



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ANA LÍDIA MADEIRA DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DO DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS) E DE PRODUTOS
NATURAIS COMO ANTIVIRAIS PARA LENTIVÍRUS DE PEQUENOS
RUMINANTES EM COLOSTRO E LEITE CAPRINO**

FORTALEZA – CEARÁ

2020

ANA LÍDIA MADEIRA DE SOUSA

AVALIAÇÃO DO DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS) E DE PRODUTOS
NATURAIS COMO ANTIVIRAIS PARA LENTIVÍRUS DE PEQUENOS
RUMINANTES EM COLOSTRO E LEITE CAPRINO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fátima de Silva Teixeira
Coorientador: Prof. Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro

FORTALEZA – CEARÁ

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Madeira de Sousa, Ana Lúcia .

Avaliação do Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e de produtos naturais como antivirais para Lentivírus de Pequenos Ruminantes em colostro e leite caprino [recurso eletrônico] / Ana Lúcia Madeira de Sousa. - 2020

Um arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 119 folhas.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2020.

Área de concentração: Reprodução e Sanidade Animal.
Orientação: Prof.^a Dra. Maria Fátima de Silva Teixeira.

Coorientação: Prof. Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro.

1. Antivirais. 2. Aditivo Químico. 3. Replicação Viral. 4. Meliáceas. 5. Transmissão .

ANA LÍDIA MADEIRA DE SOUSA

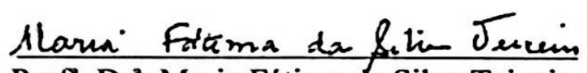
AVALIAÇÃO DO DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS) E DE PRODUTOS
NATURAIS COMO ANTIVIRAIS PARA LENTIVÍRUS DE PEQUENOS
RUMINANTES EM COLOSTRO E LEITE CAPRINO


Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em
Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da
Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial
para a obtenção do grau de Doutor em Ciências
Veterinárias.


Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Aprovado em: 29/06/2020

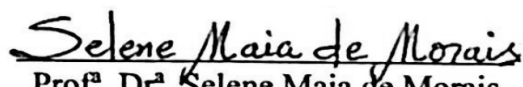
BANCA EXAMINADORA


Prof.^a. Dr.^a. Maria Fátima da Silva Teixeira
Universidade Estadual do Ceará
Orientadora


Prof. Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro
Embrapa Caprinos Ovinos
Coorientador/Examinador


Dr.^a. Alice Andrioli
Embrapa Caprinos Ovinos
Examinadora


Dr. Renato Mesquita Peixoto
Embrapa Caprinos e Ovinos
Examinador


Prof.^a. Dr.^a. Selene Maia de Moraes
Universidade Estadual do Ceará
Examinadora

FORTALEZA – CEARÁ

2020

Aos meus pais, Francisca Madeira de Sousa
e José Maria Doroteu de Sousa,
Dedico.

Agradecimentos

A **DEUS** pelo dom da vida;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará (PPGCV/UECE), em especial a todos os professores pelos ensinamentos. Além da coordenação do curso, professor Davide Rondina, e a secretária Adriana Albuquerque, por sempre estarem dispostos a ajudar;

À Fundação Cearense de Apoio Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP);

À EMBRAPA Caprinos e Ovinos e a UECE por fornecerem todo o aparato para a realização do experimento;

À Dra. Fátima Teixeira, orientadora, que ao longo desses quatro anos foi muito amiga, compreensiva e dedicada. Obrigada pelas oportunidades, pelos ensinamentos e por estar sempre disponível para ajudar em todas as circunstâncias.

Ao Dr. Rizaldo Pinheiro, coorientador e grande amigo, por sempre estar disponível para ajudar, independente das situações. Nesses nove anos de convívio, obrigada pelas oportunidades, pelos ensinamentos e por acreditar sempre na capacidade de sua equipe;

À Dra. Alice Andrioli, grande exemplo de mulher, pesquisadora e mãe, obrigada pelos ensinamentos e disponibilidade sempre;

À Dra. Selene Maia e ao Dr. Renato Peixoto por fazerem parte da banca de defesa, e auxílio nas correções dos capítulos;

Ao Laboratório de Virologia da UECE, em especial a Sabrina Bezerra, Juliana Nobre, Antoniel Oliveira, Maressa Holanda, Elisângela Moura, Rebeca Marinho, obrigada pela ajuda de todos.

Ao Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN) da UECE pela ajuda no preparo e processamento dos extratos, em especial, Dra. Selene Maia, Ana Carolina Silva e Gladstone Lima.

Aos meus pais, Francisca Madeira e José Maria Doroteu, que apesar das dificuldades, me ensinarem os valores da vida, por darem-me muito amor e carinho em todos os momentos, e sempre acreditarem em meus sonhos;

Aos meus irmãos, Sandra, Sergio e Felipe, e aos meus sobrinhos travessos, Arthêmys, Arthur, Luan, Laura e Davi, e minha filha de quatro patas, Sissi, por sempre estarem próximos a mim nos momentos difíceis e nas horas de descontração;

Ao Jael Martins, meu companheiro de todas as horas, pela compreensão, carinho, ajuda, amor e paciência durante esta jornada;

Aos meus sogros, Vanderly Martins e Edilson, que me apoiaram e me disponibilizaram local de estudo sempre que precisei;

Aos meus sogros “parte 2”, Aucélio Carlos e Fernanda Nari e minha cunhada Jamile Martins pela amizade, incentivo e apoio;

Aos meus Amigos, não só de trabalho, mas de todas as horas, Juscilânia Furtado (Laninha), Renato Peixoto, Dalva Azevedo e Milena Lima, por sempre estarem disposto a me ajudar em todo o experimento. Obrigada pela amizade, por sempre estarem presentes nos momentos difíceis e na hora de descontração;

Á minha querida equipe da Virologia: Samara Rocha, Iane Brandão, Lucigleidson Lima, Igor Gonçalves, Gabriel Amaral e Beatriz Melo, e mais uma vez, Laninha, Renato, Dalva e Milena por sempre poder contar com a ajuda de vocês, que foi crucial para a realização do experimento;

Aos meus amigos de moradia, em Fortaleza, Dauana Mesquita, Anacláudia Primo e Elvis Franklin, que compuseram a “Picareta’s House” por quase dois anos. Obrigada pela amizade, cuidado e companheirismo de vocês.

Aos meus amigos Sabrina Bezerra, Anderson Bezerra e Teodora que sempre me receberam com muito carinho e atenção nos momentos que precisei ir a Fortaleza.

Aos meus queridos amigos: Daniele Mouta, Sueli Linhares e Rafael Albuquerque por me concederem momentos de descontração e alegria;

Aos Laboratoristas da Embrapa Caprinos e Ovinos: João Ricardo Furtado, Osmarilda Maria, José Nóbrega, Jamile Bezerra e Lidiane Viana, obrigada por sempre estarem disponíveis para ajudar, mesmo que essa ajuda fosse depois do expediente;

Ao Eduardo Oliveira e ao Macílio Frota, pela grande ajuda nas experimentações a campo;

A todos, muito obrigada!

Seja forte e corajoso!

Josué 1:9 NTLH; Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde andar. ... Esforça-te, e tem bom ânimo; não temas, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus é contigo, por onde quer que andares.

RESUMO

As Lentivirose de Pequenos Ruminantes causam infecções crônicas em caprinos e ovinos, podendo ocasionar mastite, artrite, emagrecimento progressivo, pneumonia e problemas neurológicos. Estas enfermidades têm como principal via de transmissão a ingestão de leite e colostro oriundo de animais infectados, além de possuírem um alto índice de contágio e permanência em rebanhos a nível mundial. Vale ressaltar que, até o momento, não há tratamentos e/ou vacinas eficazes e disponíveis, necessitando, assim, a busca de meios inovadores passíveis de serem implementados no combate a estas enfermidades. Atualmente, vem se desenvolvendo pesquisas para o uso de antivirais tanto de origem sintética, como o dodecil sulfato de sódio (SDS), como de origem fitoquímica, como extratos de *Azadirachta indica* A. Juss (Nim) e *Melia azedarach* (Cinamomo), que já demonstraram ação antiviral com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), os vírus da dengue e o herpes vírus tipo 1. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiviral do SDS e de produtos naturais provenientes de meliáceas contra lentivírus de pequenos ruminantes presente em colostro e leite caprino. Este estudo foi dividido em duas etapas: Na primeira etapa, foi avaliado a ação antiviral do SDS no colostro e leite, em um estudo *in vitro* e *in vivo*. No estudo *in vitro* pode-se observar a ação antiviral do SDS na concentração de 1% no leite, no colostro, a ação antiviral não foi observada. Quanto ao estudo *in vivo*, esta concentração de 1% não foi eficiente e gerou problemas de saúde nos animais testados. Na segunda etapa, foram testados, *in vitro*, os extratos etanólicos brutos (EEB) de *A. indica* e *M. azedarach*, e as respectivas frações de acetato de etila (FAE) e metanol (FM), na concentração de 150 µg/mL, nas cepas isoladas de LVPRs (CAEV_{CO} e MVV_{K1514}) e em amostras de colostro e leite infectados pelo lentivírus caprino (LVC). Nas cepas de LVPRs, é possível observar a ação antiviral dos extratos de *A. indica* e *M. azedarach*, mais evidente na FAE, ao longo do ciclo replicativo da cepa aos CAEV_{CO} e na cepa de MVV_{K1514}, esta ação ocorreu somente com os extratos de *A. indica*, também na FAE, quando testados durante a inoculação viral. Em relação as amostras de colostro e leite, a FAE, na mesma concentração, de ambas as meliáceas, demonstrou maior eficácia contra LVC, com efeito antiviral potencializado principalmente no colostro.

Palavras-chave: Antivirais. Aditivo Químico. Replicação Viral. Meliáceas. Transmissão

ABSTRACT

Small Ruminant Lentiviruses cause chronic infections in goats and sheep, and can cause mastitis, arthritis, progressive weight loss, pneumonia, and neurological problems. These diseases have their main route of transmission the ingestion of milk and colostrum from infected animals, besides to having a high rate of contagion and permanence in herds worldwide. It is worth mentioning that, until now, there are no effective and available treatments and / or vaccines, thus requiring the search for innovative means that can be implemented in the fight against these diseases. Researches is currently being carried out on the use of antivirals, both synthetic in origin, such as sodium dodecyl sulfate (SDS), as well as phytochemical, such as extracts of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach*, which have already demonstrated antiviral action with the human immunodeficiency virus (HIV), dengue viruses and herpes virus type 1. Therefore, the objective of this work was to evaluate the antiviral activity of SDS and natural products from meliaceas against small ruminant lentivirus present in colostrum and goat milk. This study was divided into two stages: In the first stage, the antiviral action of SDS on colostrum and milk was evaluated in an in vitro and in vivo study. In the in vitro study it is possible to observe the antiviral action of SDS at a concentration of 1% in milk. In colostrum, the antiviral action was not observed. About the in vivo study, this concentration of 1% was not efficient and generated health problems in the tested animals. In the second stage, the crude ethanolic extracts (BSE) of *A. indica* and *M. azedarach* were tested in vitro, with the respective fractions of ethyl acetate (EAF) and methanol (MF), in contraction of 150 µg / mL in the isolated strains from LVPRs (CAEV_{CO} and MVV_{K1514}) and in samples of colostrum and milk infected caprine lentivirus (CLV). In the strains of SRLVs, it is possible to observe the antiviral action of the extracts of *A. indica* and *M. azedarach*, more evident in FAE, throughout the replicative cycle of the strain to CAEV_{CO} and in the strain of MVV_{K1514}. This action occurred only with the extracts of *A. indica*, also in EAF, when tested during viral inoculation. Regarding colostrum and milk samples, the EAF, in the same concentration, of both meliaceas, demonstrated greater efficacy against CLV, with antiviral effect potentiated mainly in colostrum.

Keywords: Antivirals. Chemical Additive. Viral replication. Meliaceas. Transmission

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Ilustração simplificada do ciclo replicativo dos Lentivírus de pequenos ruminantes. *RER: retículo endoplasmático rugoso. Fonte: Flores (2009), com adaptações..... 24

CAPÍTULO I

Figure 1 – Chemical representation of SDS..... 36

Figure 2 – Dose-dependent mechanism of action of SDS against HSV-1 (PIRET et al., 2002 with modifications) 39

CAPÍTULO II

Figure 1 - Co-culture of CSM and somatic cells in colostrum and milk. A and G: negative control of CSM cells (100x magnification). B and H: positive control of culture (100x magnification); C and I: control treatment (N/SDS) with colostrum and milk cells, respectively, with cytopathic effects (200x magnification). D, E and F: SDS treatment at 0.25%, 0.5% and 1% in colostrum, respectively. D: 0.25% SDS with presence of syncytium (circle) and cells visually increased in size (magnification 200x). E: SDS treatment at 0.5% with presence of cells (arrow) visually increased in size and rounded (magnification 200x). F: SDS treatment at 1% without the presence of cytopathic effects and only some cells (arrow) with a differentiated morphology in comparison to the others in colostrum (magnification 100x). J, K and L: SDS treatment at 0.25%, 0.5% and 1% in milk, respectively; J: 0.25% SDS treatment with presence of syncytium (circle) and cells visually increased in size (200x magnification); K: 0.5% SDS treatment with presence of cells (arrows) visually increased in size (200x magnification); L: 1% SDS treatment without the presence of cytopathic effect (100x magnification)..... 57

CAPÍTULO III

Figura 1 - Células de membrana nictitante ovina (MNO) tratadas com extratos de *Azadirachta indica* e *Melia azedarach* em diferentes fases da infecção viral pela cepa CAEVco. A: controle negativo da cultura com células de MNO (aumento 100x). B, C, D, E: cultura de células submetidas ao tratamento por 60 minutos com extrato das folhas de *Azadirachta indica*, onde B: tratamento com fração metanol (FM), antes da inoculação viral. C: tratamento com extrato etanólico bruto (EEB), durante a inoculação viral. D: tratamento com FM, após a inoculação viral. E: tratamento com fração de acetato de atila (FEA), após a inoculação viral (aumento 100x/200x). F: cultura de células submetidas ao tratamento por 60 minutos com extrato de folhas de *Melia azedarach* na fração orgânica de acetato de etila (FAE) durante a inoculação viral (aumento 100x/200x). G: controle positivo com células de MNO infectada com CAEVco, com sincícios (setas) (aumento 100x)
..... 73

Figura 2 - Células de membrana nictitante ovina (MNO) tratadas com extratos de *Azadirachta indica* durante a infecção viral pela cepa MVVK1514. A: controle negativo da cultura com células de MNO (aumento 100x). B, C e D: tratamentos, durante a inoculação viral, com o extrato etanólico bruto (EEB) e as frações orgânicas de acetato de etila (FAE) e metanol (FM), respectivamente, presença de sincício em D (seta) (aumento 100x/200x). E: controle positivo com células de MNO infectada com cepa MVVK1514, com sincícios (setas) (aumento 100x) 74

Figura 3 - Título viral dos sobrenadantes provindo do cultivo de células de membrana nictitante ovina (MNO) infectadas com cepas de CAEVco e MVV-K1514 tratadas com extratos etanólicos de folhas de *Azadirachta indica* e *Melia azedarach* em diferentes fases do ciclo replicativo viral. A: cepa CAEV-Co tratadas com extrato etanólico bruto de folhas de *A. indica* e *M. azedarach* e respectivas frações orgânicas de acetato de etila e metanol. b: Cepa MVV_{K1514} tratadas com extratos etanólicos de folhas de *Azadirachta indica* em durante o ciclo replicativo. *TCID₅₀/mL: *tissue culture infection dose*, recíproca da maior diluição que apresentou, 14 dias após inoculação, sincícios em 50% dos p₇₅os inoculados, C+.: controle positivo da cepa padrão CAEV_{CO}/MVV_{K1514}, FM –

Antes Inoc.: tratamento com fração orgânica metanol antes da inoculação viral, EEB – Após Inoc.: tratamento com extrato etanólico bruto após inoculação viral, FM – Após Inoc.: tratamento com fração orgânica metanol após inoculação viral, FAE - Após Inoc.: tratamento com fração orgânica de acetato de atila após inoculação viral, FAE - Durante Inoc.: tratamento com fração orgânica de acetato de atila durante a inoculação viral, EEB: extrato etanólico bruto, FAE: fração de acetato de etila, FM: fração metanólica
 75

CAPÍTULO IV

Figure 1 - Coculture of ovine third eyelid (OTE) cells and somatic cells of caprine colostrum. a: Negative control of OTE cell culture (100x magnification). b, c, and d: coculture of cells submitted to treatment for 90min with crude ethanolic extract of *Azadirachta indica* leaves, and ethyl acetate and methanol fractions (100x/200x magnification). h: Coculture of OTE and colostrum cells with syncytia (arrows) (control treatment with no addition of extracts) (200x magnification). i: positive control of OTE cells infected with CAEVco presenting syncytia (arrows) (100x magnification)..... 90

Figure 2 - Coculture with ovine third eyelid (OTE) cells and milk somatic cells. a: Negative control of culture with OTE cells (100x magnification). b, c and d: coculture of cells submitted to treatment by crude ethanolic extract of *Azadirachta indica* leaves and organic fractions of ethyl acetate and methanol for 90min (100x/200x magnification). e, f, g: coculture of cells submitted to treatment for 90min with crude ethanolic extract of *Melia azedarach* leaves and organic fractions of ethyl acetate and methanol (100x/200x magnification). h: coculture of OTE and colostrum cells with syncytia (arrows) (control treatment with no extract) (200x magnification). i: positive control of OTE cells infected by CAEVco with syncytia (arrows) (100x magnification)
 91

Figure 3 - Viral titers of milk and colostrum samples cocultured with ovine third eyelid (OTE) cells submitted to 90min treatment composed of ethanolic leaf extracts of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach*. a: colostrum samples

treated with crude extract of *A. indica* and *M. azedarach* leaves and respective ethyl acetate and methanol fractions. b: milk samples treated with crude extract of *A. indica* and *M. azedarach* leaves and respective ethyl acetate and methanol fractions. *TCID50/mL: tissue culture infection dose is the highest dilution that presented, at 14 days post-inoculation, syncytia in 50% of inoculated wells, C+.: positive control of standard CAEVco strain, C+T.: positive control of treatments..... 92

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 - Plantas medicinais de distintas famílias botânicas com atividade antiviral testada.....	26
--	----

CAPÍTULO 1

Table 1- SDS toxicity levels in different species.....	37
--	----

CAPÍTULO II

Table 1 - Levels of cytopathic effects in CSM cells after co-culture with somatic cells of colostrum and milk treated with SDS	56
--	----

Table 2 - Results of nPCR in supernatant samples of CSM and somatic cells co-culture from colostrum and milk	58
--	----

Table 3 - Individual monitoring with nPCR and WB of experimental animals	60
--	----

CAPÍTULO III

Tabela 1 - Níveis dos efeitos citopáticos nas células de membrana nictitante ovina (MNO) nos tratamentos com extrato etanólico bruto (EEB) e suas respectivas frações orgânicas de acetato de etila (FAE) e metanol (FM) de folhas de <i>Azadirachta indica</i> (<i>A. indica</i>) e <i>Melia azedarach</i> (<i>M. azedarach</i>) em diferentes fases da infecção viral por LVPRs	72
---	----

CAPÍTULO IIV

Table 1 - Levels of cytopathic effects in ovine third eyelid (OTE) cells after coculture with somatic cells of goat colostrum and milk (SCC/SMC) treated with crude ethanolic extract (CEE) and the respective organic ethyl acetate (EAF) and methanol (MF) fractions of <i>Azadirachta indica</i> (<i>A. indica</i>) and <i>Melia azedarach</i> (<i>M. azedarach</i>) leaves	88
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3TC	lamivudina
A	Anfotericina
Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
AZT	zidovudina
BHK	células baby hamster kidney
BVD	Bovine viral diarrhea (Vírus da diarréia bovina)
C-	Controle negativo
C+	Controle positivo
CAE	Sigla e inglês da Artrite-Encefalite Caprina
CAEV	Sigla e inglês do Vírus da Artrite-Encefalite Caprina
CAEV_{Co}	Cepa padrão do Vírus da Artrite-Encefalite Caprina
cel/μL	Células por microlitro
cel/cm²	Células por centímetro quadrado
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
ClCa	Cloreto de cálcio
CP	Concentração padrão
CPE	Cytopathic Effects (Efeitos citopáticos virais)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EEB	Extrato Etanólico Bruto
FAE	Fração orgânica de acetato de Etila
FM	Fração orgânica de Metanol
G	Força centrípeta gravitacional
G	Gramas
H	Hidrogênio
h	Horas
H₂O	Molécula de água
HBV	Sigla em vírus da hepatite B
HeLa	Células humanas de cultura contínua usada em pesquisas científicas
HIV	Sigla e inglês do Vírus da imunodeficiência humana adquirida
HIV-1	Sigla e inglês do Vírus da imunodeficiência humana adquirida tipo I
HPV	Sigla e inglês do Papiloma Vírus
HSV	Sigla e inglês do Herpes Vírus
HSV-2	Sigla em inglês do Herpes Vírus tipo 2
HTST	High Temperature Short Time
IDGA	Imunodifusão em Gel de Agarose
IgG	Imunoglobulina G
IUPAC	Sigla e inglês da União Internacional de Química Pura e Aplicada
KCl	Cloreto de potássio
KH₂PO₄	Fosfato monopotássico
LTR	Long terminal repeat
LVC	Lentivírus caprino
LVO	Lentivírus ovino

LVPR	Lentivírus de Pequenos Ruminantes
MAGI	Multinuclear Activation of Galactosidase Indicator
ME	Mix de extração
MEM	Meio essencial mínimo
Mg²⁺	Magnésio
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MNC	Membrana nictitante caprina
MSC	Membrana sinovial caprina
MVV	Sigla em inglês do vírus da Maedi-Visna
Na₂HPO₄	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
nPCR	Reação em cadeia da polimerase nested (aninhada)
NRTIs	inibidores de nucleotídeos e nucleosídeos da transcriptase reversa
OTE	Ovine Third Eyelid cells
P/S	Penicilina e estreptomicina
PBS	Tampão sódio fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>Pellet</i>	Pequenas porções de material aglomerado ou comprimido
<i>Pool</i>	Amostra compactada no fundo de frasco após centrifugação
PV	Peso vivo
PV-1	Sigla e inglês do Poliovírus
RNA	Ácido ribonucleico
SRLV	Small ruminant lentivirus
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro feral bovino
SLS	Lauril sulfato de sódio
TA	Tampão de amostra
UNEP	United Nations Environment Programme

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentual
°C	Graus Centígrados
µg	Micrograma
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
células/mL	Células por mililitro
cm	Centímetros
cm²	Centímetros Quadrado
CO²	Dióxido de Carbono
g	Gramas
G	Força Gravitacional
g/MI	Gramas por mililitro
m	Metro
M	Molar
mL	Mililitro
nm	Nanômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1. Características Gerais das Lentivirose de Pequenos Ruminantes	21
2.2. Ciclo Replicativo dos Lentivírus de Pequenos Ruminantes	23
2.3. Uso de Antivirais	25
2.4. Uso de Plantas Antivirais	26
2.4.1. <i>Azadirachta indica</i> e <i>Melia azedarach</i>	27
3 JUSTIFICATIVA	30
4 HIPÓTESE CIENTÍFICA	31
5 OBJETIVOS	32
5.1 Objetivo Geral	32
5.2 Objetivos Específicos	32
6 CAPÍTULO I	33
7 CAPÍTULO II	50
8 CAPÍTULO III	65
9 CAPÍTULO IV	85
10 CONCLUSÕES	105
11 PERSPECTIVAS	106
REFERÊNCIAS	107
APÊNDICE A – COMITÊ DE ÉTICA DO ESTUDO COM OS ANTIVIRAIS	116
APÊNDICE B – COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO DE REVISÃO ...117	
APÊNDICE C- COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO TÉCNICO I	118
APÊNDICE D – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO TÉCNICO III	119

1 INTRODUÇÃO

As lentivirose de pequenos ruminantes (LVPRs) são enfermidades causadas por vírus da família Retroviridae, gênero *Lentivirus*, representados por dois grandes grupos filogenéticos, o vírus da Maedi Visna (MVV) e o vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) (MINGUIJÓN et al., 2015). São enfermidades de caráter incurável e infectocontagioso, que acarretam, de modo geral, grandes perdas econômicas à caprinocultura (AZEVEDO et al., 2017), e clinicamente, podem ocasionar pneumonia intersticial, encefalite, artrite, mastite, emagrecimento progressivo, além de problemas neurológicos em cabritos, responsável por incoordenação, tremores musculares e paralisia (HIGHLAND, 2017).

