

## INIBIÇÃO DOS LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES POR DROGAS ANTIVIRAIS

S.A.C. de Araújo<sup>1</sup>, R.R. Pinheiro<sup>2</sup>, T.V.M. Dantas<sup>1</sup>, A. Andrioli<sup>2</sup>, F.E.S. Lima<sup>1</sup>, R.P. Dias<sup>3</sup>, C.C. Campello<sup>1</sup>, E.C. Costa<sup>1</sup>, A.R.F. Ricarte<sup>1</sup>, V.S.P. de Melo<sup>1</sup>, B.N. Rolim<sup>1</sup>, J.B.A. da Silva<sup>4</sup>, M.F.S. Teixeira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Ceará, Av. Paranjana, 1700, CEP 60740-000, Fortaleza, CE, Brasil. E-mail: suzanaraujo@msn.com

## RESUMO

Inibidores da enzima transcriptase reversa e da protease foram avaliados quanto ao seu efeito inibitório na replicação do Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) cepa CAEV Cork e do vírus Maedi-Visna (MVV) cepa K1514 cultivados em células fibroblásticas de caprinos. Os fármacos utilizados foram: lamivudina, didanosina, estavudina, zidovudina, efavirenz, atazanavir e lopinavir/ritonavir. A maior concentração utilizada para lamivudina, estavudina, zidovudina e efavirenz foi 500 µM, para atazanavir foi 50 µM e 5,0 µM para lopinavir/r e didanosina. A atividade antiviral *in vitro* foi pesquisada por meio da avaliação da viabilidade celular através da redução do MTT e pela pesquisa de inibição dos efeitos citopáticos (CPE) dos vírus. A replicação dos vírus só não foi completamente bloqueada pelos inibidores de protease (IP) atazanavir e lopinavir/r enquanto os demais apresentaram eficácia antiviral significativa em diferentes concentrações. Os IP juntamente com o efavirenz, não mostraram atividade antiviral quando foram avaliados pela técnica de redução do MTT. Esses dados indicam que os fármacos inibidores da transcriptase reversa lamivudina, didanosina, estavudina e zidovudina são eficazes na inibição *in vitro* dos lentivírus de pequenos ruminantes.

PALAVRAS-CHAVE: Maedi-Visna, Artrite Encefalite Caprina, inibidores da transcriptase reversa, inibidores da protease.

## ABSTRACT

INHIBITION OF SMALL RUMINANT LENTIVIRUS BY ANTIVIRAL DRUGS. Inhibitors of the reverse transcriptase and protease enzymes were evaluated for their inhibitory effect on the replication of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) strain CAEV Cork and of the Maedi-Visna virus (MVV) strain K1514 cultured in fibroblastic cells. The drugs lamivudine, didanosine, stavudine, zidovudine, efavirenz, atazanavir and lopinavir/ritonavir were used. The highest concentration used for lamivudine, stavudine, zidovudine and efavirenz was 500 µM, for atazanavir it was 50 µM and 5.0 µM for lopinavir/r and didanosine. The *in vitro* antiviral activity was investigated by evaluating the cell viability by the MTT method and testing for inhibition of cytopathic effects (CPE) of the virus. The replication of the virus was not completely inhibited by the protease inhibitors atazanavir and lopinavir/r in the test for CPE, while the others drugs showed significant antiviral efficacy in different concentrations. The protease inhibitors together with the efavirenz did not show antiviral activity when they were assessed by the reduced MTT technique. These data showed that the reverse transcriptase inhibitor drugs lamivudine, didanosine, stavudine and zidovudine were effective in the *in vitro* inhibition of small ruminant lentivirus.

KEY WORDS: Maedi-Visna, caprine arthritis encephalitis, inhibitors of the reverse transcriptase, inhibitors of the protease.

## INTRODUÇÃO

Os Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR) são constituídos pelos Vírus da Artrite Encefalite

Caprina (CAEV) e Maedi-Visna (MVV) (HAASE, 1986). Esses vírus causam enfermidades que apresentam caráter crônico e são responsáveis por significativas perdas econômicas, uma vez que sua principal forma

<sup>2</sup>Embrapa Caprinos, Sobral, CE, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Estadual Vale do Acaraú, CE, Brasil.

<sup>4</sup>Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, RN, Brasil.

de controle baseia-se na eliminação dos animais soropositivos. Esses retrovírus possuem a enzima transcriptase reversa (RT), permitindo ao RNA viral dar origem à dupla fita de DNA proviral capaz de incorporar ao genoma celular, além da enzima protease, responsável pela produção de vírions infecciosos maduros durante a replicação. Essas enzimas funcionam como alvos potenciais dos agentes antivirais (PEÇANHA *et al.*, 2002; SOUZA; ALMEIDA, 2003). No entanto, até o presente momento, as vacinas e os tratamentos para essas enfermidades têm se mostrado ineficazes.

