF COMPOUNDS DERIVATIVES FROM 2-PICOLYLAMINE CLASS OF 4-THIAZOLIDINONE AGAINST DIARRHEA VIRUS BOVINE VIRAL

ABSTRACT

Among the biological properties of the molecules derived from the class of thiazolidinone, the antiviral activity has attracted the attention of researchers. In this study, the cytotoxicity and antiviral activity of five compounds derived from 2-picolylamine, from the 4-thiazolidinones class (V19, V20, V23, V28 and V29), were determined against the bovine viral diarrhea virus (BVDV) in MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*) cells. The antiviral activity was determined by comparison among the titers obtained by limiting dilution in the presence or in the absence of each molecule. The V20 and V28 molecules, in higher non-cytotoxic concentrations, were able to inhibit the production of viral particles, reducing the viral titers when compared with the control, and resulted in a percent of inhibition of 78% ($p < 0.01$) against BVDV. The V20 and V28 molecules were considered non-toxic in the concentrations of 0.063 mg/mL and 0.07 mg/mL, respectively, when analyzed with the method of the neutral red dye uptake to determine cell viability. The other compounds evaluated (V19, V23 and V29) did not demonstrate activity against BVDV and are toxic above 0.078 mg/mL. In conclusion, the compounds V20 and V28 derived from 2-picolylamine, from the 4-

thiazolidinone class, presented antiviral activity against BVDV, which become targets for further studies to elucidate the mechanism of antiviral action.

Keywords: Thiazolidinones. Cytotoxicity. Antiviral activity.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE COMPUESTOS DERIVADOS DE LA 2-PICOLILAMINA DE LA CLASE 4-TIAZOLIDINONA CONTRA EL VÍRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA

RESUMEN

Dentro de las propiedades biológicas de las moléculas derivadas de la clase de las tiazolidinona, la actividad antiviral ha atraído la atención de los investigadores. En este estudio, fue determinada la citotoxicidad y la actividad antiviral de cinco compuestos derivados de la 2-picolilamina de la clase 4-tiazolidinona (V19, V20, V23, V28 y V29) frente al virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en células MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*). La actividad antiviral fue determinada mediante la comparación entre los títulos obtenidos por el método de la dilución limitante mediante la presencia y/o ausencia de cada molécula. Las moléculas V20 y V28 en la mayor concentración no citotóxica fueron capaces de inhibir la producción de partículas virales, reduciendo los títulos virales en comparación con el control y resultando en un porcentaje de inhibición de 78% ($p < 0,01$) en contra de BVDV. Las moléculas V20 y V28 fueron consideradas no tóxicas en las concentraciones de 0,063 mg/ml y de 0,07 mg/ml, respectivamente, cuando fueron evaluadas a través del ensayo del rojo neutro utilizado como método de determinación de viabilidad celular. Los otros compuestos evaluados (V19, V23 y V29) no demostraron actividad frente al VDVB y eran tóxicos por encima de 0,078 mg/mL. En conclusión, los compuestos V20 y V28 derivados de la 2-picolilamina pertenecientes a la clase de 4-tiazolidinona presentaron actividad antiviral frente al VDVB, que se convierten en objetivos de más estudios para elucidar el mecanismo de acción antiviral.

Palabras clave: Tiazolidinonas. Citotixicidad. Actividad antiviral.

REFERÊNCIAS

BEHRENS, B.; KÄRBER, C. Wie sind reichenversuche fur biologische auswertungen am zweckmassigsten anwordnen? **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, Ingelheim, v. 177, p. 379-388, 1935.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. A simple quantitative procedure using monolayer culture for toxicity assays (HTD/NR-90). **Journal of Tissue Culture Methods**, v. 9, p. 7-9, 1985.

BOSENBECKER, J.; BAREÑO, V. D.; DIFABIO, R.; et al. Synthesis and antioxidant activity of 3-(Pyridin-2-ylmethyl)-1,3-thiazinan(thiazolidin)-4-ones. **Journal of Biochemical Molecular Toxicology**, v. 28, n. 9, p. 425-432, 2014.

DURANTEL, D.; CARROUE'E-DURANTEL, S.; BRANZA-NICHITA, N.; et al. Effects of interferon, ribavirin, and iminosugar derivatives on cells persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 2, p. 497-504, 2004.

ELEFThERIOU, P.; GERONIKAKI, A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; et al. Fragment-based desing, docking, synthesis, biological evaluation and struture-activity relationships of 2-benzo/benzisothiazolimino-5-aryliden-4-thiazolidinones as cyclooxygenase/lipoxygenase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 111-124, 2012.

EL-GABY, M. S.; EL-HAG ALI, G. A.; EL-MAGHRABY, A. A.; et al. Synthesis, characterization and in vitro antimicrobial activity of novel 2-thioxo-4-thiazolidinones and 4,4' -bis (2-thioxo-4-thiazolidinone-3-yl) diphenylsulfones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 10, p. 4148-4152, 2009.

ERICKSON, G. A.; BOLIN, S. R.; LANDGRAF, J. G. Viral contamination of fetal bovine serum used for tissue culture: risks and concerns. **Developments in Biological Standardization**, v. 75, p. 173-175, 1991.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S. F.; et al. A infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no Brasil-histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 125-134, 2005.

GUDUDURU, V.; HURH, E.; DALTON, J. T.; et al. Synthesis and antiproliferative activity of 2-aryl-4-oxo-thiazolidin-3-yl-amides for prostate cancer. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 21, p. 5289-5293, 2004.

JADAV, S. S.; SINHA, B. N.; HILGENFELD, R.; et al. Thiazolidone derivaties as inhibitors of chikungunya virus. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 89, p. 172-178, 2015.

JAIN, A. K.; VAIDYA, A.; RAVICHANDRAN, V.; et al. Recent developments and biological activities of thiazolidinone derivatives: a review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 3378-3395, 2012.

KAUR, H.; KUMAR, S.; VISHWAKARMA, P.; et al. Synthesis and antipsychotic and anticonvulsant activity of some new substituted oxa/thiadiazolylazetidiny/thiazolidinolcarbazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 2777-2783, 2010.

LEMM, J. A.; O'BOYLE, D.; LIU, M.; et al. Identification of hepatitis C virus NS5A inhibitors. **Journal of Virology**, v. 84, n. 1, p. 482-491, 2010.

LINDBERG, A. L. Bovine viral diarrhea virus infections and its control. A review. **Veterinary Questions**, v. 25, p. 1-16, 2003.

MARQUES, G. H.; KUNZLER, A.; BARENO, V. D. O.; et al. Antifungal Activity of 3-(heteroaryl-2-ylmethyl) thiazolidinone derivatives. **Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 355-360, 2014.

NISHIMURA, T.; TOKU, K.; FUKUYASU, H. Antiviral compounds. XII. Antiviral activity of aminohydrazones of alkoxyphenyl-substituted carbonyl compounds against influenza virus in eggs and mice. **Kitasato Archives of Experimental Medicine**, v. 50, n. 1-2, p. 39-46, 1977.

NITSCHKE, C.; SCHREIER, V. N.; BEHNAM, M. A. M.; et al. Thiazolidinone-peptide hybrids as dengue virus protease inhibitors with antiviral activity in cell culture. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 8389-8403, 2013.

PAESHUYSE, J.; LEYSSEN, P.; MABERY, E.; et al. A novel, highly selective inhibitor of pestivirus replication that targets the viral RNA-dependent RNA polymerase. **Journal of Virology**, v. 80, n. 1, p. 149-160, 2006.

STRINGFELLOW, D. A.; RIDDELL, K. P.; GIVENS, M. D.; et al. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) in cell lines used for somatic cell cloning. **Theriogenology**, v. 63, n. 4, p. 1004-1013, 2005.

TRIPATHI, A. C.; GUPTA, S. J.; FATIMA, G. N.; et al. 4-Thiazolidinones: The advances continue...**European Journal of Medical Chemistry**, v. 72, p. 52-77, 2014.

VAUCHER, R. A.; TEIXEIRA, M. L.; BRANDELLI, A. Investigation of the cytotoxicity of antimicrobial peptide P40 on eukaryotic cells. **Current Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 1-5, 2010.

Autor para correspondência:

Clarissa Caetano de Castro.

*Laboratório de Virologia e Imunologia, Faculdade de Veterinária, UFPEL, Campus Universitário, Capão do Leão (RS), CP. 354, CEP 96010-900.
clarissac.decastro@gmail.com*

5.3 Artigo 3

Anti-viral activity of thiazolidin-4-ones against animal viruses

Castro, C.C.; Kunzler, A.; Marques, G.H.; Fernandes, M.H.V.; Silva, D.S.; Lima, M.; Fischer, G.; Vargas, G.D.; Cunico, W.; Hübner, S.O.

Será submetido à revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

Anti-viral activity of thiazolidin-4-ones derivatives against animal viruses
(Short communication)

Clarissa Caetano de Castro^{1,*}, Alice Kunzler², Gabriela Henriques Marques², Maureen Hoch Vieira Fernandes¹, Débora Scopel e Silva¹, Marcelo de Lima¹, Geferson Fischer¹, Gilberto D'Ávila Vargas¹, Wilson Cunico², Silvia de Oliveira Hübner¹.

¹Departamento de Veterinária Preventiva, Laboratório de Virologia e Imunologia Animal, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, s/nº, Zip Code: 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

²Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, s/nº, Zip Code: 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +55 53 8128 0498.

E-mail address: clarissac.decastro@gmail.com (C.C. de Castro).

Thiazolidin-4-ones represent a class of compounds with a broad number of biological activities. This work evaluated the cytotoxicity and antiviral activities of five thiazolidinones derived from 1-(2-aminoethyl)piperidine and five from 2-(aminomethyl)pyridine. The assays demonstrated moderate cytotoxicity in various cell lineages (19 to 157,5 µg/mL). The compound 2-(2-nitrophenyl)-3-(2-(piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidin-4-one was effective against EAV, FCV and CPV-2, while compounds 2-(3-hydroxyphenyl)-3-(2-(piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidin-4-one; 2-(3-methoxyphenyl)-3-(pyridin-2-yl-methyl)thiazolidin-4-one and 2-(4-methoxyphenyl)-3-(pyridin-2-ylmethyl)thiazolidin-4-one acted against EAV, EIV and CPV-2, respectively, with more than 90% of viral inhibition. In conclusion, these thiazolidinones highlight an antiviral potential that must be considered, especially due the lack of available drugs against these viruses.

Keywords: thiazolidinones; cytotoxicity; feline calicivirus; canine parvovirus type 2; equine viral arteritis; equine viral influenza.

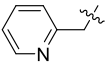
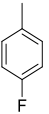
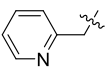
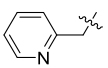
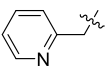
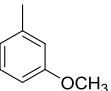
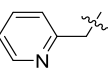
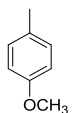
Thiazolidin-4-ones are heterocyclic substances that stand out due to their chemical properties and broad range of biological activities (Ravichandran et al. 2011; Ruiz et al. 2011; Mistry & Jauhari, 2013; Tripathi et al. 2014). Some derivatives were described as active against some viruses, such as human immunodeficiency virus (HIV) (Murugesan et al. 2014), hepatitis C virus (HCV) (Çıkla et al. 2013), dengue virus (DENV) (Nitsche et al. 2013) and chikungunya virus (CHICK-V) (Jadav et al. 2015). This study originally investigated the cytotoxicity of ten thiazolidin-4-ones in different lineages cells which previous studies demonstrated antifungal activity (Kunzler et al. 2013; Marques et al. 2014) and antioxidant (Bosenbecker et al. 2014). Antiviral activities were evaluated against animal viruses with different phenotypic and genotypic features. Canine adenovirus (CAV-2), canine parvovirus type 2 (CPV-2), feline herpesvirus type 1 (FHV-1) and bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5), being all DNA viruses, of these FHV-1 and BoHV-5 are enveloped. The RNA viruses tested were canine coronavirus (CCoV), canine distemper virus (CDV), equine arteritis virus (EAV), equine influenza virus (EIV), feline calicivirus (FCV), all enveloped viruses except for FCV (ICTV, 2016).

The desired thiazolidinones 2-aryl-3-[2-(piperidin-1-yl)ethyl]thiazolidin-4-ones **1a-e** and 2-aryl-3-(pyridin-2-ylmethyl)thiazolidinones **2a-e** were synthesized according to Kunzler et al. (2013) and Marques et al. (2014) and diluted in dimethylsulfoxide (DMSO). Rabbit Kidney (RK13 - ATCC® Number: CCL-37TM, USA), Madin-Darby Canine Kidney (MDCK

- ATCC® Number: CCL-34TM, USA), Crandell-Rees Feline Kidney (CRFK - ATCC® Number: CCL-94TM, USA) and Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK - NBL-1– ATCC® Number: CCL22TM, Manassas, USA) cells were used in all tests. Cell viability was measured by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Mosmann, 1983). Cell viability (%) was calculated for each concentration as $\text{Abs}_{\text{treated}}/\text{Abs}_{\text{CC}} \times 100$, where $\text{Abs}_{\text{treated}}$ and Abs_{CC} are the absorbance readings for the wells with and without the compound, respectively. The data were expressed as the maximum noncytotoxic concentration (MNCC). Antiviral activity was analysed by comparing the virus titres reached on treated and non-treated cells using cytopathic effect inhibition (CPE) assay performed on semi-confluent cells monolayers, in the presence or absence of thiazolidinones using MNCC. End-point titrations were performed as described by Montagnon et al. (1981) and titers were expressed in tissue culture infective dose 50% ($\text{TCID}_{50}/100 \mu\text{L}$) 72 h post infection. Results were expressed in terms of percentage of inhibition (PI) using antilogarithm values, as follows: $\text{PI} = [1 - (\text{Titer of treated} / \text{Titer of controls})] \times 100$. Statistical analysis were performed using a Student's t-test and values were considered significant when $p < 0.01$.

The thiazolidinones **1a**, **1b** and **1c** presented the highest level of toxicity (MNCC = 19 $\mu\text{g/mL}$). The compounds **1e** and **2a-e** demonstrated to have a moderate cytotoxicity with MNCC in the range of 39 to 78 $\mu\text{g/mL}$. The lower cytotoxic compound was the thiazolidinone **1d** with 157.5 ($\mu\text{g/mL}$) in MNCC evaluation for all cell lines, as observed in Table 1. The assays showed antiviral activity against EAV, FCV, CPV-2, EAV and EIV. The EAV, EIV and CPV-2 were the most sensitive to thiazolidinones, with a viral inhibition near to 100% (Table 2).

