UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA EM ÁREA PROFISSIONAL DA SAÚDE
MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA

Amanda Lovato de Oliveira

ATIVIDADE *IN VITRO* DE SEIS DROGAS ANTIVIRAIS CONTRA O ALFAHERPESVÍRUS EQUINO TIPO 1

Santa Maria, RS

2018

Amanda Lovato de Oliveira

ATIVIDADE *IN VITRO* DE SEIS DROGAS ANTIVIRAIS CONTRA O ALFAHERPESVÍRUS EQUINO TIPO 1

Monografia apresentada ao Programa de Residência em Área Profissional da Saúde - Medicina Veterinária/Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Especialista em Medicina Veterinária Preventiva.**

Orientador: Prof. Rudi Weiblen

Santa Maria, RS
2018

Amanda Lovato de Oliveira

ATIVIDADE *IN VITRO* DE SEIS DROGAS ANTIVIRAIS CONTRA O ALFAHERPESVÍRUS EQUINO TIPO 1

Monografia apresentada ao Programa de Residência em Área Profissional da Saúde - Medicina Veterinária/Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Especialista em Medicina Veterinária Preventiva.**

Aprovada em 28 de fevereiro de 2018

Rudi Weiblen, PhD. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Juliana Felipetto Cargnelutti, Dr. (UFSM)

Mathias Martins, Me. (UFSM)

Santa Maria, RS
2018

AGRADECIMENTOS

À família, Milton Otávio de Oliveira, Regina Beatriz Lovato de Oliveira e Gabriel Lovato de Oliveira, pelo amor, paciência e apoio incondicional.

Ao meu namorado, Ricardo Lago Valente, pelo amor, carinho, companheirismo e incentivo.

Aos meus orientadores Rudi Weiblen e Eduardo Furtado Flores, por me concederem a oportunidade de realizar a residência no Setor de Virologia - UFSM. Agradeço pelos ensinamentos, incentivo e disponibilidade em ajudar no que fosse preciso.

Aos colegas do Setor de Virologia - UFSM, pela colaboração no desenvolvimento do experimento, pelo convívio diário e pelos bons momentos compartilhados.

Aos professores e alunos dos Laboratórios de Análises Micotoxicológicas (LAMIC), Bacteriologia (LABAC), Doenças Parasitárias (LADOPAR), Diagnóstico de Patologias Aviárias (LCDPA), pela receptividade e pelos ensinamentos.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Residência em Área Profissional da Saúde - Medicina Veterinária/ Medicina Veterinária Preventiva, pela minha formação acadêmica e por permitir a continuidade dos meus estudos.

RESUMO

ATIVIDADE *IN VITRO* DE SEIS DROGAS ANTIVIRAIS CONTRA O ALFAHERPESVÍRUS EQUINO TIPO 1

AUTORA: Amanda Lovato de Oliveira
ORIENTADOR: Rudi Weiblen

Os vírus pertencentes à família *Herpesviridae* afetam uma ampla gama de mamíferos. Na subfamília *Alphaherpesvirinae* encontram-se a maioria dos herpesvírus de importância em medicina veterinária, dentre eles destaca-se o alfaherpervírus equino tipo 1 (EHV-1). Os herpesvírus possuem distribuição mundial e caracterizam-se pela capacidade de produzir infecção latente. No Brasil, o herpesvírus equino foi isolado pela primeira vez na década de 1960, e permanece circulando nos rebanhos equídeos do país até os dias atuais. O EHV-1 tem como hospedeiros naturais os equinos, causando doenças reprodutivas, respiratórias e neurológicas. Ainda não há tratamento específico para o EHV-1, sendo indicadas medidas preventivas, como o uso de vacinas e medidas de suporte para os animais afetados. Os fármacos antivirais são pouco empregados nas infecções por herpesvírus em animais, apesar de uma potencial aplicação. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a atividade anti-herpética *in vitro* frente ao EHV-1 dos fármacos Aciclovir, Ganciclovir, Foscanet, Famciclovir, Vidarabina e Cidofovir. Esses antivirais são comumente utilizados no tratamento do herpesvírus humano e, posteriormente, podem contribuir como uma alternativa terapêutica para a infecção por EHV-1. Para isso, foi realizado o teste de MTT para determinar a dose não citotóxica das drogas. Verificou-se que todos os fármacos testados não apresentaram citoxicidade até a dose de 200 µg/mL. Na sequência, os seis antivirais foram testados por meio do ensaio de redução de placa usando cultivo de células Vero como indicador de replicação viral. De acordo com a concentração citotóxica para 50% das células (CC_{50}), obtida pelo MTT, e pela concentração dos fármacos efetiva para inibir em 50% o número de placas virais (EC_{50}), foi possível calcular o índice de seletividade (IS) dos compostos. Através do IS estima-se a segurança dos medicamentos e, quanto maior o valor, mais seguro será o fármaco nas respectivas células. O Ganciclovir (IS: 490; EC_{50}: 1,9 µg/mL) apresentou-se como o fármaco mais seguro e eficiente frente ao EHV-1, seguido pelo Cidofovir (IS: 150; EC_{50}: 5,7 µg/mL), Aciclovir (IS: 37,4; EC_{50}: 22,2 µg/mL), Famciclovir (IS: 25,1; EC_{50}: 24,5 µg/mL), Vidarabina (IS: 12,2; EC_{50}: 40,9 µg/mL) e Foscarnet (IS: 6,9; EC_{50}: 49,5 µg/mL). Portanto, o Ganciclovir constitui-se em um candidato para uso em experimentos *in vivo*, podendo contribuir, posteriormente, como uma alternativa terapêutica às infecções em equinos.

Palavras-chave: EHV-1. Ensaio de placa. Aciclovir. Ganciclovir. Foscarnet. Famciclovir. Vidarabina. Cidofovir.

ABSTRACT

IN VITRO ACTIVITY OF SIX ANTIVIRALS DRUGS AGAINST EQUINE ALPHAHERPESVIRUS TYPE 1

AUTHOR: Amanda Lovato de Oliveira
ADVISOR: Rudi Weiblen

Viruses belonging to the family *Herpesviridae* affect a wide range of mammals. Most of herpesviruses with veterinary importance belong to subfamily *Alphaherpesvirinae*, among them the equine alphaherpesvirus type 1 (EHV-1). This herpesvirus has a worldwide distribution and is characterized by the capacity to produce latent infection. In Brazil, herpesvirus was first isolated in in the 1960s, and remains circulating in the equine herds of the country to the present day. EHV-1 has as natural hosts equines, causing reproductive, respiratory and neurological disease. There is no specific treatment for EHV-1, being indicated preventive measures, such as the use of vaccines and support treatment for affected animals. Antiviral drugs have little use in animal herpesvirus infections, in spite of a potential application. Therefore, the aim of this study was to investigate the anti-herpetic activity *in vitro* against EHV-1 of the drugs Acyclovir, Ganciclovir, Foscarnet, Famciclovir, Vidarabina e Cidofovir. These antivirals are commonly used in the treatment of human herpesvirus and may subsequently contribute as a therapeutic alternative for EHV-1 infection. For this, the MTT test was performed, in which all the antivirals tested showed no toxicity up to 200 µg/mL. In sequence, the six antivirals were tested by plaque reduction assay using Vero cells culture as an indicator of viral replication. According to the cytotoxic concentration for 50% of cells (CC50), obtained by MTT, and effective drug concentration to inhibit by 50% the number of viral plaques (EC_{50}), it was possible to calculate the selectivity index (IS) of the compounds. Through IS the safety of drugs is estimated and, the higher the value, the safer the drug in the respective cells. Ganciclovir (IS: 490; EC50: 1.9 µg / mL) was presented as the drug more efficient and safe against EHV-1, followed by Cidofovir (IS: 150; EC_{50}: 5.7 µg/mL), Acyclovir (IS: 37.4; EC_{50}: 22.2 µg/mL), Famciclovir (IS: 25.1; EC_{50}: 5 µg/mL), Vidarabine (IS: 12.2; EC_{50}: 40.9 µg/mL) and Foscarnet (IS: 6.9; EC_{50}: 49.5 µg/mL), respectively. Therefore, Ganciclovir is a candidate for use in *in vivo* experiments, and may subsequently contribute as a therapeutic alternative to equine infections.

Keywords: EHV-1. Plaque assay. Acyclovir. Ganciclovir. Foscarnet. Famciclovir. Vidarabina. Cidofovir.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Porcentagem de redução no número de placas virais, em cultivo celular, produzida pelos fármacos Aciclovir (ACV), Ganciclovir (GCV), Foscarnet (PFA), Famciclovir (FAM), Vidarabina (VID) e Cidofovir (CDV) sobre o herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1).....36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade *in vitro* do Aciclovir, Ganciclovir, Foscarnet, Famciclovir, Vidarabina e Cidofovir, em concentração de µg/mL, frente ao alfaherpesvírus equino tipo 1.....35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **10**
2 REVISÃO DE LITERATURA **11**
2.1 ETIOLOGIA E HISTÓRICO 11
2.2 TRANSMISSÃO 12
2.3 EPIDEMIOLOGIA 13
2.4 PATOGENIA 13
2.5 ASPECTOS CLÍNICOS 14
2.6 DIAGNÓSTICO 16
2.7 PROFILAXIA E CONTROLE 17
2.8 TERAPIA ANTIVIRAL 19
3 ARTIGO (Conforme normas da revista Ciência Rural) **21**
RESUMO **21**
ABSTRACT **22**
INTRODUÇÃO **23**
MATERIAL E MÉTODOS **24**
RESULTADOS E DISCUSSÃO **28**
CONCLUSÃO **31**
REFERÊNCIAS **32**
4 CONCLUSÃO **37**
REFERÊNCIAS **38**

1 INTRODUÇÃO

Os herpesvírus de mamíferos, aves e répteis fazem parte da família *Herpesviridae*. Os vírions desta família são envelopados, constituídos por uma molécula de DNA de fita dupla linear e diâmetro entre 120 e 300 nm. Possuem ciclo de replicação curto (< 24 horas), destroem rapidamente as células de cultivo e estabelecem infecções latentes em neurônios dos gânglios sensoriais e autonômicos (CARMICHAEL; GREENE, 2006; DAVISON et al., 2009).