A transmissão lactogênica, via colostro e leite, além de ser uma forma natural de transmissão da infecção, garante a disseminação do vírus entre gerações, e a persistência do mesmo em rebanhos, em nível populacional (PISONI et al., 2010). Os animais são expostos a infecção, através do trato gastrointestinal, pela ingestão do colostro infectado, tanto pelo vírus livre como pelo pro-vírus presente no interior de monócitos/macrófagos (HERRMANN-HOESING et al., 2007). Ademais, por ser uma enfermidade incurável e que até o momento não possui um tratamento adequado (vacina e ou medicamento) para combater a ação do vírus (REINA et al., 2013; VENTURINO et al., 2019) é de suma importância a busca de meios inovadores passíveis de serem implementados como medidas de controle dessa enfermidade.

Estudos correlacionam a atividade inibitória de micro-organismos com o uso de aditivos químicos para o leite (KREBS et al., 1999; MULLER; SYHRE, 1975; URDANETA et al., 2005). Dentre estes, o dodecil sulfato de sódio (SDS) é um agente surfactante, com propriedades lisantes e citolíticas, que apresenta possível atividade antiviral, em protótipos do HIV-1 (Imunodeficiência Humana), HSV (herpes vírus) e HPV (papiloma vírus) em culturas celulares (PIRET et al., 2002). Urdaneta et al.(2005) e Krebs et al.(1999) demonstraram que o SDS a 0,1% pode ser eficaz na inativação do HIV-1 no leite e relataram que esta concentração está de acordo com os limites seguros para o consumo infantil. Além disso, outros estudos indicam que o SDS a 1% no colostro, é um biocida eficiente, e que os cabritos alimentados não sofreram déficit na transferência passiva imune, bem como problemas de saúde (MORALES-DELANUEZ et al., 2011).

Adicionalmente, tem-se observado um direcionamento dos estudos para uso de extrato de plantas medicinais no tratamento de doenças respiratórias, entéricas, e no

controle de endo e ectoparasitas (SIMONI, 2011). Dentre estas plantas, temos as Meliaceae, onde espécies como *Azadirachta indica* A. Juss (Nim) e *Melia azedarach* (Cinamomo), em diversos estudos, demonstraram inúmeras aplicações, como por exemplo, inseticida, bactericida e atividade antiviral, tanto na medicina humana quanto na veterinária (ALCHÉ et al., 2003; ARAÚJO et al., 2010; MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005; SAIRAM et al., 2000).

No âmbito antiviral, extratos de folhas de *Azadirachta indica* A. Juss já foram testados contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV), em forma de comprimido intravaginal, resultando em efeitos promissores no controle e disseminação da doença na Índia (JOSHI et al., 2005). Além disso, o Nim também demonstrou efeitos no vírus da dengue, inibindo a ação de proteases por meio de bioflavonóides, contribuindo assim para o desenvolvimento de medicamento eficaz contra a infecção viral (YOUNUS et al., 2017). Enquanto isso, a *Melia azedarach*, já inibiu a multiplicação do Herpes Vírus 2 (HSV-2) em células epiteliais e também aumentou a produção de citocinas nos macrófagos, ações essas, importantes para a eliminação do vírus (PETRERA; COTO, 2014). Ademais, destacou-se com um potente antiviral contra várias cepas do vírus da influenza (H₅N₁, H₁N₁, H₃N₂, H₅N₁, H₇N₉ e H₉N₂) tanto em estudos in vitro como in vivo (NEROME et al., 2018).

Portanto, o uso destes compostos, sejam de origem sintética (SDS) ou provindos de espécies vegetais (*A. indica* A. Juss e *M. azedarach*) podem desempenhar atividade antiviral contra do LVC quando utilizados em leite e colostro, reduzindo assim o nível de transmissão pela via lactogênica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características Gerais das Lentivirose de Pequenos Ruminantes

A criação de caprinos e ovinos está associada aos sistemas tradicionais de subsistência e aos fatores econômicos, onde a produção animal tende a ser intensificada, exigindo sistemas de criações mais eficientes (GUILHERME et al., 2017). Entretanto, o manejo sanitário, com diagnósticos tardios de diversas doenças, interfere drasticamente no desempenho desta atividade (AZEVEDO et al., 2017; GUILHERME et al., 2017). Um dos problemas sanitários de relevância são as lentivirose de pequenos ruminantes (LVPR), enfermidades oriundas de dois grupos filogenéticos, o Vírus da Artrite

Encefalite Caprina (CAEV), ou Lentivírus caprino (LVC), e o Vírus Maedi-Visna (MVV), ou lentivírus ovino (LVO) (MINGUIJÓN et al., 2015).

Estas lentivirose possuem várias formas de transmissão; dentre elas: a transmissão lactogênica, por meio do leite e colostro contaminado (PISONI et al., 2010). A forma reprodutiva, pelo vírus presente no sêmen de reprodutores infectados (ANDRIOLI et al., 2002; ANDRIOLI et al., 2006; SOUZA et al., 2013). A transmissão transplacentária, que ocorre no período da gestação (EAST et al., 1993; RODRIGUES et al., 2017). E a via horizontal, que ocorre pelo contato direto entre animais, por meio de fezes, saliva e secreções respiratórias (RADOSTITS et al., 2002; SOUZA et al., 2015).

Neste contexto, a transmissão lactogênica é um modelo natural de infecção, reconhecido para os lentivírus de modo geral. Desempenha um papel fundamental na biologia dos LVPRs, além de outros lentivírus, tais como o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e vírus da Imunodeficiência Símia (SIV). De fato, esta via de transmissão é considerada o principal modo de infecção por LVPRs em caprinos, garantindo uma disseminação do vírus entre gerações e sua persistência no rebanho (PISONI et al., 2010). A ingestão de leite e colostro provindo de cabras infectadas torna-se uma das principais via de transmissão da CAE, devido à extensa quantidade de células infectadas, dentre elas, monócitos e/ou macrófagos (HERRMANN-HOESING et al., 2007). Os leucócitos maternos são conhecidos por serem absorvidos no intestino em animais recém-nascidos e entrarem na circulação periférica (SCHNORR; PEARSON, 1984). Esta grande permeabilidade do intestino de animais recém-nascidos facilita a entrada do vírus através da ingestão de colostro infectado (KALOGIANNI et al., 2020; PISONI et al., 2010).

Essas enfermidades acarretam consideráveis perdas na produção caprina e ovina, podendo comprometer a rentabilidade na exploração animal. Além disso, ambas as infecções têm como principais sinais clínicos a artrite, encefalite, mastite, e com menor frequência problemas respiratórios, além de acometer animais de todas as idades, independente do sexo ou da raça (HIGHLAND, 2017). Adicionalmente, a transmissão lactogênica influencia diretamente na disseminação do vírus entre gerações e sua persistência no rebanho, contribuindo, assim, com essas perdas produtivas e econômicas (AZEVEDO et al., 2017; PISONI et al., 2010).

Dentre os prejuízos diretos, pode-se citar: a diminuição do tempo de vida produtivo e produção de leite; menor duração do período de lactação; predisposição para infecções bacterianas, especialmente na glândula mamária; e redução nos níveis de gordura e proteína do leite produzido pelas cabras infectadas, que afetam produtos

lácteos, como a produção de queijo (BRITO, 2009; GREGORY et al., 2010; MARTÍNEZ-NAVALÓN et al., 2013). Como perdas indiretas têm-se a desvalorização dos rebanhos e a ascensão de barreiras comerciais para produtos de multiplicação animal, como: matrizes, reprodutores, sêmen, embriões, dentre outras (MODOLO et al., 2003; PINHEIRO et al., 2001). Considerando-se que não há tratamento que elimine o vírus, quando o animal já se encontra infectado (REINA et al., 2013; VENTURINO et al., 2019), é importante a prevenção do contágio no rebanho.

2.2. Ciclo Replicativo dos Lentivírus de Pequenos Ruminantes

Os lentivírus de pequenos ruminantes podem infectar células do sistema monocítico fagocitário (HERRMANN-HOESING et al., 2007), células da membrana nictitante (CAPUCCHIO et al., 2003), células epiteliais do oviduto de cabras (LAMARA et al., 2002), tecido uterino (FIENI et al., 2003), glândula mamária (LERONDELLE et al., 1999) e pulmão (ARAÚJO, 2004). Foram relatados também, em células microgliais, astrócitos e oligodentrócitos, plexo coroide, neurônios (SANNA et al., 1999), e em células estromais de medula óssea (GROSSI et al., 2005). Também houve identificação em fluidos corporais como sangue, colostro e leite (LARA et al., 2003), no líquido cefalorraquidiano (SIDER et al., 2010), no fluido uterino e no sêmen (ANDRIOLI, 2001; ANDRIOLI et al., 2006).

Quanto ao ciclo replicativo desses lentivírus é semelhante ao de outro retrovírus (Figura 1). Desta forma, o vírion liga-se ao receptor celular através da glicoproteína do envelope da superfície (SU), ocasionando a fusão do envelope viral com a membrana celular, ocorrendo a liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma. Em seguida, ocorre o desnudamento e a liberação do genoma viral, em seguida a transcrição reversa do RNA é iniciada, por meio da enzima transcriptase reversa (RT), em que o RNA viral é codificado em DNA complementar, ou DNA proviral (BLACKLAWS, 2012; BLACKLAWS; HARKISS, 2010). À medida que a transcrição avança, a fita de RNA é degradada pela atividade da ribonuclease H (RNase H) da enzima RT, a qual é igualmente responsável pela liberação do primer de RNA, que possibilita a síntese da fita complementar do DNA proviral, ocorrendo, em seguida, a formação da molécula de DNA de fita dupla, denominada provírus (PICCONE; FLORES, 2009). Em seguida é formado o complexo pré-integração (provírus DNA+ integrase), por meio da enzima integrase (IN), e este complexo adentra o núcleo celular (BLACKLAWS; HARKISS, 2010).

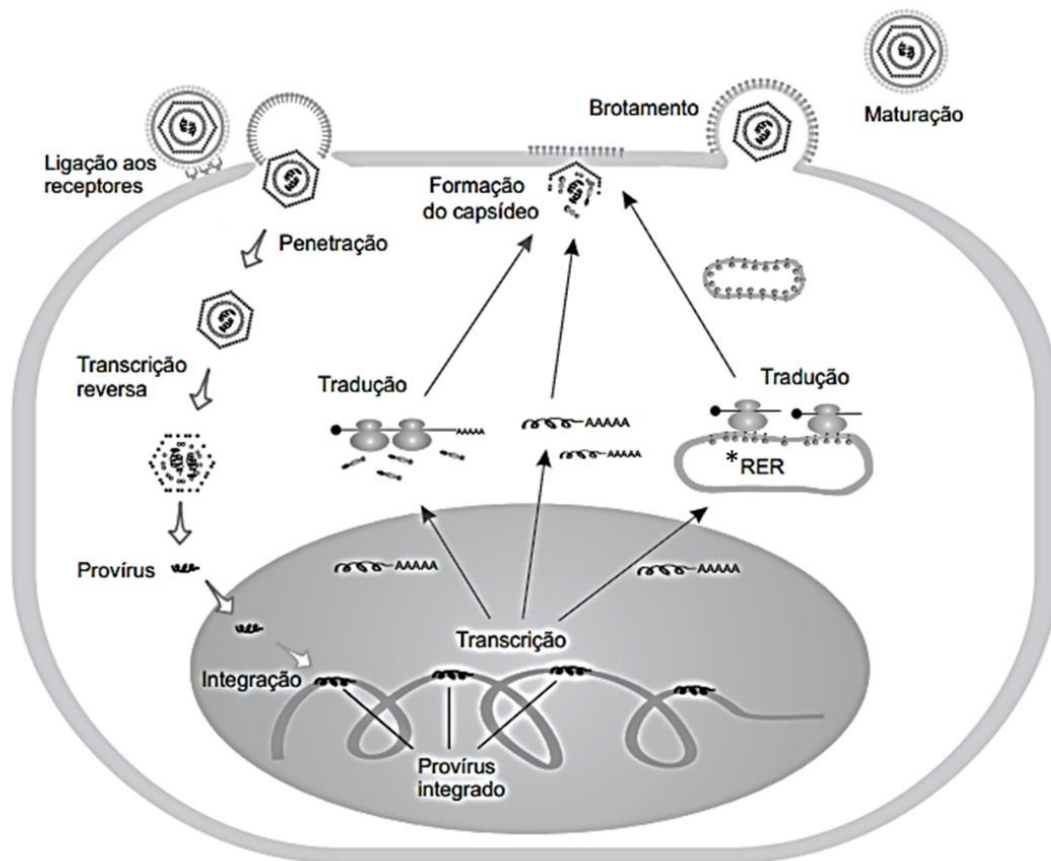


Figura 1 - Ilustração simplificada do ciclo replicativo dos Lentivírus de pequenos ruminantes. *RER: retículo endoplasmático rugoso. Fonte: Flores (2009), com adaptações.

O provírus DNA de fita dupla é, então, transportado para o núcleo da célula, onde é inserido no cromossomo celular pela atividade da IN, resultando na incorporação definitiva de uma cópia do genoma viral no cromossomo do hospedeiro e se constitui em uma etapa essencial para o prosseguimento do ciclo replicativo e produção de progênie viral (flores). Após esta incorporação, a expressão gênica viral e a síntese de mRNA ocorrerá por meio do uso do maquinário celular. Após a síntese de mRNA, se inicia, no citoplasma, a expressão de proteínas virais para a formação de novas partículas infecciosas, resultando no brotamento e egresso das mesmas (BLACKLAWS, 2012; BLACKLAWS; HARKISS, 2010; PICCONE; FLORES, 2009). Embora o principal local de brotamento de novos virions esteja na membrana plasmática (especialmente nas células fibroblásticas), também pode ocorrer brotamento em vacúolos, particularmente em macrófagos. Esses vacúolos podem então ser excitados, causando a liberação de partículas virais (BLACKLAWS; HARKISS, 2010).

2.3. Uso de Antivirais

De modo geral a produção de vacinas promove o controle de doenças virais, porém, para as lentivirose ela é inexistente, devido ao nível mutagênico desses vírus (VENTURINO et al., 2019). Em virtude disso, uma ênfase tem sido dada para a busca de drogas antivirais. Para o desenvolvimento de drogas antivirais eficientes é necessário o conhecimento sobre a bioquímica da replicação viral, devido ao uso constante do maquinário celular neste processo. Desse modo, o equilíbrio para evitar a replicação viral e não causar toxicidade para a célula é elementar (LUO; GAO, 2020; STRASFELD; CHOU, 2010).

O conhecimento dos mecanismos envolvidos na replicação viral fornece aparato para o desenvolvimento de fármacos com maior seletividade, potencial de ação, maior estabilidade *in vivo* e menores níveis de toxicidade celular. Em medicamentos humanos, o estudo de antivirais é bem mais desenvolvido, e as terapias para os vírus da hepatite B (HBV), do papiloma (HPV), da influenza e da imunodeficiência humana já estão bem consolidadas (NOVÁKOVÁ et al., 2018a, b).

Os antivirais de uso humano disponíveis, são em sua maioria sintéticos, tais como o aciclovir, o valaciclovir e fosciclovir que são análogos de nucleotídeos, muito utilizados no tratamento do vírus da herpes (HSV) e da varicela-zoster (VZV). No controle do HIV são utilizados, em maior escala, antivirais inibidores de nucleotídeos e nucleosídeos da transcriptase reversa (NRTIs), dentre eles, a zidovudina (AZT), a didanosina (ddI), a zalcitabina (ddC), a estavudina (d4T) e a lamivudina (3TC) (NOVÁKOVÁ et al., 2018a, b). Dentre estes, o AZT, ddI, d4T e o 3TC foram utilizados em estudos *in vitro* por Araújo et al.(2010), como antivirais no tratamento das LVPRs e apresentaram resultados promissores.

Outro produto sintético com ação antiviral utilizado é o Dodecil sulfato de sódio (SDS), que é um surfactante com largo espectro de ação (URDANETA et al., 2005), que mostrou eficiência como microbicida tópico e inativador viral contra o HIV (vírus da imunodeficiência humana), HPV (papiloma vírus) e HSV (herpes vírus) (PIRET et al., 2002). Demonstrou, também, atividade antiviral no leite humano, em estudos *in vitro* realizado por Urdaneta et al. (2005). Sua ação microbicida também já foi avaliada no colostro caprino, obtendo resultados efetivos (MORALES-DELANUEZ et al., 2011).

2.4. Uso de Plantas Antivirais

Além de compostos de origem sintética, o uso de plantas medicinais também tem sido observado para o tratamento de doenças virais. Nesse contexto, na literatura há relatos da eficácia de substâncias bioativas provindas de extratos aquosos ou etanólicos de folhas das mais distintas plantas medicinais contra inúmeros tipos virais. Na tabela 1, retirada do estudo de Peixoto et al. (2018), pode-se observar um aparato bibliográfico contendo estudos com diversas plantas de distintas famílias botânicas com atividade antiviral já testada anteriormente.

Tabela 1 - Plantas medicinais de distintas famílias botânicas com atividade antiviral testada

Planta	Família Botânica	Tipo de Extrato	Composto fitoquímico	Vírus	Sítio de Ação	Referência
<i>Melia azedarach</i>	Meliaceae	Etanólico	Flavonoides	Herpes - 1	Transcrição Viral	(BUENO et al., 2012)
<i>Azadirachta indica</i>	Meliaceae	Aquoso	Arabinose e galactose	Poliovírus -1	Replicação Viral	(FACCIN-GALHARDI et al., 2012)
<i>Aloe arborescens</i>	Xanthorrhoeaceae	Aquoso	-	Vírus da Gripe (H1N1; H3N2)	Inibição da Neuraminidase	(GLATTHAAR - SAALMÜLLER et al., 2015)
<i>Berberis holstii</i>	Berberidaceae	Aquoso	Alcaloides	Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)	Inibição da Transcriptase Reversa	(NGWIRA; MAHARAJ; MGANI, 2015)
<i>Salvia plebeia</i>	Lamiaceae	Etanólicos	Flavonoides e Fenólicos	H1N1	Inibição da neuraminidase	(BANG et al., 2016)
<i>Cleistocalyx operculatus</i>	Myrtaceae	Etanólico	Flavonoides	H1N1; H9N2	Inibição da neuraminidase	(HA et al., 2016)
<i>Cistus incanus</i>	Cistaceae	Aquoso	Polifenóis	(HIV)	Replicação Viral	(REBENSBURG et al., 2016)
<i>Cyathulae officinalis</i>	Amaranthaceae	Aquoso	Polissacarídeos	Parvovírus canino	Adsorção Viral	(FENG et al., 2017)
<i>Peganum harmala</i>	Zygophyllaceae	Etanólico	Alcaloides	Vírus da Influenza A	Replicação do Vírus	(MORADI et al., 2017)
<i>Bulbine frutescens</i>	Asphodelaceae	Etanólico	Flavonoides	(HIV)	Transcriptase reversa, protease e integrase	(SHIKALEPO et al., 2017)

Fonte: Peixoto et al. (2018), com adaptações.

Dentre estas plantas de cunho medicinal, podemos citar a *Azadirachta indica* e *Melia azedarach*, pertencente à família das Meliaceae. Os extratos provindos das folhas destas plantas já demonstram diversos resultados no âmbito da atividade antiviral

(BADAM et al., 1999; BUENO et al., 2012; BUENO et al., 2010; CASTILLA et al., 1998; FACCIN-GALHARDI et al., 2012; PARIDA et al., 2002; WACHSMAN et al., 1987).

2.4.1. *Azadirachta indica* e *Melia azedarach*

A família Meliaceae possui cerca de 51 gêneros e 550 espécies (CANTINO, 1999) sendo que maioria destas espécies arbóreas encontram-se em regiões tropicais e de florestas úmidas (RIZZINI, 1978). Pertencente a esta família, a *Azadirachta indica*, popularmente conhecida como Nim, é de origem Indiana (FORIM, 2006), e está distribuída em áreas tropicais e subtropicais da África, em países asiáticos e africanos, na Austrália, América Central, regiões tropicais da América do Norte e na América do Sul (NARWAL et al., 2003; SCHMUTTERER, 1990).