Table 1: Cytotoxic activities of thiazolidinones **1a-e** and **2a-e**

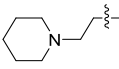
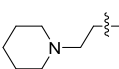
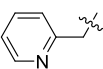
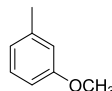
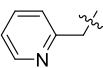
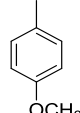
Compound	R	Ar	Cell line	MNCC (µg/mL)
2^a			RK13/MDCK/MDBK	78
			CRFK	39
2b			RK13/MDCK	78
			MDBK	63
			CRFK	62.4
2c			RK13/MDCK/MDBK	78
			CRFK	62.4
2d			RK13/MDCK	78
			CRFK	62.4
			MDBK	70
2e			RK13/MDCK/MDBK	78
			CRFK	39

MNCC: maximum noncytotoxic concentration

R: amine

AR: substituted benzaldehydes

Table 2: Thiazolidinones with antiviral activity

Comp.	R	Ar	Cell Line	Virus	Titer of control (100 µL)	Titer with the compound (100 µL)	PI (%)
1d			RK13	EAV	10 ^{5,75}	10 ^{4,25*}	96.9
			CRFK	FCV	10 ^{7,5}	10 ^{6,5*}	90.1
			CRFK	CPV-2	10 ⁷	10 ^{6*}	90.1
1e			RK13	EAV	10 ^{5,75}	10 ^{4,75*}	90.1
2d			MDCK	EIV	10 ⁷	10 ^{5,75*}	94.4
2e			CRFK	CPV-2	10 ^{6,25}	10 ^{5*}	94.4

R: amine

AR: substituted benzaldehydes

* Titers (TCID₅₀/100 µL) were compared to the control (without the compound). PI: percentage of inhibition. All data are the mean ± SD of the independent experiments carried out in triplicate. P-values were determined using Student's t test. *p < 0.01.

The results of the antiviral assays (Table 2) for thiazolidinones **1** and **2** did not allow us to suggest a structure activity relationship since the nature of the amine group (picolylamine or aminoethylpiperidine core) and the nature of the substituent of aryl group did not influence the activity. For 3-[2-(piperidin-1-yl)ethyl]thiazolidinones **1**, the best results are showed with the two electron-withdrawing groups NO₂ (**1d**) and OH (**1e**) in the positions *orto* and *meta*, respectively. Otherwise, NO₂ at 3-position (**1a**) did not present activity, along with the electron-release groups -OCH₃ (**1c**) and -OH hydroxyl at 4-position (**1b**). For 3-(pyridin-2-ylmethyl)thiazolidinones **2**, compounds bearing the methoxy group in the *meta* (**2d**) and *para* (**2e**) positions showed the best results. Thiazolidinones bearing a withdrawn group, e.g. nitro (**2b**) and fluoro (**2a** and **2c**), did not present activity (referencias).

Signaling the compounds with antiviral activity as drugs against the viruses tested is still not possible just with the results demonstrated here. However, the effective antiviral activity of these thiazolidinones **1** and **2** against FCV, CPV-2, EAV and EIV highlighted a potential that must be considered, mainly because there are no available drugs against these viruses (Timoney & McCollum, 1993; Taguchi et al. 2012; Kim et al. 2015).

FCV is an extremely infectious pathogen of cats, and it is diffuse in the feline population (Johann et al. 2009), and estimated to be the etiological cause of upper respiratory tract disease in 10–50 % of cases (Sykes, 2014). FCV infections are commonly associated with oral ulcerations and salivation and chronic stomatitis (Belgard et al. 2010). CPV-2 causes a highly contagious and often fatal disease characterized by vomiting and hemorrhagic gastroenteritis in dogs of all ages, and myocarditis in pups of less than three months of age (Kelly, 1978; Prittie, 2004). In experimentally infected dogs, mortality without treatment has been reported to be higher than 91% (Prittie, 2004). Equine influenza is a widespread contagious acute respiratory disease. Listed in OIE, due to its rapid spread among susceptible horses (Cowled et al. 2009). EAV is an influenza-like disease, but also cause abortion in pregnant mares and persistent infection of stallions (Hedges et al. 1999). EIV is responsible for two-thirds of viral respiratory infections in horses (Mumford & Chambers, 1998) and the disease is characterized by pyrexia, anorexia, depression, dyspnea, dry hacking cough, serous nasal discharge and secondary bacterial pneumonia (Gerber, 1969).

In conclusion, four of ten compounds tested (**1d**, **1e**, **2d** and **2e**) showed important antiviral activity against FCV, CPV-2, EAV and EIV viruses. Thiazolidinone **1d** is highlighted due the spread activity against three viruses and no citotoxicity at 157.5 µg/mL. These compounds may be an interesting therapeutic prospection for the treatment of cats, dogs and horses affected.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors thank CNPq, FAPERGS and Capes for the financial support.

REFERENCES

- Belgard S, Truyen U, Thibault JC, Sauter-Louis C, Hartmann K 2010. Relevance of feline calicivirus, feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus, feline herpesvirus and *Bartonella henselae* in cats with chronic gingivostomatitis. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 123: 369-376.
- Bosenbecker J, Bareño VD, Difabio R, Vasconcellos FA, Dutra FS, Oliveira PS, Barschak AG, Stefanello FM, Cunico W 2014. Synthesis and antioxidant activity of 3-(Pyridin-2-ylmethyl)-1,3-thiazinan(thiazolidin)-4-ones. *J Biochem Mol Toxicol* 28: 425-432.
- Cowled B, Ward MP, Hamilton S, Garner G 2009. The equine influenza epidemic in Australia: spatial and temporal descriptive analyses of a large propagating epidemic. *Prev Vet Med* 92: 60-70.
- Çıkla P, Tatar E, Küçükgülzel İ, Şahin F, Yurdakul D, Basu A, Krishnan R, Nichols DB, Kaushik-Basu N, Küçükgülzel ŞG 2013. Synthesis and characterization of flurbiprofen hydrazide derivatives as potential anti-HCV, anticancer and antimicrobial agents. *Med Chem Res* 22: 5685-5699.
- Gerber H. Clinical features sequelae and epidemiology of equine influenza. In: Bryans JT (ed) *Proceedings of the 2nd international conference on equine infectious diseases*, Paris, 1969, New York, 1970, Karger Basel, pp. 63-80. *Equine Infectious Diseases II*. Switzerland: S. Karger; 1969. p. 63–80.
- Hedges JF, Balasuriya UB, MacLachlan NJ 1999. The open reading frame 3 of equine arteritis virus encodes an immunogenic glycosylated, integral membrane protein. *Virology* 264: 92-98.
- ICTV 2016. Virus Taxonomy. International committee on taxonomy of viruses. Available in <<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp.html>> Accessed on February 21.
- Jadav SS, Sinha BN, Hilgenfeld R, Pastorino B, de Lamballerie X, Jayaprakash V 2015. Thiazolidone derivatives as inhibitors of chikungunya virus. *Eur J Med Chem* 89: 172-178.
- Johann JM, Caetano CF, Hass R, Guim TN, Fischer G, Vargas GD, Vidor T, Hübner SO 2009. Serum survey for antibodies to coronavirus, herpesvirus, calicivirus, and parvovirus in domestic cats from Rio Grande do Sul, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec* 61: 752-754.
- Kelly WR 1978. An enteric disease of dogs resembling feline panleukopenia. *Aust. Vet J*; 54:593.

- Kim Y, Shivanna V, Narayanan S, Prior AM, Weerasekara S, Hua DH, Kankanamalage AC, Groutas WC, Chang KO 2015. Broad-spectrum inhibitors against 3C-like proteases of feline coronaviruses and feline caliciviruses. *J Virol* 89: 4942-4950.
- Kunzler A, Neuenfeldt PD, das Neves AM, Pereira CM, Marques GH, Nascente PS, Fernandes MH, Hübner SO, Cunico W 2013. Synthesis, antifungal and cytotoxic activities of 2-aryl-3-((piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidinones. *Eur J Med Chem* 64: 74-80.
- Marques GH, Kunzler A, Bareño VD, Drawanz BB, Mastelloto HG, Leite FR, Nascimento GG, Nascente PS, Siqueira GM, Cunico W 2014. Antifungal activity of 3-(heteroaryl-2-ylmethyl)thiazolidinone derivatives. *Med Chem* 10: 355-360.
- Mistry BM, Jauhari S 2013. Synthesis and in vitro antimicrobial and anti-tubercular evaluation of some quinoline-based azitidinone and thiazolidinone analogues. *Medicinal Chem Res* 22: 635-646.
- Montagnon BJ, Nicolas AJ, Fanget B, Peyron L 1981. Comparison of sensitivity of VERO cell line versus primary monkey kidney cells in the detection of residual live polio virus during and after inactivation. *Dev Biol Stand* 47: 151-5.
- Mossmann T 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
- Mumford JA, Chambers TM. Equine Influenza. In: Textbook of influenza. *Blackwell Healthcare Communication* 1998, p. 146-162.
- Murugesan V, Makwana N, Suryawanshi R, Saxena R, Tripathi R, Paranjape R, Kulkarni S, Katti SB 2014. Rational design and synthesis of novel thiazolidin-4-ones as non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 22: 3159-3170.
- Nitsche C, Schreier VN, Behnam MAM, Kumar A, Bartenschlager R, Klein CD 2013. Thiazolidinone-peptide hybrids as dengue virus protease inhibitors with antiviral activity in cell culture. *J Med Chem* 56: 8389-8403.
- Prittie J 2004. Canine parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention. *J Vet Emerg Crit Care* 14:167-176.
- Ravichandran V, Jain A, Kumar KS, Rajak H, Agrawal RK 2011. Design, synthesis, and evaluation of thiazolidinone derivatives as antimicrobial and anti-viral agents. *Chem Biol Drug Des* 78: 464-470.
- Ruiz FAR, García-Sánchez RN, Estupiñan SV, Gómez-Barrio A, Amado DFT, Pérez-Solórzano BM, Nogal-Ruiz JJ, Matínez-Fernández AR, Kouznetsov VV 2011. Synthesis and antimalarial activity of new heterocyclic hybrids based on chloroquine and thiazolidinone scaffolds. *Bioorg Med Chem* 19: 4562-4573.
- Sykes JE 2014. Pediatric feline upper respiratory disease. *Vet Clin Am Small Anim Pract* 44: 331-342.

Taguchi M, Namikawa K, Maruo T, Saito M, Lynch J, Sahara H 2012. Effects of body weight on antibody titers against canine parvovirus type 2, canine distemper virus, and canine adenovirus type 1 in vaccinated domestic adult dogs. *Can J Vet Res* 76: 317-319.

Timoney PJ, McCollum WH 1993. Equine viral arteritis. *Vet. Clin. North Am. Equine Prac* 9: 295-309.

Tripathi AC, Gupta SJ, Fatima GN, Sonar PK, VermaA, Saraf SK 2014. 4-Thiazolidinones: The advances continue...*Eur J Med Chem* 72: 52-77

5.4 Artigo 4

Atividade inibitória de moléculas derivadas da 2-picolilamina da classe da 4-tiazolidinonas frente ao vírus da diarreia viral bovina

Castro, C.C.; Kunzler, A.; Marques, G.H.; Silva, D.S.; Lima, M.; Fischer, G.; Vargas, G.D.; Cunico, W.; Hübner, S.O.

Será submetido à revista The Veterinary Journal

Atividade inibitória das moléculas derivadas da 2-picolilamina da classe da 4-tiazolidinonas frente ao vírus da diarreia viral bovina

C. C. de Castro^{1,*}, V.D.O. Bareno², D.S.e Silva¹, M. de Lima¹, G. Fischer¹, G. D. Vargas¹, W. Cunico², S. O. Hübner¹.

¹Departamento de Veterinária Preventiva, Laboratório de Virologia e Imunologia Animal, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, s/nº, Zip Code: 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

²Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, s/nº, Zip Code: 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +55 (53) 81280498

E-mail address: clarissac.decastro@gmail.com (C.C. de Castro)

RESUMO

Este estudo investigou a ação antiviral de cinco compostos derivados da 2-picolilamina e arenealdeídos da classe das 4-tiazolidinonas frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV). Duas moléculas (V20 e V28) demonstraram ação antiviral, com um percentual de inibição (PI) de 78% ($p < 0.01$) quando avaliadas pelo ensaio de inibição do efeito citopático em células MDBK, com índices de seletividade de 16,8 (V20) e 14,73 (V28). Quando ambas foram associadas (dose EC_{50}) foi detectado um incremento no PI sobre o BVDV para 82%. Os ensaios demonstraram ausência de atividade antiviral na adsorção, competição com receptores celulares e ou penetração do BVDV, uma vez que não foram observadas diferenças significativas entre os títulos do vírus não tratado e submetido aos tratamentos. Da mesma forma, não foi detectada atividade virucida. Efeito inibitório significativo (78 - 100%) foi observado somente quando as moléculas foram adicionadas entre 1 a 5 h após a infecção viral, evidenciando atuação no período de síntese do RNA e enzimas virais.

Palavras-chave: antiviral; *Flaviviridae*; ribavirina; interferon alfa 2b

1. Introdução

O vírus da diarreia viral (BVDV) está classificado na família *Flaviviridae*, onde estão inseridos vários vírus de importância em saúde humana e animal. Todos os membros dessa família compartilham similaridades com relação à organização genômica, estrutura e ciclo replicativo. São vírions pequenos, envelopados, que contêm uma molécula de RNA linear de polaridade positiva como genoma (Ridpath, 2005). O BVDV possui distribuição mundial e causa diversas manifestações clínicas em bovinos, que incluem aborto, teratogenia, doenças respiratórias e digestivas, doença debilitante crônica e imunodepressão (Lunardi et al., 2008). Infecção pelo BVDV também pode estabelecer o nascimento de animais persistentemente infectados, os quais se mantêm em viremia durante toda a vida e são importantes fontes de disseminação do vírus (Grooms et al., 2006). Além disso, o BVDV pode ser um contaminante de produtos biológicos devido ao uso de soro fetal bovino durante cultivo celular (Erickson et

al., 1991). Há relatos, também, de contaminações de preparações de interferon (Harasawa e Mizusawa, 1995) e vacinas (Harasawa, 1994).

O tratamento com drogas anti-BVDV pode ser inviável em grandes populações bovinas, contudo, compostos que atuem especificamente contra o vírus podem ser uma alternativa adequada em determinadas ocasiões (Paeshuyse et al., 2006). Nesse sentido, a disponibilidade de um antiviral seria altamente benéfica para o tratamento de linhagens celulares contaminadas (Durantel et al., 2004), na produção de embriões *in vitro* (Stringfellow et al., 2005), para tratamento de animais reprodutores ou de alto valor genético, ou ainda, para tratamento de animais silvestres em cativeiro. Ainda podemos considerar a redução ou mesmo o impedimento da transmissão do vírus em animais tratados, o que evitaria o sacrifício de um grande número de animais saudáveis em programas de erradicação instituídos (Paeshuyse et al., 2006).