A maioria dos herpesvírus de importância em medicina veterinária pertence à subfamília *Alphaherpesvirinae* e ao gênero *Varicellovirus.* Dentre eles destaca-se o alfaherpervírus equino tipo 1 (EHV-1), o qual é responsável por causar prejuízos econômicos em criadouros de cavalos, afetando, especialmente, fêmeas prenhes e animais jovens (GALOSI et al., 2007; ICTV, 2016). O EHV-1 possui distribuição mundial e os animais infectados seguem portadores latentes por toda a vida, podendo o vírus ser reativado em casos de queda da imunidade, devido a situações estressantes, gestação, administração de medicamentos ou doenças concomitantes (RONSEE et al., 2004; SHERDING, 2008).

A transmissão do vírus ocorre, normalmente, por contato direto entre mucosas ou por inalação de aerossóis contendo partículas virais, sendo mais comum em locais com alta concentração de animais (MURPHY et al., 1999). A infecção pelo EHV-1 (agente do aborto viral equino) caracteriza-se por ser enzoótica na maioria das populações equinas e estar associada, principalmente, a casos de aborto; podendo ser responsável, também, por doença respiratória e danos neurológicos (mieloencefalopatia do herpesvírus equino [EHM]) (DAVISON et al., 2009; MA et al., 2013).

O diagnóstico presuntivo da infecção por EHV-1 pode ser estabelecido através do histórico do animal e dos sinais clínicos. No entanto, devem ser realizadas técnicas laboratoriais para a confirmação da suspeita clínica, sendo o isolamento viral em cultivo celular considerado o teste “padrão-ouro” (CARMICHAEL; GREENE, 2006). São utilizados, também, testes para a detecção do agente por imunofluorescência (IFA) e imunoperoxidase (IPX); técnicas sorológicas para a identificação de anticorpos, como soroneutralização (SN), fixação de complemento (FC) e ELISA. Por fim, métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), apresentam-se como um teste sensível para detectar o EHV-1 em secreções respiratórias, linfócitos e outros tecidos (FRANCO et al., 2012; LUNN et al., 2009; VARASSO et al., 2001).

Em humanos, as herpesviroses são comumente tratadas com medicamentos antivirais, os quais diminuem o período de convalescença e a taxa de transmissão viral entre os indivíduos

(CLERCQ, 2008). Para os equinos, não há tratamento específico para o EHV-1, sendo aplicadas medidas de higiene e manejo associadas à prática de vacinação como forma de profilaxia e controle da infecção (CHRINSIDE et al., 2000). Porém, a vacinação não é totalmente protetora, sendo limitada em intensidade e proteção, podendo ocorrer surtos de doença mesmo em rebanhos vacinados. Assim, o uso de fármacos antivirais pode ser benéfico na diminuição do impacto negativo ocasionado pelo vírus, contribuindo para melhorar a qualidade de vida e aumentar a longevidade dos animais (VISSANI et al., 2016).

No presente trabalho, objetivou-se determinar a suscetibilidade *in vitro* do EHV-1 aos antivirais comumente utilizados para infecções herpéticas em humanos, a fim de estabelecer uma dose eficiente e segura contra o vírus para, posteriormente, usá-los como uma alternativa terapêutica em cavalos. Os fármacos testados foram Aciclovir, Ganciclovir, Foscarnet, Famciclovir, Vidarabina e Cidofovir.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ETIOLOGIA E HISTÓRICO

Os herpesvírus de mamíferos, aves e répteis fazem parte da família *Herpesviridae*. Os vírions desta família são envelopados, constituídos por uma molécula de DNA de fita dupla linear e diâmetro entre 120 e 300 nm. Possuem ciclo de replicação curto (< 24 horas), destroem rapidamente as células de cultivo e estabelecem infecções latentes em neurônios dos gânglios sensoriais e autonômicos (CARMICHAEL; GREENE, 2006; DAVISON et al., 2009). A latência caracteriza-se como um dos principais mecanismos dos herpesvírus; é uma estratégia de evasão do sistema imunológico do hospedeiro, permitindo a perpetuação e manutenção do vírus na natureza (JONES, 2003; ROIZMAN et al., 1992; RONSEE et al., 2004; SHERDING, 2008).

A maioria dos herpesvírus de importância em medicina veterinária pertence à subfamília *Alphaherpesvirinae* e ao gênero *Varicellovirus.* Dentre eles destaca-se o alfaherpervírus equino tipo 1 (EHV-1) (ICTV, 2016). O EHV-1 era classificado em subtipos 1 e 2. A partir de 1981, quando os DNAs genômicos foram comparados por análises de endonucleases de restrição, o subtipo 2 foi designado como EHV-4. Nas populações domésticas, os EHV-1 e EHV-4 são os patógenos mais importantes e possuem estreita relação, no entanto, são antigenicamente distintos, promovendo perfis diferentes de doença (TELFORD et al., 1998).

A infecção por EHV-1 foi descrita pela primeira vez por Dimock e Edwards no ano de 1936, nos Estados Unidos, em éguas que abortaram logo após apresentarem alterações do sistema respiratório com sinais semelhantes aos de gripe. No Brasil, o EHV-1 foi primeiramente isolado em 1966, por Nilsson e Corrêa, a partir de inclusões de partículas virais em hepatócitos de fetos equinos abortados na região de Campinas (SP). Em 1994, o vírus foi isolado na região sul do país (DIMOCK; EDWARDS, 1936; NILSSON; CORRÊA, 1966; WEIBLEN et al., 1994).

A partir do isolamento em hospedeiros naturais (membros da família *Equidae*), os herpesvírus equinos têm sido inoculados em diferentes espécies de animais experimentais. O EHV-1 foi relatado, primeiramente, em cultura de tecidos fetais de cavalo, gato e hamster por Randall et al. (1953). Os efeitos citopáticos ocasionados pela infecção por EHV-1 desenvolvem-se de maneira rápida e simultaneamente ao aparecimento de corpúsculos de inclusão. As células cultivadas em monocamada perdem sua morfologia característica, tornando-se agrupadas e arredondadas; formam-se sincícios e placas de tamanhos variáveis na camada celular (PASCOE et al., 1969).

2.2 TRANSMISSÃO

O alfaherpesvírus equino (EHV) é responsável por causar prejuízos econômicos em criadouros de cavalos, afetando, especialmente, fêmeas prenhes e animais jovens (GALOSI et al., 2007). O vírus é excretado durante infecções agudas e em casos de reativação da infecção latente, sendo a magnitude e a duração da excreção viral significativamente superior no decorrer da infecção aguda (HEBIA et al., 2007).

Os animais infectados pelo EHV-1 serão portadores de infecções latentes por toda a vida, podendo o vírus ser reativado em casos de queda da imunidade, devido a situações estressantes, gestação, administração de medicamentos ou doenças concomitantes (RONSEE et al., 2004; SHERDING, 2008). Pode ocorrer reativação viral induzindo sinais clínicos e abortos mesmo em animais vacinados (HEBIA et al., 2007).

A transmissão do EHV-1 ocorre, normalmente, por contato direto entre mucosas, com secreções nasais, fetos abortados, fluídos placentários e fômites contaminados; ou por inalação de aerossóis contendo partículas virais, sendo mais comum em locais com alta concentração de animais (MURPHY et al., 1999).

2.3 EPIDEMIOLOGIA

O EHV- 1 possui distribuição mundial. A infecção pelo EHV-1 (agente do aborto viral equino) é enzoótica na maioria das populações equinas e está associada, principalmente, a casos de aborto; podendo ser responsável, também, por doença respiratória e danos neurológicos (mieloencefalopatia do herpesvírus equino [EHM]). Os potros são os mais suscetíveis a doenças respiratórias causadas pelo vírus, principalmente ao desmame (DAVISON et al., 2009; MA et al., 2013). Segundo Gilkerson et al. (1997), a infecção dos potros lactentes pelo EHV-1 pode ocorrer antes dos trinta dias de vida; e as éguas lactantes são as prováveis fontes primárias da transmissão do vírus para outras éguas e potros do mesmo rebanho.

Contudo, a maioria dos testes sorológicos, como a soroneutralização e a fixação de complemento, não permite diferenciar anticorpos contra EHV-1 e EHV-4, devido à extensa reatividade cruzada entre eles. Dessa forma, torna-se complicado o estudo soroepidemiológico em populações de cavalos onde é praticada a vacinação contra esses dois vírus (FRANCO et al., 2012). Para tanto, como forma de auxílio ao diagnóstico epidemiológico, foi desenvolvido um teste de ELISA para diferenciar anticorpos contra o EHV-1 e o EHV-4 (GALOSI, 2007; SHERDING, 2008).

2.4 PATOGENIA

A infecção pelo EHV-1 ocorre por contato direto ou por via respiratória (MURPHY et al., 1999). O vírus replica, inicialmente, em células epiteliais do trato respiratório e, na sequência, alcança o tecido linfoide local, incluindo o submandibular, retrofaringeal e linfonodos bronquiais. Após a replicação e liberação viral, quando células epiteliais do trato respiratório e tecido linfoide sofrem lise, ocorre linfoadenopatia local (VAN MAANEN et al., 2002).

Através de disseminação hematógena de linfócitos infectados, o alfaherpesvírus é capaz de atingir a placenta, o feto e as células endoteliais de vasos do encéfalo e da medula espinhal, podendo desencadear vasculite, trombose, isquemia, inflamação, reação de hipersensibilidade tipo III, e levar ao aborto, mortalidade neonatal e mieloencefalite. A extensão da viremia e o tropismo pelo endotélio vascular do SNC parecem estar relacionados com a quantidade de vírus, cepa e imunidade do hospedeiro (CARMAN et al., 1993; SPRAYBERRY; ROBINSON, 2014; WEIBLEN, 2007).

É comum o EHV-1 ocasionar infecções leves ou subclínicas (FOOTE et al., 2006). Para a forma respiratória da doença, o tempo de incubação é entre três e dez dias; enquanto os sinais neurológicos aparecem seis a dez dias após o animal ser infectado. Acredita-se que o estabelecimento de viremia associada à célula esteja diretamente relacionado com a indução de manifestações abortogênicas e neurológicas. Assim, sugere-se o controle da viremia para que ocorra a proteção contra o EHV-1. Para tanto, exige-se uma resposta imunitária eficiente, baseada na neutralização viral por anticorpos e na ação de linfócitos T citotóxicos (DEL PIERO et al., 2000).