Tem-se visto que a maioria das pesquisas com drogas antivirais visa ação contra as lentivirose de primatas, que incluem os vírus da imunodeficiência humana (HIV) e símia (SIV) e em menor grau o vírus da imunodeficiência felina (FIV). Poucos estudos têm sido realizados com compostos ativos contra as lentivirose em ungulados que abrange o CAEV, o MVV e o vírus da imunodeficiência bovina (BIV). Contudo, é possível se verificar um interesse cada vez maior em comparar a susceptibilidade destes vírus a drogas anti-HIV visto que eles apresentam similaridade molecular e biológica.

Por outro lado, drogas utilizadas com êxito no tratamento de infecções por vírus DNA e RNA poderiam ser investigadas com relação à suas atividades contra os LVPR. Dentre essas encontram-se os nucleosídeos inibidores da enzima RT como a zidovudina, lamiduvina; os inibidores não nucleosídicos da RT como o efavirenz; os inibidores da enzima protease como o lopinavir/ritonavir e o atazanavir. No tratamento de lentivirose animais, a zidovudina tem demonstrado resultados positivos contra o vírus da imunodeficiência felina (HARTMANN, 1998).

É possível encontrar na literatura alguns trabalhos que demonstram ação de drogas anti-HIV contra a replicação do MVV através da análise do efeito citopático em cultivo de células do plexo coroide (THORMAR *et al.*, 1993; THORMAR *et al.*, 1995), verificando que os análogos nucleosídeos acíclicos bem como o 2', 3'-dideoxynucleosídeos apresentaram ação anti-MVV significativa. Análogos da citidina e outros fármacos com potencial ação antiviral e/ou antileucêmico foram testados sobre a replicação do MVV (SALVATORI *et al.*, 2001) observando que estas classes de drogas desempenharam uma efetiva inibição do MVV.

Diante do exposto, objetivou-se avaliar o efeito antiviral *in vitro* de fármacos antivirais contra os LVPR.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Drogas

As drogas antivirais utilizadas foram: os inibidores da transcriptase reversa zidovudina ou AZT (3'-azido-

3'-desoxitimidina), a didanosina (2',3'-didesoxiinosina ou ddI), a lamivudina (3TC), a estavudina (2',3'-didehidro-3'-desoxitimidina ou D4T), o efavirenz, os inibidores da protease atazanavir e o lopinavir/ritonavir gentilmente cedidas pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE) e pelo Hospital São José (Fortaleza, CE).

### Vírus

Foram utilizadas amostras dos lentivírus CAEV Cork (CORK *et al.*, 1974) e Maedi-Visna K1514 (SIGURDSSON *et al.*, 1960), apresentando títulos de  $10^{5,3}$  e  $10^{4,2}$  TCID<sub>50</sub>/mL, respectivamente.

### Titulação do vírus

A infectividade viral foi titulada pela inoculação da suspensão viral, ao décimo, em monocamada celular de fibroblastos em placas de 96 poços. Adicionou-se 100 µL da diluição do vírus em cada poço. A placa foi incubada em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> e os efeitos citopáticos (CPE) foram avaliados com 14 dias após a infecção. Os títulos virais foram calculados pelo método de REED; MUENCH (1938).

### Cultivo celular

Células primárias da membrana sinovial caprina foram obtidas por explante da articulação carpal de um animal sorologicamente negativo pela imunodifusão em gel de agarose (IDGA) para LVPR. As células foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM) contendo penicilina, estreptomicina e anfotericina B, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). Após formação da monocamada celular, as células foram tripsinizadas e mantidas para uso após 3ª passagem. A concentração do SFB foi reduzida para 2% quando a cultura foi submetida à inoculação viral.

### Teste de citotoxicidade

O efeito dos fármacos antivirais na proliferação dos fibroblastos foi determinado anteriormente por ARAÚJO *et al.* (2008) através do método de redução do MTT (brometo de 3-(4,5)-dimetil-tiazolil -2,5 difeniltetrazólio) (Sigma, EUA).

### Atividade antiviral

Em todos os testes de avaliação antiviral os fármacos foram utilizados nas concentrações não citotóxicas determinadas *a priori*. A maior concentração utilizada para lamivudina, estavudina, zidovudina e efavirenz foi 500 µM, para atazanavir

foi 50 µM e 5,0 µM para lopinavir/r e didanosina. Para pesquisar a atividade antiviral dos fármacos foram realizados os seguintes testes:

- a) Avaliação da viabilidade celular pela redução do MTT;
- b) Pesquisa de inibição dos efeitos citopáticos.