Além disso, o BVDV é considerado um modelo substituto ao vírus da hepatite C (HCV) para avaliação de potenciais antivirais e estudos de mecanismos de ação de drogas (Buckwold et al., 2003; Okamoto et al., 2009). Este conhecimento tem sido aplicado a estudos antivirais *in vitro*, pelo fato do HCV não se replicar eficientemente em culturas celulares (Zhang et al., 2011). Vários inibidores do HCV já foram descritos usando o BVDV como modelo (Stuyver et al., 2003; Sun et al., 2003; Paeshuyse et al., 2006).

Devido à necessidade de identificação e desenvolvimento de novas substâncias que possam ser usadas como agentes antivirais, este estudo avaliou cinco tiazolidinonas derivadas da 2-picolilamina com diferentes benzaldeídos previamente sintetizadas (Marques et al. 2014), em relação ao potencial antiviral e mecanismo de ação frente ao BVDV.

2. Materiais e métodos

2.1 Síntese química

Foram utilizadas cinco moléculas derivadas da 2-picolilamina da classe da 4-tiazolidinonas identificadas como V19, V20, V23, V28 e V29 (Figura 1). Elas foram sintetizadas de acordo com Marques et al. (2014). Cada molécula foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO - Synth®, Brasil) e estocada à temperatura ambiente até o momento de uso.

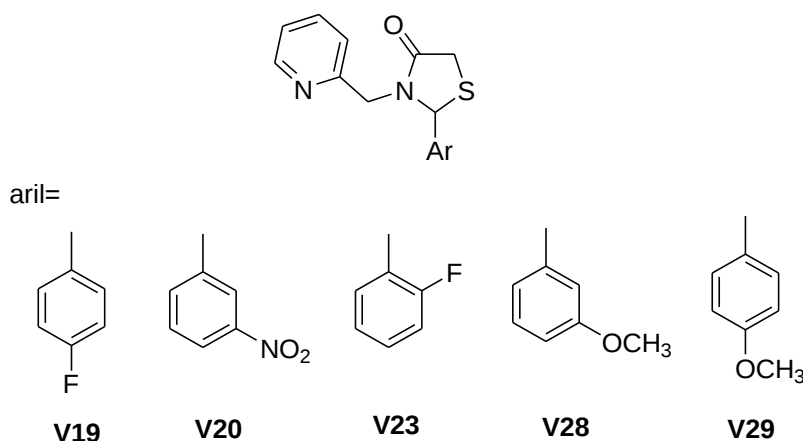


Figura 1. Estrutura química das moléculas 4-tiazolidinonas estudadas.

2.2 Vírus e célula

A cepa citopática NADL do BVDV fornecida pelo Setor de Virologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul foi utilizada em todos os ensaios. O vírus foi propagado e titulado em células MDBK (Madin Darby Bovine Kidney - ATCC® Number: CCL22TM, USA). As células foram cultivadas em meio essencial mínimo (E-MEM, Sigma Aldrich, USA) suplementado com soro fetal bovino (Gibco, USA), penicilina (Sigma-Aldrich, USA), estreptomicina (Vetec, Brasil), enrofloxacina (Bayer, Brasil) e anfotericina B (Cristália, Brasil) a 37 °C em uma estufa contendo 5% de CO₂.

As células MDBK foram constantemente monitoradas para contaminação com o BVDV não citopático mediante a técnica de imunofluorescência, através de anticorpos monoclonal anti-BVDV (Bovine Viral Diarrhea Virus Type 1&2 MAb E2 gp53 IgG1 Isotype, Veterinary Medical Research & Development, Washington, USA).

2.3 Ensaio de citotoxicidade

Em monocamadas de células MDBK confluentes foram adicionadas diferentes concentrações das moléculas (0,63 a 0,0063 mg/mL). A viabilidade celular foi avaliada pela observação microscópica diária das alterações morfológicas das células e mensurada pelo ensaio de vermelho neutro (Borenfreund e Puerner, 1985) após 72 h de incubação. A porcentagem de células viáveis foi calculada mediante a fórmula $AT/AC \times 100$, sendo AT e AC a absorbância dos tratados e a absorbância dos controles, respectivamente (Vaucher et al., 2010). As densidades ópticas foram quantificadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm (TP-READER NM, Thermo Plate). Foram consideradas concentrações não tóxicas as que permitiram uma viabilidade celular maior que 90% quando comparada com o

controle (células não tratadas). A partir do ensaio foi determinada a maior concentração não citotóxica (MNCC) de todas as moléculas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.4 Ensaios antivirais

A avaliação da atividade antiviral das moléculas foi realizada comparando a diferença entre o título viral nas células não tratadas e tratadas com os compostos nas concentrações não citotóxicas (MNCC). Os títulos foram expressos como dose infectante a 50% do tecido celular em 100 μ L (TCID₅₀/100 μ L) após 72 h de incubação a 37 °C. Os resultados dos ensaios antivirais foram expressos como percentagem de inibição (PI) usando a fórmula: $PI = [1 - (T \text{ antilog título} / C \text{ antilog título})] \times 100$. Foi determinada a concentração citotóxica 50% (CC₅₀), concentração efetiva 50% (EC₅₀) e o índice de seletividade (SI) das moléculas com atividade antiviral frente ao BVDV.

2.4.1 Ensaio de inibição do efeito citopático

O BVDV foi titulado em células MDBK na presença ou ausência das substâncias, nas concentrações não citotóxicas. Os títulos virais foram determinados após 72 h de infecção. O ensaio foi realizado inicialmente para detectar as moléculas com atividade antiviral sobre o BVDV. Posteriormente foi dado seguimento apenas com os compostos de interesse.

2.4.2 Ensaio de inibição da produção de partículas virais

Monocamadas de células MDBK confluentes foram inoculadas com 100 TCID₅₀ do BVDV e incubadas por 1 h a 37 °C com 5% de CO₂. Após a retirada do inóculo e lavagem, o cultivo celular infectado foi tratado ou não com cada moléculas (MNCC). Após 72 h de incubação as microplacas foram congeladas, descongeladas e submetidas à titulação viral.

2.4.3 Ensaio de adsorção e competição com receptores celulares

Sobre a monocamada celular foram adicionados somente BVDV, ou BVDV e o composto, ou ainda somente o composto, durante 1 h a 37 °C. Posteriormente o inóculo foi retirado e adicionado E-MEM. Nas células em que foi adicionado somente do composto, após a sua retirada 100 TCID₅₀ do BVDV foram adicionados e, após 1 h e nova lavagem foi adicionado E-MEM. As microplacas foram mantidas a 37 °C por um período de 24 h, após foram congeladas, descongeladas e submetidas à titulação viral.

2.4.4 Ensaio de penetração viral

Em microplacas com células confluentes foram inoculadas 100 TCID₅₀ do BVDV e incubadas por 2 h a 4 °C. Após a remoção do vírus não adsorvido foram adicionadas ou não as moléculas, nas concentrações não tóxicas, e permitida a penetração do vírus mediante incubação a 37 °C por 10 min. Após, as células MDBK foram lavadas com tampão de neutralização (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0,5 M glicina, pH 3,0) durante 1 min para inativar o vírus que não penetrou. Depois de lavar duas vezes com o tampão, E-MEM foi adicionado nas células e, após 72 h de incubação a 37 °C, as microplacas foram congeladas, descongeladas e o sobrenadante foi titulado.

2.4.5 Ensaio virucida

BVDV foi incubado com cada molécula (MNCC) por 0, 6, 12 e 24 h a 37 °C. A suspensão viral com E-MEM sem as moléculas foi utilizada como controle positivo. A presença de vírus infeccioso residual foi avaliada por titulação em monocamada confluyente de células MDBK.

2.4.6 Avaliação de sinergismo

O ensaio foi realizado para verificar o efeito aditivo ou inibitório quando utilizados associando os antivirais ribavirina (RBV) e interferon alfa 2b (IFN- α 2b), os compostos com conhecida atividade anti-BVDV e HCV. Células MDBK foram infectadas com BVDV e tratadas com diferentes concentrações das moléculas V20 (0,063 mg/mL e 0,0315 mg/mL) e V28 (0,07 mg/mL e 0,035 mg/mL) sozinhas ou em combinação com IFN- α 2b (256 UI, 128 UI e 64 UI) ou RBV (20 μ M, 10 μ M ou 5 μ M). O título viral detectado foi comparado com células infectadas não tratadas.

2.4.7 Ensaio das moléculas na curva de crescimento do BVDV em células MDBK

Para compreender em que tempo ocorre a interferência dos compostos durante a replicação viral, células MBDK foram inoculadas com BVDV a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 1 e, após 1 h a 37 °C o inóculo foi removido e as células lavadas com E-MEM. Os sobrenadantes das células não tratadas e infectadas foram recuperados a cada 2 h (1, 3, 5, 7, 9 e 11 h pós-infecção) e as amostras estocadas a - 70 °C até posterior titulação. Em paralelo, os compostos eleitos foram adicionados nos diferentes tempos (mesmos do controle) após a infecção por 24 h, após, os sobrenadantes foram coletados e estocados a - 70 °C até a realização da titulação.

2.4.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student comparando os títulos virais com e sem tratamento com as moléculas. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,01$.

3. Resultados

3.1 Ensaio de citotoxicidade

As toxicidades das cinco moléculas variaram pouco em células MDBK. O valor da MNCC dos compostos V19, V23, V29 foi de 0,078 mg/mL e das moléculas V20 e V28 foram de 0,063 mg/mL e 0,07 mg/mL, respectivamente (Figura 2 e Tabela 1).

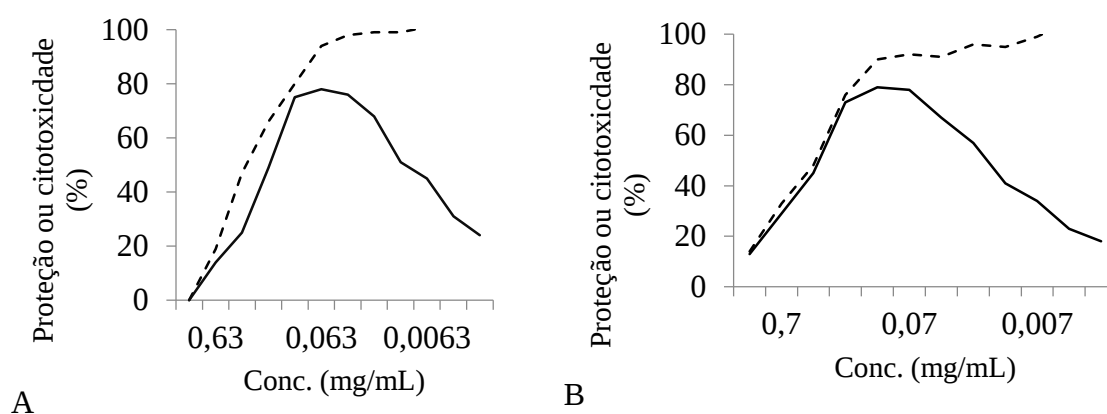
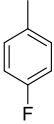
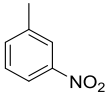
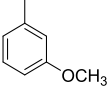
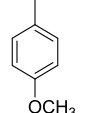


Figura 2. Inibição da replicação do BVDV pelos compostos V20 e V28. Células MDBK foram infectadas ou não com BVDV (100 TCID₅₀) e expostas a diferentes concentrações das moléculas; 72 h após tratamento foram calculadas as porcentagens de proteção (linha fechada) e citotoxicidades (linha aberta) pelo ensaio de vermelho neutro. (A) Células tratadas com o composto V20. (B) Células tratadas com o composto V28.

3.2 Ensaio antivirais

Foi observada a inibição na multiplicação das partículas virais na presença das moléculas V20 e V28. Ambas moléculas reduziram os títulos virais de $10^{3,25}$ para $10^{2,6}$ TCID₅₀/100 μ L (média), resultando em um PI de 78% ($p < 0,01$). O CC₅₀, o EC₅₀ e o SI foram de 0,252 mg/mL, 0,015 mg/mL e 16,8 para a V20 e 0,28 mg/mL, 0,019 mg/mL e 14,73 para a V28, respectivamente (Tabela 1). As moléculas V19, V23 e V29 não exerceram atividade anti-BVDV.

Tabela 1: Atividade anti-BVDV (PI), citotoxicidade (MNCC), CC₅₀, EC₅₀ e SI dos compostos Vs.

Composto	Ar	MNCC (mg/mL)	PI (%)	CC ₅₀ (mg/mL)	EC ₅₀ (mg/mL)	SI
V19		0,078	-	-	-	-
V20		0,063	78	0,252	0,015	16,8
V23		0,078	-	-	-	-
V28		0,07	78	0,28	0,019	14,73
V29		0,078	-	-	-	-

AR: benzaldeído substituído

MNCC: maior concentração não citotóxica

PI: percentual de inibição

CC₅₀: concentração citotóxica 50%

EC₅₀: concentração efetiva 50%

SI: índice de seletividade, razão entre CC₅₀/EC₅₀

Os ensaios realizados demonstraram ausência de atividade das moléculas V20 e V28 na adsorção, competição com receptores celulares e penetração do BVDV, uma vez que não foram observadas diferenças significativas entre os títulos do vírus não tratado e submetido aos tratamentos. Da mesma forma, não foi detectada atividade virucida ao ser inoculado o BVDV com a V20 ou a V28 por até 24 h a 37 °C.

Nas avaliações de sinergismo do efeito antiviral, foi detectado um aumento do PI do BVDV de 78 para 82% ($p < 0.01$) quando associadas às moléculas V20 e V28 (dose EC₅₀). Os tratamentos do BVDV com 256 UI de IFN resultou em PI de 88%, com 128 UI de IFN em 68% e 64 UI em PI de 43%. O PI do BVDV tratado com RBV a 20 µM foi 95%, a 10 µM 90% e a 5 µM 82%. A associação dos compostos com estas substâncias nestas concentrações não resultou em alteração no PI do BVDV.