A *A. indica* se adapta melhor a regiões de climas tropicais e subtropicais (VERKERK; WRIGHT, 1993). Além disso, é uma árvore que possui um porte variável, de 15 a 20m de altura, com tronco contendo de 30 a 80 cm de diâmetro, podendo ser semi reto a reto, de coloração marrom-avermelhada. As folhagens são sempre verdes, de caráter imparipenado e folíolos alternados. As inflorescências possuem morfologia bissexuada, de coloração branca, com brotamento em feixes axiais. Os frutos possuem espessura lisas e elipsoides, e quando maduros apresentam coloração amarela, com as sementes envoltas por uma polpa doce, com casca e um ou mais caroços (MARTINEZ, 2002).

No âmbito da atividade antiviral, a *A. indica* apresenta resultados satisfatórios. Em estudos anteriores, pode-se observar a atividade antiviral, *in vitro*, desta planta em extratos cetônicos contra o coxsackievirus (grupo B) (BADAM et al., 1999). Além disso, em estudos mais recentes, realizados por Parida et al. (2002), foi constatado que o extrato aquoso obtido das folhas do Nim, sobre o vírus do dengue tipo 2, suprime a replicação do vírus tanto em sistemas *in vitro* como *in vivo*. Ademais, em ensaios realizados com polissacarídeos obtidos a partir desta planta, atuaram contra o poliovírus (PV-1) ao inibir a intensidade da replicação viral (FACCIN-GALHARDI et al., 2012).

Quanto a *Melia azedarach*, pertencente também às Meliaceae, conhecida como cinamomo, teve origem na Pérsia, Índia e China (MACIEL et al., 2006). Apresenta um porte arbóreo de 15 a 20m de altura, aproximadamente, seu tronco é oblíquo com fissuras longitudinais, de cor marrom-acinzentado ou marrom-avermelhado, e diâmetro de 30-

60cm. As folhas são alternadas, compostas e bipinadas, com pecíolo longo. As flores são de pequeno porte e se caracterizam por serem ramificadas, axilares, onde se denota a presença de inúmeras flores perfumadas, de cor lilás-rósea de porte pequeno. O fruto possui o formato ovóide-arredondado, tipo drupa e marrom-amarelado (COUTINHO, 2013).

Em relação a sua atividade antiviral, Wachsman et al.,(1987) observaram que os extratos purificados das folhas da *M. azedarach* exerciam uma ampla gama de efeitos antivirais em vírus de DNA e RNA. Estes autores constataram uma inibição de 90% da atividade viral em células *baby hamster kidney* (BHK), atuando em diferentes estágios do ciclo replicativo do vírus Sindbis. Além disso, Castilla et al. (1998), extraíram em seus ensaios a Meliacine, um peptídeo isolado a partir de folhas de *M. azedarach*. Este peptídeo inibiu a multiplicação do vírus Junin em células Vero tratadas com o composto antes da infecção (pré-tratamento) ou imediatamente após a adsorção do vírus. Em estudos mais recentes com o uso de células Vero, Alché et al. (2002) constataram que extratos provindos do cinamomo exercem uma ação antiviral tanto na síntese de DNA viral quanto na maturação e saída de HSV-1.

Quando a constituição fitoquímica desta meliáceas já foram relatados vários metabólitos secundários, dentre eles: flavonoides (BUENO et al., 2012; SALEEM et al., 2018), fenóis (SINGH et al, 2005), flavonóis (COWAN, 1999), esteroides (SALEEM et al., 2018), triterpenides (SALEEM et al., 2018) alcaloides (SALEEM et al., 2018), dentre outros (BUENO et al., 2012; SALEEM et al., 2018; SINGH et al, 2005).

Estes metabólitos secundários estão atribuem a ação antiviral, seja isolado ou pelo sinergismo entre eles (MORADI et al., 2017; NOLKEMPER et al., 2010; SHIKALEPO et al., 2017). Ademais, quando atuam conjuntamente, proporciona as meliáceas grande variabilidade farmacológica, podendo estas, futuramente, serem utilizadas como agentes antimicrobiano com largo espectro de ação (GUPTA et al., 2017; SULTANA et al., 2014). Adicionalmente, grande maioria dos fitocompostos com atividade antiviral provem de extratos aquosos e etanólicos (ANGAMUTHU et al., 2019; LI et al., 2019; NEROME et al., 2018; PARIDA et al., 2002; SANNA et al., 2015; YOUNUS et al., 2017). O estudo das aplicações farmacológicas destes constituintes fitoquímicos, como alcaloides, flavonoides e terpenoides, são fundamentais na pesquisa de antivirais eficientes. Além disso, os flavonoides são considerados bioativos que promovem atividade antiviral, tanto isolados, como extratos vegetais distintos (AHMAD et al., 2016; KUMAZAWA et al., 2013; MORADI et al., 2017; SHIMIZU et al., 2017). E estes fitocomponentes podem

atuar na inibição de proteases e de enzimas, como a transcriptase reversa (AHMAD et al., 2016; SHIMIZU et al., 2017), esta, é responsável por catalisar a transcrição reversa do RNA viral em uma molécula de dsDNA, competente este a ser integrado no genoma da célula hospedeira (MALIK et al., 2017).

3 JUSTIFICATIVA

As lentivirose de pequenos ruminantes têm como principal via de transmissão à ingestão de leite e colostro provenientes cabras infectadas. Deste modo, o controle por esta via é de suma importância, pois estas enfermidades comprometem seriamente a viabilidade econômica da produção de caprinos e ovinos.

Atualmente, poucos rebanhos no Brasil não apresentam casos de infecção por LVPRs, fato esse que resulta em perdas econômicas consideráveis dentro da cadeia produtiva da ovinocaprinocultura, e que evidencia a necessidade de programas de controle eficazes, baratos e práticos. Além disso, até o momento, não há tratamentos e/ou vacinas eficazes e disponíveis contra estes agentes, necessitando assim a busca de meios inovadores passíveis de serem implementados no combate a estas enfermidades.

Nesse contexto, o uso dodecil sulfato de sódio (SDS), como possível antiviral, vem gerando resultados satisfatórios, quando relacionado à inativação química do HIV-1 no leite nas concentrações de 0,1%. Além de demonstrar eficiência no uso como antimicrobiano em leite, sendo oferecido a cabritos, onde estes não apresentaram disfunção imunológica e nutricional.

Já os produtos naturais de *Azadirachta indica* A. Juss e *Melia azedarach* são muito utilizados em estudos no tratamento de doenças respiratórias e entéricas, além de serem utilizados em inúmeras aplicações, como por exemplo, inseticida, bactericida e atividade antiviral, tanto na medicina humana quanto na veterinária. Além de já existirem estudos que comprovam a ação antiviral dessas plantas em vírus do HIV-1, herpes vírus, papiloma vírus, influenza, dentre outros.

Desta forma, o uso de produtos com ação antiviral, sejam de origem sintética ou fitoquímica seriam de grande valia para o desenvolvimento de metodologias e/ou produtos de caráter prático e eficiente para o controle da via lactogênica das LVPRs.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

As propriedades de inativação viral do SDS e dos fitocompostos contribuem para o controle da transmissão dos lentivírus de pequenos ruminantes em colostro e leite caprino.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antiviral do SDS e de produtos naturais provenientes de meliáceas contra lentivírus de pequenos ruminantes presente em colostro e leite caprino.

5.2 Objetivos Específicos

- Avaliar, *in vitro*, a eficácia do docedil-sulfato de sódio (SDS) na eliminação do LVC em colostro e leite de matrizes caprinas;
- Verificar, *in vivo*, a eficácia do docedil-sulfato de sódio (SDS) na eliminação do LVC em colostro e leite de matrizes caprinas;
- Averiguar *in vitro* a eficácia antiviral dos fitocompostos durante o ciclo replicativo das cepas de CAEV_{CO} e MVV_{K1514};
- Verificar *in vitro* a eficácia dos fitocompostos na inativação viral do LVC em colostro e leite caprino.

6 CAPÍTULO I

Emprego do dodecil sulfato de sódio (SDS) como inativador viral e suas perspectivas no controle dos lentivírus de pequenos ruminantes (LVPRs)

Sodium dodecyl sulfate (SDS) as a viral inactivator and future perspectives in the control of small ruminant lentiviruses (SRLV)

Periódico: **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 86, p. 1-9, e0752018, 2019.

Qualis Capes: B3 na Medicina Veterinária; Fator de Impacto: 0.104

DOI: 10.1590/1808-1657000752018

Sodium dodecyl sulfate (SDS) as a viral inactivator and future perspectives in the control of small ruminant lentiviruses (SRLV)

[Emprego do dodecil sulfato de sódio (SDS) como inativador viral e suas perspectivas no controle dos lentivírus de pequenos ruminantes (LVPRs)]

Ana Lídia Madeira de Sousa^{1*}, Raymundo Rizaldo Pinheiro², Juscilânia Furtado Araújo¹, Dalva Alana Aragão de Azevedo¹, Renato Mesquita Peixoto³, Alice Andrioli², Sabrina Tainah da Cruz Silva Bezerra¹, Maria Fátima da Silva Teixeira¹.

¹State University of Ceará – Fortaleza (CE), Brazil

²Embrapa Goats and Sheep – Sobral (CE), Brazil

³Federal University of Acre

*analidiams10@yahoo.com.br

Abstract

Infections by Small Ruminant Lentiviruses (SRLV) affect goats and sheep causing chronic multisystemic diseases that generate great economic losses. The caprine lentivirus (CLV) and the ovine lentivirus (OLV) present tropism for cells of the monocyte/macrophage lineage, which are directly associated with the main route of transmission through the ingestion of milk and colostrum from infected animals. In this manner, controlling this route is of paramount importance. Currently, researches have investigated the use of chemical additives in milk that can preserve colostrum or milk and inactivate microbiological agents. Among the compounds, sodium dodecyl sulfate (SDS) has been shown to be satisfactory in the chemical inactivation of HIV and CLV in milk, and also as a biocide in goat colostrum.

Keywords: Colostrum; Chemical inactivation; Milk; monocyte/macrophage system

Resumo

As Lentivirose de Pequenos Ruminantes (LVPRs) são enfermidades que afetam caprinos e ovinos, causando uma infecção multissistêmica e crônica, que ocasiona grandes perdas econômicas. Os agentes causadores, lentivírus caprino (LVC) e o lentivírus ovino (LVO), apresentam tropismo por células da linhagem monocítico-fagocitária, que estão diretamente associadas a principal via de transmissão, por meio da ingestão de leite e colostro provindo de animais infectados. Deste modo, o controle por esta via é de suma importância. Atualmente, vem se desenvolvendo pesquisas para o uso de aditivos

químicos no leite, que possam conservar o colostro ou leite, e inativar agentes microbiológicos presentes. Dentre estes, o dodecil sulfato de sódio (SDS) vem apresentando resultados satisfatórios na inativação química do HIV e LVC em leite, e ainda como biocida em colostro caprino.

Palavras-chave: Colostro; Inativação química; Leite; Sistema monicítico-fagocitário

INTRODUCTION

The use of chemical compounds as antivirals in humans have been investigated as possible control forms of sexually transmitted diseases, especially in association with preservatives and topical microbicides (KABAMBA et al., 2016). Most of these compounds are surfactants that solubilize bacterial and viral membranes, inactivating the pathogens. Among studies, the most investigated substances are nonoxynol-9, C31G or SAVVY® (Cellegy Pharmaceuticals, Quakertown, PA, EUA), n-Lauroylsarcosine and sodium-dodecyl-sulfate (SDS) (KREBS ET AL., 1999; ROY ET AL., 2001; KABAMBA ET AL., 2016).

SDS is a broad-spectrum surfactant (URDANETA et al., 2005) that have presented efficient activity as a topical microbicide and viral inactivator against HIV (human immunodeficiency virus), HPV (human papillomavirus) and HSV (herpes simplex virus) (PIRET et al., 2002). Antiviral activity in human milk was also investigated in an in vitro study performed by URDANETA et al. (2005). The microbicide effect has also been evaluated in caprine colostrum, which presented effective results (MORALES-DE LA NUEZ et al. 2011). In addition, SOUSA (2016) aimed to prevent milk transmission of the caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) with SDS acting as a prophylactic microbicide and observed a possible reduction of viral load in milk and colostrum.

Hence, this study aimed to briefly review general characteristics and toxicity levels of SDS in addition to its potential as a viral inactivator.

SODIUM DODECYL SULFATE: BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND VIRAL INACTIVATION

General characteristics

Sodium dodecyl sulfate (SDS) or sodium lauryl sulfate (SLS), chemical formula $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ (IUPAC, 2014), is a tenso-active agent that have detergent properties. SDS

possesses a zwitterionic form in aqueous solution with two distinct portions, polar and apolar, in opposite ends of a single molecule (Fig. 1). The polar end is formed by a sulfate group while the opposite end, apolar, is composed by a long chain hydrocarbon, which may be linear, branched or aromatic according to the diluent solution (SINGER; TJEERDEMA, 1993).

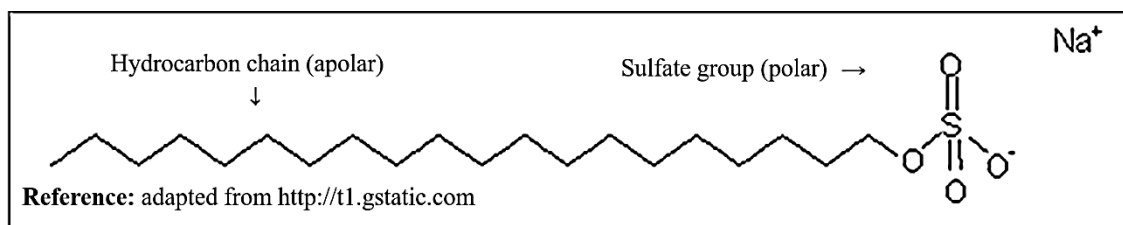


Figure 1 – Chemical representation of SDS

SDS chemical structure was described for the first time by Lottermoser and Stoll in Germany, 1993. Afterwards, this compound was classified as tenso-active or surfactant containing 6 – 18 carbon atoms. Its use as a detergent propagated the chemistry technology in the first half of the 19th century when synthetic alternatives were developed to substitute detergents of animal origin, which were often used at the time (KIRK-OTHMER, 1984).

SDS is useful due to its chemical nature that provides adequate ionic balance, solubilizing fats and oils, and the formation of microemulsions. Hence, there are different uses for this substance, such as an ingredient in cleaning products, cosmetic production and in biological research (SINGER; TJEERDEMA, 1993). SDS has cytolytic properties, which are useful in the preparation of subcellular materials for biochemical studies, such as plasmatic membranes, organelles and genetic material. In addition, it also aided in the development of proteomics, identification of proteins and determination of structures with polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (SHAPIRO et al., 1967).

Cytolytic activities

Cell membranes are characterized by an architecture containing lipid bilayers. These lipids are amphipathic with a hydrophobic and a hydrophilic end in the same molecule. These membranes are impermeable to most polar or charged solutes but are permeable to apolar compounds (NELSON; COX, 2011).

In direct contact with cells, SDS cause physical and biochemical effects. The main targeted structure is the cell membrane in every type of cell, and it is able to undo its

barrier capacity (BENOIT et al., 1987; PARTEARROYO et al., 1990). The cytotoxic effects are dependent of absolute concentrations and lipid/surfactant molar ratios. When in low concentrations of surfactants, cell membranes lose their barrier capacity increasing permeability (KALMANZON et al., 1992). On the other hand, equal or superior surfactant/lipid ratios cause cell lysis (PARTEARROYO et al., 1990).

According to BARTNIK (1992), three interaction phases may be established when SDS is added in high concentrations and surfactant levels surpasses those of cellular lipids. Initially, the tenso-active may cause membrane permeability alterations. Then, if it exceeds cytolytic concentrations, the lamellar structure of the membrane is solubilized releasing proteins, lipoproteins and micelles, determining a complete cell lysis. In the third phase, phospholipid separation and structural denaturation of proteins occur. SDS is one of the ionic tenso-actives that can perform covalent bonds, which usually results in conformational alterations and simultaneous loss of biological activity.

Toxicity levels

SDS toxicity is attributed to the use of high doses of the product. According to the data provided by the *United Nations Environment Programme* (UNEP, 1997), this substance may be considered with a low potential risk for humans and the environment. Table 1 shows toxicity levels of SDS in several species.

Table 1: SDS toxicity levels in different species

Species	Application	Results	Reference
Rats	Intraperitoneal	LD ₅₀ = 210 mg/kg	EPSTEIN et al., 1939
	5 and 10% in water for 5 days	100% lethality	EPSTEIN et al., 1939
	2% and 4% in feed for 4 months	No reaction and growth reduction, respectively.	FITZHUGH; NELSON, 1948
	Intravenous	LD ₅₀ = 188 mg/kg	CASCORBI et al., 1963
	Acute oral Repeated doses (oral hepatotoxicity)	LD ₅₀ ¹ = 1200 mg/kg NOAEL ² = 100 mg/kg/day	UNEP, 1997 UNEP, 1997
Guinea pigs	Acute dermal	LD ₅₀ = >1200 mg/kg	UNEP, 1997
Rabbits and mouse	Toxicity for development/teratogenicity	NOAEL ≤ 300 mg/kg/day (maternal toxicity) NOAEL = 600 mg/kg/day (fetal malformation)	UNEP, 1997
Rabbits	Acute dermal toxicity	LD ₅₀ = 600 mg/kg	UNEP, 1997
Mouse	Intraperitoneal	LD ₅₀ = 250 mg/kg	GALE; SCOTT, 1953
	Oral	LD ₅₀ = 2700 mg/kg	GLOXHUBER, 1972

	Reproductive route (male fertility)	NOAEL = 1000mg/kg/day	UNEP, 1997
Dogs	Oral: 135 mg/kg/day for 10 months	No reaction	FOGELSON; SHOCH, 1944
Goat kids	Oral: 0.5% in milk	Apathy and light diarrhea in 7 days of treatment	SOUSA, 2016
	Oral: 1% in milk	Apathy, severe diarrhea and death in 72h of treatment	SOUSA, 2016

¹: Average lethal concentration, ²: No adverse effects were observed

The estimated human exposure results reported by UNEP (1997) revealed that SDS does not present risk to the human health. According to the data, daily use of SDS in kids (15 kg) and in babies (5kg) were considered safe with doses of 0.158 mg/kg/day and 0.034 mg/kg/day, respectively. In addition, maximum consumption of SDS was 1g/kg/day for kids. This includes exposure to body lotions and oral ingestion of contaminated water or toothpaste (DREISBACH; ROBERTSON, 1987).

Use as a viral inactivator

SDS has showed potent inhibition of enveloped and non-enveloped viruses causing dissociation of the viral envelope and capsid proteins through denaturation. These proteins play different roles in the viral replication cycle from adhesion to viral encapsidation (PIRET et al., 2002).

Sexually transmitted diseases have global incidence, morbidity and mortality with significant levels. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), herpes simplex virus (HSV) and human papillomavirus (HPV) are part of these rates (BRUGHA et al., 1997). SDS mechanism of action has shown efficiency in chemically inactivating these viruses, denaturing proteins from the envelope and/or capsid in HeLa cell culture (human cells from Henrietta Lacks) (PIRET et al., 2002, KREBS et al., 1999). Furthermore, this surfactant does not compromise the vaginal mucosa of rabbits. Hence, it is a good option for use as a topical microbicide to prevent sexually transmitted pathogenic agents, which could be a high impact tool to the public health (PIRET et al., 2000; 2002).

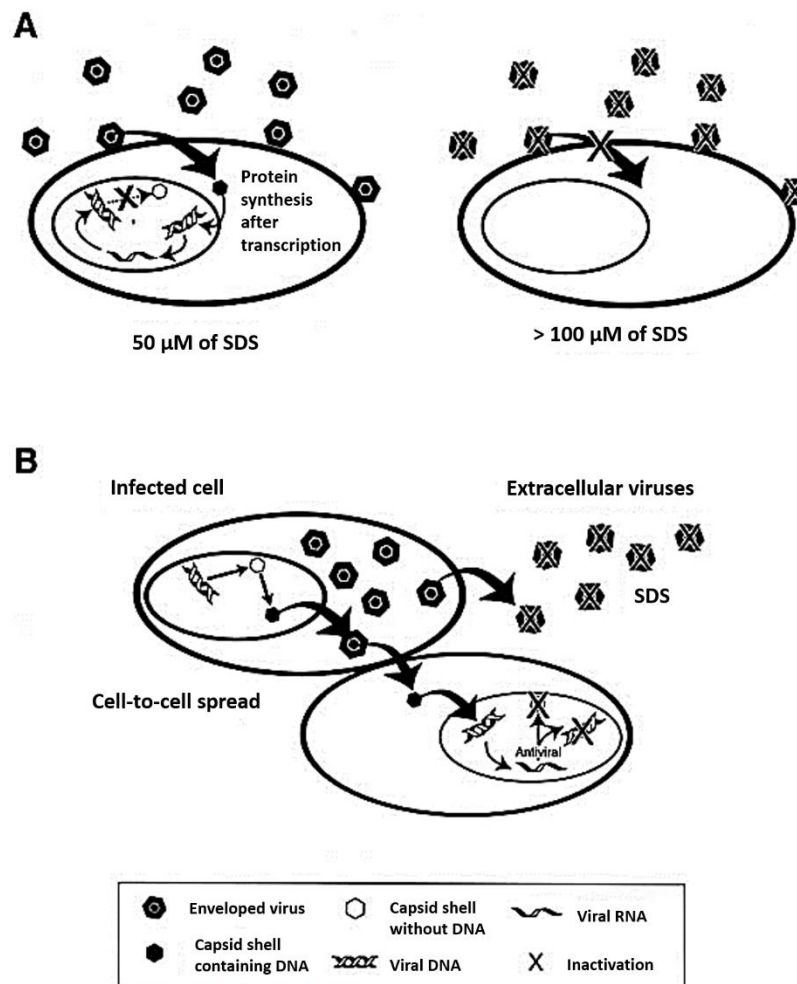


Figure 2 – Dose-dependent mechanism of action of SDS against HSV-1 (PIRET et al., 2002 with modifications).

Figure 2 demonstrates a dose-dependent effect of SDS against HSV-1 in VERO cells (African green monkey kidney cells). Low concentrations ($\leq 50 \mu\text{M}$) did not reduce synthesis of viral glycoprotein D (gD). However, viral infectivity was completely inhibited, which suggests that the surfactant could interfere with the maturation of nucleocapsids and with encapsidation of nucleic acids (Fig. 2, A). In contrast, viral activity in SDS concentrations higher than $100 \mu\text{M}$ caused a reduction of 65.1% in gD synthesis. In these conditions, envelope solubilization of most of the investigated viruses was observed and the remaining particles were not able to penetrate cells and continue with the natural replication process (Fig. 2, B) (PIRET et al., 2000; 2002).