#### Avaliação da viabilidade celular pela redução do MTT

Foram utilizadas microplacas de 96 poços, sendo que em cada poço depositou-se 100 µL de uma suspensão celular a uma concentração de  $2 \times 10^5$  céls/mL contendo MEM com 10% de SFB. Após adesão das células e formação da monocamada, o meio de cultivo foi retirado, sendo então adicionada em cada poço alíquotas do vírus na concentração de 10 TCID<sub>50</sub> (Dose Infectante para Cultura de Tecido 50%). Essas células ficaram incubadas a 37°C, por 1 hora, para que ocorresse a adsorção viral. Após esse período, o meio de cultivo foi substituído por MEM suplementado com 2% de SFB e com as diferentes concentrações dos fármacos a serem testados, exceto o grupo controle negativo que recebeu apenas MEM e o controle positivo no qual se adicionou o vírus e o meio sem adição dos fármacos. As placas foram incubadas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> por 7 dias. No tocante à metodologia de redução do MTT, essa foi realizada de acordo como descrito por ANDRIGHETTI-FRÖHNER *et al.* (2003). A absorbância foi lida em espectrofotômetro (Bio-Rad, Modelo 680, EUA) com o comprimento de onda de 490nm. O percentual de proteção teve seu cálculo baseado na seguinte fórmula:  $[(A-B)/(C-B) \times 100]$ , onde A, B e C indicam a absorbância do extrato, vírus e controle celular, respectivamente.

#### Pesquisa de inibição dos efeitos citopáticos

A preparação das placas de 96 poços e a adição dos vírus foi semelhante à descrita para a realização da prova de redução do MTT. Após o período de incubação de 7 dias, o sobrenadante foi descartado e as monocamadas das placas foram coradas com Cristal Violeta, para avaliação dos CPE em microscópio invertido.

#### Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata e os resultados representam a média ± desvio padrão. Inicialmente os dados foram submetidos aos testes de Shapiro-wilk e Bartlett para avaliar a distribuição normal e homogeneidade da variância entre os tratamentos. Quando atendidas as condições necessárias para análise de variância esta foi executada através do procedimento GLM do programa SAS (1999) e as médias comparadas pelo teste Student Newman-Keuls (SNK). Nos casos de heterocedasticidade,

mesmo após transformação logarítmica, angular ou radicial dos dados, as análises foram realizadas por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para simular o tratamento de uma infecção estabelecida, as drogas antiretrovirais foram adicionadas após infecção das células fibroblásticas com as cepas CAEVCo e MVVK1514 e o resultado da inibição dos CPE avaliado após 7 dias de incubação. Na determinação da citotoxicidade verificou-se que a lamivudina, a estavudina, a zidovudina e o efavirens apresentaram concentração citotóxica média (CC<sub>50</sub>) de 500 µM. A CC<sub>50</sub> para lopinavir/r e didanosina foi 5 µM e para o atazanavir de 50 µM (ARAÚJO *et al.*, 2008). Portanto, essas representam as maiores concentrações utilizadas para avaliação da inibição dos LVPR *in vitro* em fibroblastos. Como concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>) considerou a menor concentração capaz de inibir a replicação dos LVPR.

Os análogos nucleosídicos inibidores da transcriptase reversa (NRTIs) lamivudina, estavudina e zidovudina inibiram significativamente o lentivírus caprino. A zidovudina com concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>) de 0,5 µM, enquanto a estavudina e a lamivudina apresentaram CI<sub>50</sub> de 0,005 µM. Quanto à ação de inibição do lentivírus ovino, além dos NRTIs lamivudina, estavudina, didanosina e zidovudina o não nucleosídico efavirens foram significativamente eficazes, demonstrando CI<sub>50</sub> de 0,05 µM para zidovudina e efavirens. A lamivudina e a didanosina expressaram CI<sub>50</sub> de 0,005 µM e a estavudina de 0,5 µM. Por outro lado, os inibidores de protease, atazanavir e lopinavir/r não foram capazes de inibir significativamente os CPE dos LVPR. Esses dados corroboram com os resultados encontrados por THORMAR *et al.* (1993) nos quais verificam que a zidovudina e a estavudina inibiram a replicação do MVV cepa K796 e diferem daqueles encontrados por DAHLBERG *et al.* (1987) que constataram que fármacos altamente eficazes contra o HIV, como a zidovudina e a estavudina, não demonstraram atividade contra a replicação do CAEV, enquanto alguns dideoxynucleosídeos foram altamente eficazes. Estes autores sugerem que esses achados podem decorrer da diferença existente entre o CAEV e o HIV quanto à susceptibilidade aos fármacos ou pela diferença entre os tipos celulares utilizados em cada experimento. No que diz respeito ao tipo celular, neste trabalho foram utilizados fibroblastos provenientes de membrana sinovial caprina, visto que eles são susceptíveis a infecção e multiplicação das cepas padrões utilizadas que foram CAEVCo da artrite encefalite caprina e MVV/K1514 do vírus Maedi-Visna. THORMAR *et al.* (1993),