Analisando a curva de crescimento do BVDV em células MDBK, foi possível observar uma redução significativa no título quando as moléculas V20 ou V28 foram adicionadas entre 1a 5 h pós-infecção (Figura 3). Máximo de PI (100%) foi detectado quando

as moléculas V 20 e 28 foram adicionadas 1 h pós-infecção. Nos períodos entre 3 e 5 h houve redução entre 68 a 90% ($p < 0,01$). Não houve redução no crescimento viral quando as moléculas foram adicionadas a partir de 7 h pós infecção, quando comparado com a curva controle.

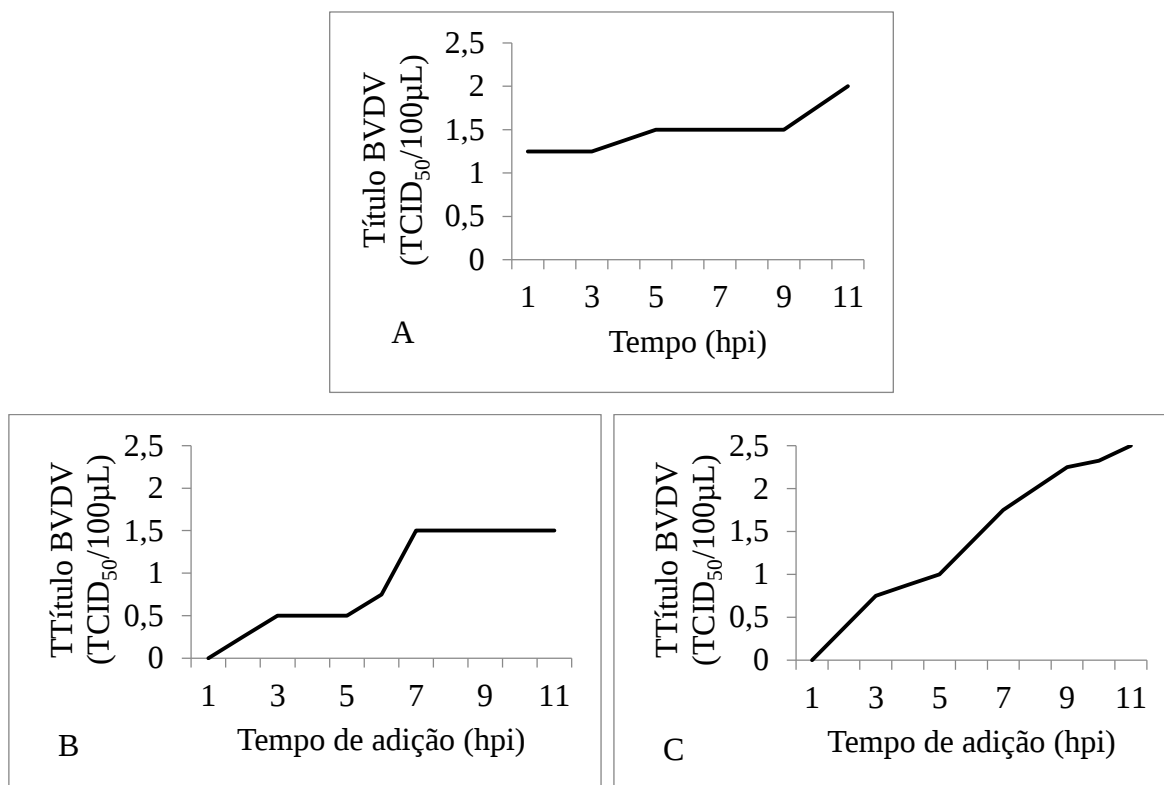


Figura 3. Efeito das moléculas V20 e V28 sobre o crescimento do BVDV. (A) Curva de crescimento *one-step* do BVDV. Células MDBK foram infectadas com BVDV a um MOI de 1, nos tempos indicados (1, 3, 5, 7, 9 ou 11 hpi), foi determinado o título viral (TCID₅₀/100 µl). (B) V20 e (C) V28, efeito de diferentes tempos de adição das moléculas sobre a curva de crescimento do BVDV. Células MDBK foram infectadas com MOI de 1 com BVDV e após 1, 3, 5, 7, 9 ou 11 h foi adicionada a molécula V20 ou V28.

4. Discussão

A química orgânica medicinal está contribuindo na descoberta de fármacos mais eficazes e menos tóxicos contra várias doenças mediante a síntese de novos compostos ou modificações estruturais em moléculas já conhecidas (Patani e LaVoie, 1996).

Os compostos derivados das 4-tiazolidinonas aqui avaliados foram escolhidos por pertencerem a uma classe que apresentarem um amplo espectro de atividades biológicas (Küçükgül et al., 2013; Abdelazeem et al., 2015; Hussein et al., 2015; De Monte et al.,

2016; Yang et al., 2016). Neste trabalho, foi avaliado o potencial antiviral e o mecanismo de ação das moléculas derivadas da 2-picolilamina da classe da 4-tiazolidinona contra o BVDV. Estas já demonstraram atividade antifúngica (Marques et al., 2014) e antioxidante (Bosenbecker et al., 2014).

Os resultados obtidos demonstraram que os compostos apresentaram pouca variação em relação à toxicidade em células MDBK (MNCC entre 0,063 e 0,078 mg/mL). Das cinco moléculas avaliadas apenas as V20 e V28 evidenciaram atividade antiviral contra o BVDV. Ambas demonstraram um PI de 78% e um SI de 16,8 (V20) e 14,73 (V28) indicando um potencial para serem utilizadas como fármaco terapêutico, uma vez que apresentam uma margem de segurança confiável (Al-Khayat e Ahmad, 2012).

Na busca para determinar o mecanismo de atuação destas moléculas foram realizados diversos ensaios antivirais. Os resultados destes ensaios mostraram ausência de ação das moléculas nas etapas pré e pós-infecção. Após determinar a curva de crescimento viral foram adicionadas as moléculas V20 ou V28 em diferentes fases do ciclo replicativo. A produção de novas partículas virais foi significativamente reduzida quando as moléculas foram introduzidas na fase precoce da infecção celular (até 5 h pós-infecção), possivelmente no período de síntese do RNA e enzimas virais, e antes da montagem e egresso.

Na busca de efeito aditivo ou inibitório entre as moléculas teste e os compostos antivirais IFN- α 2b e RBV não foi verificado efeito, possivelmente, devido a similaridade do mecanismo de ação. Porém, quando adicionadas ambas as moléculas (V20 e V28) observou-se um aumento no PI de 78 para 82% sobre o BVDV. O IFN- α e a RBV são drogas utilizadas para diversas doenças causadas por vírus, como HCV (Scott e Perry, 2002). Neste estudo, estes medicamentos quando utilizados isoladamente demonstraram um PI sobre o BVDV superior aos das moléculas teste, o IFN- α 2b (256 UI) 88% e RBV (20 μ M) 95%. Contudo, são drogas antivirais com efeitos colaterais, grau de toxicidade alto e já apresentam resistência em pacientes (Durantel et al., 2004)

Os resultados aqui demonstrados são promissores, contudo investigações adicionais devem ser realizadas para desvendar em que período da síntese do RNA e/ou enzimas virais as moléculas atuam com exatidão. Em conclusão, os dados aqui apresentados indicam que as moléculas V20 e V28 podem ser consideradas como novos inibidores da infecção causada pelo BVDV e, assim, servir para testes em modelos animais e no combate contra outros vírus da família *Flaviviridae* de importância clínica.

Referências

- Abdelazeem, A.H., Salama, S.A., Maghrabi, I.A., 2015. Design, synthesis, and anti-inflammatory evaluation of novel diphenylthiazole-thiazolidinone hybrids. *Arch Pharm (Weinheim)* 348, 518-530.
- Al-Khayat, Z.A., Ahmad, A.M., 2012. Antiviral activity of enviroxime against poliovirus and rubellavirus in tissue culture. *Ibnosina J Med BS* 4, 9-12.
- Borenfreund, E., Puerner, J.A., 1985. A simple quantitative procedure using monolayer culture for toxicity assays (HTD/NR-90). *J Tissue Cult Meth* 9, 7-9.
- Bosenbecker, J., Bareño, V.D., Difabio, R., Vasconcellos, F.A., Dutra, F.S., Oliveira, P.S., Barschak, A.G., Stefanello, F.M., Cunico, W., 2014. Synthesis and antioxidant activity of 3-(Pyridin-2-ylmethyl)-1,3-thiazinan(thiazolidin)-4-ones. *J Biochem Mol Toxicol* 28, 425-432.
- Buckwold, V.E., Beer, B.E., Donis, R.O., 2003. Bovine viral diarrhea virus as a surrogate model of hepatitis C virus for the evaluation of antiviral agents. *Antiviral Res* 60, 1–15.
- De Monte, C., Carradori, S., Bizzarri, B., Bolasco, A., Caprara, F., Mollica, A., Rivanera, D., Mari, E., Zicari, A., Akdemir, A., Secci, D., 2016. Anti-Candida activity and cytotoxicity of a large library of new N-substituted-1,3-thiazolidin-4-one derivatives. *Eur J Med Chem* 107, 82-96.
- Durantel, D.S., Carroué-Durantel, N., Branza-Nichita, R. A., Dwek, N. Zitzmann., 2004. Effects of interferon, ribavirin, and iminosugar derivatives on cells persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 497-504.
- Erickson, G.A., Bolin, S.R., Landgraf, J.G., 1991. Viral contamination of fetal bovine serum used for tissue culture: risks and concerns. *Dev Biol Stand* 75, 173-175.
- Grooms, D.L., 2006. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis. *Theriogenology* 66, 624-628,
- Harasawa, R., 1994. Comparative analysis of the 5' non-coding region of pestivirus RNA detected from live virus vaccines. *J Vet Med Sci* 56, 961-964.
- Harasawa, R., Mizusawa, H., 1995. Demonstration and genotyping of pestivirus RNA from mammalian cell lines. *Microbiol Immunol* 39, 979-985.
- Hussein, E.M., Masaret, G.S., Khairou, K.S., 2015. Efficient synthesis and antimicrobial evaluation of some Mannich bases from 2-arylidine-1-thia-4-azaspiro[4.5]decan-3-ones. *Chem Cent J* 10, 9-25.
- Küçükgülzel, I., Satılmış, G., Gurukumar, K.R., Basu, A., Tatar, E., Nichols, D.B., Talele, T.T., Kaushik-Basu, N., 2013. 2-Heteroarylimino-5-arylidene-4-thiazolidinones as

a new class of non-nucleoside inhibitors of HCV NS5B polymerase. *Eur J Med Chem* 69, 931-94.

Lunardi, M., Headley, S.A., Lisbôa, J.A.N., Amude, A.M., Alfieri, A.A., 2008. Outbreak of acute bovine viral diarrhea in Brazilian beef cattle: Clinico pathological findings and molecular characterization of a wild-type BVDV strain subtype 1b. *Res Vet Sci* 85, 599-604.

Marques, G.H., Kunzler, A., Bareño, V.D., Drawanz, B.B., Mastelloto, H.G., Leite, FR, Nascimento, G.G., Nascente, P.S., Siqueira, G.M., Cunico, W., 2014. Antifungal activity of 3-(heteroaryl-2-ylmethyl)thiazolidinone derivatives. *Med Chem* 10, 355-360.

Okamoto, M., Sakai, M., Goto, Y., Salim, M.T., Baba, C., Goto, K., Watashi, K., Shimotohno, K., Baba, M., 2009. Anti-bovine viral diarrhoea virus and hepatitis c virus activity of cyclooxygenase inhibitor SC-560. *Antiv Chem Chemother* 20, 47-54.

Paeshuyse, J., Leyssen, P., Mabery, E., Boddeker, N., Vrancken, R., Froeyen, M., Ansari, I.R., Dutartre, H., Rozenski, J., Gil, L.H., Letellier, C., Lanford, R., Canard, B., Koenen, F., Kerkhofs, P., Donis, R.O., Herdewijn, P., Watson, J., De Clercq, E., Puerstinger, G., Neyts, J., 2006. A novel, highly selective inhibitor of pestivirus replication that targets the viral RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* 80, 149-60.

Patani, G.A., LaVoie, E.J., 1996. Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design. *Chem Ver* 96, 3147-3176.

Ridpath, J.F., 2005. Classification and molecular biology. *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, management and control*. Ed. Iowa: Blackwell Publishing, p.65-80

Scott, L.J., Perry, C.M., 2002. Interferon-alpha-2b plus ribavirin: a review of its use in the management of chronic hepatitis C. *Drugs* 62, 507-556.

Stringfellow, D. A., K. P. Riddell, M. D. Givens, P. K. Galik, E. Sullivan, C. C. Dykstra, J. Robl, P. Kasinathan., 2005. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) in cell lines used for somatic cell cloning. *Theriogenology* 63, 1004–1013.

Stuyver, L.J., Whitaker, T., McBrayer, T.R., Hernandez-Santiago, B.I., Lostia, S., Tharnish, P.M., Ramesh, M., Chu, C.K., Jordan, R., Shi, J., Rachakonda, S., Watanabe, K.A., Otto, M.J., Schinazi, R.F., 2003. Ribonucleoside analogue that blocks replication of bovine viral diarrhea and hepatitis C viruses in culture. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 244-254.

Sun, J.H., Lemm, J.A., O'Boyle, D.R. 2nd, Racela, J., Colonmo, R., Gao, M., 2003. Specific inhibition of bovine viral diarrhea virus replicase. *J Virol* 77, 6753-6760.

Vaucher, R.A., Teixeira, M.L., Brandelli, A., 2010. Investigation of the cytotoxicity of antimicrobial peptide P40 on eukaryotic cells. *Curr Microbiol* 60, 1-5.

- Yang, F., Peng, S., Li, Y., Su, L., Peng, Y., Wu, J., Chen, H., Liu, M., Yi, Z., Chen, Y., 2016. A hybrid of thiazolidinone with the hydroxamate scaffold for developing novel histone deacetylase inhibitors with antitumor activities. *Org Biomol Chem* 14, 1727-1735.
- Zhang, N., Liu, Z., Han, Q., Qiu, J., Chen, J., Zhang, G., Li, Z., Lou, S., Li, N., 2011. Development of one-step SYBR Green real-time RT-PCR for quantifying bovine viral diarrhea virus type-1 and its comparison with conventional RT-PCR. *Virology* 374, 1-8.