URDANETA et al., (2005) demonstrated that 0.1% SDS could effectively inactivate HIV-1 in milk and the proposed treatment concentrations were within the safe limits for SDS ingestion in kids. These authors evaluated their samples in a rapid in vitro system (MAGI - Multinuclear Activation of Galactosidase Indicator) that quantifies viral

infectivity after microbicide treatment. The results showed that SDS use for 10min at 0.1% and 0.5% in HeLa cell culture was sufficient to totally inhibit viral infection caused by HIV-1 in maternal milk.

URDANETA et al. (2005) and HARTMANN et al. (2006) described SDS as an efficient microbicide in the treatment of human milk against HIV-1 with the following characteristics: efficient in low doses, low toxicity level, broad-spectrum of microbicide activity, insipid and inodorous. Hence, it can be used to conserve nutritional and immune-related traits of milk. Due to the broad-spectrum, SDS may also eliminate other pathogens from milk (secondary contaminant bacteria), which could potentially contaminate it during manipulation.

In goat production, MORALES-DE LA NUEZ et al. (2011) demonstrated that caprine colostrum treated with SDS at 1% reduced bacterial load at a rate similar to pasteurization. However, IgG destruction in SDS treated colostrum is significantly lower than pasteurized colostrum. In addition, goat kids fed with colostrum added 1% of SDS did not present pathological deficit or alterations in the transmission of passive immunity.

An *in vitro* study with SDS at 0.25%, 0.5% and 1% in colostrum and milk performed by SOUSA (2016) revealed dose-dependent effects in caprine synovial membrane cell cultures (CSM). According to the SDS concentration in treatments (0.25% and 0.5%), a gradual reduction of cytopathic effects occurred (CPE). On the other hand, cells with signs of viral infection were not observed in colostrum treated with 1% SDS. In milk, the absence of CPE was more relevant, which was observed in concentrations of 0.5% and 1%. In addition, CLV particles were not identified in milk samples treated with 1% SDS and investigated with nested polymerase chain reaction (nPCR), which demonstrates antiviral activity against this pathogen.

The same author performed *in vivo* studies, in which goat kids were fed with colostrum and milk from CAE positive goat nannies and treated with SDS in the same concentrations used in the *in vitro* experiment. Hence, animals that received SDS in 0.25% and 0.5% presented positive results for the CLV in the early phases of monitoring. However, animals that received 1% SDS presented positive result only after 90 days of study. Probably, this dosage diminished viral load and consequently delayed the infection but did not fully prevented it. Nonetheless, this concentration promoted gastrointestinal complications, such as profuse diarrhea.

GENERAL CHARACTERISTICS OF SMALL RUMINANT LENTIVIRUS (SRLV) INFECTIONS

Goat and sheep production are associated to traditional systems of subsistence and to economic factors, where animal production tends to be more intensive and demands more efficient production systems (GUILHERME et al., 2017). However, health management with late diagnoses of diverse diseases of different etiologies drastically interfere in the performance of these activities (AZEVEDO et al., 2017). Among the most relevant health problems are the infections caused by small ruminant lentiviruses (SRLV). These pathogens are classified in two phylogenetic groups, the caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) or Caprine Lentivirus (CLV), and the Maedi-Visna virus (MVV) or ovine lentivirus (OLV) (BLACKLAWS, 2012).

These diseases cause considerable losses in goat and sheep productions, which may compromise profitability of the animal farm (AZEVEDO et al., 2017). In addition, the main clinical signs of both infections include arthritis, encephalitis, mastitis and, less frequently, respiratory conditions. Furthermore, animals from all ages, sex and races are susceptible (FRANKE, 1998).

SRLV have several transmission pathways, such as the lactogenic route, either through contaminated milk or colostrum (PISONI et al., 2010). The reproductive transmission may occur through the presence of the virus in the semen of infected breeders (TRAVASSOS et al., 1999; ANDRIOLI et al., 2002; 2006; SOUZA, 2012). The horizontal route may occur in direct contact between animals through feces, saliva, urogenital and respiratory secretions (RADOSTITS et al., 2002, SOUZA et al., 2015). The vertical transmission may occur via transplacental passage (RODRIGUES et al., 2017).

LACTOGENIC TRANSMISSION OF SRLV

Mononuclear phagocyte system

Monocytes and macrophages play a key role in the regulation of the immune system, guiding innate and specific immune responses (FLORES, 2007). A monocyte circulates the bloodstream until it migrates to a tissue and mature into a macrophage (TIZARD, 2014).

These cells are present in tissues, blood, colostrum and milk, among other biological fluids, which are related to the main transmission pathways of SRLV (ZINK;

JOHNSON, 1994). SRLV-free flocks usually get infected through contact with carrier animals short after introduction (PISONI et al., 2010).

Pathogeny of these lentivirus infections is directly related to cells of the mononuclear phagocyte system with a focus on differentiation and maturation of monocytes into macrophages, where the viral multiplication occurs (NARAYAN et al., 1983; GENDELMAN et al., 1986). However, when in vivo, macrophages are the most infected cells (NARAYAN; CLEMENTS, 1989; LUJÁN et al., 1994; BRODIE et al., 1995). Lymphocytes may also be targeted with a less efficient viral multiplication (ZINK; JOHNSON, 1994).

Milk and colostrum cells

Colostrum is characterized as a secretion from the mammary gland produced in the last weeks of pregnancy that holds essential nutrients for the nutrition and immunological development of the newborn (HERNÁNDEZ-CASTELLANO et al., 2014, SÁNCHEZ-MACÍAS et al., 2014, TIZARD, 2014). Milk is defined as a lacteous secretion practically free of colostrum. It is composed in general by 87% of water, carbohydrates, lipids, proteins, numerous mineral salts, lactose, urea, lactic acid, creatinine, amino acids and water-soluble vitamins (SERTÃOBRAS, 1952; SÁNCHEZ-MACÍAS et al., 2014).

Somatic cells that compose milk and colostrum may originate from epithelium or the immune system. Epithelial cells are derived from natural peeling of the secretory epithelium of the mammary gland. Cells from the immune system, usually leukocytes (macrophages, lymphocytes and neutrophils), are those that migrate from the bloodstream to the alveoli (HERNÁNDEZ-CASTELLANO et al., 2014, SÁNCHEZ-MACÍAS et al., 2014, TIZARD, 2014).

Lactogenic transmission via

Lactogenic transmission is a natural model of infection that is more effective in lentiviruses. It plays a key role in SRLV biology, as in other lentiviruses, such as HIV and SIV. In fact, it is considered the main pathway of SRLV transmission in goats, since it guarantees the dissemination between generations and the persistence in flocks on a population level. Maternal leukocytes are absorbed by the intestine of newborns and enter their peripheral circulation. The great intestinal permeability in this phase favor the entry of the virus through the ingestion of contaminated colostrum (PISONI et al., 2010).

According to HERRMANN-HOESING et al. (2007), animals are exposed to infection after ingesting colostrum, either by free viruses or proviruses within monocytes/macrophages, which demonstrates efficient transmission between mother and offspring. Goat kids that are born from seronegative nannies and receive colostrum and/or milk from seropositive females soon become infected. Hence, a single ingestion of these fluids is sufficient to start the infection (RADOSTITS et al., 2002).

Furthermore, lactogenic transmission was also observed in interspecies contact as described by SOUZA et al. (2015). In this study, newborn lambs received colostrum from goat nannies positive for CAE and during the seven days of the experiment, seven out of nine (77.78%) of the group were positive for the virus in nPCR.

METHODS FOR BLOCKING THE LACTOGENIC TRANSMISSION

Several prophylactic measures for SRLV have been suggested in studies throughout the years (ROWE et al., 1992, PERETZ, et al., 1993, ALVES, 1999, NOGUEIRA et al., 2009). Among these, the control of the lactogenic pathway is critical due to its potential of transmission from breeders to their offspring (ROWE ET AL., 1992; PERETZ ET AL., 1993; RADOSTITS ET AL., 2002; PISONI ET AL., 2010; SOUZA ET AL., 2015). The most used techniques by farmers are:

- **Use of artificial colostrum:** this is composed by 700 mL of bovine milk (healthy and specifically free of bovine viral diarrhea – BVD), 300 mL of blood serum from negative goats or sheep, and one chicken egg (ALVES, 1999). The serum is obtained through blood collection without anticoagulant following centrifugation.
- **Use of bovine colostrum:** colostrum from cows are also recommended to feed goats and sheep. However, donors for this purpose must be healthy, especially concerning bovine leukosis to prevent interspecies transmission (PERETZ, et al., 1993, NOGUEIRA et al., 2009).
- **Thermal treatment of colostrum and milk:** thermization procedure may be performed in colostrum, transition milk and common milk. For example, colostrum is collected in plastic bottles from females after delivering, which are sealed and heated at 56°C in water bath for one hour. Then, bottles are removed and cooled naturally to room temperature before being stocked at -15°C (PERETZ, et al., 1993, ANDRADE, 2008, NOGUEIRA et al., 2009).

- **Milk pasteurization:** milk may be conserved through pasteurization, which is a method that maintains organoleptic and nutritional characteristics and ensures destruction of pathogenic micro-organisms guaranteeing a healthy food (CHEFTEL et al., 1989; RIEDEL, 1996). There are two types of pasteurization, which are slow and fast. In slow pasteurization, milk is heated to 63 to 65 °C for 30 minutes and cooled to 4°C. During the heating period, milk is moderately agitated to avoid adhesion to the walls of the bottle, to promote uniform heating of all particles and in the same time to avoid foam formation (PRATA, 2001; LEITE et al., 2006). Fast pasteurization of the High Temperature Short Time (HTST) method consists of heating the milk to 72 to 75°C for 15 to 20 seconds following immediate cooling to 5°C, which causes a thermal shock (LEITE et al., 2006).

However, these methods may be considered costly due to the need for trained laborers and equipment, such as water baths or thermizators, and centrifuges. Hence, the search for practical and low-cost alternatives that are efficient in blocking SRLV transmission in colostrum and milk are necessary for farmers to control the dissemination of these diseases in flocks.

CONCLUSION

This study demonstrated the antiviral potential of SDS in the prevention of sexually transmitted diseases and in SRLV prophylaxis. In addition, general aspects of the lactogenic transmission of CLV, advantages of SDS use as a viral inactivator in human research and promising results of its application as a chemical inactivator of CLV were presented. Although several studies have reported the antiviral activity of SDS, there is still a lack of data that can assess its effects on SRLV and the application as a control measure for the lactogenic transmission.

REFERENCES

- ALVES, F. S. F. *Artrite encefalite caprina a vírus: prevenção e controle*. Sobral: Embrapa Caprinos, 1999. 11 p. (Embrapa Caprinos. Circular Técnica, 15).
- ANDRADE, M. L. R. *Avaliação da dinâmica de absorção do colostro em caprinos das raças saanen e moxotó explorados no semi-árido cearense*. 2008. 60f. Dissertação (Mestrado Em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale Do Acaraú – UVA, Sobral – CE, 2008.
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; MOURA-SOBRINHO, P.A. Transferência de embriões em cabras naturalmente infectadas pelo lentivírus caprino. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.24, n.1, p.215-220, 2002.

- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; MARTINS, A. S. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, n.8, p.1313-1319, 2006.
- AZEVEDO, D.; SANTOS, V. S. dos; SOUSA, A.; PEIXOTO, R.; PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI, A.; TEIXEIRA, M. F. da Small ruminant lentiviruses: economic and productive losses, consequences of the disease. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 84, n.1, p.1-10, 2017.
- BARTNIK, F.G. *Interaction of anionic surfactants with proteins, enzymes, and membranes*. In Gloxhuber Ch, Kiinstler K (eds) *Anionic surfactants: Biochemistry, toxicology, dermatology*, 2nd ed. Marcel Dekker: New York, p. 1-42, 1992.
- BENOIT, J.; CORMIER, M.; WEPIERRE, J. Effect of proteins on the assessment of surfactant cytotoxicity by an in vitro test: Possible correlation with in vivo data. *Toxicology In Vitro*, v.1, n.2, p.91-96, 1987.
- BLACKLAWS, B. A. Small ruminant lentiviruses: Immunopathogenesis of visna- maedi and caprine arthritis and encephalitis vírus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v.35, n.1, p.259-269, 2012
- BRODIE, S.; PEARSON, L.; ZINK, M. C.; BICKLE, H. M.; ANDERSON, B. C.; MARCOM, K. A.; DEMARTINI, J.C. Ovine lentivirus expression and disease. Virus replication, but not entry, is restricted to macrophages of specific tissues. *American Journal of Pathology*, v.146, n.1, p.250-263, 1995.
- BRUGHA, R. K.; KEERSMAEKERS, A.; RENTON, E. A. Genital herpes infection: a review. *International Journal of Epidemiology*. v.26, n.4, p.698 -709, 1997.
- CASCORBI, H. F.; RUDO, F. G.; LU, G. G. Acute toxicity of intravenous sodium lauryl sulfate. *Journal of Pharmacological Sciences*, v.52, n.1, p.803-805, 1963
- CHEFTEL, J. C.; CHEFTEL, H.; BESANÇON, P. *Métodos de conservación – calor*. In: *Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos*. v.2, Zaragoza: Acríbia, 1989, p. 236-271.
- DREISBACH, R. H.; ROBERTSON, W.O. *Miscellaneous Chemicals*. In *Handbook of poisoning: Prevention, diagnosis & treatment*. 12th edition. Norwalk, Appleton & Lange; 1987, p.286-291.
- EPSTEIN, S.; THRONDSO, W. D.; TAINTER, M. L. Possible deleterious effects of using soap substitutes in dentifrices. *The Journal of the American Dental Association*, v.26, n.1, p.1461-1471, 1939.
- FITZHUGH, O. G.; NELSON, A. A. Chronic oral toxicities of surface-active agents. *Journal of the American Pharmacists Association*. v.37, n.1, p.29-32, 1948.
- FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*, Ed. da UFSM, Santa Maria, 2007. p. 67.
- FOGELSON, S. J.; SHOCH, D. E. Treatment of gastroduodenal ulcerative disease with sodium alkyl sulfate. *Archives of Internal Medicine*, v.73, n.3, p.212-216, 1944
- FRANKE, C.R. *Controle Sanitário da Artrite-Encefalite Caprina*. Salvador: EDUFBA, 1998. p.70.
- GALE, L.E.; SCOTT, P.M. A pharmacological study of a homologous series of sodium alkyl sulfates. *Journal of the American Pharmacists Association*. v.42, n.5, p.283-287, 1953

GENDELMAN, H. E.; NARAYAN, O.; KENNEDY-STOSKPF, S.; KENNEDY, P. G. E.; GHOTBI, Z.; CLEMENTS, J. E.; STANLEY, J.; PEZESHKPOUR, G. Tropism of sheep lentivirus for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. *Journal Virology*, v.1, n.58, p. 67-74, 1986.

GLOXHUBER, C. H. Toxicology of basic materials in washing and cleaning agents. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, v.74, n.1, p.49-57, 1972

GUILHERME, R. F.; LIMA, A. M. C.; ALVES, J. R. A.; COSTA, D. F.; PINHEIRO, R.R.; ALVES, F. S.F.; AZEVEDO, S. S.; ALVES, C. J. Characterization and typology of sheep and goat production systems in the State of Paraíba, a semi-arid region of northeastern Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, v.38, n.4, p.2163-2178, 2017

HARTMANN, S. U.; WIGDAHL, B., NEELY, E. B.; BERLIN, C. M.; SCHENGRUND, C. L.; LIN, H. M.; HOWETT, M. K. Biochemical analysis of human milk treated with sodium dodecyl sulfate, an alkyl sulfate microbicide that inactivates human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Human Lactation*. v.22, n.1, p.61-74, 2006.

HERNÁNDEZ-CASTELLANO, L.E.; ALMEIDA, A.M.; CASTRO, N.; ARGÜELLO, A. The colostrum proteome, ruminant nutrition and immunity: a review. *Current Protein & Peptide Science*. v.15, n.1, p. 64-74, 2014.

HERRMANN-HOESING, L. M.; PALMER, G. H.; KNOWLES, D. P. Evidence of proviral clearance following postpartum transmission of an ovine lentivirus. *Virology*, v.362, n.1, p.226–234, 2007.

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*. The IUPAC Network, 2014. Disponível em: > <http://www.acdlabs.com/iupac/nomenclature/> < acesso em: 27/11/2014.

KABAMBA, B.; ALEXANDREA H. T.; MUFHANDUA, G. M.; LONDONB E.; CHAKAUYYAA, M. K. Progress and Perspectives on HIV-1 microbicide development. *Virology*, v.497, n.1, p.69-80, 2016.

KALMANZON, E.; ZLOTKIN, E., COHEN, R.; BARENHOLZ, Y. Liposomes as a model for the study of the mechanism of fish toxicity of sodium dodecyl sulfate in sea water. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1103, n.1, p.148-156, 1992.

KIRK-OTHMER. *Encyclopedia of chemical technology*, 3rd ed. New York: John Wiley and Sons, 1984.

KREBS, F.C.; MILLER, S.R.; MALAMUD, D.; HOWETT, M.K.; WIGDAHL, B. Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by nonoxynol-9, C31G, or an alkyl sulfate, sodium dodecyl sulfate. *Antiviral Research*, v.43, n.3, p.157-173, 1999.

LEITE, Z. T. C.; VAITSMAN, D. S.; DUTRA, P. B.; GUEDES, A. Leite e alguns de seus derivados – da antiguidade à atualidade. *Química Nova*, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 876 - 880, 2006.

LUJÁN, L.; BEGARA, I.; COLLIE, D. D. S.; WATT, N. J. Ovine lentivirus (Maedi-Visna virus) protein expression in sheep alveolar macrophages. *Veterinary Pathology*, v.31, n.6, p.695-703, 1994.

MORALES-DE LANUEZ, A.; MORENO-INDIAS, I.; SANCHEZ-MACIAS, D.; CAPOTE, J.; JUSTE, M.C.; CASTRO, N.; HERNANDEZ-CASTELLANO, L.E.; ARGUELLO, A. Sodium dodecyl sulfate reduces bacterial contamination in goat

colostrum without negative effects on immune passive transfer in goat kids. *Journal of Dairy Science*, v.94, n.1, p.410-415, 2011.

NARAYAN, O.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; SHEFFER, D.; GRIFFIN, D.E.; CLEMENTS, J. E. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. *Infection and Immunity*, v. 41, n. 1, p. 67-73, 1983.

NARAYAN, O.; CLEMENTS, J.E. Biology and pathogenesis of lentiviruses. *Journal of General Virology*, v.70, n.7, p.1617-1639, 1989.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NOGUEIRA, D. M.; PINHEIRO, R. R.; ALVES, F. S. F. *Artrite encefalite caprina viral: um alerta aos produtores*. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2009. 4 p. (Embrapa Semiárido. Comunicado Técnico, 139).

PARTEARROYO, M. A.; OSTOLAZA, H., GONI, F. M.; BARBERA-GUILLEM, E. Surfactant-induced cell toxicity and cell lysis. *Biochemical Pharmacology*, v.40, n.6, p.1323-1328, 1990.

PERETZ, G.; ASSO, J.; DEVILLECHAISE, P. Le CAEV: Revue des connaissances actuelles et conséquences pratiques. *Revue de Médecine Vétérinaire*, v.144, n.2, p. 93-98, 1993.

PIRET, J.; LAMONTAGNE, J.; BESTMAN-SMITH, J.; ROY, S.; GOURDE, P.; DÉSORMEAUX, A.; OMAR, R.F.; JUHÁSZ, J. AND BERGERON, M.G. In vitro and in vivo evaluations of sodium lauryl sulfate and dextran sulfate as microbicides against herpes simplex and human immunodeficiency viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, n.1, p.110-119, 2000.

PIRET, J.; DÉSORMEAUX A.; BERGERON, M.G. Sodium Lauryl Sulfate, a Microbicide Effective Against Enveloped and Nonenveloped Viruses. *Current Drug Targets*, v.3, n.1, p. 17-30, 2002.

PISONI, G.; BERTONI, G.; MANAROLLA, G.; VOGT, H. R.; SCACCABAROZZI, L.; LOCATELLI C.; MORONI, P. Genetic analysis of small ruminant lentiviruses following lactogenic transmission. *Virology*, v.407, n.1, p. 91-99, 2010

PRATA, L. F. *Fundamentos de ciência do leite*. São Paulo: Unesp, 2001. p.287.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. *Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 1098 – 1101.

RIEDEL, G. *Controle Sanitário do Alimento*. 2ª ed., São Paulo: Atheneu, 1996. p.230.

RIISPOA - *REGULAMENTO DA INSPEÇÃO INDUSTRIAL E SANITÁRIA DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL*, Título VIII - Inspeção Industrial e Sanitária do Leite e Derivados, Capítulo I - Leite em Natureza. p.78-92. Disponível em >http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf> acesso em: 15/03/2018.

RODRIGUES, A. de S.; PINHEIRO, R. R.; BRITO, R. L. L. de; OLIVEIRA, L. S.; OLIVEIRA, E. L. de; SANTOS, V. W. S. dos; ANDRIOLI, A.; SOUZA, T. S. de; DIAS, R. P.; TEIXEIRA, M. F. da S.; BRITO, R. L. L. de Evaluation of caprine arthritis-

encephalitis virus transmission in newborn goat kids. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.84, n.1, p. 1-5, 2017.

ROWE, J. D.; EAST, N. E.; THUNNOND, M. C.; FRANTI, C. E.; PEDERSEN, N. C. Cohort study of natural transmission and two methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats on a California dairy. *American Journal of Veterinary Research*, v.53, n.12, p.2386-2395, 1992.

ROY, S.; GOURDE, P.; PIRET, J.; SORMEAUX, A.; LAMONTAGNE, J.; HAINEAULT, C.; OMAR, R. F.; BERGERON, M. G. Thermoreversible Gel Formulations Containing Sodium Lauryl Sulfate or n-Lauroylsarcosine as Potential Topical Microbicides against Sexually Transmitted Diseases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 6, p.1671–1681, 2001.

SÁNCHEZ-MACÍAS, D.; MORENO-INDIAS, I.; CASTRO, N.; MORALES-DELANUEZ, A.; ARGÜELLO, A. From goat colostrum to milk: physical, chemical, and immune evolution from partum to 90 days postpartum. *Journal of Dairy Science*, v.97, n.1, p.10-6, 2014.