Um importante papel na biologia dos herpesvírus é desenvolvido pelas glicoproteínas, principalmente no processo de infecção (adsorção, penetração e disseminação), devido ao fato delas serem expressas na membrana de superfície das células infectadas. A glicoproteína D (gD) é uma das principais proteínas e é considerada o principal alvo da molécula do sistema imune do hospedeiro para o EHV-1. Anticorpos contra ela aparecem logo após a infecção e exibem propriedades neutralizantes. Um dos epítopos indutor de produção de anticorpos neutralizantes parece ser um alvo promissor para a terapia antiviral e uma meta específica para a detecção de infecções pelo EHV-1 (VAN MAANEN et al., 2002).

2.5 ASPECTOS CLÍNICOS

Os animais que foram expostos ao EHV-1 podem apresentar sinais brandos ou serem assintomáticos. Esse alfaherpesvírus está associado à infecção urogenital, doença respiratória, surtos de aborto e problemas neurológicos (SPRAYBERRY; ROBINSON, 2014).

O quadro respiratório aparece na forma de surtos, acometendo especialmente animais jovens (até dois anos de idade), apresentando febre alta (em torno de 41ºC), a qual pode ser bifásica com episódios febris relacionados à viremia associada às células. Os sinais clínicos incluem, também, depressão, letargia, anorexia, aumento de volume dos linfonodos submandibulares, congestão das conjuntivas palpebrais e profusa descarga nasal serosa, que pode se tornar mucopurulenta. Ainda, é possível ocorrer uma infecção por EHV-1 vasculotrópica pulmonar fatal, causando vasculite multissistêmica, edema pulmonar e hemorragia (DEL PIERO et al., 2000; PATEL; HELDENS, 2005).

É comum o quadro abortivo acontecer após um surto respiratório (LARA et al., 2003). O abortamento é observado com maior frequência depois do sétimo mês de gestação (CHRINSIDE et al., 2000). A razão para o quadro abortivo ocorrer com maior frequência no último terço gestacional ainda não está bem esclarecida, mas acredita-se que fatores hormonais

relacionados à gestação influenciem no quadro inflamatório ocasionado pelo EHV-1 (SMITH et al., 1996).

Os hormônios progesterona, cortisona e estrógeno inibem a resposta linfocitária quando estão em alta concentração. Nos mamíferos, durante o processo de infecção viral, a progesterona é secretada na interface transplacentária em maior quantidade no período final da gestação (SMITH et al., 1996). Quando ocorre próxima ao parto, a infecção transplacentária pode resultar no nascimento de um potro vivo infectado, que pode vir a óbito alguns dias após nascer, situação conhecida como doença neonatal do potro (PATEL; HELDENS, 2005).

Nos vasos sanguíneos endometriais, pode ocorrer uma infecção generalizada, resultando em uma grave vasculite e trombose multifocal, as quais são capazes de ocasionar aborto por lesões no endométrio sem o feto estar infectado. É possível que lesões vasculares menos extensas ocorram, permitindo a transferência de vírus ao longo da barreira uteroplacentária e, com isso, acontece o aborto devido à infecção viral do feto (PATEL; HELDENS, 2005).

No feto e na placenta, as lesões macroscópicas e achados de necropsia incluem edema subcutâneo e pulmonar, lesões vasculares graves nas cavidades serosas e acúmulo de líquido pleural e peritoneal. Ainda, as mucosas apresentam-se ictéricas; há petéquias em órgãos como o baço e os rins; e fígado congesto com focos de necrose (THOMASSIAN, 2005).

Em relação à mieloencefalopatia causada pelo EHV-1, esta é uma enfermidade neurológica de manifestação esporádica e incomum (PUSTERLA et al., 2009). Os sinais clínicos têm início rápido e tornam-se severos até 48 horas. Algumas alterações clínicas podem preceder os sinais nervosos, tais como: edema de escroto e membros, febre e doença respiratória (HENNINGER et al., 2007). Os cavalos com manifestações neurológicas apresentam relutância em se movimentar, debilidade dos membros torácicos e/ou pélvicos, andar cambaleante, incoordenação e ataxia. Pode ocorrer paralisia dos membros ou um quadro de quadriplegia e decúbito. São descritos, também, paralisia da cauda, diminuição do tônus anal e incontinência urinária (STUDDERT et al., 2003; WEIBLEN, 2007).

É comum o quadro neurológico do EHV-1 ter morbidade baixa, com período de duração dos sinais clínicos variável (WILSON; PUSTERLA, 2004). Não há lesões macroscópicas significantes e raramente são observadas hemorragias ou áreas de malácia na medula espinhal dos animais (O’TOOLE et al., 1993). Os animais levemente afetados podem sobreviver, recuperando-se completamente durante um período de dias a várias semanas. Enquanto os equinos afetados de forma grave podem morrer ou ser submetidos à eutanásia em decorrência de complicações secundárias (WILSON; PUSTERLA, 2004).

2.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico presuntivo da infecção por EHV-1 pode ser estabelecido de acordo com o histórico do animal e por algumas características clínicas e epidemiológicas, tais como: sinais clínicos apresentados pelas fêmeas, período gestacional de ocorrência, históricos de estresse, surtos respiratórios e abortivos nos animais suspeitos (CARMICHAEL; GREENE, 2006). Para auxiliar no diagnóstico, podem ser realizadas análises macroscópicas do feto abortado e da placenta, além dos achados de necropsia (THOMASSIAN, 2005). Nesse caso, os fragmentos de tecidos devem ser encaminhados a um laboratório de patologia, sob refrigeração ou fixados em formol a 10% (HENNINGER et al., 2007).

No entanto, devem ser realizadas técnicas laboratoriais, para a confirmação da suspeita clínica, sendo o isolamento viral em cultivo celular considerado o teste “padrão-ouro”. As amostras coletadas e enviadas para análise em laboratório incluem: capa leucocitária de equinos na fase aguda da doença, soro dos animais suspeitos, suabe nasofaríngeo, fragmentos de pulmão, fígado, baço e timo dos fetos abortados ou natimortos (CARMICHAEL; GREENE, 2006).

O EHV-1 tem a capacidade de multiplicar-se em cultivos celulares de outras espécies, não somente da equina como ocorre com o EHV-4, sendo essa característica uma forma de diferenciá-los. Em laboratórios de virologia, as células VERO (*African Green Monkey Kidney Cell*) e RK-13 (*Rabbit Kidney Cell*) são comumente utilizadas para o isolamento e multiplicação do EHV-1 (FRANCO et al., 2012).

Por meio das técnicas de imunofluorescência (IFA) e imunoperoxidase (IPX) é possível detectar o antígeno viral presente em células infectadas ou em cortes de tecidos congelados. Ainda, para a identificação de anticorpos no soro dos animais suspeitos da infecção por EHV-1, podem ser empregados testes sorológicos, como soroneutralização (SN), fixação de complemento (FC) e ELISA (FRANCO et al., 2012; LUNN et al., 2009).

O teste de soroneutralização detecta anticorpos específicos e que possuam a capacidade de neutralizar os vírus presentes no soro. A SN pode ser realizada em amostras de soros individuais ou soros pareados. Porém, em amostras únicas, a maioria dos resultados positivos indica uma exposição ao vírus, mas não necessariamente à doença (HENNINGER et al., 2007). Na sorologia pareada, o soro é coletado em mais de um momento, ou seja, nas fases aguda e convalescente da enfermidade. Se houver um aumento de quatro vezes ou mais no título de anticorpos, é possível que o diagnóstico da infecção por EHV-1 seja confirmado (DIAZ et al., 2015). Nesse caso, é importante a identificação dos animais vacinados, pois caso essa prática

tenha sido empregada, o teste de soroneutralização poderá levar a “falsos positivos” (HENNINGER et al., 2007).

Os anticorpos neutralizantes possuem meia-vida longa, podendo persistir por mais de um ano; enquanto os anticorpos fixadores de complemento podem desaparecer em um período de três meses. No entanto, embora possam ser aplicadas, há restrições no uso das técnicas de soroneutralização e fixação de complemento: ambas não são capazes de diferenciar anticorpos induzidos por EHV-1 e EHV-4, em decorrência da reatividade cruzada entre eles, assim como não distinguem anticorpos vacinais dos ocasionados por infecção natural (FOOTE et al., 2006; PATEL; HELDENS, 2005).

Através de estudos sorológicos, a técnica de ELISA revelou-se mais vantajosa em comparação à soroneutralização, pois é capaz de diferenciar o EHV-1 do EHV-4, além de apresentar maior rapidez nos resultados (STUDDERT et al., 2003). No entanto, ainda não há teste comercial no Brasil, o que dificulta a aplicação desse método em decorrência do alto custo (WEIBLEN, 2007).

São utilizados, também, métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo este um teste sensível para detectar o EHV-1 em secreções respiratórias, linfócitos e outros tecidos. Após o processamento das amostras, o resultado é obtido em poucas horas. Assim, o PCR é uma boa alternativa ao isolamento viral em cultivo celular, pois permite a implementação precoce de medidas de controle, reduzindo a disseminação viral (LUNN et al., 2009; VARASSO et al., 2001).

O diagnóstico diferencial da infecção pelo EHV-1 deve ser realizado por exames laboratoriais. Os sinais clínicos da infecção por EHV-1 são semelhantes às enfermidades respiratórias ocasionados por outros agentes, como o EHV-4, vírus da arterite equina (EAV), rinovírus equino, vírus da influenza equina (EIV), vírus da anemia infecciosa equina (EIAV), *Streptococcus* spp. e *Rhodococcus equi* (CHRINSIDE, 2000).

2.7 PROFILAXIA E CONTROLE

A profilaxia e controle da infecção por EHV-1 consistem, principalmente, em medidas de higiene e manejo adequadas associadas à prática de vacinação. Através das medidas preventivas, busca-se evitar situações estressantes como superlotação, transporte e desnutrição, que podem desencadear a reativação de infecções latentes. Deve-se restringir a movimentação de equinos e fazer o isolamento de animais com sinais respiratórios. Ainda, é necessário ter cuidado em casos de aborto em éguas, pois o vírus é excretado juntamente com o feto e a

placenta, que podem conter altos títulos virais, constituindo-se em importantes fontes de infecção (CHRINSIDE et al., 2000; FOOTE et al., 2006).