6 Conclusões

- O peptídeo P34 apresenta toxicidade acima de 1,2 µg/mL em células MDBK.
- O P34 exibe um percentual de inibição de 99,94% sobre o BoHV-1 e um índice de seletividade de 22.9.
- O P34 não possui ação virucida sobre o BoHV-1.
- O P34 atua em diferentes etapas da infecção pelo BoHV-1: adsorção/penetração, montagem e egresso da partícula viral.
- A molécula menos tóxica foi a AK16 (157 µg/mL) e as mais tóxicas foram as AK11, AK18 e AK20 (19 µg/mL).
- A inibição viral foi detectada pela AK16 contra EAV (96,9%), FCV (90,1%) e CPV-2 (90,1%); AK17 contra EAV (90,1%); V20 contra BVDV (78%); V28 contra EIV (94,4%) e BVDV (78%) e V29 contra CPV-2 (94,4%).
- Frente ao BVDV os compostos V20 e V28 apresentaram EC₅₀ 0,015 mg/mL e 0,019 mg/mL e SI 16,8 e 14,73, respectivamente.
- A associação das moléculas V20 e V28 resultaram em um aumento do PI sobre o BVDV de 78 para 82%.
- A associação das moléculas V20 e V28 com IFN-α 2b ou RBV não resultou em efeito sinérgico frente ao BVDV.
- As moléculas V20 e V28 não apresentaram ação virucida frente ao BVDV.
- As moléculas V20 e V28 atuam no período entre 1 a 5 h após a infecção em células MDBK pelo BVDV.
- O peptídeo P34 e as moléculas V20 e V28 servem para futuros estudos em modelos experimentais visando definir a atividade *in vivo* e como modelos para novos medicamentos.

Referências

ABDELAZEEM, A.H.; SALAMA, S.A.; MAGHRABI, I.A. Design, synthesis, and anti-inflammatory evaluation of novel diphenylthiazole-thiazolidinone hybrids. **Archiv der Pharmazie (Weinheim)**, v.348, n.7, p.518-530, 2015.

ABDELLATIF, K.R.; ABDELGAWAD, M.A.; ELSHEMY, H.A.; ALSAYED, S.S. Design, synthesis and biological screening of new 4-thiazolidinone derivatives with promising COX-2 selectivity, anti-inflammatory activity and gastric safety profile. **Bioorganic Chemistry**, v.64, p.1-12, 2016.

AGIER, J.; EFENBERGER, M.; BRZEZIŃSKA-BŁASZCZYK, E. Cathelicidin impact on inflammatory cells. **Central European Journal Immunology**, v.40, n.2, p.225-235, 2015.

ALAN, A.R.; BLOWERS, A.; EARLE, E.D. Expression of a magainin-type antimicrobial peptide gene (MSI-99) in tomato enhances resistance to bacterial speck disease. **Plant Cell Reports**, v.22, n.6, p.388-396, 2004.

ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; KERLEI, C. M. Conseqüências da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 sobre o sistema reprodutivo de bovinos. **Semina: Ciências Agrárias**, v.19, n.1, p.86-93, 1998.

AL-KHAYAT, Z.A.; AHMAD, A.M. Antiviral activity of enviroxime against poliovirus and rubellavirus in tissue culture. **Ibnosina Journal of Medicine and Biomedical Sciences**, v.4, n.1, p.9-12, 2012.

ALTENA, K.; GUDER, A.; CRAMER, C.; BIERBAUM, G. Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type B lantibiotic gene cluster. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.6, p.2565-2571, 2000.

ALTINTAS, H.; ATES, Ö.; BIRTEKSÖZ, S.; ÖTÜK, G.; UZUN, M.; ŞATANA, D. Synthesis of mannich bases of some 2,5-disubstituted 4-thiazolidinones and evaluation of their antimicrobial activities. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 29, p. 425-435, 2005.

ANDRES, C.J.; BRONSON, J.J.; D'ANDREA, S.V.; DESHPANDE, M.S.; FALK, P.J.; GRANT-YOUNG, K.A.; HARTE, W.E.; HO, H.T.; MISCO, P.F.; ROBERTSON, J.G.; STOCK, D.; SUN, Y.; WALSH, A.W. 4-Thiazolidinones: novel inhibitors of the bacterial enzyme MurB. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.10, n.8, p.715-717, 2000.

APPEL, M. J. Pathogenesis of canine distemper. **American Journal of Veterinary Research**, v.30, n.7, p.1167-1182, 1969.

APPEL, M.J.G.; SUMMERS, B.A. Canine Distemper: Current Status. **Recent Advances in Canine Infectious Diseases**. International Veterinary Information Service (www.ivis.org), 1999.

BACHERE, E.; GUEGUEN, Y.; GONZALEZ, M.; DE LORGERIL, J.; GARNIER, J. E.; ROMESTAND, B. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunological Reviews**, v.198, n.1, p.149-168, 2004.

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; JÚNIOR, M.R.M.; PASTORE, G.M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v.30, n.2, p.409-414, 2007.

BASU, D.; WALKIEWICZ, M.P.; FRIEMAN, M.; BARIC, R.S.; AUBLE, D.T.; ENGEL, D.A. Novel influenza virus NS1 antagonists block replication and restore innate immune function. **Journal of Virology**, v.83, n.4, p.1881-1891, 2009.

BEHRENS, B.; KARBEL, C. Wie sind Reichenversuche für biologische Auswertungen am zweckmassigsten anzuordnen "(in German)". **Journal Archives Experimental Pathology Pharmacology**, v.177, p.379-388, 1935.

BELAID, A.; AOUNI, M.; KHELIFA, R.; TRABELSI, A.; JEMMALI, M.; HANI, K. In vitro antiviral activity of dermaseptins against herpesvirus simplex virus type 1. **Journal of Medical Virology**, v.66, n.2, p. 229-234, 2002.

BELGARD, S.; TRUYEN, U.; THIBAUT, J.C.; SAUTER-LOUIS, C.; HARTMANN, K. Relevance of feline calicivirus, feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus, feline herpesvirus and *Bartonella henselae* in cats with chronic gingivostomatitis. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, v.123, n.9-10, p.369-376, 2010.

BHOSLE, M.R.; MALI, J.R.; PAL, S.; SRIVASTAVA, A.K.; MANE, R.A. Synthesis and antihyperglycemic evaluation of new 2-hydrazolyl-4-thiazolidinone-5-

carboxylicacids having pyrazolyl pharmacophores. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.24, n.12, p.2651-2654, 2014.

BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Manual Saunders - Clínica de pequenos animais**. 3 ed. São Paulo: Rocca, 2008, 2072p.

BIZANI, D.; BRANDELLI, A. Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. strain 8A. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, n.3, p.512-519, 2002.

BLIXENKRONE-MOLLER, M.; SVANSSON, V.; HAVE, P.; ORVELL, C.; APPEL, M.; PEDERSEN, I.R.; DIETZ, H.H.; HENRIKSEN, P. Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. **Veterinary Microbiology**, v.37, n.1-2, p.163-173, 1993.

BOGEFORS, J.; KVARNHAMMAR, M.A.; HOCKERFELTI, U.; CARDELL, L.O. Reduced tonsillar expression of human β -defensins 1,2 and 3 in allergic rhinitis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.65, n.3, p.431-438, 2012.

BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhea viruses in calves. **American Journal of Veterinary Research**, v.53, n.11, p.2157-2163, 1992.

BONDE, C.G.; GAIKWAD, N.J. Synthesis and preliminary evaluation of some pyrazine containing thiazolines and thiazolidinones as antimicrobial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.12, n.9, p.2151-2161, 2004.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J.A. A simple quantitative procedure using monolayer culture for toxicity assays (HTD/NR-90). **Journal of tissue culture methods**, v.9, p.7-9, 1985.

BOSENBECKER, J.; BAREÑO, V.D.; DIFABIO, R.; VASCONCELLOS, F.A.; DUTRA, F.S.; OLIVEIRA, P.S.; BARSCHAK, A.G.; STEFANELLO, F.M.; CUNICO, W. Synthesis and antioxidant activity of 3-(Pyridin-2-ylmethyl)-1,3-thiazinan(thiazolidin)-4-ones. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v.28, n.9, p.425-432, 2014.

BOWDISH, D. M.; DAVIDSON, D. J.; SPEERT, D. P.; HANCOCK, R. E. The human cationic peptide LL-37 induces activation of the extracellular signal-regulated kinase and p38 kinase pathways in primary human monocytes. **The Journal of Immunology**, v.172, n.6, p.3758-3765, 2004.

BRANDÃO, P.E.; LOVATO, L.T.; SLHESSARENKO, R.D. Coronaviridae. In: _____. **Virologia Veterinária**, Santa Maria, 2 ed. da UFSM, 2012, 1008 p.

BROCK K.V. Diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.11, n.3, p.549-561, 1995.

BROGDEN, K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v.3, n.3, p.238-250, 2005.

BROWN, F.C. 4- Thiazolidinones. **Chemical Reviews**, v.61, n.5, p.463-521, 1961.

BROWNLIE, J. The pathogenesis of bovine viral diarrhea virus infections. **Revue Scientifique et Technique (Office International des Epizooties)**, v.9, n.1, p.24-59, 1990.

BUCKWOLD, V.E.; BEER, B.E.; DONIS, R.O. Bovine viral diarrhea virus as a surrogate model of hepatitis C virus for the evaluation of antiviral agents. **Antiviral Research**, v.60, n.1, p.1-15, 2003.

BULET, P.; STÖCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological Reviews**, v.198, p.169-184, 2004.

BULUT, O.; YAPICI, O.; AVCI, O.; SIMSEK, A.; ATLI, K.; DIK, I.; YAVRU, S.; HASIRCIOGLU, S.; KALE, M.; MAMAK, N. The serological and virological investigation of canine adenovirus infection on the dogs. **The Scientific World Journal**, v.2013, p.1-6, 2013.

BUONAVOGLIA, C.; MARTELLA, V.; PRATELLI, A.; TEMPESTA, M.; CAVALLI, A.; BUONAVOGLIA, D.; BOZZO, G.; DECARO, N.; CARMICHAEL, L. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. **Journal of General Virology**, v.82, p.1555-1560, 2001.

BUONAVOGLIA, C.; MARTELLA, V. Canine respiratory viruses. **Veterinary Research**, v.38, n.2, p.355-373, 2007.

CAMPADELLI-FIUME, G.; COCCHI, F.; MENOTTI, L.; LOPES, M. The novel receptors that mediated the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesvirus into cells. **Reviews in Medical Virology**, v.10, n.5, p.305-319, 2000.

CARRIEL-GOMES, M.C.; KRATZ, J.M.; BARRACCO, M.A.; BACHÉRE, E.; BARARDI, C.R.M.; SIMOES, C.M.O. *In vitro* antiviral activity of antimicrobial peptides against herpes simplex virus 1, adenovirus, and rotavirus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n.4, p.469-472, 2007.

CHASE, C.C.L.; ELMOWALID, G.; YOUSIF, A.A.A. The immune response to bovine viral diarrhea virus: a constantly changing picture. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.20, n.1, p.95-114, 2004.

CIHAN-ÜSTÜNDAĞ, G.; ŞATANA, D.; ÖZHAN, G.; ÇAPAN, G. Indole-based hydrazide-hydrazones and 4-thiazolidinones: synthesis and evaluation as antitubercular and anticancer agents. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v.24, p.1-12, 2015.

CIHAN-ÜSTÜNDAĞ, G.; GÜRSOY, E.; NAESENS, L.; ULUSOY-GÜZELDEMIRCI, N.; ÇAPAN, G. Synthesis and antiviral properties of novel indole based thiosemicarbazides and 4-thiazolidinones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.24, n.2, p.240-246, 2016.

CLERCQ, E. Antivirals and antiviral strategies. **Natural Review Microbiology**, v.2, p.704-720, 2004.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F.; CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, n.1, p.1-20, 2001.

COEN, Donald et al. Antiviral agents. In: _____. **Fields Virology**. Philadelphia: 5th, Ed. Williams and Wilkins, 2007, p.447-485.

COLE, A.; MHONG, T.; BOO, L.M.; NGUYEN, T.; ZHAO, C.; BRISTOL, G.; ZACK, J.A.; WARING, A.J.; YANG, O.O.; LEHRER, R.I. Retrocyclin: a primate peptide that protects from infection by T and M tropic strains of HIV-1. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v.99, n.4, p.1813-1818, 2002.

CORREA, Walter Mauricio et al. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992, 844p.

COWLED, B.; WARD, M.P.; HAMILTON, S.; GARNER, G. The equine influenza epidemic in Australia: spatial and temporal descriptive analyses of a large propagating epidemic. **Preventive Veterinary Medicine**, v.92, n.1-2, p.60-70, 2009.

CRAIK, D.J.; FAIRLIE, D.P.; LIRAS, S.; PRICE, D. The future of peptide-based drugs. **Chemical Biology & Drug Design**, v.81, n.1, p.136-147, 2013.

ÇIKLA, P.; TATAR, E.; KÜÇÜKGÜZEL, İ.; ŞAHİN, F.; YURDAKUL, D.; BASU, A.; KRISHNAN, R.; NICHOLS, D.B.; KAUSHIK-BASU, N.; KÜÇÜKGÜZEL, Ş.G. Synthesis and characterization of flurbiprofen hydrazide derivatives as potential anti-HCV, anticancer and antimicrobial agents. **Medicinal Chemistry Research**, v.22, p.5685-5699, 2013.

D'ARCE, R.C.F.; ALMEIDA, R.S.; SILVA, T.C.; FRANCO, A.C.; SPILKI, F.R.; ROEHE, P.M.; ARNS, C.W. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesvirus types 1 and 5. **Veterinary Microbiology**, v.88, n.4, p.315-324, 2002.

DAHER, K.A.; SELSTED, M.E.; LEHRER, R.I. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. **Journal of Virology**, v.60, n.3, p.1068-1074, 1986.

DANDIA, A.; SINGH, R.; KHATURIA, S.; MÉRIENNE, C.; MORGANTC, G.; LOUPY, A. Efficient microwave enhanced regioselective synthesis of a series of benzimidazolyl/triazolyl spiro [indole-thiazolidinones] as potent antifungal agents and crystal structure of spiro [3H-indole-3,20 -thiazolidine] -3' (1,2,4-triazol-3-yl)-2,4' (1H)-dione. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.14, n.7, p.2409-2417, 2006.

DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. An update on canine coronaviruses: viral evolution and pathobiology. **Veterinary Microbiology**, v.132, n.3-4, p.221-234, 2008.

DECARO, N.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Canine adenoviruses and herpesvirus. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.38, n.4, p.799-814, 2008.

DEL FAVA, C.; PITUCO, E. M.; D'ANGELO, J. L. Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1): revisão e situação atual no Brasil. **Revista de Educação Continuada**, v.5, n.3, p.300-312, 2002.

DEL PIERO, F. Equine viral arteritis. **Veterinary Pathology**, v.37, p.287-296, 2000.