SERTÃOBRAS. *REGULAMENTO DA INSPEÇÃO INDUSTRIAL E SANITÁRIA DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL*. Título VIII - Inspeção Industrial e Sanitária do Leite e Derivados, Capítulo I - Leite em Natureza. 1952. p.78-92. Available from: <<https://www.sertaobras.org.br/wp-content/uploads/2010/11/RIISPOA.pdf>>. Access on: Mar. 15 2018.

SHAPIRO, A. L.; VIFIUELA, E.; MAIZEL, J.V. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and Biophysical Research*, v.28, n.5, p. 815-820, 1967.

SINGER, M. M.; TJEERDEMA, R.S. Fate and effects of the surfactant sodium dodecyl sulfate. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. v.133, n.1, p.95–149, 1993.

SOUSA, A. L. M. *Utilização do dodecil sulfato de sódio (SDS) no leite e colostro como inativador químico do vírus da Artrite Encefalite Caprina*. 2016. 96f. Dissertação (Mestrado Em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale Do Acaraú – UVA, Sobral – CE, 2016.

SOUZA, K. C.; PINHEIRO, R. R.; SANTOS, D. O.; BRITO, R. L. L.; RODRIGUES, A. S.; SIDER, L. H.; PAULA, N. R. O.; AVILA, A. A.; CARDOSO, J. F. S.; ANDRIOLI, A. Transmission of the caprine arthritis–encephalitis virus through artificial insemination. *Small Ruminant Research*, v.109, n.2, p.193–198, 2012.

SOUZA, T. S.; PINHEIRO R. R.; COSTA, J. N.; LIMA, C. C. V; ANDRIOLI, A.; AZEVEDO, D. A. A, SANTOS, V. W. S; ARAÚJO, J. F; SOUSA, A. L. M; PINHEIRO, D. N. S; FERNANDES, F. M. C; COSTA NETO, A. O. Interspecific transmission of small ruminant lentiviruses from goats to sheep. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.46, n.3, p. 867-874, 2015.

TIZARD, I.R. *Imunologia Veterinária*. 9. Ed. Holanda: Elsevier, 2014

TRAVASSOS, C.; BENOÎT, C.; VALAS, S.; SILVA, A. G.; PERRIN, G. Caprine Arthritis-Encephalitis Virus in semen of naturally infected bucks. *Small Ruminant Research*, v. 32, n. 2, p. 101-106, 1999.

United Nations Environment Programme (UNEP): SIDS initial assessment report. Sodium dodecyl sulfate (CAS No. 151- 21-3). In Screening Information Data Sheet (SIDS)

for High Volume Chemicals Volume 4, Part 2 Volume 4. Edited by: UNEP/OECD/UN/IRPTC. Geneva, United Nations; 1997:1-39.

URDANETA, S.; WIGDAHL, B.; NEELY, E. B.; BERLIN, C. M., JR.; SCHENGRUND, C. L.; LIN, H. M.; HOWETT, M. K. Inactivation of HIV-1 in breast milk by treatment with the alkyl sulfate microbicide sodium dodecyl sulfate (SDS). *Retrovirology*, v. 2, n.1, p.28, 2005.

ZINK, M. C., JOHNSON, L. K. Pathobiology of lentivirus infections of sheep and goats. *Virus Research*, v.32, n.2, p.139-154, 1994.

7 CAPÍTULO II

***In vitro* and *in vivo* evaluation of sodium dodecyl sulfate (SDS) as an inactivator of caprine lentivirus (CLV) in colostrum and milk**

Avaliação *in vitro* e *in vivo* do dodecil sulfato de sódio (SDS) como inativador do lentivírus caprino (LVC) em colostro e leite

Periódico: **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**

v.70, n.5, p.1459-1467, 2018

Qualis Capes: A2 na Medicina Veterinária; Fator de impacto: 0.354

DOI: 10.1590/1678-4162-9556

***In vitro* and *in vivo* evaluation of sodium dodecyl sulfate (SDS) as an inactivator of caprine lentivirus (CLV) in colostrum and milk**

[*Avaliação in vitro e in vivo do dodecil sulfato de sódio (SDS) como inativador do lentivírus caprino (LVC) em colostro e leite*]

A.L.M. Sousa^{1*}, R.R. Pinheiro², J.F. Araújo¹, V.W.S. Santos⁴, D.A.A. Azevedo¹, R.M. Peixoto¹, V. Souza², A. Andrioli², E.M. Damasceno³, T.V.M. Dantas⁵, M.F.S. Teixeira¹

¹ Universidade Estadual do Ceará - Fortaleza, CE

² Embrapa Caprinos e Ovinos - Sobral, CE

³ Universidade Estadual Vale do Acaraú - Sobral, CE

⁴ Universidade Federal Rural do Semiárido - Mossoró, RN

⁵ Embrapa Tabuleiros Costeiros - Brasília, DF

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate *in vitro* and *in vivo* the effect of sodium dodecyl sulfate (SDS) on the caprine lentivirus (CLV) in colostrum and milk. This was performed to develop a practical and efficient method of blocking the lactogenic transmission of the virus. In the *in vitro* experiment, colostrum and milk were treated with 0.25%; 0.50% and 1% SDS. Then, somatic cells of colostrum and milk were submitted to co-culture with caprine synovial membrane cells (CSM). In the *in vivo* test, goats were fed with colostrum and milk provided from CLV-positive goats treated with SDS in the same concentrations used in the *in vitro* experiment. Animals were tested by nested polymerase chain reaction (nPCR) and Western blot (WB) assays. In the *in vitro* experiment, inhibitory activity against CLV without inactivation occurred in colostrum with all SDS concentrations. However, concentrations of 0.25 and 0.5% SDS presented only inhibitory activity against CLV in milk cells, and 1% concentration provided inactivation of the virus. In the *in vivo* tests, none of the three concentrations of SDS was effective in inactivating LVC in colostrum or goat milk, which was confirmed by seroconversion and presence of proviral DNA in animals afterwards.

Keywords: monocyte-phagocytic system, viral inactivation, surfactant, small ruminant lentiviruses

RESUMO

O objetivo da pesquisa foi avaliar *in vitro* e *in vivo* o efeito do dodecil sulfato de sódio (SDS) sobre o lentivírus caprino (LVC) no colostro e no leite, a fim de desenvolver um método prático e eficiente no bloqueio da via de transmissão lactogênica do vírus. No experimento *in vitro*, o colostro e o leite de cabras positivas foram tratados com SDS a 0,25%, 0,50% e 1,0%. Em seguida, as células somáticas do colostro e do leite foram obtidas e direcionadas ao cocultivo com células de membrana sinovial caprina (MSC). No teste *in vivo*, os cabritos foram alimentados com colostro e leite providos de cabras positivas para LVC, tratados com SDS nas mesmas concentrações usadas no teste *in vitro*. Os animais foram acompanhados pelos testes de reação em cadeia da polimerase *nested* (nPCR) e *western blot* (WB). Nos resultados *in vitro*, no colostro, observou-se que, em todas as concentrações de SDS, ocorreu uma atividade inibitória contra o LVC, sem a inativação. Em relação às células do leite, o SDS apresentou, nas concentrações de 0,25 e 0,5%, atividade inibitória contra o LVC, e na concentração de 1%, houve inativação viral. Nos testes *in vivo*, as três concentrações de SDS testadas não foram efetivas na inativação do LVC no colostro e no leite caprino, o que se comprovou pela soroconversão e pela presença de DNA proviral nos animais.

Palavras-chave: sistema monocitofagocitário, inativação viral, surfactante, lentivirose de pequenos ruminantes

INTRODUCTION

Small ruminant lentiviruses (SRLVs) are diseases caused by viruses of the Retroviridae family, genus *Lentivirus*. These pathogens are divided in two species Maedi-Visna virus (MVV) and Caprine Lentivirus (CLV) (Pisoni *et al.*, 2005). SRLVs cause significant economic losses in goat production (Carneiro, 2011) and clinically cause interstitial pneumonia, arthritis, mastitis and progressive emaciation, in addition to neurologic conditions in goat kids (Callado *et al.*, 2001).

Lactogenic transmission in either colostrum or milk is a natural model of infection recognized in lentiviruses in general. This form guarantees viral dissemination between generations and persistence of the pathogen in the flock in a population level. In addition, this aspect has a fundamental role in the biology of these viruses, considering that it is one of the main forms of transmission (Pisoni *et al.*, 2010). According to Herrmann-Hoesing, *et al.* (2007), animals are exposed to infection by the ingestion of

colostrum contaminated with free viral particles and proviruses within monocytes and macrophages, which are then absorbed in the gastrointestinal tract.

Among the blockade techniques of the virus in lactogenic transmission, thermization can be performed in colostrum, transition milk and common milk. Colostrum, for instance, after collection from does soon after giving birth may be placed in plastic bottles, which are sealed and submitted to water bath at 56°C for an hour. Then, bottles are removed and cooled to room temperature, which may then be stocked at -20°C until milk feeding (Peretz, *et al.*, 1993; Andrade, 2008). However, this method may present costs, considering the necessary equipment, such as water bath or heater, and technical labor. Therefore, low cost and practical alternatives that effectively block SRLVs transmission in colostrum and milk are necessary for goat farmers.

Some studies correlating the use of chemical additives in milk with an inhibitory activity of microorganisms have been performed (Muller e Syhre, 1975; Krebs *et al.*, 1999; Urdaneta *et al.*, 2005). Among these, sodium dodecyl sulfate (SDS), a surfactant with cytolytic properties, presents a possible antiviral activity in cell cultures of HIV-1 (*Human immunodeficiency virus type 1*), HSV (*Herpesvirus*) and HPV (*Papillomavirus*) (Piret *et al.*, 2002). Krebs *et al.* (1999) and Urdaneta *et al.* (2005) demonstrated that 0.1% SDS may be effective in inactivating HIV-1 in milk and reported that this concentration is in accordance with safe limits for child consumption. In addition, other studies indicate that 1% SDS in colostrum is an effective biocide and there is no interference in passive transference of immunity or health problems in goat kids (Morales-De La Nuez *et al.*, 2011). Therefore, this study aimed to evaluate *in vitro* and *in vivo* the use of sodium dodecyl sulfate (SDS) in colostrum and milk positive for the caprine lentivirus (CLV) in order to develop a practical and efficient method of blocking the lactogenic transmission of the virus.

MATERIAL AND METHODS

This study was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals of the Embrapa Goats and Sheep with the protocol number 012/2014.

The experiment was performed in the same location and divided in two phases (*in vitro* and *in vivo*). In the first phase, colostrum of five adult goat nannies seropositive for CLV, which were tested with Western blot technique, was collected in sterile tubes after giving birth. Approximately 25mL of colostrum was collected from each animal and samples were combined in a pool, which was subdivided in 12 aliquots of 10mL each.

Milk collection was performed in the same animals after 30 days following the same methodology.

SDS (CEQuímica®, Brasil) treatment was performed adding the compound to colostrum and milk samples in the concentrations of 0.25%, 0.5% and 1% in triplicate for 15min. Control treatments were used in colostrum and milk without adding SDS. Then, samples were centrifuged at 3,000g for 15min at 4°C. Somatic cells were obtained following the methodology of Karanikolaou *et al.* (2005).

In order to perform co-culture with caprine synovial membrane cells (CSM), biological samples from SDS treatment step in colostrum and milk were washed with 1000µL of 1X PBS (phosphate-buffered saline: 8g NaCl; 0.2g KCl; 0.2g KH₂PO₄; 1.15g Na₂HPO₄ and 1000 mL of H₂O q.s.p.; components: Sigma-Aldrich®, EUA) for removing SDS. Then, 1000µL of minimal essential medium (MEM - Gibco®, EUA), treated with 2% amphotericin B (Sigma-Aldrich®, EUA), 3% penicillin and streptomycin (P/S - Gibco®, EUA), 1% gentamycin (Sigma-Aldrich®, EUA) and 10% fetal bovine serum (FBS - Gibco®, EUA) was added. Then, aliquots of 100µL of samples were distributed in 24 well plates in eight repetitions, in which 1900µL of MEM treated with 5% of FBS was added. A total of 16 control wells were used throughout the culture period. In half, only CSM cells were added as negative control. In the other half of wells, CSM cells infected with standard sample of CLV (CAEVco) with an initial titer of 10^{4.8} TCID₅₀/mL were added as positive control. Plates were incubated in 5% CO₂ at 37 °C for 24h. Then, CSM cells were added in eighth passage in the concentration 2.0 x 10⁵ cells/µL, following incubation in the same previous conditions. In every seven days, media were replaced and cellular trypsinization was performed, and a total duration of 63 days of culture. Supernatants were collected and separated per treatment to be submitted to nested polymerase chain reaction (*nPCR*). Following culture, four wells of each treatment were stained with violet crystal (0.1%) and the remaining was submitted to trypsinization to collect cellular material.

Proviral DNA extraction of cellular supernatant from co-culture was performed according to the methodology by Feitosa (2012) and *nPCR* was performed according to Barlough *et al.* (1994).

In phase two of experimentation (*in vivo*), SDS was tested in 31 goat kids, male, born of females negative for CLV by WB and *nPCR*. Three experimental groups were formed according to the concentrations of SDS, containing seven goat kids each. In addition, two control groups (positive and negative) were formed with five animals. Goat

kids were immediately separated after birth, weighted and submitted to the same diagnostic tests.

SDS was diluted from a standard concentration (SC) to 10% using 100g SDS for every 1000mL of sterile Milli-Q water. To form the concentrations of 0.25%, 0.5% and 1%, the volumes 25mL, 50mL and 100mL of SC were used, respectively, for every liter of caprine colostrum or milk used in feeding the animals of each experimental group.

Inoculum was prepared with SDS using colostrum and milk collected daily from positive nannie goats. Before any treatment, and aliquot (10mL) of colostrum and milk were collected for *n*PCR test to confirm the presence of CLV in the samples. Then, colostrum and milk were treated with SDS in the previous concentrations for 15min and administered to the goat kids. Negative control animals received colostrum and milk treated thermally (56°C for 60min) and positive control received colostrum and milk from infected goats. Treatments were administered to animals for six days. Then, animals received thermally treated milk until weaning.

Along with milking, experimental monitoring was performed, in which blood collection was performed for diagnostic tests in days 0, 7, 15, 30 and every month for a semester. Blood was collected with venipuncture of jugular vein. Blood serums and leucocytes were maintained in microtubes (*Eppendorf*®, EUA) and frozen at -20°C until WB was performed, which followed methodology by Pinheiro *et al.*, (2011), and *n*PCR.

RESULTS AND DISCUSSION

Viral cytopathic effects were investigated in *in vitro* evaluation with co-culture of CSM and somatic cells of colostrum and goat milk treated with SDS at 0.25%, 0.5% and 1% after 63 days of culture (Table 1). Colostrum treatments of 0.25% and 0.5% SDS revealed a gradual decrease in the presence of syncytium and cell destruction. The concentration of 1% SDS did not cause cytopathic effects, which is an indication of CLV infection. In milk, 0.25% SDS treatment reduced the formation of syncytium and cell destruction. The concentrations of 0.5% and 1% did not produce cytopathic effects.

Table 1. Levels of cytopathic effects in CSM cells after co-culture with somatic cells of colostrum and milk treated with SDS.

Cytopathic effects	SDS Treatments											
	Colostrum						Milk					
	C ⁻	C ⁺	N/SDS	0.25%	0.5%	1%	C ⁻	C ⁺	N/SDS	0.25%	0.5%	1%
Syncytium	-	+++	++	+	-	-	-	+++	++	+(+)	-	-
Cellular Destruction	-	+++	+	(+)	(+)	-	-	+++	++	+(+)	-	-

C⁻: negative control; C⁺: positive control, N/SDS: no SDS. -: no cytopathic effect; (+): very light cytopathic effect, +: light effect; +(>): light to moderate effect; ++: moderate effect; +++: intense effect.

Figure 1 demonstrates viral cytopathic effects caused by CLV in CSM cells from co-culture with somatic cells from caprine colostrum and milk treated with SDS. The cytopathic effects of multi-nucleated cells and cell destruction were observed in cultures without the addition of SDS (Figures 1A to 1J).

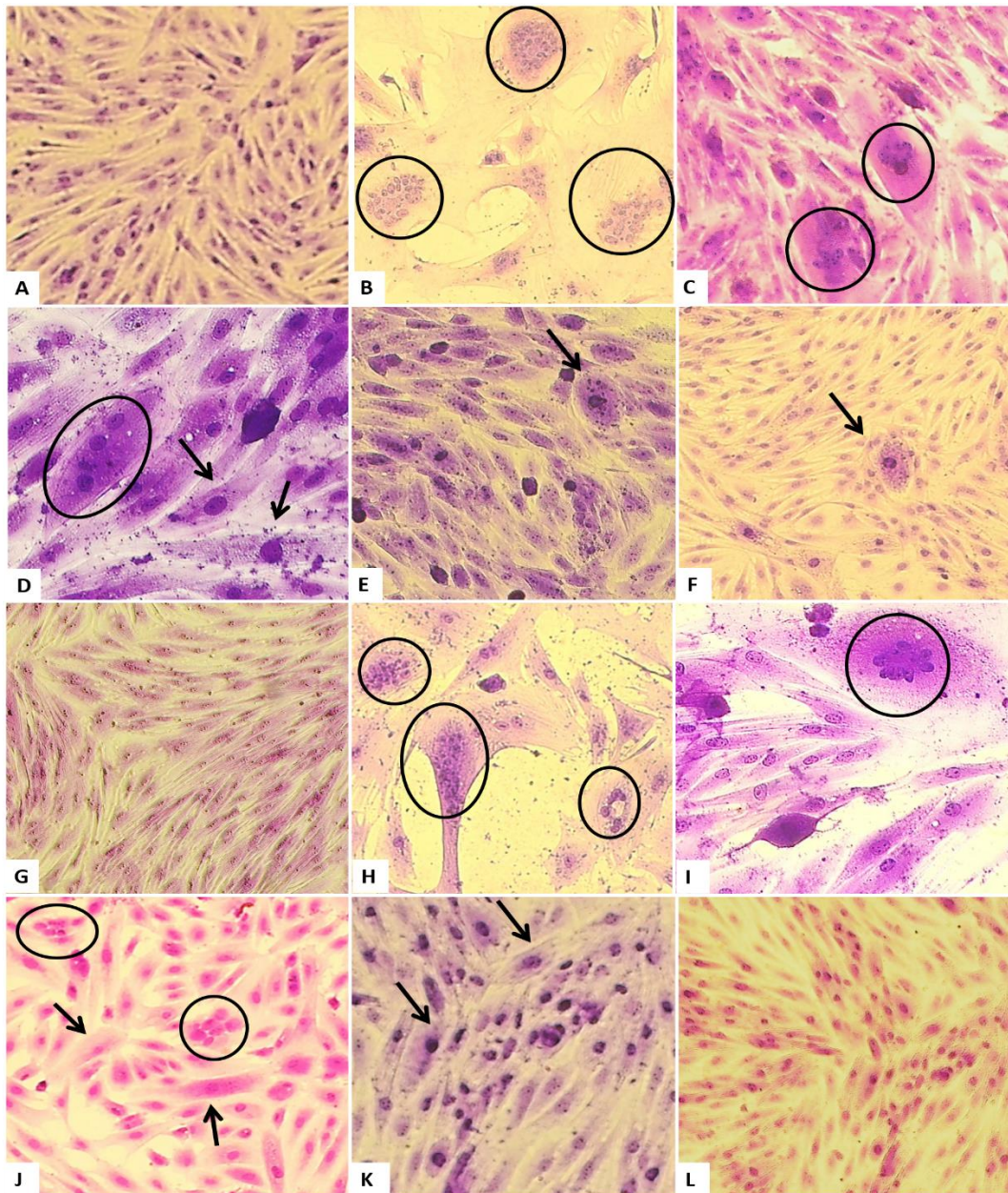


Figure 1. Co-culture of CSM and somatic cells in colostrum and milk. A and G: negative control of CSM cells (100x magnification). B and H: positive control of culture (100x magnification); C and I: control treatment (N/SDS) with colostrum and milk cells, respectively, with cytopathic effects (200x magnification). D, E and F: SDS treatment at 0.25%, 0.5% and 1% in colostrum, respectively. D: 0.25% SDS with presence of syncytium (circle) and cells visually increased in size (magnification 200x). E: SDS treatment at 0.5% with presence of cells (arrow) visually increased in size and rounded (magnification 200x). F: SDS treatment at 1% without the presence of cytopathic effects and only some cells (arrow) with a differentiated morphology in comparison to the others in colostrum (magnification 100x). J, K and L: SDS treatment at 0.25%, 0.5% and 1% in milk, respectively; J: 0.25% SDS treatment with presence of syncytium (circle) and cells visually increased in size (200x magnification); K: 0.5% SDS treatment with presence of cells (arrows) visually increased in size (200x magnification); L: 1% SDS treatment without the presence of cytopathic effect (100x magnification).

A gradual reduction of cytopathic effect was observed with the progression of the experiment according to the SDS concentration of treatments. In addition, 1% SDS concentrations in colostrum did not present characteristics of viral infection (Figure 1E).

In milk, this decrease was observed in SDS concentrations of 0.5% and 1% (Figures 1K and 1L). In both co-cultures, cells from mammary gland were observed characterized by rounded forms and increased nuclei in comparison to CSM (Figures 1E, 1F and 1K).

Viral cytopathic effects were more clearly observed in samples of colostrum in comparison to milk. This difference may be related to the defense cells (monocytes and macrophages) and lipid molecules, which are found in greater rates in colostrum. These characteristics decrease SDS efficiency due to the superior proportions of fat in comparison to surfactant, causing a possible reduction in processes of cell suffering and lysis (Partearroyo *et al.*, 1990; Kalmanzon *et al.*, 1992). In this context, monocytes/macrophages when are not destroyed may carry the virus in a cellular and flock level (Herrmann-Hoesing *et al.*, 2007).

Table 2 present analyses of cell suspension and supernatant with *n*PCR test in 63 day of co-culture. Colostrum samples presented positive results at least once in tests, independent of SDS treatment. Milk samples presented positive results in reactions of SDS treatments 0.25% and 0.5%. However, 1% SDS concentration did not present positive results in any of the samples submitted to *n*PCR test throughout the experiment.

Table 2. Results of *n*PCR in supernatant samples of CSM and somatic cells co-culture from colostrum and milk.