utilizaram células de plexo coroide, pois buscavam a similaridade das reações neurológicas com os pacientes de HIV comparados aos de visna dos ovinos, além disso as cepas virais foram Visna K796 e isolados de ovinos islandeses com pneumonia denominadas de M88 e M34. SALVATORI *et al.* (2001) utilizaram também células do plexo coroide de ovi-

nos; o clone neurovirulento KV1772 e amostra MV1514.

No tocante aos fármacos antivirais, SALVATORI *et al.* (2001) utilizaram onze drogas dentre elas a zidovudina, enquanto THORMAR *et al.* (1993) utilizaram 23 fosfatos nucleosídicos acíclicos entre os quais a didanosina.

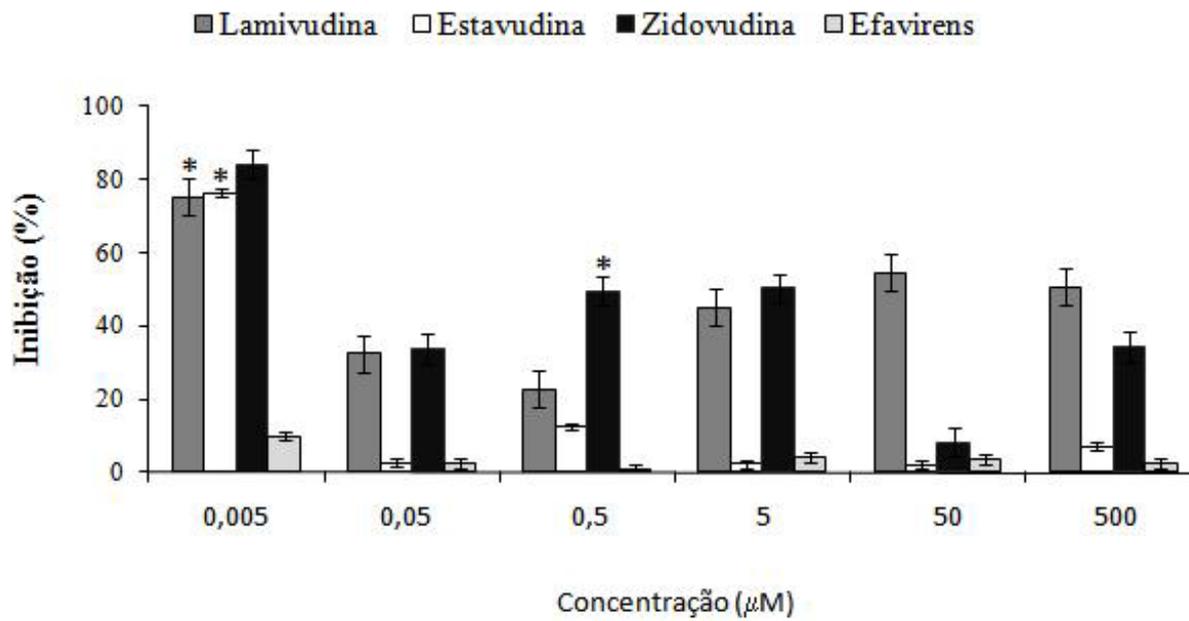


Fig. 1 - Efeito dos fármacos inibidores da transcriptase reversa sobre o CAEV.