DE MONTE, C.; CARRADORI, S.; BIZZARRI, B.; BOLASCO, A.; CAPRARA, F.; MOLLICA, A.; RIVANERA, D.; MARI, E.; ZICARI, A.; AKDEMIR, A.; SECCI, D.

Anti-Candida activity and cytotoxicity of a large library of new N-substituted-1,3-thiazolidin-4-one derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.107, p.82-96, 2016.

DENG, R.; BROCK, K.V. 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analyses. **Nucleic Acids Research**, v.21, n.8, p.1949-1957, 1993.

DENNISON, S. R.; WALLACE, J.; HARRIS, F.; PHOENIX, D. A. Amphiphilic alpha-helical antimicrobial peptides and their structure/function relationships. **Protein and Peptide Letters**, v.12, n.1, p.31-39, 2005.

DE VUYST, L.D et al. Lactic acid bacteria and bacteriocins: their practical importance. In: _____. **Bacteriocins of lactic-acid bacteria**. London: Ed. Blackie Academic & Professional, 1994, p.1-11.

DURANTEL, D.; CARROUE'E-DURANTEL, S.; BRANZA-NICHITA, N.; DWEK, R.A.; ZITZMANN, N. Effects of interferon, ribavirin, and iminosugar derivatives on cells persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.2, p.497-504, 2004.

ELAID, S.; LIBERSOU, S.; OULDALI, M.; MORELLET, N.; DESBAT, B.; ALVES, I.D.; LEPAULT, J.; BOUAZIZ, S. A peptide derived from the rotavirus outer capsid protein VP7 permeabilizes artificial membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1838, n.8, p.2026-2035, 2014.

ELEFThERIOU, P.; GERONIKAKI, A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; VICINI, P.; FILZ, O.; FILIMONOV, D.; POROIKOV, V.; CHAUDHAERY, S.S.; ROY, K.K.; SAXENA, A.K. Fragment-based design, docking, synthesis, biological evaluation and structure-activity relationships of 2-benzo/benzisothiazolimino-5-aryliden-4-thiazolidinones as cyclooxygenase/lipoxygenase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.47, n.1, p.111-124, 2012.

EL-GABY, M.S.; EL-HAG ALI, G.A.; EL-MAGHRABY, A.A.; ABD EL-RAHMAN, M.T.; HELAL, M.H. Synthesis, characterization and in vitro antimicrobial activity of novel 2-thioxo-4-thiazolidinones and 4,4' -bis (2-thioxo-4-thiazolidinone-3-yl) diphenylsulfones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.44, n.10, p.4148-4152, 2009.

ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, v.53, n.1-2, p.3-15, 1996.

ERGENÇ, N.; ÇAPAN, G.; GÜNAY, N.S.; ÖZKIRIMLI, S.; GÜNGÖR, M.; ÖZBEY, S.; KENDI, E. Synthesis and hypnotic activity of new 4-thiazolidinone and 2-thioxo-4,5-imidazolidinedione derivatives. **Archiv Pharmaceutical & Medicinal Chemistry**, v.332, n.10, p.343-347, 1999.

ERICKSON, G.A.; BOLIN, S.R.; LANDGRAF, J.G. Viral contamination of fetal bovine serum used for tissue culture: risks and concerns. **Developments in Biological Standardization**, v.75, p.173-175, 1991.

ESPADA, S.F.; FACCIN-GALHARDI, L.C.; RINCAO, V.P.; BERNARDI, A.L.; LOPES, N.; LONGHINI, R.; DE MELLO, J.C.; LINHARES, R.E.; NOZAWA, C. Antiviral Activity of Trichilia catigua Bark Extracts for Herpesvirus and Poliovirus. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.16, n.8, p.724-732, 2015.

EVERMANN, J.F.; BARRINGTON, G.M. Clinical features of bovine viral diarrhea virus. In:_____. **Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management, and Control**. Ames, IA: Ed. S.M.E., Black well Publishing, 2005, p.105–120.

FAIDALLAH, H.M.; ROSTOM, S.A.; KHAN, K.A. Synthesis and biological evaluation of pyrazole chalcones and derived bipyrazoles as anti-inflammatory and antioxidant agents. **Archives of Pharmacal Research**, v.38, n.2, p.203-215, 2015.

FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F.S.F.; ROEHE, P.M.; ALFIERI, A.A.; PITUCO, E.M. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.3, p.125-134, 2005.

FLORES, E.F.; LOVATO, L.Y.; SILVA, M.S.; DEZENGRINI, R.; DIEL, D.G. Orthomyxoviridae. In:_____. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ed. Universidade Federal de Santa Maria, 2007, p. 723-754.

FRANCO, Ana Claudia et al. Herpesviridae. In:_____. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ed. Universidade Federal de Santa Maria, 2012, p.503-570.

GALDIERO, S.; FALANGA, A.; TARALLO, R.; RUSSO, L.; GALDIERO, E.; CANTISANI, M.; MORELLI, G.; GALDIERO, M. Peptide inhibitors against herpes simplex virus infections. **Journal of Peptide Science**, v.19, n.3, p.148-158, 2013.

GALLO, R.L.; MURAKAMI, M.; OHTAKE, T.; ZAIUO, M. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.110, n.6, p.823-831, 2002.

GÁLVEZ, A.; MAQUEDA, M.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; LEBBADI, M.; VALDIVIA, E. Isolation and physico-chemical characterization of an antifungal and antibacterial peptide produced by *Bacillus licheniformes* A12. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.39, n.4-5, p.438-442, 1993.

GANZ, T et al. Antimicrobial peptides in innate immunity. In: _____. **Development of novel antimicrobial agents: emerging strategies**. Wymondham, Norfolk: Ed. Horizon Scientific Press, 2001, 284p.

GARCÍA-OLMEDO, F.; MOLINA, A.; ALAMILLO, J. M. E RODRÍGUEZ-PALENZUÉLA, P. Plant defense peptides. **Biopolymers**, v.47, n.6, p.479-491, 1998.

GEBHARDT, K.; SCHIMANA, J.; MÜLLER, J.; FIEDLER, H.P.; KALLENBORN, H.G.; HOLZENKÄMPFER, M.; KRASTEL, P.; ZEECK, A.; VATER, J.; HÖLTZEL, A.; SCHMID, D.G.; RHEINHEIMER, J.; DETTNER, K. Screening for biologically active metabolites with endosymbiotic bacilli isolated from arthropods. **FEMS Microbiology Letters**, v.217, n.2, p.199-205, 2002.

GERBER, H. Clinical features sequelae and epidemiology of equine influenza. In: _____. **Equine Infectious Diseases II**. Switzerland: Ed. S. Karger; 1969, p.63-80.

GLASER, A.L.; CHIRNSIDE, E.D.; HORZINEK, M.C.; VRIES, A.A.F. Equine arteritis virus. **Theriogenology**, v.47, n.6, p.1275–1295, 1997.

GOULD, D. Feline herpesvirus 1: ocular manifestations, diagnosis and treatment options. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.13, n.5, p.333-346, 2011.

GOULD, D.; PAPASOULIOTIS, K. Clinical microbiology and parasitology. In: _____. **Veterinary ophthalmology**. Iowa: Wiley-Blackwell. 5 ed., 2013, p.300-350.

GOYAL, S.M. Diagnosis. In: _____. **Bovine Viral Diarrhea Virus**. Iowa: Ed. Wiley-Blackwell, 2005, p.197-208.

GRACE, S. F. Herpesvirus infection. In: _____. **The Feline Patient**. Iowa: Blackwell Science Ltda, USA, 4 ed., 2011, p.225-227.

GRAU-CAMPISTANY, A.; MANRESA, Á.; PUJOL, M.; RABANAL, F.; CAJAL, Y. Tryptophan-containing lipopeptide antibiotics derived from polymyxin B with activity against Gram positive and Gram negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1858, n.2, p.333-343, 2016.

GROOMS, D.L. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis. **Theriogenology**, v.66, n.3, p.624-628, 2006.

GUDUDURU, V.; HURH, E.; DALTON, J.T.; MILLER, D.D. Synthesis and antiproliferative activity of 2-aryl-4-oxo-thiazolidin-3-yl-amides for prostate cancer. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.14, n.21, p.5289-5293, 2004.

HARASAWA, R. Comparative analysis of the 5' non-coding region of pestivirus RNA detected from live virus vaccines. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.56, n.5, p.961-964, 1994.

HARASAWA, R.; MIZUSAWA, H. Demonstration and genotyping of pestivirus RNA from mammalian cell lines. **Microbiology and Immunology**, v.39, n.12, p.979-985, 1995.

HEDGES, J.F.; BALASURIYA, U.B.; MACLACHLAN, N.J. The open reading frame 3 of equine arteritis virus encodes an immunogenic glycosylated, integral membrane protein. **Virology**, v.264, n.1, p.92-98, 1999.

HOLMES, K.V.; LAI, M.M.C. Coronaviridae: the viruses and their replication. In: _____. **Virology**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 3 ed., 1996, p. 1075-1093.

HOLYOAK, G.R.; BALASURIYA, U.B.R.; BROADDUS, C.C.; TIMONEY, P.J. Equine viral arteritis: current status and prevention. **Theriogenology**, n.70, p.403-414, 2008.

HONG, C.; DECARO, N.; DESARIO, C.; TANNER, P.; PARDO, M.C.; SANCHEZ, S.; BUONAVOGLIA, C.; SALIKI, J.T. Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, n.19, n.5, p.535-539, 2007.

HU, J.M.; HSIUNG, G.D. Evaluation of new antiviral agents: I. In vitro perspectives. **Antiviral Research**, v.11, n. 5-6, p.217-232, 1989.

HU, R.L.; HUANG, G.; QIU, W.; ZHONG, Z.H.; XIA, X.Z.; YIN, Z. Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain reaction. **Veterinary Research Communications**, v.25, n.1, p.77-84, 2001.

HUSSEIN, E.M.; MASARET, G.S.; KHAIROU, K.S. Efficient synthesis and antimicrobial evaluation of some Mannich bases from 2-arylidine-1-thia-4-azaspiro[4.5]decan-3-ones. **Chemistry Central Journal**, v.9, n.25, p.2-10, 2015.

ICTV 2016. Virus Taxonomy. International committee on taxonomy of viruses. Available in <<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp.html>> Accessed on February 21.

JADAV, S.S.; SINHA, B.N.; HILGENFELD, R.; PASTORINO, B.; DE LAMBALLERIE, X.; JAYAPRAKASH, V. Thiazolidone derivatives as inhibitors of chikungunya virus. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.89, p.172-178, 2015.

JAIN, A.K.; VAIDYA, A.; RAVICHANDRAN, V.; KASHAW, S.K.; AGRAWAL, R.K. Recent developments and biological activities of thiazolidinone derivatives: a review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.20, n.11, p. 3378-3395, 2012.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R.E.W. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.3, p.491-511, 2006.

JOHANN, J.M.; CAETANO, C.F.; HASS, R.; GUIM, T.N.; FISCHER, G.; VARGAS, G.D.; VIDOR, T.; HÜBNER, S.O. Serum survey for antibodies to coronavirus, herpesvirus, calicivirus, and parvovirus in domestic cats from Rio Grande do Sul, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.3, p.752-754, 2009.

JOHNSTON, P.R.; MAKAROVA, O.; ROLFF, J. Inducible defenses stay up late: temporal patterns of immune gene expression in *Tenebrio molitor*. **G3 (Bethesda)**, v.6, n.4, p.947-955, 2013.

KAHRS, R.F. Infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis. In: _____. **Viral diseases of cattle**. Ames, Iowa: Ed. Iowa State University, 2001, p.159-170.

KAUR, H.; KUMAR, S.; VISHWAKARMA, P.; SHARMA, M.; SAXENA, K.K.; KUMAR, A. Synthesis and antipsychotic and anticonvulsant activity of some new substituted oxa/thiadiazolylazetidinonyl/thiazolidinolcarbazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, n.7, p.2777-2783, 2010.

KELLY, W.R. An enteric disease of dogs resembling feline panleukopenia. **Australian Veterinary Journal**, v.54, n.12, p.593, 1978.

KIM, Y.; SHIVANNA, V.; NARAYANAN, S.; PRIOR, A.M.; WEERASEKARA, S.; HUA, D.H.; KANKANAMALAGE, A.C.; GROUTAS, W.C.; CHANG, K.O. Broad-spectrum inhibitors against 3C-like proteases of feline coronaviruses and feline caliciviruses. **Journal of Virology**, v.89, n.9, p.4942-4950, 2015.

KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.12, n.1-3, p.39-86, 1993.

KOUTINAS, A. F.; POLIZOPOULOU, Z.S.; BAUMGAERTNER, W.; LEKKAS, S.; KONTOS, V. Relation of clinical signs to pathological changes in 19 cases of canine distemper encephalomyelitis. **Journal of Comparative Pathology**, v.126, n.1, p.47-56, 2002.

KRAKOWKA, S.; HOOVER, E.A.; KOESTNER, A.; KETRING, K. Experimental and naturally occurring transplacental transmission of canine distemper virus. **American Journal of Veterinary Research**, v.38, n.7, p.919-922, 1977.

KUNZLER, A.; NEUENFELDT, P.D.; DAS NEVES, A.M.; PEREIRA, C.M.; MARQUES, G.H.; NASCENTE, P.S.; FERNANDES, M.H.; HÜBNER, S.O.; CUNICO, W. Synthesis, antifungal and cytotoxic activities of 2-aryl-3-((piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidinones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.64, p.74-80, 2013.

KÜÇÜKGÜZEL, I.; SATILMIŞ, G.; GURUKUMAR, K.R.; BASU, A.; TATAR, E.; NICHOLS, D.B.; TALELE, T.T.; KAUSHIK-BASU, N. 2-Heteroarylimino-5-arylidene-4-thiazolidinones as a new class of non-nucleoside inhibitors of HCV NS5B polymerase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.69, p.931-941, 2013.

LAIRMORE, M.D. Retroviridae. In: _____. **Fenner's Veterinary Virology**, San Diego, CA, USA: Academic Press of Elsevier, 4 Ed., 2011, p.242-274.

LEMM, J.A.; O'BOYLE, D.; LIU, M.; NOWER, P.T.; COLONNO, R.; DESHPANDE, M.S.; SNYDER, L.B.; MARTIN, S.W.; ST LAURENT, D.R.; SERRANO-WU, M.H.; ROMINE, J.L.; MEANWELL, N.A.; GAO, M. Identification of hepatitis C virus NS5A inhibitors. **Journal of Virology**, v.84, n.1, p.482-491, 2010.

LIEBLER-TENORIO, E.M. Pathogenesis. In: _____. **Bovine Viral Diarrhea Virus**. Iowa: Ed. Wiley-Blackwell, 2005, p.121-143.