SDS Concentrations (%)	Colostrum			Milk		
	21d*	42d	63d	21d	42d	63d
0.25	+	+	+	+	+	+
0.5	+	+	-	+	+	+
1	+	-	+	-	-	-

*: days of culture

Data found in this study demonstrated that SDS presented inhibitory activity against CLV in colostrum, considering the decrease in cytopathic effects as concentrations increased. However, a complete viral inactivation was not possible. In milk, SDS presented partial inhibitory activity against CLV in 0.25% and 0.5% concentrations, considering the decrease in cytopathic effects as concentrations of the surfactant were increased. However, 1% SDS presented a probable viral inactivation of CLV in culture, considering the absence of cells with infectious characteristics and negative *n*PCR results.

Comparing the viral activity of SDS in CLV and data found in literature with HIV-1 revealed that SDS concentrations needed for a significant result of CLV inactivation were ten times higher than what Urdaneta *et al.* (2005) used. These authors evaluated samples in a rapid *in vitro* system (MAGI - *Multinuclear Activation of Galactosidase*

Indicator), which quantifies viral infectiveness after microbiocide treatment. They found that SDS concentrations of 0.1 and 0.5% for 10min in HeLa cultures were sufficient to cause full inhibition of viral infection caused by HIV-1 in milk. Similar findings were observed used in studies performed by Krebs *et al.* (1999) with 0.025% and 0.05% SDS in HIV-1, which are 20 and 40 times lower than 1% concentration used in this study.

A greater resistance of SRLV in comparison to HIV was also observed by Thormar *et al.* (1995), which used several viral inhibitors, among these: plant derived lectins (LOA, GNA, NPA, CA, GlcNAc, UDA, Gal-4, GalNAc, SNA-II, BPA, IRA, SBA, Neu5Ac, Gal/GalNAc), TIBO-RT (*tetrahydroimidazo-[4,5,1-jk][1,4]-benzodiazepin-2-(1H)-one*, reverse transcriptase inhibitor) and AZT (3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine). These authors verified that concentrations 12 to 40 times higher of lectin, 200 to 300 times higher of TIBO-RT and 5 to 10 times higher of AZT were necessary to cause a full inactivation of MVV in comparison to concentrations used for HIV.

In the second experimental phase (*in vivo*), molecular (*n*PCR) and serological (WB) follow-ups were performed in experimental animals, which were fed with colostrum and milk of infected goat nannies treated with SDS at 0.25%, 0.5% and 1% (Table 3).

Table 3. Individual monitoring with *n*PCR and WB of experimental animals.

Groups	Animal	0d		7d	15d	30d	60d	90d	120d		150d		180d		
		<i>n</i> PCR	WB	<i>n</i> PCR	<i>n</i> PCR	WB	<i>n</i> PCR	WB	<i>n</i> PCR	WB	<i>n</i> PCR	WB	<i>n</i> PCR	WB	
Cont(-)	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cont(+)	F	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
	G	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	
	H	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	
	I	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	
	J	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	
	G1 (0.25%)	K	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
		L	-	-	+	+	+	-	+	-	*_____				
	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	
	N	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
	O	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	
P	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+		
Q	-	+	#_____					-	-	-	-	-	-		
G2 (0.5%)	R	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	
	S	-	-	+	-	-	-	+	-	_____					
	T	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	
	U	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
	V	-	-	+	-	-	+	-	-	_____					
	W	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
G3 (1%)	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	
	Z	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	
	A1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	

+: positive diagnostic, -: negative diagnostic, *: animals that died before collection of 120 days (suggestive of clostridiosis), #: animal eliminated from group due to positive result in 0h in WB test.

Positive results were found soon in the first collection (7 days) for *n*PCR after experimentation in G1 and G2. In collections performed after 180 days, 60% (3/5) of animals in G1 and 40% (2/5) of G2 were positive in *n*PCR. Animals of G3 were positive for CAEV only in collection performed at 150 days, when one animal (33%) was positive. However, at 180 days, 100% (3/3) of animals were positive. Data found in this study demonstrated that SDS concentrations tested in caprine milk and colostrum did not promote *in vivo* inactivation of the lentivirus, exposing animals to infection.

At 90 days of evaluation, antibodies for CLV were identified in WB test of all groups that received colostrum/milk (G1- 33.3%; G2 – 42.8%; G3 – 66.7%; and positive control group - 80%), confirming the infection and activation of immune system. In addition, animals from these groups were also positive in all collection thereafter (120 days, 150 days and 180 days). Antibodies for CLV found until 70 days of life detected by WB are very likely to have been originated from colostrum (Sousa *et al.*, 2015). Antibodies were detected after 120 days of life and proviral DNA after seven days of

experimentation, which indicates that SDS concentrations were not effective in viral inactivation, confirming results obtained with molecular and serological diagnostic tests.

Despite the report by Piret *et al.* (2002), which demonstrates that SDS is a potent inhibitor of infectiveness of enveloped and non-enveloped viruses due to protein denaturation properties, the *in vivo* study here reported did not present CLV inactivation. In addition, this data contradicts the *in vitro* results by Urdaneta *et al.* (2005), which assessed infectiveness level of HIV. According to these authors, concentrations and time of action of SDS were sufficient to inhibit in full the viral infection index of HIV-1 in milk. This study also does not corroborates with Krebs *et al.* (1999), which identified inhibition of HIV-1 by SDS concentrations of 0.0025% to 0.05%.

In addition to evaluating the SDS effect as viral inactivator, the second experimental phase (*in vivo*) allowed the assessment of receptiveness of goat kids to treated colostrum and milk. During milk feeding, animals from G1 did not present clinical alterations, demonstrating a good receptiveness in consuming colostrum and milk treated with SDS at 0.25%. Animals from G2 and G3 presented good acceptance of colostrum treated with SDS at 0.5% and 1%, respectively, without clinical signs. However, during the milk-feeding period, both groups presented rejection to treated milk in the same concentrations as SDS. To improve palatability, 2g of strawberry flavored Nesquik (Nestle®) was added to every 200mL of milk. After 24h of treatment, all animals from G2 group (7/7) presented light diarrhea. However, these animals remained in the experiment until the period of six days administering milk was ended. In G3 group, after 24h of ingestion of milk treated with SDS at 1%, 57.1% (4/7) of animals died and the remaining presented intense diarrhea and apathy. Therefore, treatment was suspended, and animals were maintained and monitored until the end of the experiment.

Hatmann *et al.* (2006) described a method of removing SDS with a commercial resin, which is based in the ion-exchange chromatography. This is considered an efficient method for removing SDS, considering that protein recovery of 4 out of 5 samples of human milk treated with 1% SDS was 100%. However, this method would not be applicable or profitable for goat farmers, considering the equipment, reagents and specialized labor necessary to execute. In this sense, SDS was not removed from milk or colostrum provided for goat kids in the second experimental phase.

These adverse effects that occurred in G2 and G3 probably occurred due to the lytic activity of SDS, which was not completely emulsified to lipids found in milk, causing possible lesions in gastrointestinal epithelial cells. SDS in direct contact with

cells may cause permeability alterations in plasma membrane, which is the target structure for this substance (Benoit *et al.*, 1987; Partearroyo *et al.*, 1990).

According to Morales-De La Nuez *et al.* (2011), SDS treatment at 1% in caprine colostrum promoted a reduction in bacterial load and lower destruction of immunoglobulin G (IgG) in comparison to what is observed in pasteurization. In addition, these authors reported that goat kids fed with 1% SDS in colostrum did not present pathological effects of alterations in passive immune transference.

Kimura and Yoshida (1982) observed the reduction of enzymatic activities in pharmacological studies after administration of SDS at 0.25% in diet of mice. During experimentation, diarrhea, exfoliation of gastrointestinal membrane and malnutrition were observed in animals.

Data observed in this study with the sole administration of colostrum treated with SDS corroborate with Morales-De La Nuez *et al.* (2011) in health status of the animals. However, SDS may cause diverse effects when administered in diet, corroborating with data by Kimura e Yoshida (1982).

CONCLUSIONS

The *in vitro* study promoted inhibition of the caprine lentivirus in milk only in the 1% concentration of SDS.

In the *in vivo* evaluation, SDS in colostrum/milk in none of the tested concentrations promoted inactivation of the caprine lentivirus. In addition, gastrointestinal complications occurred, such as profuse diarrhea.

However, more studies are necessary in the chemical inactivation of virus to elucidate the activity of SDS in small ruminant lentiviruses. Considering the promising *in vitro* results found in this study, more studies involving the action of this compound in colostrum and milk should be performed.

REFERENCES

ANDRADE, M. L. R. *Avaliação da dinâmica de absorção do colostro em caprinos das raças saanen e moxotó explorados no semi-árido cearense*. 2008. 60f. Dissertação (Mestrado Em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale Do Acaraú – UVA, Sobral – CE, 2008.

BARLOUGH, J.; EAST, N.; ROWE, J.D. *et al.* Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk and tissues of infected goats. *J. Virol. Methods*, v.50, n.1-3, p. 101-114, 1994.

BARTNIK, F.G. *Interaction of anionic surfactants with proteins, enzymes, and membranes.* In Gloxhuber Ch, Kiinstler K (eds) *Anionic surfactants: Biochemistry, toxicology, dermatology*, 2nd ed. Marcel Dekker: New York, p 1-42, 1992.

BENOIT, J.; CORMIER, M.; WEPIERRE, J. Effect of proteins on the assessment of surfactant cytotoxicity by an in vitro test: Possible correlation with in vivo data. *Toxicol. In Vitro*, v.1, n.2, p.91-96, 1987.

CALLADO, A.K.C.; CASTRO, R.S.; TEIXEIRA, M.F.S. Lentivírus de pequenos ruminantes (LVC e Maedi-Visna): Revisão e perspectivas. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, v.21, n.3, p.87-97, 2001.

CARNEIRO, F.F.D. *Perdas econômicas decorrentes da Artrite Encefalite Caprina.* 97f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA, Sobral - CE, 2011.

FEITOSA, A. L.V. L. *Análise filogenética de lentivirus de pequenos ruminantes isolados do Ceará.* 2007. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2007.

GRIMBERG, J.; NOWOSCHIK, S.; BELLUSCIO, L. *et al.* A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. *Nucleic Acids Res.*, v.17, n.20, p.83-90, 1989.

HARTMANN, S. U.; WIGDAHL, B., NEELY, E. B. *et al.* Biochemical analysis of human milk treated with sodium dodecyl sulfate, an alkyl sulfate microbicide that inactivates human immunodeficiency virus type 1. *J. Hum. Lact.* v.22, n.1, p. 61-74, 2006.

HERRMANN-HOESING, L. M.; PALMER, G. H.; KNOWLES, D. P. Evidence of proviral clearance following postpartum transmission of an ovine lentivirus. *Virology*, v.362, n.1, p.226–234, 2007.

KALMANZON, E.; ZLOTKIN, E., COHEN, R.; BARENHOLZ, Y. Liposomes as a model for the study of the mechanism of fish toxicity of sodium dodecyl sulfate in sea water. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, v.1103, n.1, p.148-156, 1992.

KARANIKOLAOU, K.; ANGELOPOULOU, K.; PAPANASTASOPOULOU, M. *et al.* Detection of small ruminant lentiviruses by nPCR and serology tests in field samples of animals from Greece. *Small Ruminant Res.*, v.58, n.2, p.181-187, 2005.

KIMURA, T.; YOSHIDA, A. Toxicity of detergent feeding and effect of the concurrent feeding of dietary fiber in rats. *Nutr. Rep. Int.*, v.26, n.2, p.271-279, 1982.

KREBS, F.C.; MILLER, S.R.; MALAMUD, D. *et al.* Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by nonoxynol-9, C31G, or an alkyl sulfate, sodium dodecyl sulfate. *Antiviral Res.*, v.43, n.3, p.157-173, 1999.

- MORALES-DE LANUEZ, A.; MORENO-INDIAS, I.; SANCHEZ-MACIAS, D. *et al.* Sodium dodecyl sulfate reduces bacterial contamination in goat colostrum without negative effects on immune passive transfer in goat kids. *J. Dairy Sci.*, v.94, n.1, p.410-415, 2011.
- MULLER, L. D.; SYHRE, D. R. Influence of Chemicals and Bacterial Cultures on Preservation of Colostrum. *J. Dairy Sci.*, v. 58, n.6, p. 957-961, 1975.
- PARTEARROYO, M. A.; OSTOLAZA, H., GONI, F. M.; BARBERA-GUILLEM, E. Surfactant-induced cell toxicity and cell lysis. *Biochem. Pharmacol.*, v.40, n.6, p.1323-1328, 1990.
- PERETZ, G.; ASSO, J.; DEVILLECHAISE, P. Le CAEV: Revue des connaissances actuelles et conséquences pratiques. *Revue Méd. Vét.* v.144, n.2, p. 93-98, 1993.
- PINHEIRO, R. R.; BRITO, R. L. L.; RODRIGUES, A.S. *et al.* *Protocolo de immunoblotting para diagnóstico da Artrite Encefalite caprina*. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2011. 4 f. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Comunicado Técnico, 122).
- PHELPS, S.L.; SMITH, M.C. Caprine arthritis encephalitis virus infection. *J. Amer. Vet. Medical*, v.203, n.1, p.1663-1666, 1993.
- PIRET, J.; DÉSORMEAUX A.; BERGERON, M.G. Sodium Lauryl Sulfate, a Microbicide Effective Against Enveloped and Nonenveloped Viruses. *Curr. Drug. Targets*. v.3, n.1, p. 17-30, 2002.
- PISONI, G.; BERTONI, G.; MANAROLLA, G. *et al.* Genetic analysis of small ruminant lentiviruses following lactogenic transmission. *Virology*, v.407, n.1, p. 91–99, 2010.
- PISONI, G.; QUASSO, A.; MORONI, P. Phylogenetic analysis of small-ruminant lentivirus subtype B1 in mixed flocks: Evidence for natural transmission from goats to sheep. *Virology*, v.339, n.2, p.147–152, 2005.
- THORMAR, H.; BALZARINI, J.; DEBYSER, Z. *et al.* Inhibition of visna virus replication and cytopathic effect in sheep choroid plexus cell cultures by selected anti-HIV agentes. *Antiviral Res.*, v.27, n.1, p.49-57, 1995.
- SOUZA, T. S.; PINHEIRO R. R.; COSTA, J. N. *et al.* Interspecific transmission of small ruminant lentiviruses from goats to sheep. *Braz. J. Microbiol.*, v.46, n.3, p. 867-874, 2015.
- URDANETA, S.; WIGDAHL, B.; NEELY, E. B. *et al.* Inactivation of HIV-1 in breast milk by treatment with the alkyl sulfate microbicide sodium dodecyl sulfate (SDS). *Retrovirology*, v. 2, n.1, p.28, 2005.

8 CAPÍTULO III

Atividade antiviral dos extratos de *Azadirachta indica* A. Juss e *Melia azedarach* durante o ciclo replicativo dos Lentivírus de Pequenos Ruminantes

Artigo a ser submetido ao periódico: **Virology** (ISSN: 0042-6822)

Qualis Capes: A1 na Medicina Veterinária, Fator de impacto: 2.657

Atividade antiviral dos extratos de *Azadirachta indica* A. Juss e *Melia azedarach* durante o ciclo replicativo dos Lentivírus de Pequenos Ruminantes

Ana Lúcia Madeira de Sousa^{1*}, Raymundo Rizaldo Pinheiro², Juscelânia Furtado Araújo¹, Renato Mesquita Peixoto^{2,3}, Dalva Alana Aragão de Azevedo¹, Antônio Adailson de Sousa Silva⁴, Sabrina Tainah da Cruz Silva Bezerra¹, Gladstone Lima Maciel⁴, Alice Andrioli², Gabriel Paula Amaral⁵, Maria Fátima da Silva Teixeira¹.

¹Universidade Estadual do Ceará, Laboratório de Virologia (LABOVIR) – Fortaleza (CE), Brasil

²Embrapa Caprinos e Ovinos, Laboratório de Virologia – Sobral (CE), Brasil

³Regional Scientific Development Scholarship of National Scientific and Technological Development Council - Level C (DCR/CNPq/ FUNCAP), Brasília, Brazil

⁴Universidade Estadual do Ceará, Laboratório de Química e Produtos Naturais (LQPN) – Fortaleza (CE), Brasil

⁵Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA, Sobral (CE), Brasil

*Autor para correspondência: analidiams10@yahoo.com.br

Resumo

Este estudo teve com o objetivo avaliar *in vitro* a atividade antiviral dos extratos etanólicos de *Azadirachta indica* A. Juss e *Melia azedarach* durante o ciclo replicativo das cepas CAEV_{Co} e MVV_{K1514}, pertencentes ao grupo de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPRs) em células de membrana nictitante ovina (MNO). Para tanto, os extratos brutos (EEB) e as frações orgânicas de acetato de etila (FAE) e metanol (FM), destas plantas, foram testadas em tratamentos utilizados antes, durante e após a inoculação viral. Em seguida, os melhores resultados foram destinados a titulação viral. Por fim, constatou-se que as FAEs de *A. indica* A. Juss e *M. azedarach*, foram capazes de reduzir em 2,5 log, após a inoculação viral, e 3,5log, concomitantemente a inoculação, o título viral da cepa CAEV_{Co}, respectivamente. E em relação à cepa de MVV_{K1514}, a redução foi de até 2,2 log utilizando a FAE de *A. indica* A. Juss, concomitantemente a inoculação viral.

Palavras-Chave: Antirretroviral; Lentivírus Caprino; Lentivírus Ovino; Meliáceas; Replicação Viral.

Introdução

As lentivirose de pequenos ruminantes são enfermidades infectocontagiosas, multissistêmicas, degenerativas e crônicas (Highland, 2017). São causadas por lentivírus descritos como o vírus da Artrite encefalite caprina (CAEV), ou lentivírus caprino (LVC) e o vírus da Maedi-Visna (MVV), ou lentivírus ovino (LVO) e podem causar infecções interespecíficas (Minguijón et al., 2015). Estes agentes podem ocasionar artrite, mastite, emagrecimento progressivo, pneumonia em animais adultos e problemas neurológicos em animais jovens (Highland, 2017; Minguijón et al., 2015). Eles caracterizam-se por possuírem um alto índice de contágio e permanência em rebanhos a nível mundial (Kalogianni et al., 2020; Larruskain and Jugo, 2013; Pisoni et al., 2010), causando assim, prejuízos econômicos significativos à ovinocaprinocultura (Azevedo et al., 2017; de Figueiredo Guilherme et al., 2017; Molae et al., 2020). Vale ressaltar que, até o momento, não há tratamentos e/ou vacinas eficazes e disponíveis contra estes agentes (Reina et al., 2013; Venturino et al., 2019), necessitando, assim, a busca de meios inovadores passíveis de serem implementados no combate a estas enfermidades.

Ademais, o ciclo replicativo dos LVPRs é semelhante a outros lentivírus e retrovírus (Blacklaws and Harkiss, 2010), sendo este dividido em duas fases distintas: a fase inicial, que refere-se a etapa de adsorção entre vírus e célula hospedeira à integração do ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) viral no genoma celular; enquanto a fase tardia, retrata a expressão dos genes virais até a liberação e maturação dos vírions à progênie (Nisole and Saïb, 2004). Desta forma, elucidar as etapas da replicação viral, bem como entender o funcionamento de fármacos que atuem na inibição desses processos são de grande relevância no estudo de medicamentos que atuem no combate a estes lentivírus.

Nesse contexto, o uso de produtos naturais de origem vegetal como antivirais vem se destacando. Dentre estes, as meliáceas *Azadirachta indica* A. Juss (nim) e *Melia azedarach* (cinamomo) têm apresentado resultados satisfatórios. A *A. indica* A. Juss vem demonstrando efeito antiviral, em estudos *in vitro* com extratos cetônicos, contra o coxsackievirus (grupo B) (Badam et al., 1999) e contra o vírus do dengue tipo 2 (Parida et al., 2002), suprimindo a replicação de ambos. Ademais, em ensaios realizados com polissacarídeos, obtidos a partir desta planta, verificou-se inibição da intensidade da replicação viral do poliovírus (PV-1) (Faccin-Galhardi et al., 2012). Este produtos fitoterápico também se mostraram eficientes contra os vírus da influenza (Ahmad et al.,

2016), da febre aftosa (Younus et al., 2017, 2016) e da herpes tipo I (HSV-1) (Faccin-Galhardi et al., 2019)

A *M. azedarach*, por sua vez, demonstrou ação antiviral contra o vírus Sindbis, atuando em diferentes estágios do ciclo replicativo viral (Wachsman et al., 1987) e contra o vírus Junin, inibindo a multiplicação viral (Castilla et al., 1998). Além disso, esta planta já atuou como antiviral contra o vírus herpes tipo 2 (HSV-2) (Petraera and Coto, 2014) e em várias cepas do vírus da influenza (Nerome et al., 2018). Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* a atividade antiviral dos extratos etanólicos de *Azadirachta indica* A. Juss e *Melia azedarach* durante o ciclo replicativo das cepas CAEV_{Co} e MVV_{K1514}, pertencentes ao grupo de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPRs) em células de membrana nictitante ovina (MNO).

Material e métodos

Aspectos Bioéticos

A realização do presente estudo foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Caprinos e Ovinos com protocolo de Nº 002/2018, seguindo as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, Lei 11794 de oito de outubro de 2008) e demais resoluções normativas subsequentes.

Coleta e processamento dos extratos etanólicos *Azadirachta indica* A. Juss e de *Melia azedarach*

As folhagens provindas de *Azadirachta indica* A. Juss e de *Melia azedarach* foram colhidas, em uma quantidade aproximada de 5 kg de cada espécie, no estado do Ceará e Piauí, respectivamente. Em seguida, estas foram identificadas em exsiccatas obtendo os vouchers 18898 e 18897, nesta ordem, no herbário professor Francisco José Abreu de Matos, localizada na Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA, Sobral, CE, Brasil. Após a identificação, as folhas foram separadas dos galhos e secas à temperatura ambiente. A obtenção do extrato etanólico bruto e das frações de acetato de etila e metanol seguiram metodologia descrita por Pizzolatti et al. (2003)

Teste fitoquímicos dos extratos de *Azadirachta indica* A. Juss e de *Melia azedarach*

Os extratos etanólicos das meliáceas foram submetidos aos testes fitoquímicos, conforme metodologia descrita por Matos (2009).

Diluição dos extratos de *Azadirachta indica* A. Juss e de *Melia azedarach*

O extrato etanólico bruto e as frações de acetato de etila e metanol de ambas as plantas, em uma concentração de 150µg/mL, foram diluídos em 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO), separadamente. Em seguida, estes foram diluídos novamente, em 20 mL de meio essencial mínimo (MEM), acrescido de 2% de penicilina e estreptomicina (P/S) e 1% de anfotericina B, sem a adição de soro feral bovino (SFB). Após Isto, foram armazenados, sob agitação, à 4°C, até a realização dos testes com as placas, subsequentemente.