Outra ação profilática adotada é a vacinação contra o EHV-1. Foi desenvolvida na década de 1960, logo após a descoberta do isolamento e adaptação do herpesvírus equino em cultivos celulares, uma vacina replicativa resultante da atenuação da cepa RacH por sucessivas passagens em células de rim suíno (CHRINSIDE et al., 2000). Atualmente, a maioria das vacinas utilizadas para combater o EHV-1 é inativada. Embora os níveis de anticorpos neutralizantes não estejam correlacionados com o nível de proteção, a frequência de linfócitos T citotóxicos específicos para o EHV-1 parece ser maior em indivíduos protegidos contra a infecção do que os não protegidos (DIAZ et al., 2015).

A maior parte das vacinas contendo antígenos do EHV-1 é comercializada como polivalente, associada a antígenos do tétano, EHV-4, vírus da influenza equina (EIV), e vírus das encefalites equina venezuela, leste e oeste (VEEV, EEEV e WEEV). A vacinação não é totalmente protetora, sendo limitada em intensidade e proteção, podendo ocorrer surtos da doença mesmo em rebanhos vacinados. Além disso, não há evidências de que possam prevenir a ocorrência natural dos casos de mieloencefalopatia do herpesvírus equino (EHM), não existindo vacinas comerciais com esse foco (DIAZ et al., 2015; GOODMAN et al., 2012; KYDD et al., 2012).

A ineficácia das atuais vacinas comerciais em promover uma protecão completa e duradoura frente ao EHV-1 tem resultado numa reavaliação dos imunógenos usados para o controle da infecção em rebanhos equinos. Assim como estimulou a pesquisa e o desenvolvimento de vacinas experimentais de DNA, subunidades e deleção de genes (FOOTE et al., 2006).

Em humanos, as herpesviroses são comumente tratadas com medicamentos antivirais, os quais diminuem o período de convalescença e a taxa de transmissão viral entre os indivíduos e no meio ambiente (CLERCQ, 2008). Para os equinos, não há tratamento específico para a infecção por EHV-1, sendo indicadas apenas medidas preventivas e de suporte para os animais afetados, com o objetivo de controlar a introdução e transmissão das infecções e de minimizar os sinais clínicos (CARMICHAEL; GREENE, 2006). Na forma nervosa da enfermidade, há um quadro de vasculite mediada por processo imunológico, podendo ser empregados corticóides, como dexametasona, e anti-inflamatórios, como dimetilsulfóxido (DMSO) e flunixin meglumine. Contudo, o uso de fármacos antivirais pode ser benéfico na diminuição do impacto negativo ocasionado pelo vírus, contribuindo para melhorar a qualidade de vida e aumentar a longevidade dos animais (VISSANI et al., 2016). Os compostos devem ser efetivos

tanto em isolados associados a surtos de aborto como a manifestações neurológicas (GARRÉ et al., 2007).

2.8 TERAPIA ANTIVIRAL

A terapia antiviral é uma estratégia promissora contra o alfaherpesvírus equino (VISSANI et al., 2016). Para o tratamento da enfermidade, é ideal que os fármacos sejam de fácil administração e de custo acessível, visto que normalmente é preciso tratar um grande número de animais do rebanho (DAL POZZO; THIRY, 2014).

Os compostos antivirais mais utilizados em medicina humana no intuito de inibir a replicação dos herpesvírus são o Aciclovir, Ganciclovir, Famciclovir, Vidarabina e Cidofovir, os quais são análogos de nucleosídeos; além do Foscarnet, que por sua vez é um análogo sintético do pirofosfato (COEN; RICHMAN, 2007). Os análogos do nucleosídeo guanina, Aciclovir, Ganciclovir e Famciclovir (pró-farmaco oral do Penciclovir) têm sua atividade antiviral dependente da fosforilação por uma enzima quinase viral, a timidina quinase (TK), seguida de duas fosforilações por quinases celulares. O Aciclovir é altamente eficaz frente ao herpesvírus simplex (HSV-1 e HSV-2), possuindo, também, certa eficiência contra o vírus da varicela zoster (VZV). Em relação ao Ganciclovir, este demonstrou ação *in vitro* frente a diversos vírus: HSV, citomegalovírus (CMV), adenovírus e vírus da vaccínia. O Famciclovir tem seu uso aprovado no tratamento do VZV, HSV-1 e HSV-2 em pacientes adultos (CLERCQ, 2001; COEN; RICHMAN, 2007; KLEYMANN, 2003).

O Cidofovir é um análogo nucleosídeo da citosina, que, para ser ativado, precisa de duas etapas de fosforilação, independentes da TK. Esse fármaco é um finalizador da cadeia de DNA e tem se mostrado efetivo em infecções por HSV, CMV, adenovírus e poxvírus (CLERCQ, 2001). O análogo nucleosídico da adenina, a Vidarabina, é rapidamente desaminada pela adenosina desaminase em hipoxantina-arabinose, a qual possui atividade antiviral mais fraca e é pelo menos 10 vezes menos potente que a primeira. A Vidarabina possui atividade comprovada contra o HSV, rabdovírus e poxvírus (SHEN et al., 2009).

O análogo de pirofosfato - Foscarnet - não requer ativação prévia por fatores celulares ou virais. O fármaco liga-se no sítio ocupado pelo pirofosfato, impedindo que a polimerase complete o seu ciclo catalítico. Por esta razão, o PFA é utilizado para o tratamento de infecções herpéticas por mutantes na TK ou na DNA polimerase do HSV-1, VZV ou CMV resistentes a análogos de nucleosídeo (COEN; RICHMAN, 2007).

Em variados estudos *in vitro*, utilizando cultivos celulares distintos ao do presente trabalho, também foi evidenciada a eficácia, em diferentes graus, desses seis fármacos frente ao EHV-1 (GARRÉ et al., 2007; MAXWELL, 2017; VISSANI et al., 2016). Entretanto, são necessárias mais pesquisas a fim de estabelecer uma dose eficiente e segura contra o vírus para, posteriormente, usá-los como uma alternativa terapêutica em cavalos. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Pesquisa (IBGE), em 2016, o número de equinos no Brasil era de 5,58 milhões, com alta de 0,5% em relação ao ano de 2015 (BRASIL, 2017). Portanto, devido à expressiva quantidade de equinos no país e a importância desses animais para o agronegócio e setores como lazer e esporte, os quais geram impacto na economia brasileira, justifica-se o interesse em estabelecer um efetivo tratamento contra o EHV-1.

3 ARTIGO (Conforme normas da revista Ciência Rural)

Atividade *in vitro* de seis drogas antivirais contra o alfaherpesvírus equino tipo 1

In vitro activity of six antivirals drugs against equine alphaherpesvirus type 1

Amanda Lovato de Oliveira[1] Juliana Felipetto Cargnelutti[2] Ana Paula Gnocato Mortari[2] Eduardo Furtado Flores[3] Rudi Weiblen[3]

RESUMO

O alfaherpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) está amplamente distribuído nos rebanhos equinos de todo o mundo e constitui-se como um dos principais agentes causadores de abortos, podendo causar também doença respiratória e neurológica. A vacinação é um possível método de controle para o EHV-1, porém não confere proteção total, sendo necessário um tratamento eficaz. Com isso, neste estudo investigou-se a atividade anti-herpética *in vitro* frente ao EHV-1 dos fármacos Aciclovir, Ganciclovir, Foscanet, Famciclovir, Vidarabina e Cidofovir, com o objetivo de verificar a atividade antiviral e de estabelecer uma dose segura para o bloqueio da replicação do vírus. Inicialmente foi realizado o teste de MTT para determinar a dose não citotóxica das drogas. Verificou-se que todos os antivirais testados não apresentaram citoxicidade até a dose de 200 μg/mL. Na sequência, diferentes concentrações dos seis fármacos foram submetidas ao teste de redução de placas virais em cultivo celular. De acordo com a concentração citotóxica para 50% das células (CC_{50}), obtida pelo MTT, e pela concentração

[1]Programa de Residência em Área Profissional da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.
[2]Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.
[3]Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

dos fármacos efetiva para inibir em 50% o número de placas virais (EC_{50}), foi possível calcular o índice de seletividade (IS) dos compostos. Assim, o Ganciclovir (IS: 490; EC_{50}: 1,9 µg/mL) foi o mais seguro e eficiente frente ao EHV-1, seguido pelo Cidofovir (IS: 150; EC_{50}: 5,7 µg/mL), Aciclovir (IS: 37,4; EC_{50}: 22,2 µg/mL), Famciclovir (IS: 25,1; EC_{50}: 24,5 µg/mL), Vidarabina (IS: 12,2; EC_{50}: 40,9 µg/mL) e Foscarnet (IS: 6,9; EC_{50}: 49,5 µg/mL). Portanto, o Ganciclovir constitui-se em um candidato para uso em experimentos *in vivo*, podendo contribuir, posteriormente, como uma alternativa terapêutica às infecções em equinos.

Palavras-chave: EHV-1, ensaio de placa, Aciclovir, Ganciclovir, Foscarnet, Famciclovir, Vidarabina, Cidofovir.

ABSTRACT

Equine alphaherpesvirus type 1 (EHV-1) is world widely distributed in equine herds and constitutes one of the main agents causing abortion, and may also produce neurological and respiratory disease. Vaccination is a possible control method for EHV-1, but it does not provide complete protection, and effective treatment is necessary. Thus, in this study we investigated the *in vitro* anti-herpetic activity against EHV-1 of the drugs Aciclovir, Ganciclovir, Foscanet, Famciclovir, Vidarabina and Cidofovir, with the aim of to determine the antiviral activity and a safe and effective dose against the virus. For this, the MTT test was performed, in which all the antivirals tested showed no toxicity up to 200 µg/mL. Subsequently, different concentrations of the six drugs were submitted to the viral plaque reduction test in cell culture. According to the cytotoxic concentration for 50% of cells (CC_{50}), obtained by MTT, and effective drug concentration to inhibit by 50% the number of viral plaques (EC_{50}), it was possible to calculate the selectivity index (IS) of the compounds. Thus, Ganciclovir (IS: 490; EC_{50}: 1.9 µg/mL) was the safest and most efficient against EHV-1, followed by Cidofovir (IS: 150; EC_{50}: 5.7 µg/mL), Acyclovir (IS: 37.4; EC_{50}: 22.2 µg/mL), Famciclovir (IS: 25.1; EC_{50}: 5 µg/mL), Vidarabine

(IS: 12.2; EC_{50}: 40.9 μg/mL) and Foscarnet (IS: 6.9; EC_{50}: 49.5 μg/mL), respectively. Therefore, Ganciclovir is a candidate for use in *in vivo* experiments, and may subsequently contribute as a therapeutic alternative to equine infections.