LIESEN, A. P.; AQUINO, T. M.; GÓES, A. J. S.; LIMA, J. G.; FARIA, A. R.; ALVES, A. J. Métodos de obtenção, reatividade e importância biológica de 4-tiazolidinona. **Química Nova**, v.31, n.2, p.369-376, 2008.

LIESEN, A.P.; DE AQUINO, T.M.; CARVALHO, C.S.; LIMA, V.T.; DE ARAÚJO, J.M.; DE LIMA, J.G.; DE FARIA, A.R.; DE MELO, E.J.; ALVES, A.J.; ALVES, E.W.; ALVES, A.Q.; GÓES, A.J. Synthesis and evaluation of anti-Toxoplasma gondii and antimicrobial activities of thiosemicarbazides, 4-thiazolidinones and 1,3,4-thiadiazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, n.9, p.3685-3691, 2010.

LINDBERG, A.L. Bovine viral diarrhea virus infections and its control. A review. **Veterinary Questions**, v.25, n.1, p.1-16, 2003.

LISOV, A.; VRUBLEVSKAYA, V.; LISOVA, Z.; LEONTIEVSKY, A.; MORENKOV, O. A 2,5-Dihydroxybenzoic Acid-Gelatin Conjugate: The Synthesis, Antiviral Activity and Mechanism of Antiviral Action Against Two Alpha herpesviruses. **Viruses**, v.7, n.10, p.5343-5360, 2015.

LUGANINI, A.; GIULIANI, A.; PIRRI, G.; PIZZUTO, L.; LANDOLFO, S.; GRIBAUDO, G. Peptide-derivatized dendrimers inhibit human cytomegalovirus infection by blocking virus binding to cell surface heparan sulfate. **Antiviral Research**, v.85, n.3, p.532-540, 2010.

LUNARDI, M.; HEADLEY, S.A.; LISBÔA, J.A.N.; AMUDE, A.M.; ALFIERI, A.A. Outbreak of acute bovine viral diarrhea in Brazilian beef cattle: Clinicopathological findings and molecular characterization of a wild-type BVDV strain subtype 1b. **Research in Veterinary Science**, v.85, n.3, p.599-604, 2008.

MAGET-DIANA, R. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1462, n.1-2, p.109-140, 1999.

MANVAR, D.; KÜÇÜKGÜZEL, İ.; ERENŞOY, G.; TATAR, E.; DERYABAŞOĞULLARI, G.; REDDY, H.; TALELE T, T.; CEVIK, O.; KAUSHIK-BASU, N. Discovery of conjugated thiazolidinone-thiadiazole scaffold as anti-dengue virus polymerase inhibitors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.469, n.3, p.743-747, 2016.

MARQUES, A.R.; GALERA, P.D.; RIBEIRO, C.R. Alterações oculares causadas por herpesvirus felino: revisão de literatura. **Medvop-Revista Científica de Medicina Veterinária: pequenos animais e animais de estimação**, v.6, n.17, p.92-100, 2008.

MARQUES, G.H.; KUNZLER, A.; BAREÑO, V.D.; DRAWANZ, B.B.; MASTELLOTO, H.G.; LEITE, F.R.; NASCIMENTO, G.G.; NASCENTE, P.S.; SIQUEIRA, G.M.;

CUNICO, W. Antifungal activity of 3-(heteroaryl-2-ylmethyl)thiazolidinone derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.10, n.4, p.355-360, 2014.

MARS, M.H.; JONG, M.C.M.; VAN OIRSCHOT, J. T. A gE-negative bovine herpesvirus 1 vaccine strain is not re-excreted nor transmitted in an experimental cattle population after corticosteroid treatments. **Vaccine**, v.18, n.19, p.1975-1981, 2000.

MARTELLA, V.; ELIA, G.; BUONAVOGLIA, C. Canine distemper virus. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.38, n.4, p.787-797, 2008.

MARULAPPA, S.Y.; KAPIL, S. Simple test for rapid detection of canine parvovirus antigen and canine parvovirus-specific antibodies. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.16, n.1, p.127-131, 2009.

MASTERS, P.S. The molecular biology of coronaviruses. **Advances in Virus Research**, v.66, p.193-292, 2006.

MATTHEWS, T.; SALGO, M.; GREENBERG, M.; CHUNG, J.; DEMASI, R.; BOLOGNESI, D. Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.3, n.3, p.215-225, 2004.

MATTICK, A.T.R.; HIRSH, A. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. **The Journal-Lancet**, v.2, n.27, p.5-7, 1947.

MCCANDLISH, I.A.P. **Tratado de Medicina de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 1 ed., 2001, p.1075.

MCDONAGH, P.; SHEEHY, P.A.; FAWCETT, A.; NORRIS, J.M. Antiviral effect of mefloquine on feline calicivirus invitro. **Veterinary Microbiology**, v.176, n.3-4, p.370-377, 2015.

MISTRY, B.M.; JAUHARI, S. Synthesis and in vitro antimicrobial and anti-tubercular evaluation of some quinoline-based azitidinone and thiazolidinone analogues. **Medicinal Chemistry Research**, v.22, p.635-646, 2013.

MOENNIG, V.; PLAGEMANN, P.G.W. The pestiviruses. **Advances Virus Research**, v.41, p.53-98, 1992.

MONTAGNON, B.J.; NICOLAS, A.J.; FANGET, B.; PEYRON, L. Comparison of sensitivity of VERO cell line versus primary monkey kidney cells in the detection of residual live polio virus during and after inactivation. **Developments in Biology Standardization**, v.47, p.151-155, 1981.

MORAES, M.P et al. Adenovírus. In: _____. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ed. Universidade Federal de Santa Maria, 2007, p.422.

MORAES, M.P et al. Coronavírus. In: _____. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ed. Universidade Federal de Santa Maria, 2007, p. 388-392.

MORAES, M.P et al. Parvoviridae. In: _____. **Virologia Veterinária**, Santa Maria: 2 ed. Universidade Federal de Santa Maria, 2012, 1008p.

MOREIRA, D.R.; LEITE, A.C.; CARDOSO, M.V.; SRIVASTAVA, R.M.; HERNANDES, M.Z.; RABELLO, M.M.; DA CRUZ, L.F.; FERREIRA, R.S.; DE SIMONE, C.A.; MEIRA, C.S.; GUIMARAES, E.T.; DA SILVA, A.C.; DOS SANTOS, T.A.; PEREIRA, V.R.; SOARES, M.B. Structural design, synthesis and structure-activity relationships of thiazolidinones with enhanced anti-Trypanosoma cruzi activity. **Chemistry Medicinal Chemistry**, v.9, n.1, p.177-188, 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.

MOTTA, A.S.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the Amazon Basin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, n.4, p.307-310, 2004.

MOTTA, A.S.; LORENZINI, D.M.; BRANDELLI, A. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by a novel Bacillus sp. isolated from the Amazon basin. **Current Microbiology**, v.54, n.4, p.282-286, 2007a.

MOTTA, A.S.; CANNAVAN, F.S.; TSAI, S.M.; BRANDELLI, A. Characterization of a broad range antibacterial substance from a new Bacillus species isolated from Amazon basin. **Archives of Microbiology**, v.188, n.4, p.367-375, 2007b.

MOTTA, A.S.; FLORES, F.S.; SOUTO, A.A.; BRANDELLI, A. Antibacterial activity of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus* sp. P34 that targets the bacterial cell envelope. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.93, n.3, p.275-284, 2008.

MUMFORD, J.A et al. Equine Influenza. In:_____. **Textbook of influenza**. Ed. Blackwell Healthcare Communication, 1998, p.146-162.

MURUGESAN, V.; MAKWANA, N.; SURYAWANSHI, R.; SAXENA, R.; TRIPATHI, R.; PARANJAPE, R.; KULKARNI, S.; KATTI, S.B. Rational design and synthesis of novel thiazolidin-4-ones as non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.22, n.12, p.3159-3170, 2014.

MUSHTAQUE, M.; AVECILLA, F.; AZAM, A. Synthesis, characterization and structure optimization of series of thiazolidinone derivatives as *Entamoeba histolytica* inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.55, p.439-448, 2012.

MUYLKENS, B.; THIRY, J.; KIRTEN, P.; SCHYNTS, F.; THIRY, E. Bovine herpesvirus infection and bovine herpesvirus rhinotracheitis. **Veterinary Research**, v.38, p.181-209, 2007.

NAGHMOUCHI, K.; KHEADR, E.; LACROIX, C.; FLISS, I. Class I/Class IIa bacteriocin cross-resistance phenomenon in *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, v.24, n.7-8, p.718-727, 2007.

NES, I.F.; DIEP, D.B.; HAVARSTEIN, L.S.; BRURBERG, M.B.; EIJSINK, V.; HOLO, H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.70, n.2-4, p.113-128, 1996.

NGAMBENJAWONG, C.; CIESLEWICZ, M.; SCHELLINGER, J.G.; PUN, S.H. Synthesis and evaluation of multivalent M2pep peptides for targeting alternatively activated M2 macrophages. **Journal of Controlled Release**, v.224, p.103-111, 2016.

NICOLAS, P.; EL AMRI, C. The dermaseptin superfamily: a gene-based combinatorial library of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1788, n.8, p.1537-1550, 2009.

NIGRO, E.; COLAVITA, I.; SARNATARO, D.; SCUDIERO, O.; ZAMBRANO, G.; GRANATA, V.; DANIELE, A.; CAROTENUTO, A.; GALDIERO, S.; FOLLIERO, V.; GALDIERO, M.; URBANOWICZ, R.A.; BALL, J.K.; SALVATORE, F.; PESSI, A. An ancestral host defence peptide within human β -defensin 3 recapitulates the antibacterial and antiviral activity of the full-length molecule. **Scientific Reports**, v.5, p.1-11, 2015.

NISHIMURA, T.; TOKU, K.; FUKUYASU, H. Antiviral compounds. XII. Antiviral activity of aminohydrazones of alkoxyphenyl-substituted carbonyl compounds against

influenza virus in eggs and mice. **Kitasato Archives of Experimental Medicine**, v.50, n.1-2, p.39-46, 1977.

NITSCHKE, C.; SCHREIER, V.N.; BEHNAM, M.A.; KUMAR, A.; BARTENSCHLAGER, R.; KLEIN, C.D. Thiazolidinone-peptide hybrids as dengue virus protease inhibitors with antiviral activity in cell culture. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.56, n.21, p.8389-8403, 2013.

OKAMOTO, M.; SAKAI, M.; GOTO, Y.; SALIM, M.T.; BABA, C.; GOTO, K.; WATASHI, K.; SHIMOTOHNO, K.; BABA, M. Anti-bovine viral diarrhoea virus and hepatitis C virus activity of cyclooxygenase inhibitor SC-560. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**, v.20, n.1, p.47-54, 2009

OLUSA, T.A.O.; ADEGUNWA, A.K.; ADERONMU, A.A.; ADEYEFA, C.A.O. Serologic evidence of equine H7 influenza virus in polo horses in Nigeria. **Science World Journal**, v.5, n.2, p.17-19, 2010.

OYSTON, P.C.; FOX, M.A.; RICHARDS, S.J.; CLARK, G.C. Novel peptide therapeutics for treatment of infections. **Journal of Medical Microbiology**, v.58, n.8, p.977-987, 2009.

PAESHUYSE, J.; LEYSSEN, P.; MABERY, E.; BODDEKER, N.; VRANCKEN, R.; FROEYEN, M.; ANSARI, I.H.; DUTARTRE, H.; ROZENSKI, J.; GIL, L.H.; LETELLIER, C.; LANFORD, R.; CANARD, B.; KOENEN, F.; KERKHOFS, P.; DONIS, R.O.; HERDEWIJN, P.; WATSON, J.; DE CLERCQ, E.; PUERSTINGER, G.; NEYTS, J. A novel, highly selective inhibitor of pestivirus replication that targets the viral RNA-dependent RNA polymerase. **Journal of Virology**, v.80, n.1, p.149-160, 2006.

PASTORET, P.P.; THIRY, E. Diagnosis and prophylaxis of infectious bovine rhinotracheitis: the role of virus latency. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease**, v.89, n.1, p.35-42, 1985.

PASTORET, P.P.; THIRY, E.; BROCHIER, B.; DERBOVEN, G. Bovid herpesvirus 1 infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency. **Annales Recherches Vétérinaires**, v.13, n.3, p.221-235, 1982.

PATANI, G.A.; LAVOIE, E.J. Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design. **Chemical Reviews**, v.96, n.8, p.3147-3176, 1996.

PAWESKA, J.T.; BINNS, M.M.; WOODS, P.S.A.; CHIRNSIDE, E.D. A survey for antibodies to equine arteritis virus in donkeys, mules and zebra using virus

neutralization (VN) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Equine Veterinary Journal**, v.29, n.1, p.40-43, 1997.

PEREIRA, A. V.; DE BARROS, G.; PINTO, E.G.; TEMPONE, A.G.; ORSIRDE, O.; DOS SANTOS, L.D.; CALVI, S.; FERREIRA, R.S.J.R.; PIMENTA, D.C.; BARRAVIERA, B. Melittin induces in vitro death of *Leishmania (Leishmania) infantum* by triggering the cellular innate immune response. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v.22, n.1, p.1-8, 2016.

PESAVENTO, P.A.; CHANG, K.O.; PARKER, J.S. Molecular virology of feline calicivirus. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.38, n.4, p.775-786, 2008.

PIETRANTONI, A.; AMMENDOLIA, M.G.; TINARI, A.; SICILIANO, R.; VALENTI, P.; SUPERTI, F. Bovine lactoferrin peptidic fragments involved in inhibition of Echovirus 6 in vitro infection. **Antiviral Research**, v.69, n.2, p.98-106, 2006.

PRATELLI, A.; TEMPESTA, M.; ROPERTO, F.P.; SAGAZIO, P.; CARMICHAEL, L.E.; BUONAVOGLIA, C. Fatal coronavirus infection in puppies following canine parvovirus 2b infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, n.6, p.550-553, 1999.

PRITTIE, J. Canine parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.14, p.167-176, 2004.

RADFORD, A.D.; COYNE, K.P.; DAWSON, S.; PORTER, C.J.; GASKELL, R.M. Feline calicivirus. **Veterinary Research**, v.38, p.319-335, 2007.

RADFORD, A.D.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HARTMANN, K.; HOSIE, M.J.; LLORET, A.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; PENNISI, M.G.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M. Feline calicivirus infection: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.11, p.556-564, 2009.