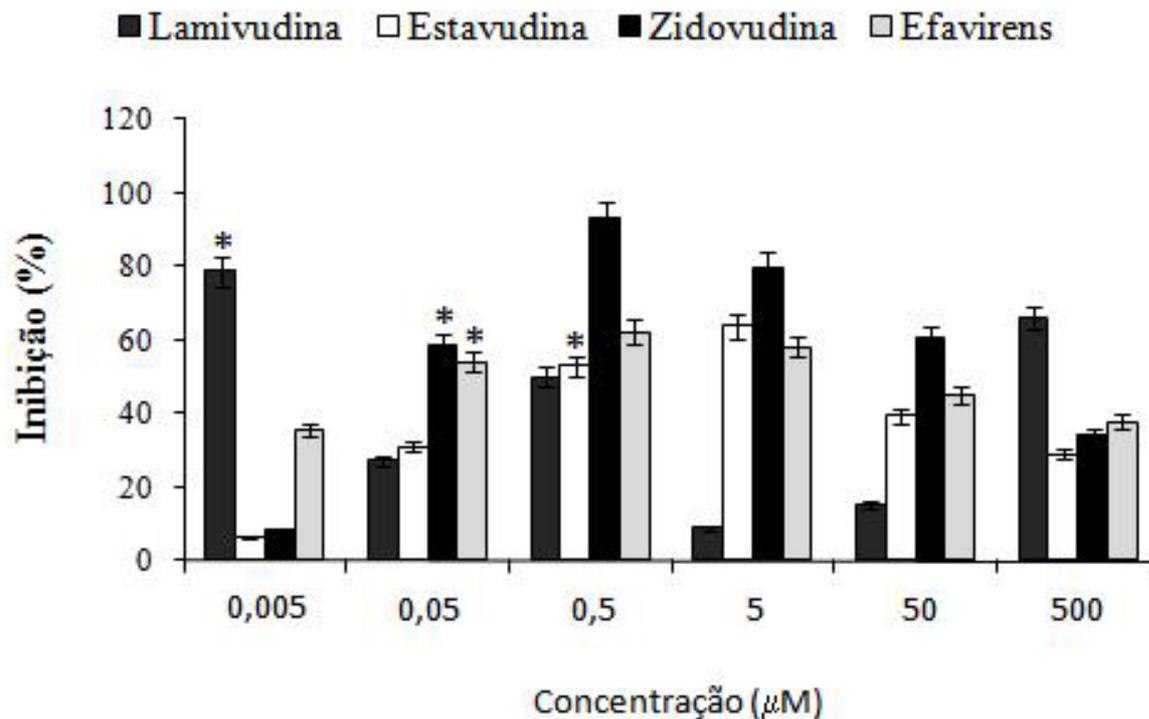


Fig. 2 - Efeito dos fármacos inibidores da transcriptase reversa sobre o MVV.

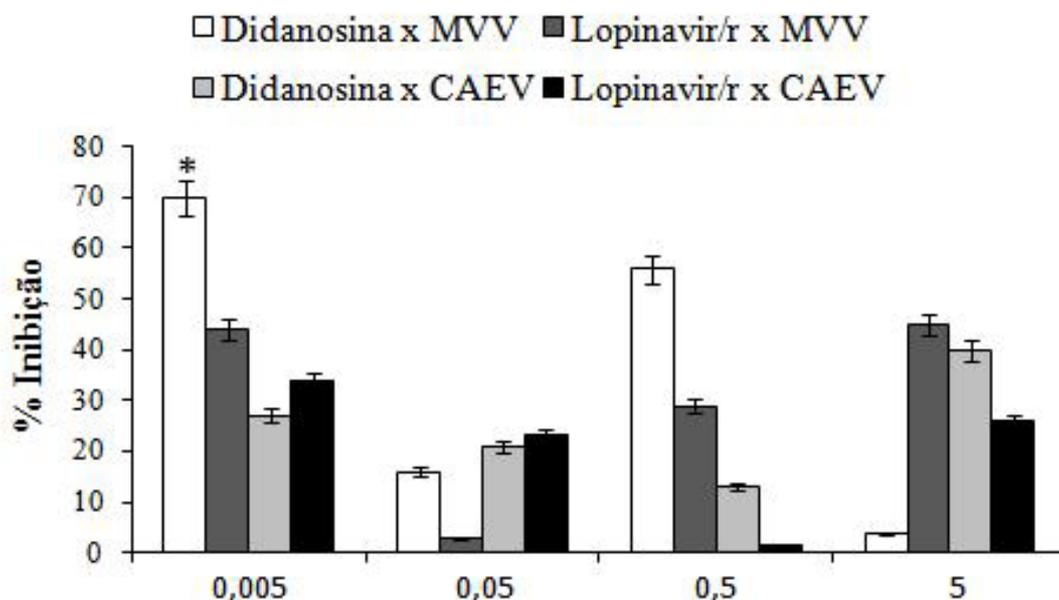


Fig. 3 - Efeito inibitório dos fármacos antivirais didanosina e lopinavir/r sobre o CAEV e o MVV.