Keywords: EHV-1, plaque assay, Acyclovir, Ganciclovir, Foscarnet, Famciclovir, Vidarabina, Cidofovir.

INTRODUÇÃO

Os vírus pertencentes à família *Herpesviridae* afetam uma ampla gama de mamíferos (DAVISON et al., 2009). Na subfamília *Alphaherpesvirinae* encontram-se a maioria dos herpesvírus de importância em medicina veterinária, dentre eles o alfaherpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) (ICTV, 2016). Esse alfaherpesvírus possui distribuição mundial e caracteriza-se pela capacidade de produzir infecção latente nos hospedeiros. O vírus pode ser reativado devido à queda da imunidade, situações estressantes, gestação, administração de medicamentos ou doenças concomitantes (RONSEE et al., 2004; SHERDING, 2008).

O EHV-1 é um dos principais agentes responsável por induzir surtos de aborto em equinos, e também está associado a distúrbios neurológicos e respiratórios, podendo causar prejuízos econômicos em criadouros de cavalos, afetando, especialmente, fêmeas prenhes e animais jovens (GALOSI et al., 2007). Ainda não há um tratamento específico para o EHV-1. A vacinação é a principal forma de profilaxia e controle da infecção, mas não é totalmente protetora, pois podem ocorrer surtos da doença mesmo em rebanhos vacinados. Assim, faz-se necessário determinar um tratamento eficaz contra o EHV-1 (CHRINSIDE et al., 2000).

A terapia antiviral é uma prática comum na clínica médica humana, mas é pouco utilizada nas infecções por herpesvírus em animais. Até o momento, o Aciclovir foi o composto mais estudado contra os vírus BoHV-1, FeHV-1 e EHV tipos 1 e 4, demonstrando variada eficiência na concentração necessária para reduzir em 50% o número de placas virais (EC_{50}).

Em relação ao BoHV-1, FeHV-1 e EHV-4, o Aciclovir demonstrou-se pouco ativo. Frente ao EHV-1, foi eficaz, porém apresentou o EC_{50} 20 vezes maior que o do Ganciclovir (THIRY et al., 1983; MUELEN et al., 2006; GARRÉ et al., 2007; DEZENGRINI et al., 2010).

Embora pesquisas com alguns anti-herpéticos tenham sido conduzidas *in vitro* frente ao EHV-1, demonstrando potencial aplicação (GARRÉ et al., 2007; AZAB et al., 2010), ainda não há orientações claras sobre as formulações disponíveis para tratamento, necessitando de mais investigações *in vitro* que possam auxiliar na determinação da terapia *in vivo*. Com isso, o objetivo deste trabalho foi investigar, *in vitro*, a suscetibilidade do EHV-1 para fármacos antivirais utilizados em medicina humana (Aciclovir, Ganciclovir, Foscarnet, Famciclovir, Vidarabina e Cidofovir), a fim de estabelecer uma dose eficiente e segura para, posteriormente, testá-los *in vivo*, contribuindo como uma alternativa terapêutica em equídeos.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental

A suscetibilidade *in vitro* do EHV-1 às drogas antivirais Aciclovir (ACV), Ganciclovir (GCV), Foscanet (PFA), Famciclovir (FAM), Vidarabina (VID) e Cidofovir (CDV) foi avaliada pelo ensaio de redução do número de placas. Inicialmente, investigou-se a toxicidade de doses crescentes dos seis fármacos para células Vero (*African Green Monkey kidney*). Em seguida, foi realizado, em células de cultivo, o teste de redução do número de placas virais para cada fármaco. Por fim, foi determinado o índice de seletividade dos compostos.

Células e vírus

Foram utilizadas células Vero (*African Green Monkey kidney*) para amplificação e quantificação do EHV-1 e do herpesvírus simplex tipo 1 (HSV-1), realização dos testes de titulação, testes de citotoxicidade e ensaios de redução no número de placa. As células foram

cultivadas no meio RPMI (Instituto Roswell Park Memorial) e suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB), acrescido de antibióticos (estreptomicina 0,4 mg/mL; penincilina 1,6 mg/mL) e antifúngico (anfotericina B 0,0025 mg/mL). A cepa EHV-1 Kentucky D, gentilmente fornecida pelo Dr. Rodrigo Franco (Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil), foi testada frente aos seis antivirais, enquanto a cepa HSV-1 KOS (Dr. Paulo Michel Roehe, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil) serviu como controle positivo de suscetibilidade aos fármacos.

Fármacos

Para os testes *in vitro*, foram usados, em diferentes concentrações, seis fármacos comerciais indicados para o tratamento de infecções herpéticas em humanos: o Aciclovir (peso molecular - PM 225,21; Dermapelle Farmácia de Manipulação, Santa Maria, RS, BR), Ganciclovir (PM 255,2; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), Foscarnet (PM 300,04; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), Famciclovir (PM 321,3; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), Vidarabina (PM 285,2; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e Cidofovir (PM 279,1; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Os antivirais foram diluídos na concentração de 1mg/mL em solução salina (ACV); solução salina com 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) (GCV); água ultrapura (PFA, CDV e VID); ou somente em DMSO (FAM).

Teste de viabilidade celular

A toxicidade dos seis antivirais para as células de cultivo foi determinada pelo teste de MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*). Para tanto, as células Vero ($2x10^6$ células/placas de poliestireno com 96 cavidades) foram incubadas durante 24 horas a 37ºC em estufa de CO_2 a 5% e, posteriormente, submetidas ao teste de MTT adaptado de GARRÉ et al. (2007), onde foram adicionadas cinco diferentes diluições de cada antiviral (1; 10; 100; 200 e 500 μg/mL). Após 72 horas de incubação com o antiviral, removeu-se o

sobrenadante e 50 μL de MTT foram adicionados, por cavidade; nessa etapa, as células ficaram incubadas por 2 horas a 37ºC em estufa de CO_2 a 5%. Em seguida, o MTT foi substituído por 150 μL de DMSO por poço da placa, e a absorbância (em densidade óptica - OD) foi medida a um comprimento de onda de 550 nm em leitor de microplacas. A porcentagem de células viáveis para cada concentração do fármaco foi testada pela fórmula: *% células viáveis = média OD (antiviral) x 100/média OD (controles).*

A partir das porcentagens de viabilidade das células para cada concentração dos fármacos, foi possível determinar a concentração citotóxica para 50% das células (CC_{50}), por análise de regressão linear. Segundo GARRÉ et al. (2007), no teste de MTT, considera-se como tóxica a concentração de antiviral em que a viabilidade das células é inferior a 80%, em comparação aos controles.

Atividade antiviral in vitro

Para investigar a atividade antiviral *in vitro* dos seis fármacos frente ao EHV-1 Kentucky D, foi realizado o teste de redução do número de placas virais. No ensaio, utilizou-se HSV-1 KOS como controle positivo. Diante disso, foram usadas células Vero cultivadas em placas de poliestireno de seis cavidades ($3x10^5$ células/cavidade). Antes do ensaio, três cavidades da placa contendo células Vero receberam 1 mL de RPMI com a concentração do antiviral a ser testada (0,1; 1; 10; 25; 75 e 100 μg/mL), e outras duas cavidades foram mantidas como controles (viral e celular), e incubadas por 1 hora a 37ºC em estufa de CO_2 a 5%. Na sequência, removeu-se o sobrenadante e adicionou-se, sobre o tapete celular, 1 mL de inóculo por cavidade, contendo, aproximadamente, 100 unidades formadoras de placa (PFU) do respectivo vírus. Depois de 2 horas de adsorção, o inóculo foi removido e os tapetes celulares recobertos por 3 mL de uma solução contendo RPMI, 10% de soro fetal bovino e 1% de ágar de baixo ponto de fusão, além das diferentes concentrações (μg/mL) de cada antiviral. As

placas contendo os ensaios foram incubadas a 37ºC em estufa de CO_2 a 5%, por 72h. Após este período, o meio sólido foi removido e os tapetes celulares foram fixados e corados com 2 ml/cavidade com solução de cristal violeta e formalina (0,65 g de cristal violeta; 62,5 ml de formalina e 500 ml de água q.s.p.). Por fim, realizou-se a contagem do número de placas induzidas pelos vírus (EHV-1 e HSV-1) nas replicatas de células tratadas e no controle viral.

O efeito inibitório dos compostos antivirais foi determinado pela seguinte fórmula: *% inibição da replicação viral = 1 - (número médio de placas virais nas cavidades com antiviral/ número médio de placas virais nas cavidades sem antiviral) x 100*. A partir disso, calculou-se a concentração de cada fármaco efetiva para inibir em 50% o número de placas virais (EC_{50}). A EC_{50} e o índice de seletividade (IS) foram calculados por análise de regressão linear, considerando-se a equação da reta adequada quando o valor de R^2 foi igual ou superior a 0,9. Para o cálculo da EC_{50} empregou-se a equação da reta: $y = ax - b$ (onde: y = EC_{50} e x = % de inibição das placas virais). O IS é a relação entre a CC_{50} do fármaco (adquirido pelo MTT) e a EC_{50}. O valor obtido no IS permite estimar o nível de segurança dos medicamentos para posterior uso em animais. Quanto maior o valor do IS (acima de 1), mais significativa será a diferença entre a dose de antiviral que reduz em 50% a replicação viral (EC_{50}) e a dose citotóxica (CC_{50}), por consequência, mais seguro será o fármaco para uso nas respectivas células (COEN & RICHMAN, 2007; DEZENGRINI et al., 2010).

Análise de dados

Foram conduzidos dois testes independentes, em triplicata, para cada experimento (MTT e atividade antiviral *in vitro*). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelos testes de análise de variância (ANOVA), através do programa GraphPad Prism 6.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes de MTT realizados com células Vero, somente os fármacos Ganciclovir e Cidofovir não apresentaram citotoxicidade na concentração de 500 μg/mL, sendo esses resultados compatíveis com os obtidos por GARRÉ (2007). No entanto, todos os seis antivirais testados apresentaram viabilidade celular superior a 80% na concentração de 200 μg/mL. Por isso, foram utilizadas concentrações inferiores nos ensaios de redução de placa.