Obtenção das células de membrana nictitante ovina (MNO)

As células de MNO utilizadas foram provenientes de cultivo primário. Essas foram obtidas de um ovino, com idade aproximada de 30 dias, comprovadamente negativo para LVPRs de acordo com o teste de *Western Blot* e Reação em cadeia de polimerase *nested* (nPCR). Após, a obtenção dos *explants* o cultivo foi mantido até a obtenção de 100% de confluência da monocamada celular (de Azevedo et al., 2015).

Preparo das placas de cultivo e do inóculo viral

As células de MNO cultivadas anteriormente foram transferidas para placas de 24 poços em uma concentração de $2,5 \times 10^5$ cel/mL e foram mantidas em estufa de CO₂, a 37°C, até a obtenção de 80 a 90% de confluência. Quanto as cepas padrões de lentivírus de pequenos ruminantes, CAEV_{Co} (amostra viral gentilmente cedida pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, oriundas do *Laboratoire Associé de Recherches sur les Petits Ruminants – INRA – ENVL - France*) e MVV_{K1514} (amostra viral gentilmente cedida pela Universidade Estadual do Ceará, oriundas da *Université Claude Bernard Lyon I, UCBL, France*), com título inicial de 10^{4,8} e 10^{4,0} TCID₅₀/mL, em uma quantidade de 0,328MOI e 0,400MOI, respectivamente, foram diluídas em 50 mL de MEM acrescido de 2% de penicilina e estreptomicina (P/S) e 1% de anfotericina B, sem a adição de SFB, cada uma. Em seguida foram armazenadas, sob agitação, à 4°C, até os testes. Vale ressaltar que os testes com as cepas virais foram realizados em dias diferentes para evitar contaminação entre elas.

Fase de inoculação viral dos LVPRs e utilização dos extratos de *Azadirachta indica*

A. Juss e de *Melia azedarach*

- Pré-tratamento com os extratos antes da inoculação viral

Na execução do pré-tratamento foram utilizadas duas placas de 24 poços, sendo uma para cada planta estudada. Para tanto, as placas foram lavadas duas vezes com PBS 1X (tampão sódio fosfato). Em seguida, 500 µL de MEM contendo os extratos brutos e as frações orgânicas de acetato de etila e de metanol, diluídos anteriormente, foram adicionados em quadruplicatas nas placas, conforme o desenho experimental: A1 a D1 representava o controle negativo (somente MEM); A2 a D2 com extrato bruto; A3 a D3 com a fração acetato de etila; A4 a D4 com a fração metanol; e A6 a D6 com controle positivo (somente MEM). Nesta fase inicial não foram utilizadas as cepas virais, inclusive no controle positivo. Após 60 minutos, o MEM contendo os extratos foi retirado, e posteriormente, foi adicionado 500µL de MEM contendo as cepas para LVPRs, com exceção do controle negativo, que foi adicionado somente MEM. Novamente, após 60 minutos, o inóculo foi removido e acrescentado 500µL de MEM, contendo de 2% de penicilina e estreptomicina (P/S) e 1% de anfotericina B, e 5% de SFB. Por fim, as placas foram mantidas em estufa de CO₂, a 37 °C, durante 63 dias, com tripsinização celular a cada 21 dias. Após este período, as placas foram coradas com cristal violeta a 0,3%, para visualização dos efeitos citopáticos virais. Esta metodologia foi baseada no estudo de Parida et al (2002), com adaptações.

- Inoculação viral durante a ação dos extratos

Neste tratamento, o MEM contendo as cepas virais diluídas foi subdividido em alíquotas de 5 mL, e estas acrescidas de 150µg/mL dos extratos brutos e das respectivas frações. Em seguida, 500µL do MEM+extratos foram adicionados nas placas de 24 poços (previamente lavadas com PBS 1X), conforme desenho experimental da placa: A1 a D1 com controle negativo (somente MEM); A2 a D2 com extrato bruto; A3 a D3 com a fração acetato de etila; A4 a D4 com a fração metanol; e A6 a D6 com controle positivo (MEM+vírus). Após 60 minutos, os tratamentos foram removidos das placas, estas acrescidas de 500µL de MEM, com 2% de penicilina e estreptomicina (P/S) e 1% de anfotericina B, e 5% de SFB e mantidas nas condições do teste anterior. Esta metodologia foi baseada no estudo de Parida et al (2002), com adaptações.

- Tratamento com os extratos após a inoculação viral

Para este tratamento, as células de MNO, contidas nas placas, foram previamente inoculadas com as cepas de CAEV_{C0} ou MVV_{K1514}, com exceção do controle negativo (A1 a D1, controle negativo somente com MEM). Após os 60 minutos deste procedimento, as células foram tratadas com os extratos, seguindo o desenho experimental da placa: A1 a D1 com controle negativo (somente MEM); A2 a D2 com extrato bruto; A3 a D3 com a fração acetato de etila; A4 a D4 com a fração metanol; e A6 a D6 com controle positivo (somente MEM). Logo após 60 minutos de ação dos extratos em MEM, este foi removido das placas. Em seguida, foi adicionado 500µL de MEM, contendo 2% de penicilina e estreptomicina (P/S) e 1% de anfotericina B, e 5% de SFB, as placas foram mantidas nas condições dos testes anteriores. Esta metodologia foi baseada no estudo de Parida et al (2002), com adaptações.

Titulação das amostras com atividade antiviral

Após a visualização dos efeitos citopáticos virais, as amostras que obtiveram melhores resultados correspondentes a possível atividade antiviral, tanto nas cepas de CAEV_{C0} quanto de MVV_{K1514}, foram destinadas a titulação viral (Reed and Muench, 1938).

Resultados

Potencial antiviral dos extratos de folhas de *Azadirachta indica* A. Juss e *Melia azedarach* nas cepas de LVPRs

As células de MNO, deste estudo, foram tratadas com os extratos de *A. indica* A. Juss e *M. azedarach* em diferentes estágios da inoculação viral das cepas de LVPRs. No entanto, os efeitos citopáticos virais, para ambas as cepas, se mantiveram constantes em vários tratamentos (tab.1).

Tabela 1. Níveis dos efeitos citopáticos nas células de membrana nictitante ovina (MNO) nos tratamentos com extrato etanólico bruto (EEB) e suas respectivas frações orgânicas de acetato de etila (FAE) e metanol (FM) de folhas de *Azadirachta indica* A. Juss (*A. indica* A. Juss) e *Melia azedarach* (*M. azedarach*) em diferentes fases da infecção viral por lentivírus de pequenos ruminantes LVPRs

Cepas de LVPRs		Efeitos citopáticos virais										
		Tratamento	Destruição celular					Presença de sincício				
			C-	EEB	FAE	FM	C+T.	C-	EEB	FAE	FM	C+T
CAEV _{Co}	<i>A. indica</i>	Pré-Inoculação ¹	-	++	++	+	+++	-	+++	++	-	+++
		Durante a Inoculação ²	-	+	+++	++	+++	-	-	+++	+++	+++
		Pós-Inoculação ³	-	+++	+	+	+++	-	+++	-	-	+++
	<i>M. azedarach</i>	Pré-Inoculação	-	++	+	+++	+++	-	++	++	+++	+++
		Durante a Inoculação	-	+++	+	+++	+++	-	+++	-	+++	+++
		Pós-Inoculação	-	++	++	++	+++	-	++	+	+++	+++
MVV _{K1514}	<i>A. indica</i>	Pré-Inoculação	-	+	+++	++	+++	-	++	-	+	++++
		Durante a Inoculação	-	-	-	+	+++	-	-	-	+	++++
		Pós-Inoculação	-	++	+	+++	+++	-	++	++	++++	++++
	<i>M. azedarach</i>	Pré-Inoculação	-	++++	+++	++	+++	-	-	++++	++++	++++
		Durante a Inoculação	-	+	+	+	+++	-	+++	+++	+++	++++
		Pós-Inoculação	-	+++	+++	+++	+++	-	++++	++++	++++	++++

¹: Pré-tratamento com os extratos antes da inoculação viral, ²: Tratamento com os extratos durante a inoculação viral, ³: Pós-tratamento com os extratos após a inoculação viral, C-: controle negativo (somente células de MNO); C+T.: controle positivo do tratamento (células de MNO e cepa de LVPR), sem extratos, -: sem efeito citopático; +: efeito muito leve; ++: efeito leve; +++: efeito moderado; ++++: efeito intenso.

Verificou-se com a utilização dos extratos de *A. indica* A. Juss nas células infectadas com a cepa CAEV_{Co}, nos pré-tratamentos, que somente na fração metanólica (FM) não houve formação de sincícios. Observou-se, ainda, pouca destruição celular (Fig.1-B). Os mesmos efeitos citopáticos (ECPs) foram visualizados no tratamento com o extrato etanólico bruto (EEB), durante o processo de inoculação viral (Fig.1-C). No entanto, nas demais frações orgânicas deste tratamento, os ECPs se mantiveram intensos, semelhantes ao controle positivo (C+T) (Fig.1-G). Em outra etapa, após a inoculação viral, foi observada uma redução dos ECPs, semelhantes aos tratamentos anteriores, com o uso das frações orgânicas de acetato de etila (FAE) e FM (Fig.1-D, E). Entretanto, no tratamento como o EEB os ECPs se mantiveram a níveis moderados.

A atividade antiviral dos extratos de *M. azedarach* foi observada apenas no tratamento que ocorreu durante a inoculação viral, quando foi utilizada a FAE, e os ECPs foram reduzidos, sendo observados uma leve destruição celular na monocamada de MNO (Fig.1-F). Nos demais tratamentos, os ECPs foram ocasionados de maneira mais intensa, equivalentes ao C+T, não sendo a atividade antiviral eficiente.

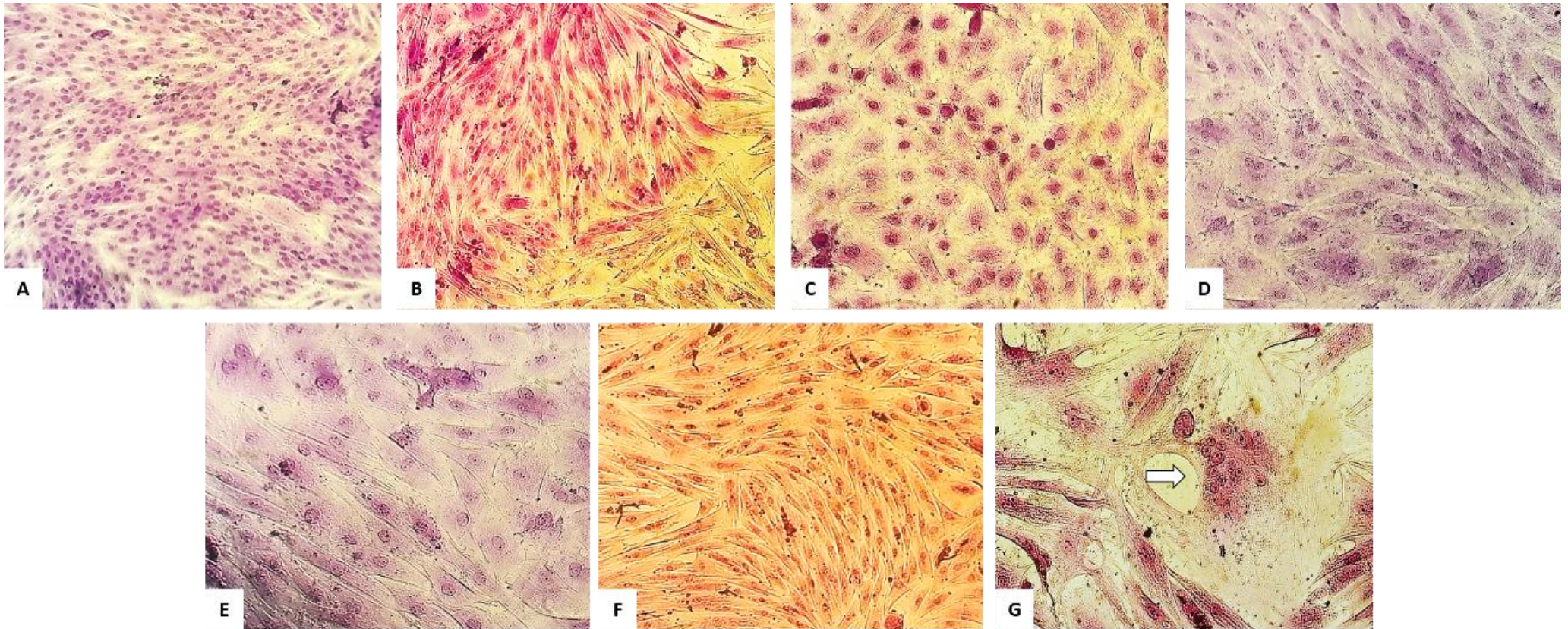


Figura 1. Células de membrana nictitante ovina (MNO) tratadas com extratos de *Azadirachta indica* A. Juss e *Melia azedarach* em diferentes fases da infecção viral pela cepa CAEV-Co. A: controle negativo da cultura com células de MNO (aumento 100x). B, C, D, E: cultura de células submetidas ao tratamento por 60 minutos com extrato das folhas de *Azadirachta indica* A. Juss, onde B: tratamento com fração metanol (FM), antes da inoculação viral. C: tratamento com extrato etanólico bruto (EEB), durante a inoculação viral. D: tratamento com FM, após a inoculação viral. E: tratamento com fração de acetato de atila (FAE), após a inoculação viral (aumento 100x/200x). F: cultura de células submetidas ao tratamento por 60 minutos com extrato de folhas de *Melia azedarach* na fração orgânica de acetato de etila (FAE) durante a inoculação viral (aumento 100x/200x). G: controle positivo com células de MNO infectada com CAEV_{Co}, com sincícios (setas) (aumento 100x).

Com relação aos ECPs ocasionados pela cepa MVV_{K1514}, estes foram reduzidos somente quando as células foram tratadas durante o processo de inoculação viral, utilizando o EEB, e as FAE e FM de *A. indica* A. Juss (Fig.2). Além disso, no EEB e na FAE foram observadas somente célula gigante presente na monocamada (Fig.2-B e C, setas), sem a presença de sincícios nem destruição celular. Nas células tratadas com a FM, os ECPs foram mais acentuados, sendo visualizado formação de sincícios e leve destruição celular (Fig.2-D, seta). Ademais, os tratamentos utilizando os extratos de *M. azedarach* não foram eficientes na redução do MVV_{K1514}, sendo possível visualizar ECPs característicos (tab.1).

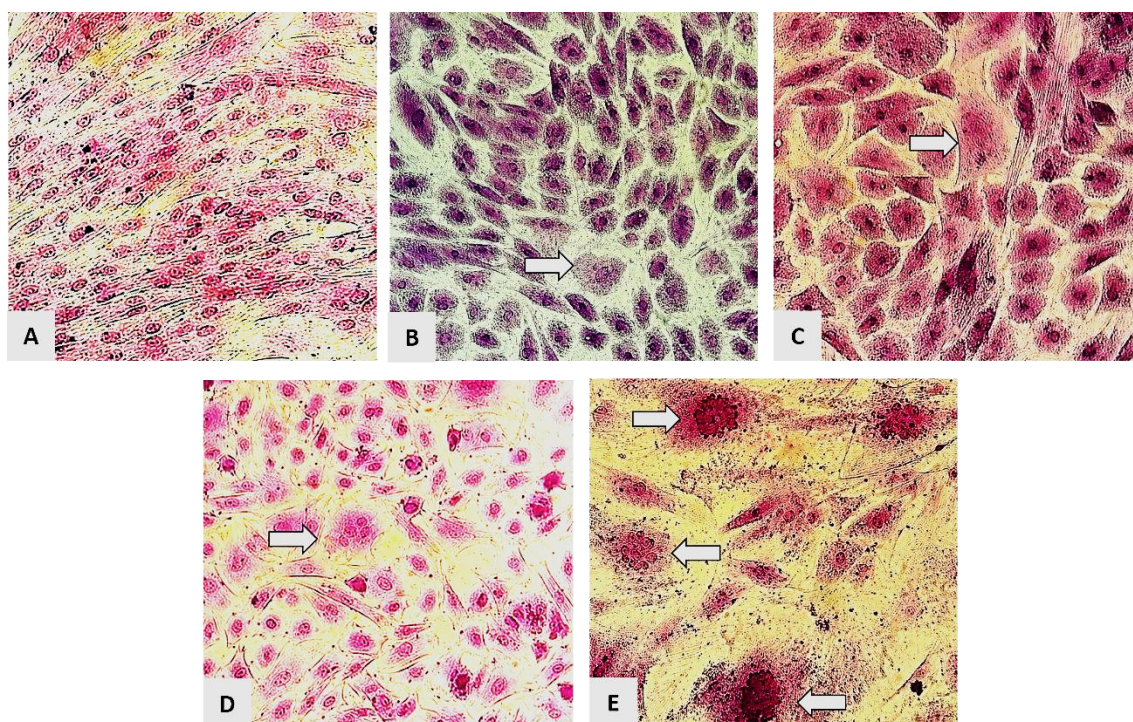


Figura 2. Células de membrana nictitante ovina (MNO) tratadas com extratos de *Azadirachta indica* A. Juss durante a infecção viral pela cepa MVV_{K1514}. A: controle negativo da cultura com células de MNO (aumento 100x). B, C e D: tratamentos, durante a inoculação viral, com o extrato etanólico bruto (EEB) e as frações orgânicas de acetato de etila (FAE) e metanol (FM), respectivamente, presença de sincício em D (seta) (aumento 100x/200x). E: controle positivo com células de MNO infectada com cepa MVV_{K1514}, com sincícios (setas) (aumento 100x).

Titulação viral dos tratamentos com os extratos de *A. indica* A. Juss e de *M. azedarach*

Nos tratamentos com os extratos de folhas de *A. indica* A. Juss e de *M. azedarach*, comprovou-se por meio do método de titulação viral, o que foi evidenciado na análise de presença ou ausência de efeito citopático característicos de LVPRs, na técnica de cultivo celular. Pode-se verificar, indiretamente, um provável decréscimo do número de

partículas virais infecciosas presentes na suspensão celular, nos diversos tratamentos, através da não observação de ECPs com o uso dos extratos etanólicos das meliáceas, em comparação aos tratamentos controle, tanto das cepas de CAEV_{Co}, quanto de MVV_{K1514} (Fig.3).

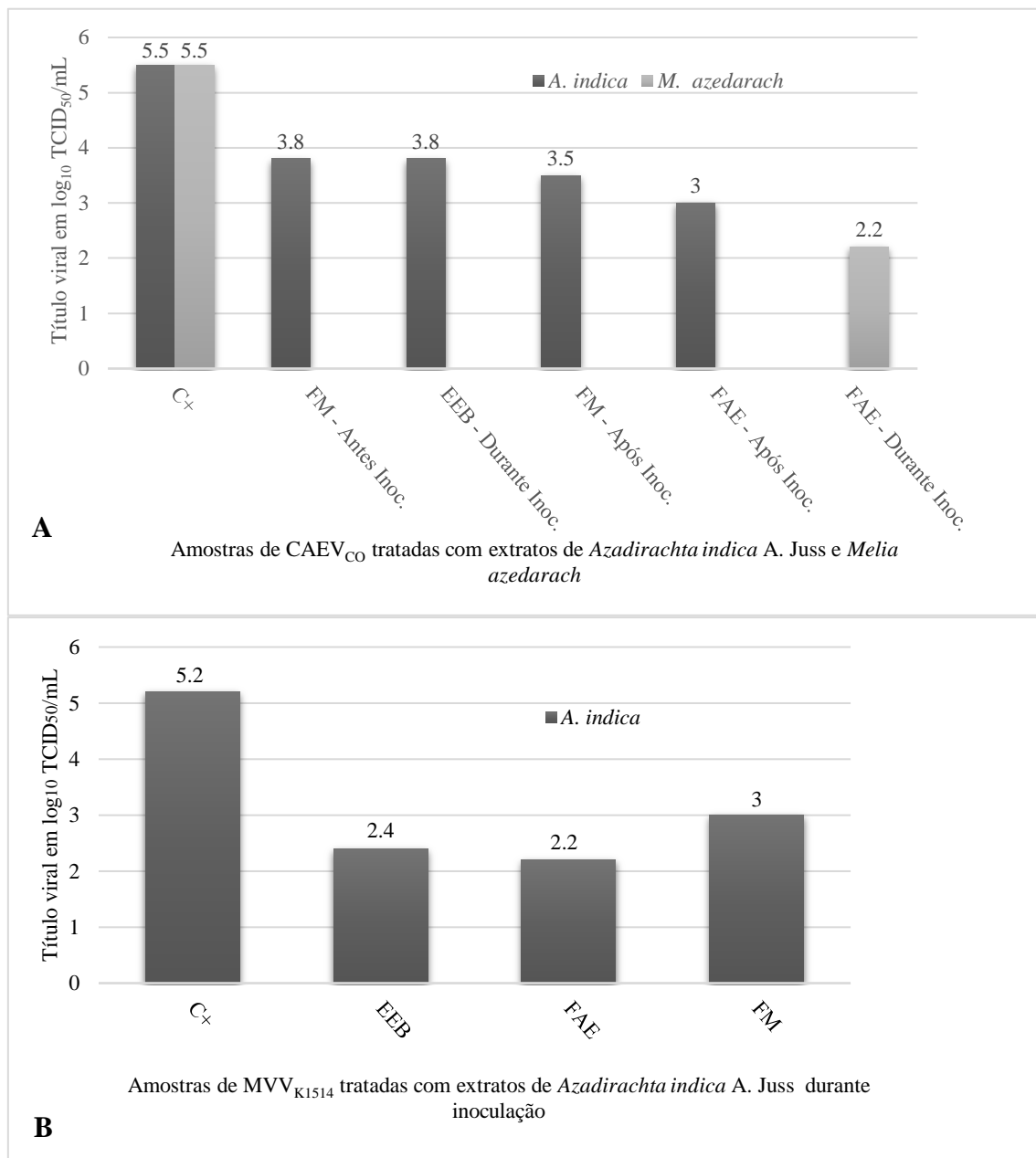


Figura 3. Título viral dos sobrenadantes provindo do cultivo de células de membrana nictitante ovina infectadas com cepas de CAEV_{Co} e MVV_{K1514} tratadas com extratos etanólicos de folhas de *Azadirachta indica* A. Juss e *Melia azedarach* em diferentes fases do ciclo replicativo viral. A: cepa CAEV_{Co} tratadas com extrato etanólico bruto de folhas de *A. indica* A. Juss e *M. azedarach* e respectivas frações orgânicas de acetato de etila e metanol. b: Cepa MVV_{K1514} tratadas com extratos etanólicos de folhas de *Azadirachta indica* A. Juss durante o ciclo replicativo. *TCID₅₀/mL: tissue culture infection dose, recíproca da maior diluição que apresentou, 14 dias após inoculação, sincícios em 50% dos poços inoculados, C₊: controle positivo da cepa padrão CAEV_{Co} / MVV_{K1514}, FM – Antes Inoc.: tratamento com fração orgânica metanol antes da inoculação viral, EEB – Após Inoc.: tratamento com extrato etanólico bruto após inoculação viral,

FM – Após Inoc.: tratamento com fração orgânica metanol após inoculação viral, FAE - Após Inoc.: tratamento com fração orgânica de acetato de etila após inoculação viral, FAE - Durante Inoc.: tratamento com fração orgânica de acetato de etila durante a inoculação viral, EEB: extrato etanólico bruto, FAE: fração de acetato de etila, FM: fração metanólica.