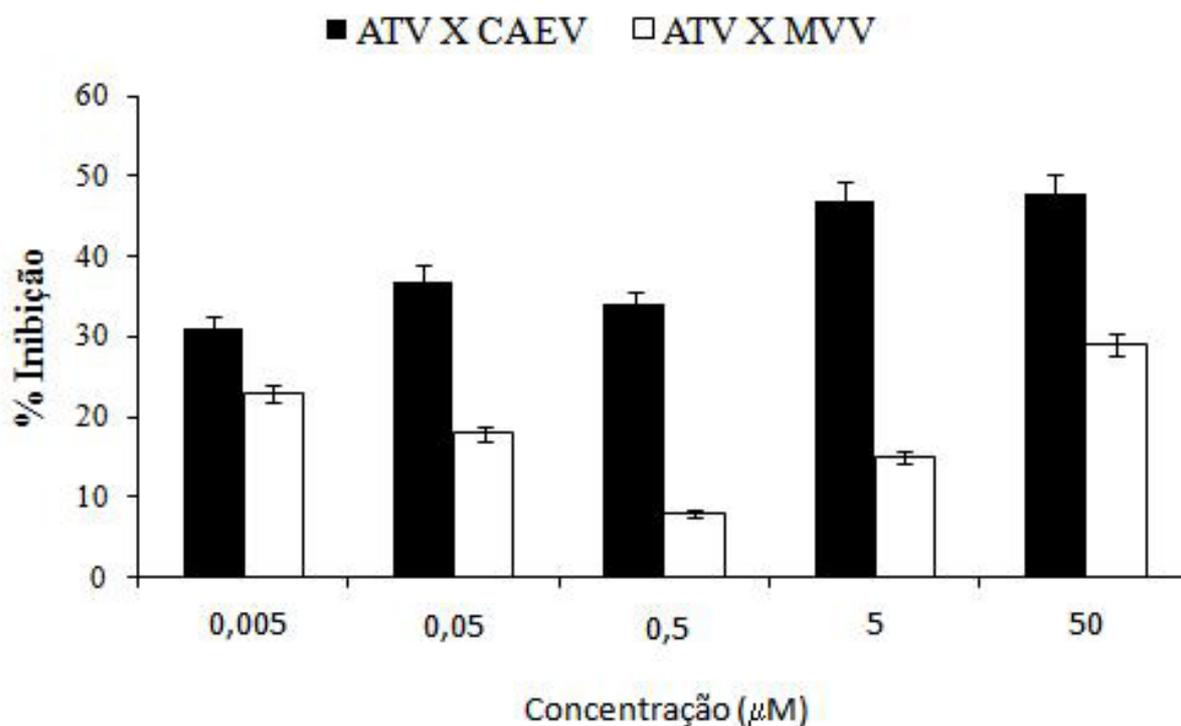


Fig. 4 - Efeito antiviral do inibidor de protease atazanavir sobre o MVV e o CAEV.

As divergências na atividade antiviral dos NRTIs em tipos celulares diversos dependem da afinidade desses fármacos com as quinases que estão envolvidas na conversão metabólica do composto para a forma de trifosfato (WITVROUW *et al.*, 2000; BALINT, 2001).

Os NRTIs inibem a replicação do ácido nucleico através da inibição de enzimas das vias metabólicas

das purinas ou pirimidinas pela inibição das polimerases utilizadas na replicação do ácido nucleico. Além disso, alguns análogos podem ser incorporados ao ácido nucleico e bloquear sua síntese ou alterar sua função (BROOKS *et al.*, 2000). Esses análogos nucleosídeos, para ficarem ativos, necessitam sofrer fosforilação intracelular para se converterem à

forma 5'-trifosfato atuando como inibidor competitivo ou substrato alternativo para a transcriptase reversa (DE CLERCQ, 2005). A ausência ou redução da fosforilação intracelular justifica o fato da porcentagem de inibição da replicação viral para algumas drogas ser maior na concentração mais baixa. Essa ausência e/ou redução da fosforilação intracelular pode ser resultado da ação citopática das cepas virais. Se o inibidor for incorporado à cadeia de DNA, torna-se impossível a continuidade do seu crescimento. Assim, os NRTIs funcionam como terminadores de cadeia (WITVROUW *et al.*, 2000; BALINT, 2001). Análogos de nucleosídeos incapazes de serem convertidos em nucleotídeos são fatalmente inativos.

Quando a forma de avaliação da atividade antiviral foi a redução do MTT, a lamivudina, a estavudina e a zidovudina inibiram significativamente o CAEV na concentração de 0,005  $\mu\text{M}$  com um percentual de inibição acima de 70%. Por sua vez, o efavirenz não foi capaz de inibir esse vírus nas concentrações avaliadas (Fig. 1). No que diz respeito à ação desses fármacos contra o MVV, observa-se que a lamivudina e a zidovudina apresentaram ações significativas nas concentrações de 0,005 e 50  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Apesar da estavudina apresentar uma inibição de 63% na concentração de 5,0  $\mu\text{M}$ , essa não foi significativa. O efavirenz, à semelhança dos resultados para o CAEV, não mostrou ação significativa sobre o lentivírus ovino (Fig. 2).