No teste para verificar a inibição das placas induzidas pelo EHV-1, o fármaco mais eficaz foi o Ganciclovir ($EC_{50:}$ 1,9), seguido pelo Cidofovir ($EC_{50:}$ 5,7), Aciclovir ($EC_{50:}$ 22,2), Famciclovir ($EC_{50:}$ 24,5), Vidarabina ($EC_{50:}$ 40,9) e Foscarnet ($EC_{50:}$ 49,5), respectivamente. Na Tabela 1 estão expostos os valores da concentração citotóxica dos compostos para 50% das células (CC_{50}), a concentração de antiviral que inibiu 50% da replicação viral (EC_{50}) e o índice de seletividade (IS) frente ao EHV-1 dos seis antivirais comerciais testados. Os resultados do EC_{50} foram obtidos a partir das porcentagens de redução do número de placas, demonstrados na Figura 1.

Em relação a replicação do HSV-1, em cultivo celular, todos os fármacos inibiram totalmente a formação de placas virais nas concentrações de 75 e 100 μg/mL, exceto o Famciclovir que, como os demais compostos, foi eficaz contra o vírus, porém não eliminou por completo as placas na concentração de 75 μg/mL. O HSV, protótipo da subfamília *Alphaherpesvirinae*, possui destaque no desenvolvimento da quimioterapia antiviral, pois foi o primeiro vírus a ser efetivamente tratado utilizando um composto antiviral, o Idoxuridine (PRUSOFF, 1959), e por isso foi utilizado como controle de eficácia dos antivirais testados.

O Ganciclovir apresentou menor EC_{50}, resultando também no maior IS, sendo, portanto, além de mais eficaz, o mais seguro entre os antivirais testados. O resultado obtido para esse fármaco assemelha-se ao observado por MUELEN et al. (2006) e por GARRÉ et al. (2007), os quais avaliaram a suscetibilidade de seis fármacos antivirais contra o FeHV-1 e

EHV-1, porém utilizando células de rim felino (CRFK) e células de pulmão embrionário de equino (EEL), respectivamente. O Cidofovir também induziu diminuição notável no número de placas, diferindo do encontrado na pesquisa de GARRÉ et al. (2007), na qual o fármaco não foi altamente eficiente na inibição da replicação viral, mas foi capaz de reduzir significativamente um outro parâmetro, o tamanho das placas, em concentrações muito baixas. A diferença nos resultados dos dois experimentos quanto à diminuição do número de placas virais pode ser consequência da variável suscetibilidade dos isolados de EHV-1 testados ao Cidofovir.

Dos seis compostos selecionados, classificam-se como análogos de nucleosídeos: Aciclovir, Ganciclovir, Famciclovir, Vidarabina e Cidofovir; enquanto o Foscarnet é representante dos análogos de pirofosfato. Os análogos do nucleosídeo guanina, Aciclovir, Ganciclovir e Famciclovir (pró-farmaco oral do Penciclovir) têm sua atividade antiviral dependente da fosforilação por uma enzima quinase viral, a timidina quinase (TK), seguida de duas fosforilações por quinases celulares. O Aciclovir e o Famciclovir promovem o término da extensão da molécula de DNA viral após serem incorporados na cadeia; enquanto a incorporação do Ganciclovir ocorre sem necessariamente interromper a extensão da cadeia (CLERCQ, 2001; KLEYMANN, 2003; COEN & RICHMAN, 2007).

O Cidofovir é um análogo nucleosídeo da citosina, que, para ser ativado, precisa de duas etapas de fosforilação, independentes da TK. O CDV é um finalizador da cadeia de DNA e tem se mostrado efetivo em infecções por HSV, citomegalovírus (CMV), adenovírus e poxvírus (CLERCQ, 2001). O análogo nucleosídico da adenina, a Vidarabina, é rapidamente desaminada pela adenosina desaminase em hipoxantina-arabinose, a qual possui atividade antiviral mais fraca e é pelo menos 10 vezes menos potente que a primeira (SHEN et al., 2009).

O análogo de pirofosfato - Foscarnet - não requer ativação prévia por fatores celulares ou virais. O fármaco liga-se no sítio ocupado pelo pirofosfato, impedindo que a polimerase

complete o seu ciclo catalítico. Por esta razão, o PFA é utilizado para o tratamento de infecções herpéticas por mutantes na TK ou na DNA polimerase do HSV-1, vírus da varicela zoster (VZV) ou citomegalovírus humano (CMV) resistentes a análogos de nucleosídeo (COEN & RICHMAN, 2007).

No trabalho realizado por MUELEN et al. (2006), o Aciclovir foi o fármaco menos eficiente contra o FeHV no teste de redução de placas. Embora tenha tido efeito sobre o EHV-1, o ACV resultou em EC_{50} 20 vezes maior do que o EC_{50} do Ganciclovir, sendo esse resultado compatível com o obtido no experimento feito por GARRÉ et al. (2007). A atividade do Aciclovir e do Famciclovir frente ao EHV-1 foi semelhante, se comparados os valores de EC_{50}, assim como nos relatos de MAXWELL et al. (2008). Porém, em cavalos, ainda não há estudos de farmacocinética usando o Famciclovir, possivelmente devido ao alto custo do fármaco e à falta de produtos injetáveis disponíveis (MAXWELL, 2017). Entretanto, no estudo realizado por MALIK et al. (2009), o Famciclovir apresentou-se como um medicamento sistêmico promissor para o tratamento de doenças oculares atribuídas ao FeHV-1, sendo mais eficaz que o Aciclovir e seu pró-fármaco Valaciclovir.

Acredita-se que a diferença na sensibilidade do Aciclovir para os herpesvírus de animais esteja relacionada à variabilidade na TK viral, pois as enzimas do HSV e VZV fosforilam de forma mais eficiente esse fármaco. A TK do EHV-1 fosforila o Aciclovir, embora de maneira moderada ao comparar com a TK do HSV-1. Em relação ao FeHV, a eficiência apresentada pelo antiviral é baixa, pois a fosforilação pela TK desse vírus é pouco eficiente (COEN & RICHMAN, 2007).

O Famciclovir assemelha-se ao Aciclovir quanto à estrutura, seletividade e ao mecanismo de ação. No entanto, o Famciclovir possui ação mais prolongada, devido ao maior tempo de meia-vida de seus metabólitos, formados após a captação do fármaco pelas células, diminuindo, assim, a duração da lesão (MAXWELL, 2017).

Os fármacos Ganciclovir e Aciclovir substituíram a Vidarabina no tratamento de infecções por HSV, pois são metabolicamente menos tóxicos e mais estáveis (SHEN et al., 2009). Em medicina equina, são escassos os relatos do uso de Vidarabina frente ao EHV-1. No presente estudo, este fármaco apresentou resultados moderados sobre o vírus, sendo apenas mais eficiente que o Foscarnet. Este, por sua vez, reduziu o número de placas virais, mas apresentou os maiores índices de EC_{50} e menores índices de IS para o EHV-1, mostrando um comportamento diferente ao relatado por DEZENGRINI et al. (2010), em que o Foscarnet apresentou os melhores resultados, no teste de redução de placa, frente ao BoHV-1, BoHV-2 e BoHV-5. Portanto, o Foscarnet não se constitui em um anti-herpético de escolha para o tratamento em equinos.

Em relação ao custo dos seis fármacos testados, o Aciclovir possui o valor mais acessível (frasco 10 mg: R$ 20,00 - Dermapelle Farmácia de Manipulação). Embora o Aciclovir seja eficaz frente ao EHV-1 *in vitro*, sua absorção oral é baixa ou insignificante em equinos, tornando seu uso questionável nessa espécie. Quanto ao Ganciclovir, este torna o tratamento mais oneroso (frasco 100 mg: R$ 2.785,00 - Sigma-Aldrich), porém com maior efetividade mesmo em concentrações baixas (0,1 - 0,4 μg/mL por via intravenosa) (MAXWELL, 2017). Apesar do custo bastante elevado, em criações de cavalo de alto valor comercial, assim como para animais destinados ao esporte, o tratamento da infecção por EHV-1 com o antiviral Ganciclovir pode ser uma alternativa aplicável.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nos ensaios de redução de placa viral indicam que o fármaco Ganciclovir (GCV) é o mais seguro e eficaz frente ao EHV-1. Dessa forma, o composto tem potencialidade para ser usado em experimentos *in vivo* e, posteriormente, poderá contribuir como uma alternativa terapêutica às infecções por EHV-1 em equinos.

REFERÊNCIAS

AZAB, W. et al. Characterization of a thymidine kinase-deficient mutant of equine herpesvirus 4 and in vitro susceptibility of the virus to antiviral agents. **Antiviral Research**, v. 85, p. 389 - 395, 2010. Disponível em: <https://www-sciencedirect-com.ez47.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0166354209005361> Acesso em: 15 out. 2017. doi: https://doi-org.ez47.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.antiviral.2009.11.007.

CHRINSIDE, E. et al. Doenças respiratórias virais. In: REED, S. M.; BAYLY, W. M. **Medicina Interna Equina**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 79 - 85, 2000.

CLERCQ, E.D. Molecular targets for antiviral agents. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 297, n. 1, p. 1-10, 2001.

COEN, D.M.; RICHMAN, D.D. Antiviral agents. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 5.ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2007. Cap. 14, p. 447-485.

DAVISON, A. J. et al. The Order *Herpesvirales*. **Archives of Virology,** v.154, p.171–177, 2009. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00705-008-0278-4> Acesso em: 22 set. 2017. doi: https://www-ncbi-nlm-nih-gov.ez47.periodicos.capes.gov.br/pmc/articles/PMC3552636/.

DEZENGRINI, R. et al. Activity of three antiviral drugs against bovine herpesviruses 1, 2 and 5 in cell culture. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.10, p. 855-860, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2010001000008&script=sci_abstract&tlng=pt> Acesso em: 22 set. 2017. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2010001000008.

GALOSI, C.M. Herpesvírus canino 1: Agente etiológico y enfermedad. **Analecta Veterinaria,** v. 2, p.5-12, 2007. Disponível em: <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11202/Documento_completo__.pdf?sequence=1> Acesso em: 22 set. 2017. doi: ISSN 0365-5148.

GARRÉ, B. et al. *In vitro* susceptibility of six isolates of equine herpesvirus 1 to acyclovir, ganciclovir, cidofovir, adefovir, PMEDAP and foscarnet. **Veterinary Microbiology**, v.122, p. 43-45, 2007. Disponível em: <https://www-sciencedirect-com.ez47.periodicos.capes.gov .br/science/article/pii/S0378113507000120> Acesso em: 27 out. 2017. doi: https://doi-org.ez47.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.vetmic.2007.01.004.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. **Virus Taxonomy**: 2016 Release. <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> Acesso em: 30 out. 2017.