RAVICHANDRAN, V.; JAIN, A.; KUMAR, K.S.; RAJAK, H.; AGRAWAL, R.K. Design, synthesis, and evaluation of thiazolidinone derivatives as antimicrobial and anti-viral agents. **Chemical Biology & Drug Design**, v.78, n.3, p.464-470, 2011.

RIDPATH, J.F. Classification and molecular biology. In: _____. **Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, management and control**. Ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2005, p.65-80

RIDPATH, J.F.; FLORES, E.F. Flaviviridae. In: _____. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ed. Universidade Federal de Santa Maria, 2007, p.565-591.

ROBINSON WE, J.; MCDOUGALL, B.; TRAN, D.; SELSTED, M.E. Anti-HIV-1 activity of indolicidin, an antimicrobial peptide from neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v.63, n.1, 94-100, 1998.

ROCHA, M.A.; GOUVEIA, A.M.G.; LEITE, R.C. Bovine herpesvirus-1 in semen. **Ciência Rural**, v.29, n.2, p.373-380, 1999.

ROCK, D.L. Latent infection by bovine herpesvirus type 1. **Seminars in Virology**, v.5, p.233-240, 1994.

ROIZMAN, B.; KNIPE, M.D. Herpes simplex virus and their replication. In: _____. **Field's virology**, Philadelphia-USA: 4th,Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2001, p.2399-2461.

ROIZMANN, B.; DESROSIERS R.C.; FLECKENSTEIN B.; LOPEZ C.; MINSON A.C.; STUDDERT M.J. The family Herpesviridae: an update. The herpesvirus study group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, v.123, n.3-4, p.425-449, 1992.

ROIZMANN, B.; PELLETT, P.E., The family Herpesviridae: a brief introduction. In: KNIPE, M.D.; HOWLEY, P.M., *Field's Virology*, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v.2, 2007, p.2480-2497.

RUIZ, F.A.R.; GARCÍA-SÁNCHEZ, R.N.; ESTUPIÑAN, S.V.; GÓMEZ-BARRIO, A.; AMADO, D.F.T.; PÉREZ-SOLÓRZANO, B.M.; NOGAL-RUIZ, J.J.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A.R.; KOUZNETSOV, V.V. Synthesis and antimalarial activity of new heterocyclic hybrids based on chloroquine and thiazolidinone scaffolds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.19, n.15, p.4562-4573, 2011.

SCHUCH, L.F.D. Diarreia Viral Bovina. In: _____. **Doenças de ruminantes e equinos**. São Paulo: Ed. Varela Editora e Livraria, 2006, p.64-71.

SCHULZ, D.; PEREIRA, M.A.; BONELLI, R.R.; NUNES, M.M.; BATISTA, C.R.V. Bacteriocinas: mecanismo de ação e uso na conservação de alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.14, n.2, p.229-235, 2003.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminant herpesviruses. **Veterinary Microbiology**, v.53, n.1-2, p.17-29, 1996.

SCOTT, L.J.; PERRY, C.M. Interferon-alpha-2b plus ribavirin: a review of its use in the management of chronic hepatitis C. **Drugs**, v.62, n.3, p.507-556, 2002.

SCUDIERO, O.; GALDIERO, S.; CANTISANI, M.; DI NOTO, R.; VITIELLO, M.; GALDIERO, M.; NACLERIO, G.; CASSIMAN, J.J.; PEDONE, C.; CASTALDO, G.; SALVATORE, F. Novel synthetic, salt-resistant analogs of human beta-defensins 1 and 3 endowed with enhanced antimicrobial activity. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, n.6, p.2312-2322, 2010.

SENIYA, C.; YADAV, A.; UCHADIA, K.; KUMAR, S.; SAGAR, N.; SHRIVASTAVA, P.; SHRIVASTAVA, S.; WADHWA, G. Molecular docking of (5E)-3-(2-aminoethyl)-5-(2-thienylmethylene)-1, 3-thiazolidine-2, 4-dione on HIV-1 reverse transcriptase: novel drug acting on enzyme. **Bioinformation**, v.8, n.14, p.678-683, 2012.

SHIEH, M.T.; WUDUNN, D.; MONTGOMERY, R.I.; ESKO, J.D.; SPEAR, P.G. Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparin sulfate proteoglycans. **The Journal Cell Biology**, v.116, p.1273-1281, 1992.

SILVA, M.S.; BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.10, p.403-408, 2007.

SILVA, D.S.; CASTRO, C.C.; SILVA, F.S.; SANT'ANNA, V.; VARGAS, G.A.; LIMA, M.; FISCHER, G.; BRANDELLI, A.; MOTTA, A.S.; HÜBNER, S.O. Antiviral activity of a *Bacillus* sp.P34 peptide against pathogenic viruses of domestic animals. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.45, n.3, p.1089-1094, 2014.

SINGH, S.P.; PARMAR, S.S.; RAMAN, K.; STENBERG, V.I. Chemistry and biological activity of thiazolidinones. **Chemical Reviews**, v.81, n.2, p.175-203, 1981.

SPEAR, P.G. Entry of alphaherpesviruses into cells. **Seminars in Virology**, v.4, n.1, p.167-180, 1993.

STILES, J. Feline herpesvirus. **Veterinary clinics of north america: small animal practice**, v.30, n.5, p.1001-1003, 2000.

STILES, J. Feline ophthalmology. In:_____. **Veterinary ophthalmology**. Iowa: Wiley-Blackwell, 5 ed., 2013, p.1477-1559.

ST.LAURENT, D.R.; DEDONG WU, Q.G.; SERRANO-WU, M.H. Regioselective synthesis of 3-(heteroaryl)-iminothiazolidin-4-ones. **Tetrahedron Letters**, v.45, p.1907-1910, 2004.

STRINGFELLOW, D.A.; RIDDELL, K.P.; GIVENS, M.D.; GALIK, P.K.; SULLIVAN, E.; DYKSTRA, C.C.; ROBL, J.; KASINATHAN, P. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) in cell lines used for somatic cell cloning. **Theriogenology**, v.63, n.4, p.1004-1013, 2005.

STUYVER, L.J.; WHITAKER, T.; MCBRAYER, T.R.; HERNANDEZ-SANTIAGO, B.I.; LOSTIA, S.; THARNISH, P.M.; RAMESH, M.; CHU, C.K.; JORDAN, R.; SHI, J.; RACHAKONDA, S.; WATANABE, K.A.; OTTO, M.J.; SCHINAZI, R.F. Ribonucleoside analogue that blocks replication of bovine viral diarrhea and hepatitis C viruses in culture. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.1, p.244-254, 2003.

SUN, J.H.; LEMM, J.A.; O'BOYLE, DR 2ND; RACELA, J.; COLONMO, R.; GAO, M. Specific inhibition of bovine viral diarrhea virus replicase. **Journal of Virology**, v.77, n.12, p.6753-6760, 2003.

SYKES, J.E; PAPICH, M.G. Antimicrobial drugs. In:_____. **Canine and feline infectious diseases**. Missouri: Elsevier Saunders, 2013, p. 66-86.

SYKES, J.E. Pediatric feline upper respiratory disease. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.44, p.331-342, 2014.

TAGUCHI, M.; NAMIKAWA, K.; MARUO, T.; SAITO, M.; LYNCH, J.; SAHARA, H. Effects of body weight on antibody titers against canine parvovirus type 2, canine distemper virus, and canine adenovirus type 1 in vaccinated domestic adult dogs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.76, n.4, p.317-319, 2012.

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A. A. Herpesvírus bovino tipo 1: tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Semina: Ciências Agrárias**, v.22, n.2, p. 203-209, 2001.

TAM, J.P.; WANG, S.; WONG, K.H.; TAN, W.L. Antimicrobial Peptides from Plants. **Pharmaceuticals (Basel)**, v.8, n.4, p.711-757, 2015.

TENÓRIO, R.P.; CARVALHO, C.S.; PESSANHA, C.S.; LIMA, J.G.; DE FARIA, A.R.; ALVES, A.J.; MELO, E.J.T.; GÓES, A.J.S. Synthesis of thiosemicarbazone and 4-thiazolidinone derivatives and their in vitro anti-Toxoplasma gondii activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.15, n.10, p.2575-2578, 2005.

THIRY, E.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HARTMANN, K.; HOSIE, M. J.; LLORET, A.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; PENNISI, M. G.; RADFORD, A. D.; TRUYEN, U.; HORZINECK, M. C. Feline herpesvirus infection. ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 7, p. 547-555, 2009.

TIAN, X.; LIU, M.; SU, X.; JIANG, Z.; MA, Q.; LIAO, X.; LI, X.; ZHOU, Z.; LI, C.; ZHOU, R. Mapping the epitope of neutralizing monoclonal antibodies against human adenovirus type 3. **Virus Research**, v.2, n.208, p.66-72, 2015.

TIMONEY, P.J.; MCCOLLUM, W.H. Equine viral arteritis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.9, n.2, p.295-309, 1993.

TIMONEY, P.J.; MCCOLLUM, W.H. Equine viral arteritis. **Equine Veterinary Education**, v.8, n.2, p.97-100, 1996.

TIMONEY, P.J. Equine influenza. **Comparative Immunology and Microbiology of Infectious Disease**. v.19 n.3, p.205-211, 1996.

TIMONEY, P.J.; MCCOLLUM, W.H. Equine viral arteritis: Essential facts about the disease. **Proceedings Annual Convention of the AAEP**, v.43, p.199-201, 1997.

TRIPATHI, A.C.; GUPTA, S.J.; FATIMA, G.N.; SONAR, P.K.; VERMA, A.; SARAF, S.K. 4-Thiazolidinones: The advances continue...**European Journal of Medical Chemistry**, v.72, p.52-77, 2014.

TWOMEY, D.; ROSS, R.P.; RYAN, M.; MEANEY, B.; HILL, C. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.82, n.1-4, p.165-185, 2002.

VANHEULE, V.; VERVAEKE, P.; MORTIER, A.; NOPPEN, S.; GOUWY, M.; SNOECK, R.; ANDREI, G.; VAN DAMME, J.; LIEKENS, S.; PROOST, P. Basic chemokine-derived glycosaminoglycan binding peptides exert antiviral properties against dengue virus serotype 2, herpes simplex virus-1 and respiratory syncytial virus. **Biochemical Pharmacology**, v.100, p.73-85, 2016.

VAN REGENMORTEL, M. H. V et al. Virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses. **Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**, San Diego: Academic, 2000, 1167 p.

VAN ZOGGEL, H.; CARPENTIER, G.; DOS SANTOS, C.; HAMMA-KOURBALI, Y.; COURTY, J.; AMICHE, M.; DELBÉ, J. Antitumor and angiostatic activities of the antimicrobial peptide dermaseptin B2. **PLoS One**, v.7, n.9, p.1-13, 2012.

VAUCHER, R.A.; DA MOTTA, A.D.E. S.; BRANDELLI, A. Evaluation of the in vitro cytotoxicity of the antimicrobial peptide P34. **Cell Biology International**, v.34, n.3, p.317-323, 2010.

VAUCHER, R.D.E.A.; VELHO GEWEHR, C.D.E.C.; CORREA, A.P.; SANT'ANNA, V.; FERREIRA, J.; BRANDELLI, A. Evaluation of the immunogenicity and in vivo toxicity of the antimicrobial peptide P34. **International Journal of Pharmaceutics**, v.421, n.1, p.94-98, 2011.

VOGEL, F.S.F.; CARON, L.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E.R.; MAYER, S.V.; BASTOS, R.G. Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous system of latently, experimentally infected calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.10, p.4512-4520, 2003.

WACHINGER, M.; KLEINSCHMIDT, A.; WINDER, D.; VON PECHMANN, N.; LUDVIGSEN, A.; NEUMANN, M.; HOLLE, R.; SALMONS, B.; ERFLE, V.; BRACKWERNER, R. Antimicrobial peptides mellitin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression. **Journal of General Virology**, v.79, n.4, p.731-740, 1998.

WACHSMAN, M.B.; CASTILLA, V.; HOLGADO, A.P.R.; TORRES, R.A.; SESMA, F.; COTO, C.E. Enterocin CRL35 inhibits late stages of HSV-1 and HSV-2 replication *in vitro*. **Antiviral Research**, v.58, n.1, p.17-24, 2003.

WANG, K.; JIA, F.; DANG, W.; ZHAO, Y.; ZHU, R.; SUN, M.; QIU, S.; AN, X.; MA, Z.; ZHU, Y.; YAN, J.; KONG, Z.; YAN, W.; WANG, R. Antifungal effect and action mechanism of antimicrobial peptide polybia-CP. **Journal of Peptide Science**, v.22, n.1, p.28-35, 2016.

WRIGHT, P.; NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: _____. **Fields Virology**. 5 ed., Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2007, 3091p.

YANG, F.; PENG, S.; LI, Y.; SU, L.; PENG, Y.; WU, J.; CHEN, H.; LIU, M.; YI, Z.; CHEN, Y. A hybrid of thiazolidinone with the hydroxamate scaffold for developing novel histone deacetylase inhibitors with antitumor activities. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.14, n.5, p.1727-1735, 2016.

YEAMAN, M.R.; YOUNT, N.Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological Reviews**, v.55, n.1, p.27-55, 2003.

YOON, S.S.; BYUN, J.W.; PARK, Y.; KIM, M.J.; BAE, Y.C. Comparison of the diagnostic methods on the canine adenovirus type 2 infection. **Basic and Applied Pathology**, v.3, n.2, p.52-56, 2010.

ZAIOU, M. Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. **Journal of Molecular Medicine**, v.85, n.4, p.317-329, 2007.

ZAPPULLI, V.; CALIARI, D.; CAVICCHIOLI, L.; TINELLI, A.; CASTAGNARO, M. Systemic fatal type II coronavirus infection in a dog: pathological findings and immunohistochemistry. **Research in Veterinary Science**, v.84, p. 278-282, 2008.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides in health and disease. **The New England Journal of Medicine**, v.347, n.15, p.1199-1210, 2002a.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v.415, n.6870, p.389-395, 2002b.

ZHANG, N.; LIU, Z.; HAN, Q.; QIU, J.; CHEN, J.; ZHANG, G.; LI, Z.; LOU, S.; LI, N. Development of one-step SYBR Green real-time RT-PCR for quantifying bovine viral diarrhea virus type-1 and its comparison with conventional RT-PCR. **Virology Journal**, v.374, p.1-8, 2011.

ZHU, L.; DING, X.; ZHANG, D.; YUAN, C.H.; WANG, J.; NDEGWA, E.; ZHU, G. Curcumin inhibits bovine herpesvirus type 1 entry into MDBK cells. **Acta Virologica**, v.59, n.3, p.221-227, 2015.