A didanosina não inibiu significativamente o CAEV apesar da inibição de 52% na concentração de 0,005  $\mu\text{M}$ , porém nessa mesma concentração verificou-se uma inibição significativa contra o MVV (Fig. 3). De forma análoga ao teste de inibição dos CPE o lopinavir/r (Fig. 3) e atazanavir não indicaram atividade antiviral expressiva contra os LVPR, apesar desse fármaco apresentar 59% de inibição do CAEV na concentração de 5  $\mu\text{M}$  (Fig. 4). Como os inibidores de protease atuam na fase final do ciclo de replicação viral, a falta de atividade antiviral dos inibidores de protease lopinavir/r e atazanavir sugere que os LVPR encontravam-se nas células infectadas na forma pró-viral. Visto que a protease, enzima alvo desses fármacos, é responsável pela clivagem das poliproteínas virais produzindo as proteínas estruturais finais dos LVPR (LE *et al.*, 2001; MAK *et al.*, 2003; OHTAKA; FREIRE, 2005; SAFRIN, 2008).

Entre os testes utilizados na avaliação da atividade antiviral observa-se uma similaridade entre os resultados, com exceção do fármaco efavirenz que, ao contrário dos resultados apresentados na prova de pesquisa de inibição dos CPE, não mostrou eficácia contra os LVPR quando avaliado pela técnica de redução do MTT. Ademais, comparando os resultados obtidos em ambas as técnicas, verifica-se que as concentrações eficazes foram diferentes para alguns fármacos. Essas

diferenças na atividade antiviral podem ser explicadas pela utilização de uma técnica de avaliação subjetiva como na pesquisa de inibição dos CPE.

SMEE *et al.* (2002) afirmaram que, algumas vezes, a técnica do MTT pode mascarar a ação de certas substâncias, uma vez que, à exigência de conversão enzimática pelas células viáveis, é possível que certos compostos inibam esse processo fazendo com que alguns compostos sejam mais ou menos ativos do que eles realmente são. Além disso, as discrepâncias entre os efeitos inibitórios desses fármacos provavelmente refletem as diferenças na conversão metabólica em células fibroblásticas.

Com exceção da multiplicidade de pesquisas existentes com o HIV, os estudos que visam avaliar a ação de fármacos contra as lentiviruses em animais ainda são escassos. No entanto, THORMAR *et al.* (1993) analisaram o efeito inibitório *in vitro* de análogos fosfonato nucleosídeo acíclico na replicação do Maedi-Visna verificando que a maioria dos fosfonatos nucleosídeo acíclico inibiu a replicação do MVV e que existe formação de CPE nas concentrações entre 0,2 a 1,8  $\mu\text{M}$ . THORMAR *et al.* (1995) avaliaram outros agentes com ação anti-HIV comprovada contra a replicação do Maedi-Visna vírus (MVV) através da análise do efeito citopático em cultivo de células do plexo coróide, sendo possível constatar que os análogos nucleosídeos acíclicos, bem como o 2', 3'-dideoxynucleosídeos, mostraram ação anti-MVV significativa. SALVATORI *et al.* (2001) testaram análogos da citidina e outros fármacos com potencial ação antiviral e/ou antileucêmico sobre a replicação do MVV, observando que essas classes de drogas desempenharam uma efetiva inibição do MVV. Outros fármacos como análogos deoxinucleosídeos e alguns nucleosídeos tiveram sua atividade antiviral testada contra o MVV e o herpesvírus bovino 1 (BHV-1) e foi possível averiguar que todos os compostos apresentaram boa atividade antireplicativa (SALVATORI *et al.*, 2002).

## CONCLUSÕES

Os inibidores da enzima transcriptase reversa inibiram *in vitro* a replicação dos LVPR, enquanto os inibidores da enzima protease não foram capazes de impedir a multiplicação dos LVPR. Desta forma, os resultados alcançados representam o alicerce para descoberta de uma terapêutica eficaz para a infecção ocasionada pelos LVPR, sendo imprescindível a avaliação *in vivo* da eficácia desses fármacos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento

Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro. Ao Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE) e ao Hospital São José de Fortaleza-CE pela concessão dos fármacos e à Embrapa-CNPC pelo fornecimento das condições técnicas e estruturais.