KLEYMANN, G. Novel agents and strategies to treat Herpex Simplex Virus infections. **Expert Investigation Drugs**, v.12, p. 165-183, 2003.

MALIK, R. et al. Treatment of feline herpesvirus-1 associated disease in cats with famciclovir and related drugs. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.11, n.1, p.40-48, 2009. Disponível em: <http://www.jfm.sagepub.com/content/11/1/40.full.pdf> Acesso em: 14 nov. 2017. doi: https://doi-org.ez47.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.jfms.2008.11.012.

MAXWELL, L.K. et al. Pharmacokinetics of valacyclovir in the adult horse. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.31, n.4, p. 312–20, 2008. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2885.2008.00957.x/full> Acesso em: 22 set. 2017. doi: 10.1111/j.1365-2885.2008.00957.x.

MAXWELL, L.K. Antiherpetic drugs in equine medicine. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 33, n.1, p. 99-125, 2017. Disponível em: <https://www-sciencedirectcom.ez47.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0749073916300852#tbl2> Acesso em: 17 out. 2017. doi: https://doiorg.ez47.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.cveq.2016.12.002.

MEULEN, K.V.D. et al. In vitro comparison of antiviral drugs against feline herpesvirus 1. **BioMed Central Veterinary Research**, v.2, p.1-7, 2006. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1475582/ > Acesso em: 17 out. 2017. doi: https://dx.doi.org/10.1186%2F1746-6148-2-13.

PRUSOFF, W.H. Synthesis and biological activities of iododeoxyuridine, an analog of thymidine. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.32, p. 295-296, 1959. Disponível em: <https://wwwsciencedirectcom.ez47.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/0006300259905979?via%3Dihub> Acesso em: 12 set. 2017. doi: https://doi-org.ez47.periodicos.capes.gov.br/10.1016/0006-3002(59)90597-9.

RONSSE, V. et al. Risk factors and reproductive disorders associated with canine herpesvirus-1. **Theriogenology**, v.61, p.619-636, 2004. Disponível em: <https://www-sciencedirect-com.ez47.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0093691X03002498> Acesso em: 27 out. 2017. doi: https://doi-org.ez47.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0093-691X(03)00249-8.

SHEN, W. et al. 5-O-D-VALYL ara A, A potencial prodrug for improving oral biovailability of the antiviral agent vidarabine, **National Institute of Health**, v. 28, n.1, p. 43-55, 2009.

SHERDING, R.G. Doenças virais variadas. In: BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders: Clínica de pequenos animais**, 3 ed. São Paulo: Roca, cap.16, p.177-178, 2008.

THIRY, E. et al. In vivo and in vitro effect of acyclovir on pseudorabies virus, infectious bovine rhinotracheitis virus and pigeon herpesvirus. **Annales Recherches Vetérinaries**, v. 14, n. 3, p. 233-245, 1983.

VISSANI, M. A. et al. Antiviral agents against equid alphaherpesviruses: Current status and Perspectives. **The Veterinary Journal**, v. 207, p. 38-44, 2016. Disponível em: <https://www-sciencedirect-com.ez47.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1090023315002543> Acesso em: 14 nov. 2017. doi: https://doi-org.ez47.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.tvjl.2015.06.010.

Tabela 1. Atividade *in vitro* do Aciclovir, Ganciclovir, Foscarnet, Famciclovir, Vidarabina e Cidofovir, em concentração de µg/mL, frente ao alfaherpesvírus equino tipo 1.

Fármaco	CC_{50} [1]	EC_{50} [2]	IS[3]
Ganciclovir	931	1,9	490
Cidofovir	855,5	5,7	150
Aciclovir	830,7	22,2	37,4
Famciclovir	615,7	24,5	25,1
Vidarabina	500,4	40,9	12,2
Foscarnet	345,1	49,5	6,9

[1]CC50: concentração do antiviral em µg/mL citotóxica para 50% das células Vero.
[2]EC50: concentração de cada antiviral necessária para inibir em 50% o número de placas virais, em µg/mL.
[3]IS: índice de seletividade; relação entre a CC_{50} e a EC_{50}.

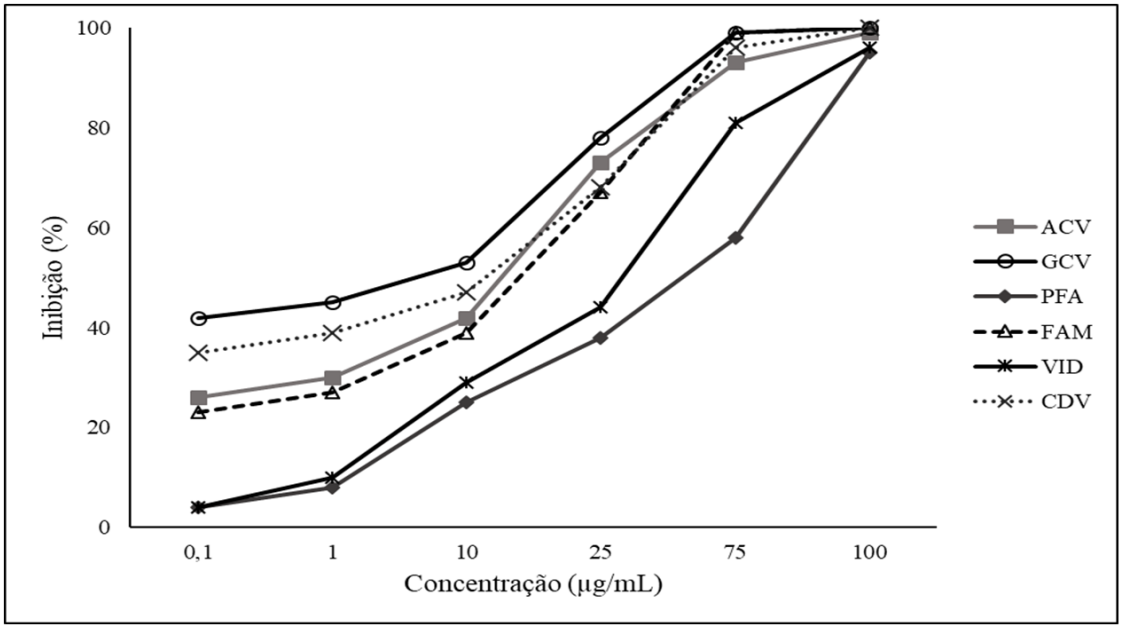

Figura 1. Porcentagem de redução no número de placas virais, em cultivo celular, produzida pelos fármacos Aciclovir (ACV), Ganciclovir (GCV), Foscarnet (PFA), Famciclovir (FAM), Vidarabina (VID) e Cidofovir (CDV) sobre o herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1).

4 CONCLUSÃO

.

Os resultados obtidos a partir dos ensaios de redução de placa viral indicaram que o fármaco Ganciclovir (GCV) é o mais seguro e eficaz frente ao EHV-1. Dessa forma, o composto tem potencialidade para ser usado em experimentos *in vivo* e, posteriormente, poderá contribuir como uma alternativa terapêutica às infecções por EHV-1 em equinos.

REFERÊNCIAS

AZAB, W. et al. Characterization of a thymidine kinase-deficient mutant of equine herpesvirus 4 and in vitro susceptibility of the virus to antiviral agents. **Antiviral Research,** v. 85, p. 389 - 395, 2010. Disponível em: <https://www-sciencedirect-com.ez47.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0166354209005361> Acesso em: 15 out. 2017.

BRASIL. IBGE. Estatísticas econômicas. **Agência IBGE Notícias**, 2017. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2013-agencia-de-noticias/releases/16992-pecuaria-municipal-2016-centro-oeste-concentra-34-4-do-rebanho-bovino-do-pais.ht> Acesso em: 25 dez. 2017.

CARMAN, S. et al. Equine herpesvirus type 1 neurological disease and enterocolitis in mature standardbred horses. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, p. 261-263, 1993. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/10406387930050022> Acesso em: 22 set. 2017.

CARMICHAEL, L.E; GREENE, C.E. Canine herpesvirus infection. In: GREENE, C.E. (Ed.), **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 3 ed. Philadelphia, Elsevier, cap. 5, p. 47-53. 2006.

CHRINSIDE, E. et al. Doenças respiratórias virais. In: REED, S. M.; BAYLY, W. M. **Medicina Interna Equina**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 79 - 85, 2000.

CLERCQ, E.D. Molecular targets for antiviral agents. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 297, n. 1, p. 1-10, 2001.

CLERCQ, E. D. Antivirals: Current state of art. **Future Virology**, v. 3, p. 393–405, 2008. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/17460794.3.4.393> Acesso em: 22 set. 2017.

COEN, D.M.; RICHMAN, D.D. Antiviral agents. In: KNIPE, D.M.; HOWLWY, P.M. (Eds), **Fields Virology**, 5ed, Philadelphia, p.447-485, 2007.

DAL POZZO, F.; THIRY, E. Antiviral chemotherapy in veterinary medicine: Current applications and perspectives. **Scientific and Technical Review, International Office of Epizootics**, v. 33, p. 791–801, 2014. Disponível em: <http://boutique.oie.int/extrait/070302201400026endalpozzo791801.pdf> Acesso em: 22 set. 2017.

DAVISON, A. J. et al. The Order *Herpesvirales*. **Archives of Virology,** v.154, p.171–177, 2009. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00705-008-0278-4> Acesso em: 22 set. 2017.

DEL PIERO, F. et al. Fatal neurological EHV-1 infection in a yearling fily. **Veterinary Pathology**, v. 37, p. 672-676, 2000. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1354/vp.37-6-672> Acesso em: 22 set. 2017.

DEZENGRINI, R. et al. Activity of three antiviral drugs against bovine herpesviruses 1, 2 and 5 in cell culture. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.10, p. 855-860, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2010001000008&script=sci_abstract&tlng=pt> Acesso em: 22 set. 2017.

DIAZ, K. A. F. et al. Ocorrência de anticorpos contra o herpesvírus equino e vírus da arterite equina em rebanhos equinos do estado do Rio de Janeiro. **Revista Ciência Animal Brasileira**,

v.16, n.3, p.410-418, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cab/v16n3/1518-2797-cab-16-03-0410.pdf> Acesso em: 22 set. 2017.