#### REFERÊNCIAS

- ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; ANTONIO, R.V.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.98, n.6, p.843-848, 2003.
- ARAÚJO, S.A.C.; TEIXEIRA, M.F.S.; DANTAS, T.V.M.; MIRANDA, A.M.; LIMA, F.E.S.; MELO, V.S.P.; RICARTE, A.R.F.; COSTA, E.C. Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. *Ciência Animal*, v.18, p.25-31. 2008.
- BALINT, G.A. Antiretroviral therapeutic possibilities for human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome. *Pharmacology & Therapeutics*, v.89, p.17-27, 2001.
- BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; ORNSTON, L.N.; JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. *Microbiologia médica*. 21.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 670p.
- CORK, L.C.; HADLOW, W.J.; CRAWFORD, T.B.; GORHAM, J.R.; PIPER, R.C. infectious leukoencephalomyelitis of young goats. *Journal of Infectious Diseases*, v.129, p.134-141, 1974.
- DAHLBERG, J.E.; MITSUYA, H.; BLAM, S.B.; BRODER, S.; AARONSON, S.A. Broad spectrum antiretroviral activity of 2',3'- dideoxynucleosides. *Proceedings of the United State of Sciences*, v.84, p.2469-2473, 1987.
- De CLERCQ, E. HIV chemotherapy and prophylaxis: new drugs, leads and approaches. *International of Journal Biochemistry and Cell Biology*, v.2, p.581-591, 2005.
- HAASE, A. T. The pathogenesis of lentivirus infections. *Nature*, v.322, p.130-136, 1986.
- HARTMANN, K. Feline immunodeficiency virus infection: an Overview. *The Veterinary Journal*, v.155, p.123-137, 1998.
- LE, V.; MAK, C.C.; LIN, Y.; ELDER, J.H.; WONG, C. Structure-activity studies of FIV and HIV protease inhibitors containing allophenylnorstatine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.9, p.1185-1195, 2001.
- MAK, C.C.; BRIK, A.; LERNER, D.L.; ELDER, J.H.; MORRIS, G.M.; OLSON, A.J.; WONG, C. Design and synthesis of broad-based mono and bi-cyclic inhibitors of FIV and HIV proteases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.11, p.2025-2040, 2003.
- OHTAKA, H.; FREIRE, E. Adaptive inhibitors of the HIV-1 protease. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v.88, p.193-208, 2005.
- PEÇANHA, E.P.; ANTUNES, O.A.C.; TANURI, A. Estratégias farmacológicas para a terapia anti-AIDS. *Química Nova*, v.25, n.6, p.1108-1116, 2002.
- REED, L.; MUENCH, H. A simple method for estimating fifty per points. *American Journal of Hygiene*, v.27, p.413-497, 1938.
- SAFRIN, S. Agentes antivirais. In: KATZUNG, B.G. (Ed.). *Farmacologia básica e clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 717-735.
- SALVATORI, D.; VINCENZETTI, S.; MAURY, G.; GOSELIN, G.; GAUBERT, G.; VITA, A. Maedi-visna vírus, a model for *in vitro* testing of potential anti-HIV drugs. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, v.24, p.113-122, 2001.
- SALVATORI, D.; VOLPINI, R.; VINCENZETTI, S.; VITA, A.; COSTANZI, S.; LAMBERTUCCI, C.; CRISTALLI, G.; VITTORI, S. Adenine and deazaadenine nucleoside and deoxynucleoside analogues: inhibition of viral replication of sheep MVV (*in vitro* model for HIV) and bovine BHV-1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.10, p.2973-2980, 2002.
- SAS INSTITUTE SAS/STAT. User's Guide, version 8. Cary, NC: SAS Institute Inc.. 1999.
- SIGURDSSON, B.; THORMAR, H.; PALSSON, P. A. Cultivation of visna virus in tissue culture. *Archiv fur die Gesamte Virusforschung*, v.10, p.368-381, 1960.
- SMEE, D.F.; MORRISON, A.C.; BARNARD, D.L.; SIDWELL, R.W. Comparison of colorimetric, fluorometric, and visual methods for determining anti-influenza (H1N1 and H3N2) virus activities and toxicities of compounds. *Journal of Virological Methods*, v.106, p.71-79, 2002.
- SOUZA, M.V.N.; ALMEIDA, M.V. Drogas anti-HIV: passado, presente e perspectivas futuras. *Química nova*, v.26, n.3, p.366-372, 2003.
- THORMAR, H.; BALZARINI, J.; HOLY, A.; JINDRICH, J.; ROSENBERG, I.; DEBYSER, Z.; DESMYTER, J.; De CLERCQ, E. Inhibition of visna virus replication by 2', 3'-dideoxynucleosides and acyclic nucleoside phosphonate analogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.37, p.2540-2544, 1993.
- THORMAR, K.; BALZARINI, J.; DEBYSER, Z.; WITVROUW, M.; DESMYTER, J.; De CLERCQ, E.

Inhibition of visna virus replication and cytopathic effect in sheep choroids plexus cell cultures by selected anti-HIV agents. *Antiviral Research*, v.27, p.49-57, 1995.

WITVROUW, M.; PANNECOUQUE, C.; DESMYTER, J.; De CLERCQ, E.; ANDRIES, K. In vitro evaluation of

the effect of temporary removal of HIV drug pressure. *Antiviral Research*, v.46. p.215-221, 2000.

Recebido em 23/1/09  
Aceito em 23/5/10