DIMOCK, W. W.; EDWARDS, P. R. The differential diagnosis of equine abortion with special reference to a hitherto undescribed formo f epizootic abortion of mares. **The Cornell Veterinarian**, v. 26, n. 3, p. 231 – 240, 1936.

FOOTE, C.E. et al. EHV-1 and EHV-4 infection in vaccinated mares and their foals**.** **Veterinary Immunology and Immunopatology**, v. 111, p. 41-46, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016524270600016X?via%3Dihub> Acesso em: 27 out. 2017.

FRANCO, A.C. et al. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária.** Ed. UFSM, Santa Maria, p.550 – 562, 2012.

GALOSI, C.M. Herpesvírus canino 1: Agente etiológico y enfermedad. **Analecta Veterinaria,** v. 2, p.5-12, 2007. Disponível em: <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle /10915/11202/Documento_completo__.pdf?sequence=1> Acesso em: 22 set. 2017.

GARRÉ, B. et al. *In vitro* susceptibility of six isolates of equine herpesvirus 1 to acyclovir, ganciclovir, cidofovir, adefovir, PMEDAP and foscarnet. **Veterinary Microbiology**, v.122, p. 43-45, 2007. Disponível em: <https://www-sciencedirect-com.ez47.periodicos.capes.gov .br/science/article/pii/S0378113507000120> Acesso em: 27 out. 2017.

GILKERSON, J. R. et al. Serological evidence of equine herpesvirus in Thoroughbred foals 30 - 120 days of age. **Australian Equine Veterinary Journal**, n. 15, p. 128 - 134, 1997.

GOODMAN, L.B. et al. Immunological correlates of vaccination and infection for equine herpesvirus 1. **Clinical andVaccine Immunology**, v. 19, p.235–241, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3272919/> Acesso em: 27 out. 2017.

HEBIA, I. et al. Potential risk of equine Herpesvirus 1 (EHV-1). **Theriogenology**, v.67, p. 1485 - 1491, 2007. Disponível em: <http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(07)00092-1/fulltext> Acesso em: 27 out. 2017.

HENNINGER R.W. et al. Outbreak of neurologic disease caused by equine herpesvirus-1 at a university equestrian center. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 21, p.157-165, 2007.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. **Virus Taxonomy**: 2016 Release. <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> Acesso em: 30 out. 2017.

JONES, C. Herpes simplex vírus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. **Clinical Microbiology Reviews**. Washington, v.16, n.1, p.79-95, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC145298/> Acesso em: 27 out. 2017.

KLEYMANN, G. Novel agents and strategies to treat Herpex Simplex Virus infections. **Expert Investigation Drugs**, v.12, p. 165-183, 2003.

KYDD, J.H. et al. Third International Havemeyer Workshop on Equine Herpesvirus Type 1. **Equine Veterinary Journal**, v. 44, p. 513–517, 2012. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2042-3306.2012.00604.x/full> Acesso em: 27 out. 2017.

LARA, M.C.C.S.H. et al. Ocorrência do herpesvirus equino1 (HVE-1) em cavalos criados no estado de São Paulo, Brasil. **Ars Veterinária**, v. 19, n. 3, p. 254-259, 2003. Disponível em: <http://www.arsveterinaria.org.br/arquivo/2003/v.19,%20n.3,%202003/254-259.pdf> Acesso em: 27 out. 2017.

LUNN, D.P. et al. Equine herpesvirus-1 consensus statement. **Journal of Veterinary Internal Medicine,** v.23, p. 450–461, 2009. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2009.0304.x/pdf> Acesso em: 23 out. 2017.

MA, G. et al. Equine herpesviruses type 1 (EHV-1) and 4(EHV-4) – masters of co-evolution and a constant threat to equids and beyond. **Veterinary Microbiology,** v. 167, p. 123–134, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113513003325?via%3Dihub> Acesso em: 23 out. 2017.

MALIK, R. et al. Treatment of feline herpesvirus-1 associated disease in cats with famciclovir and related drugs. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.11, n.1, p.40-48, 2009. Disponível em: <http://www.jfm.sagepub.com/content/11/1/40.full.pdf> Acesso em: 14 nov. 2017.

MAXWELL, L.K. et al. Pharmacokinetics of valacyclovir in the adult horse. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.31, n.4, p. 312–20, 2008. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2885.2008.00957.x/full> Acesso em: 22 set. 2017.

MAXWELL, L.K. Antiherpetic Drugs in Equine Medicine. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 33, n.1, p. 99-125, 2017. Disponível em: <https://www-sciencedirectcom.ez47.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0749073916300852#tbl2> Acesso em: 17 out. 2017.

MEULEN, K.V.D. et al. In vitro comparison of antiviral drugs against feline herpesvirus 1. **BioMed Central Veterinary Research**, v.2, p.1-7, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1475582/ > Acesso em: 17 out. 2017.

MURPHY, F. A. et al. **Veterinary Virology**, Ed. Elsevier. 3ed., 1999.

NILSSON, M.R.; CORREA, W.M. Isolamento do vírus do aborto equino no estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.33, p.23-25, 1966.

O'TOOLE, D. et al. Polyomyelomalacia and ganglioneuritis in a horse with paralytic rabies. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.5, p.94-97, 1993.

PASCOE, R.R. et al. An equine genital infection resembling coital exanthema associated with a vírus. **Australian Veterinary Journal**, v. 45, p. 166- 170, 1969.

PATEL, J.R.; HELDENS, J. Equine herpesvírus 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) epidemiology, disease and, immunoprophylaxis: a brief review. **Veterinary Journal**, v. 170, n. 1, p. 14-23, 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023304001169?via%3Dihub> Acesso em: 23 out. 2017.

PRUSOFF, W.H. Synthesis and biological activities of iododeoxyuridine, an analog of thymidine. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.32, p. 295-296, 1959. Disponível em: <https://wwwsciencedirectcom.ez47.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/0006300259905979?via%3Dihub> Acesso em: 12 set. 2017.

PUSTERLA, N. et al. Equine herpesvírus-1 myeloencephalopathy: A review of recent developments. **The Veterinary Journal**, v. 180, p. 279-289, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023308002864?via%3Dihub> Acesso em: 23 out. 2017.

RANDALL, C. C. et al. Cultivation of equine abortion vírus in fetal horse tissue *in vitro*. **American Journal of Pathology**, v. 29, p. 139 – 153, 1953. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1937421/> Acesso em: 23 out. 2017.

ROIZMAN, B. et al. The family Herpesviridae: An update. The herpesvirus study group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, v.123, p.425- 449, 1992. Disponível em: < www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1562239>. Acesso em: 27 out. 2017.

RONSSE, V. et al. Risk factors and reproductive disorders associated with canine herpesvirus-1. **Theriogenology**, v.61, p.619-636, 2004. Disponível em: Acesso em: 27 out. 2017. Disponível em: <https://www-sciencedirect-com.ez47.periodicos.capes.gov.br/science /article/pii/S0093691X03002498> Acesso em: 27 out. 2017.

SHEN, W. et al. 5-O-D-VALYL ara A, A potencial prodrug for improving oral biovailability of the antiviral agent vidarabine, **National Institute of Health**, v. 28, n.1, p. 43-55, 2009.

SHERDING, R.G. Doenças virais variadas. In: BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders: Clínica de pequenos animais**, 3 ed. São Paulo: Roca, cap.16, p.177-178, 2008.

SMITH, K. S. et al. A comparison of equid herpesvirus-1 (EHV-1) vascular lesions in the early versus late pregnant equine uterus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 114, p. 231-247, 1996. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002199759 6800454> Acesso em: 23 out. 2017.

SPRAYBERRY, K.A.; ROBINSON, N.E. Robinson's current therapy in equine medicine. **Elsevier Health Sciences**, 2014.

STUDDERT, M.J. et al. Outbreak of equine herpesvirus type 1 myeloencephalitis: new insights from virus identification by PCR and the application of an EHV-1 -specific antibody detection ELISA. **Veterinay Research**, v. 153, p. 417- 423, 2003.

TELFORD, E.A. et al. The DNA sequence of equine herpesvirus 4. **Journal of General Virology**, v. 79, n. 5, p. 1197-1203, 1998. Disponível em: <http://www.microbiolog yresearch.org/docserver/fulltext/jgv/79/5/0791197a.pdf?expires=1517856679&id=id&accnam e=guest&checksum=5B7167F696CA318730951910BAD344D0> Acesso em: 23 out. 2017.

THIRY, E. et al. In vivo and in vitro effect of acyclovir on pseudorabies virus, infectious bovine rhinotracheitis virus and pigeon herpesvirus. **Annales Recherches Vetérinaries**, v. 14, n. 3, p. 233-245, 1983.

THOMASSIAN, A. Enfermidades infecciosas. In: **Enfermidades dos cavalos**, 4ed., p. 469-470. Livraria Varela, São Paulo, SP, 2005.

VAN MAANEN, C. Equine herpesvirus 1 and 4 infections: an update. **Vet. Q.**, v.4, p.58-78, 2002. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/11280972_Equi ne_herpesvirus_1_and_4_infections_An_update> Acesso em: 27 out. 2017.

VARASSO, K. D. et al. Identification of equine herpesvirus 1 and 4 by polymerase chain reaction. **Australian Veterinary Journal**, v. 79, n. 8, p. 563-569, 2001. Disponível em:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-0813.2001.tb10751.x/full> Acesso em: 22 set. 2017.

VISSANI, M. A. et al. Antiviral agents against equid alphaherpesviruses: Current status and Perspectives. **The Veterinary Journal**, v. 207, p. 38-44, 2016. Disponível em: <https://www-sciencedirect-com.ez47.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1090023315002543> Acesso em: 14 nov. 2017.

WEIBLEN, R. et al. Abortion due to equine herpesvirus in southern Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, p.1317- 1320, 1994.

WEIBLEN, R. Doenças víricas. Infecções por herpesvírus equino, p. 138-146. In: Riet-Correa F., et al. (ed.) **Doenças de Ruminantes e Equinos**, vol. 1, 3 ed., 722p. Editora Pallotti, Santa Maria, 2007.

WILSON, W.D.; PUSTERLA, N. Equine Herpesvirus 1 Myeloencephalopathy, p. 617-628. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M.; SELLON, D.C**. Equine Internal Medicine**, 2. Ed., Saunders, 1659p., 2004.