A cepa CAEV_{Co}, após as tripsinizações da monocamada celular e ao final do período de cultura, obteve um título viral de $10^{5,5}$ TCID₅₀/mL (C+) (Fig. 3-A). Nos testes, os valores dos títulos virais recuaram, conforme os tratamentos e os tipos de extratos utilizados. Ademais, nos que foram utilizados os extratos de *A. indica* A. Juss, o pré-tratamento com a FM, obteve-se um título de $10^{3,8}$ TCID₅₀/mL, como uma diferença logarítmica de 1,7log, comparando com o valor final do C+. No tratamento com EEB concomitante a inoculação viral, o título foi de $10^{3,8}$ TCID₅₀/mL, obtendo assim, a mesma diferença logarítmica do tratamento anterior. Já em relação aos tratamentos após a inoculação viral, utilizando a FM e a FAE, os títulos virais foram de $10^{3,5}$, 10^3 TCID₅₀/mL, respectivamente. Sendo que a diferença de recuo entre esses títulos, comparando com o C+ foram de 2 e 2,5log. Referente ao tratamento com *M. azedarach*, utilizando a FAE, durante o processo de inoculação viral, o título obtido foi de $10^{2,2}$ TCID₅₀/mL, sendo que este, obteve uma diferença de recuo bem mais elevado, com valor de 3,3log (Fig. 3-A).

Com relação à cepa MVV_{K1514}, seu título viral após a cultura foi elevado a $10^{5,2}$ TCID₅₀/mL. Nos tratamentos em que foram adicionados os extratos de *A. indica* A. Juss, durante o processo de inoculação viral, os títulos foram recuados aos valores de $10^{2,4}$, $10^{2,2}$, $10^{3,0}$ TCID₅₀/mL, com os tratamentos com EEB, FAE e FM, respectivamente. Estes valores obtiveram uma diferença logarítmica de 2,8; 3 e 2,2log entres os recuos.

Composição fitoquímica dos extratos de folhas de *A. indica* A. Juss e *M. azedarach*

Na análise fitoquímica das distintas frações das meliáceas avaliadas foram encontrados os seguintes metabólitos secundários: fenóis, flavononas, flavonóis, xantonas, esteroides, flavonoides, triterpenoides, saponinas e alcaloides em todos os extratos de ambas as meliáceas.

Discussão

As infecções virais são um grande problema de saúde global, e, até o momento, nenhum agente antiviral, considerado de amplo espectro de ação, está disponível para uso (Luo and Gao, 2020). Além disso, a resistência emergente a agentes antivirais que circulam a nível mundial, também é um grande problema (Strasfeld and Chou, 2010). Assim, o desenvolvimento de novos e eficazes agentes antivirais é relatado em vários

estudos de plantas com propriedades antivirais contra vírus de DNA e RNA (Alché et al., 2002; Angamuthu et al., 2019; Bueno et al., 2012; Gupta et al., 2017; Kanyara and Njagi, 2005; Naithani et al., 2008; Parida et al., 2002; Petrera and Coto, 2014; Sanna et al., 2015; Wachsmann et al., 1987; Younus et al., 2016). De modo geral, os agente fitoterápicos possuem um largo espectro de ação, atuando contra microrganismos de importância médica e veterinária (Naithani et al., 2008; Peixoto et al., 2018).

As meliáceas *Azadirachta indica* A. Juss e *Melia azedarach*, em estudos anteriores, já demonstram ação antiviral em vários outros vírus (Alché et al., 2002; Angamuthu et al., 2019; Bueno et al., 2012; Gupta et al., 2017; Kanyara and Njagi, 2005; Parida et al., 2002; Petrera and Coto, 2014; Sanna et al., 2015; Wachsmann et al., 1987). E, diante dos resultados obtidos neste estudo, a utilização dos extratos etanólicos das folhas destas plantas, evidenciam uma possível ação antirretroviral contra os LVPRs. Ação essa, mediada por meio da utilização dos mesmos, durante o ciclo replicativo de cepas de CAEV_{Co} e MVV_{K1514} em cultura de células de MNO. Nesse contexto, a FAE de *A. indica* A. Juss demonstrou que pode atuar, como um possível antirretroviral, principalmente e com mais intensidade, na fase final do ciclo replicativo da cepa CAEV_{Co}, devido à inibição desta demonstrado nos resultados descritos no presente artigo. Fato esse de elevada notoriedade, uma vez que, a fase tardia do ciclo viral trata-se da expressão dos genes virais até a liberação e maturação dos vírions à progênie (Nisole and Saïb, 2004).

Adicionalmente, os resultados antirretrovirais, bastante promissores, evidenciados neste estudo, com a cepa MVV_{K1514}, durante a inoculação viral com os extratos de *A. indica* A. Juss, corroboram com estudos anteriores (Badam et al., 1999; Faccin-Galhardi et al., 2012; Li et al., 2019; Parida et al., 2002) que relatam a atividade antiviral de extratos desta meliácea, adicionados em cultura, concomitantemente a inoculação viral do coxsackievirus (Badam et al., 1999), do vírus da dengue tipo 2 (Parida et al., 2002), do poliovirus (Faccin-Galhardi et al., 2012) e do vírus da febre aftosa (Li et al., 2019). Estudos esses, que ainda mencionam a observação de menor efeito, quando os fitocompostos foram adicionados como pré-tratamento ou após infecção viral. Contudo, a atividade antiviral dos extratos de Nim, já foi averiguada também, no vírus da Imunodeficiência humana, tipo I (HIV-I) (Joshi et al., 2005; Mbah et al., 2007), no vírus da influenza (Ahmad et al., 2016), febre aftosa (Younus et al., 2017, 2016), herpes tipo I (HSV-1) (Faccin-Galhardi et al., 2019) e no vírus da dengue (Dwivedi et al., 2020, 2016).

Em relação a *M. azedarach*, os resultados demonstraram que mediante o uso da FAE, o efeito inibitório viral foi observado somente na cepa CAEV_{Co}. Desta forma, a FAE, possivelmente, também atuou como um inibidor dessa cepa viral, na fase inicial, que está relacionada com a adsorção entre vírus e célula hospedeira, atuação de enzimas, como a transcriptase reversa, e a integração do cDNA viral no genoma celular (Blacklaws and Harkiss, 2010; Nisole and Saïb, 2004). Além disso, a ação antiviral desses extratos coincidiu com tratamentos contra as cepas do vírus da dengue, da febre amarela e do vírus do Nilo, em que os fitocompostos, também agiram melhor durante a inoculação viral, interrompendo os processos de adsorção do vírus à célula, em concentrações de EC₅₀ de 3,0; 3,0, e 7,0 µM, respectivamente (Sanna et al., 2015).

É válido salientar que em um dos primeiros estudos com esta planta foi demonstrada a atividade antiviral, durante pré e pós-tratamentos de seus extratos, inibindo desde a adsorção viral até a fase de progênie do vírus Sindbis (Wachsman et al., 1987). Castilla et al. (1998) também observaram a redução da multiplicação do vírus Junin, de maneira dose dependente, com EC₅₀ de 0,13 mg/ml, utilizando extratos dessa planta. Além do mais, a ação antiviral desta meliácea já foi relatada em estudos, contra o vírus do HIV (Kanyara and Njagi, 2005) da herpes tipo I (Bueno et al., 2012), tipo II (Petretera and Coto, 2014) e III (Angamuthu et al., 2019) e contra os vírus da influenza A e B (Nerome et al., 2018).

Quanto à concentração de 150µg/mL das referidas frações de ambas as meliáceas, testada na presente pesquisa, estas foram relativamente maiores que as concentrações descritas em estudos contra PV-1(12,1 a 80 µg /mL de extrato de *A. indica* A. Juss) (Faccin-Galhardi et al., 2012) e contra o Herpes Simples Tipo I (HSV-1) (63,5 µg /mL de *M. azedarach*) (Bueno et al., 2012), e dentre outras evidenciadas na literatura (Castilla et al., 1998; Sanna et al., 2015). No entanto, ressalta-se que a dosagem eficaz de uma substância contra um tipo viral apresenta variabilidade, especialmente, conforme o tipo de vírus alvo; assim, em decorrência da alta capacidade mutagênica desses microrganismos, dosagens maiores podem ser necessárias para exercer um efeito inibidor contra um determinado agente viral (Sousa et al., 2018; Thormar et al., 1995; Younus et al., 2017).

Thormar et al.(1995) comprovou justamente isso ao comparar a atividade antiviral de drogas usadas no combate ao HIV nos LVPRs. Esses autores relataram uma grande resistência por parte dos LVPRs aos antivirais testados, em que, ao utilizar lectinas

derivadas de plantas (LOA, GNA, NPA, CA, GlcNAc, UDA, Gal-4, GalNAc, SNA-II, BPA, IRA, SBA, Neu5Ac, Gal / GalNAc), TIBO-RT (tetra-hidroimidazo-[4,5,1-jk][1,4]-benzodiazepin-2-(1H)-ona, inibidor da transcriptase reversa) e o AZT (3'-Azido-2', 3'-didesoxitimidina) evidenciaram que concentrações de 12 a 40 vezes maiores de lectina, de 200 a 300 vezes maiores de TIBO-RT e de 5 a 10 vezes maiores de AZT eram necessárias para causar uma inativação completa do MVV em comparação às concentrações usadas para o HIV. Dados semelhantes, em estudos com dodecil-sulfato de sódio (SDS) como antiviral, para o lentivírus caprino, foram relatados por Sousa et al. (2018), em que foi necessária uma concentração 20 e 40 vezes maior de SDS para inativar o LVC em comparação às utilizadas no HIV (Krebs et al., 1999; Urdaneta et al., 2005).

Em relação à atividade antiviral dos extratos testados das referidas meliáceas, possivelmente possa estar atrelado à composição fitoquímica dos mesmos (Angamuthu et al., 2019; Li et al., 2019; Nerome et al., 2018; Parida et al., 2002; Sanna et al., 2015; Younus et al., 2017). Esta inferência deve-se aos constituintes fitoquímicos encontrados nas frações orgânicas das espécies vegetais avaliadas na presente pesquisa. Fitoconstituintes esses, que tradicionalmente são citados em diversas plantas da família Meliácea (Bueno et al., 2012), exercendo ação antiviral, seja isolado ou pelo sinergismo entre os mesmos (Moradi et al., 2017; Nolkemper et al., 2010; Shikalepo et al., 2018). Ademais, estes quando atuam conjuntamente, proporcionam grande variabilidade farmacológica, podendo futuramente, serem utilizadas como agentes antimicrobiano com largo espectro de ação (Gupta et al., 2017; Sultana et al., 2014).

Na literatura, a maioria dos estudos com possíveis terapias antivirais é provinda de extratos com eluições aquosas e etanólicas (Angamuthu et al., 2019; Li et al., 2019; Nerome et al., 2018; Parida et al., 2002; Sanna et al., 2015; Younus et al., 2017). E o estudo destes fitocomponentes, bem como suas aplicações farmacológicas são fundamentais na pesquisa de antivirais eficientes. Além disso, os flavonoides são considerados bioativos que promovem atividade antiviral, seja isolado, ou atuando em conjunto com outros fitocomponentes em extratos vegetais distintos (Ahmad et al., 2016; Kumazawa et al., 2013; Moradi et al., 2017; Shimizu et al., 2017), podendo atuar na inibição de proteases e de enzimas, como a transcriptase reversa (Ahmad et al., 2016; Shimizu et al., 2017).

Por fim, o uso de antivirais como possíveis medidas profiláticas vêm em ascensão, fazendo-se necessário o conhecimento sobre a bioquímica da replicação viral, devido ao

uso constante do maquinário celular no processo de infecção. Bem como, a definição de melhores dosagens de fármacos que promovam o equilíbrio para evitar a replicação viral e não causar toxicidade para a célula (Chaudhuri et al., 2018). Associado a isso, o conhecimento dos mecanismos envolvidos na replicação viral do HIV e dos vírus da hepatite B e C, tem sido de grande valia, por fornecerem aparato para o desenvolvimento de medicamentos com maior seletividade, potencial de ação, maior estabilidade *in vivo* e menores níveis de toxicidade celular (Nováková et al., 2018a, 2018b).

Desta forma, podemos concluir que o estudo dos distintos extratos das meliáceas, ajudou a elucidar a atuação desses nas fases do ciclo replicativo viral dos LVPRs, inibindo parcialmente a ação do vírus. Todavia, não tendo ocorrido a completa inibição viral, esses produtos naturais podem ser alternativas promissoras no combate a estes retrovírus, e até mesmo no tratamento, já que reduziram significativamente a carga viral. Contudo, são necessários estudos mais aprofundados sobre estes fitoterápicos para validar e otimizar metodologias, técnicas, e conseqüentemente, a eficácia dos mesmos como antivirais específicos, ou como agentes de largo espectro virucida, conforme sua variabilidade de ação viral.

Referências

- Ahmad, A., Javed, M.R., Rao, A.Q., Husnain, T., 2016. Designing and screening of universal drug from neem (*Azadirachta indica*) and standard drug chemicals against influenza virus nucleoprotein. *BMC Complement. Altern. Med.* 16, 519.
- Alché, L.E., Barquero, A.A., Sanjuan, N.A., Coto, C.E., 2002. An antiviral principle present in a purified fraction from *Melia azedarach* L. leaf aqueous extract restrains herpes simplex virus type 1 propagation. *Phyther. Res.* 16, 348–352.
- Angamuthu, D., Purushothaman, I., Kothandan, S., Swaminathan, R., 2019. Antiviral study on *Punica granatum* L., *Momordica charantia* L., *Andrographis paniculata* Nees, and *Melia azedarach* L., to Human Herpes Virus-3. *Eur. J. Integr. Med.* 28, 98–108.
- Azevedo, D.A.A. de, Santos, V.W.S. dos, Sousa, A.L.M. de, Peixoto, R.M., Pinheiro, R.R., Andrioli, A., Teixeira, M.F. da S., 2017. Small ruminant lentiviruses: economic and productive losses, consequences of the disease. *Arq. Inst. Biol. (Sao Paulo)*. 84.
- Badam, L., Joshi, S.P., Bedekar, S.S., 1999. 'In vitro' antiviral activity of neem (*Azadirachta indica*. A. Juss) leaf extract against group B coxsackieviruses. *J. Commun. Dis.* 31, 79–90.
- Blacklaws, B.A., Harkiss, G.D., 2010. Small ruminant lentiviruses and human immunodeficiency virus: cousins that take a long view. *Curr. HIV Res.* 8, 26–52.

- Bueno, C.A., Lombardi, M.G., Sales, M.E., Alché, L.E., 2012. A natural antiviral and immunomodulatory compound with antiangiogenic properties. *Microvasc. Res.* 84, 235–241.
- Castilla, V., Barquero, A.A., Mersich, S.E., Coto, C.E., 1998. In vitro anti-Junin virus activity of a peptide isolated from *Melia azedarach* L. leaves. *Int. J. Antimicrob. Agents* 10, 67–75.
- Chaudhuri, S., Symons, J.A., Deval, J., 2018. Innovation and trends in the development and approval of antiviral medicines: 1987–2017 and beyond. *Antiviral Res.* 155, 76–88.
- de Azevedo, D.A.A., Araújo, J.F., de Sousa, A.L.M., Dias, R.P., de Souza, T.S., Andrioli, A., Pinheiro, R.R., 2015. Produção de antígeno de lentivírus de pequenos ruminantes através da cultura celular de membrana nictitante caprina. *Brazilian J. Vet. Med.* 37, 316–320.
- de Figueiredo Guilherme, R., Lima, A.M.C., Alves, J.R.A., da Costa, D.F., Pinheiro, R.R., Alves, F.S.F., de Azevedo, S.S., Alves, C.J., 2017. Characterization and typology of sheep and goat production systems in the State of Paraíba, a semi-arid region of northeastern Brazil. *Semin. Ciências Agrárias* 38, 2163–2178.
- Dwivedi, V.D., Bharadwaj, S., Afroz, S., Khan, N., Ansari, M.A., Yadava, U., Tripathi, R.C., Tripathi, I.P., Mishra, S.K., Kang, S.G., 2020. Anti-Dengue infectivity evaluation of bioflavonoid from *Azadirachta indica* by dengue virus serine protease inhibition. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1–16.
- Dwivedi, V.D., Tripathi, I.P., Mishra, S.K., 2016. In silico evaluation of inhibitory potential of triterpenoids from *Azadirachta indica* against therapeutic target of dengue virus, NS2B-NS3 protease. *J. Vector Borne Dis.* 53, 156.
- Faccin-Galhardi, L.C., Ray, S., Lopes, N., Ali, I., Espada, S.F., dos Santos, J.P., Ray, B., Linhares, R.E.C., Nozawa, C., 2019. Assessment of antiherpetic activity of nonsulfated and sulfated polysaccharides from *Azadirachta indica*. *Int. J. Biol. Macromol.* 137, 54–61.
- Faccin-Galhardi, L.C., Yamamoto, K.A., Ray, S., Ray, B., Linhares, R.E.C., Nozawa, C., 2012. The in vitro antiviral property of *Azadirachta indica* polysaccharides for poliovirus. *J. Ethnopharmacol.* 142, 86–90.
- Gupta, S.C., Prasad, S., Tyagi, A.K., Kunnumakkara, A.B., Aggarwal, B.B., 2017. Neem (*Azadirachta indica*): An indian traditional panacea with modern molecular basis. *Phytomedicine* 34, 14–20.
- Highland, M.A., 2017. Small ruminant lentiviruses: Strain variation, viral tropism, and host genetics influence pathogenesis. *Vet Pathol* 54, 353–354.
- Joshi, S.N., Katti, U., Godbole, S., Bharucha, K., Kulkarni, S., Risbud, A., Mehendale, S., 2005. Phase I safety study of Praneem polyherbal vaginal tablet use among HIV-uninfected women in Pune, India. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 99, 769–774.

- Kalogianni, A.I., Bossis, I., Ekateriniadou, L. V, Gelasakis, A.I., 2020. Etiology, Epizootiology and Control of Maedi-Visna in Dairy Sheep: A Review. *Animals* 10, 616.
- Kanyara, J.N., Njagi, E.N.M., 2005. Anti-HIV-1 activities in extracts from some medicinal plants as assessed in an in vitro biochemical HIV-1 reverse transcriptase assay. *Phyther. Res. An Int. J. Devoted to Pharmacol. Toxicol. Eval. Nat. Prod. Deriv.* 19, 287–290.
- Krebs, F.C., Miller, S.R., Malamud, D., Howett, M.K., Wigdahl, B., 1999. Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by nonoxynol-9, C31G, or an alkyl sulfate, sodium dodecyl sulfate. *Antiviral Res.* 43, 157–173.
- Kumazawa, S., Kubota, S., Yamamoto, H., Okamura, N., Sugiyama, Y., Kobayashi, H., Nakanishi, M., Ohta, T., 2013. Antiangiogenic activity of flavonoids from *Melia azedarach*. *Nat. Prod. Commun.* 8, 1934578X1300801215.
- Larruskain, A., Jugo, B.M., 2013. Retroviral infections in sheep and goats: small ruminant lentiviruses and host interaction. *Viruses* 5, 2043–2061.
- Li, S.-F., Gong, M.-J., Sun, Y.-F., Shao, J.-J., Zhang, Y.-G., Chang, H.-Y., 2019. In vitro and in vivo antiviral activity of mizoribine against foot-and-mouth disease virus. *Molecules* 24, 1723.
- Luo, G., Gao, S., 2020. Global health concerns stirred by emerging viral infections. *J. Med. Virol.* 92, 399–400.
- Matos, F.J. de A., 2009. *Introdução à fitoquímica experimental*. edições UFC.
- Mbah, A.U., Udeinya, I.J., Shu, E.N., Chijioke, C.P., Nubila, T., Udeinya, F., Muobuikwe, A., Mmuobieri, A., Obioma, M.S., 2007. Fractionated neem leaf extract is safe and increases CD4+ cell levels in HIV/AIDS patients. *Am. J. Ther.* 14, 369–374.
- Minguijón, E., Reina, R., Pérez, M., Polledo, L., Villoria, M., Ramírez, H., Leginagoikoa, I., Badiola, J.J., García-Marín, J.F., De Andrés, D., 2015. Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Vet. Microbiol.* 181, 75–89.
- Molaei, V., Bazzucchi, M., De Mia, G.M., Otarod, V., Abdollahi, D., Rosati, S., Lühken, G., 2020. phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses in Germany and Iran suggests their expansion with domestic sheep. *Sci. Rep.* 10, 1–12.
- Moradi, M.-T., Karimi, A., Rafieian-Kopaei, M., Fotouhi, F., 2017. In vitro antiviral effects of *Peganum harmala* seed extract and its total alkaloids against Influenza virus. *Microb. Pathog.* 110, 42–49.
- Naithani, R., Huma, L.C., Holland, L.E., Shukla, D., McCormick, D.L., Mehta, R.G., Moriarty, R.M., 2008. Antiviral activity of phytochemicals: a comprehensive review. *Mini Rev. Med. Chem.* 8, 1106–1133.
- Nerome, K., Shimizu, K., Zukeran, S., Igarashi, Y., Kuroda, K., Sugita, S., Shibata, T., Ito, Y., Nerome, R., 2018. Functional growth inhibition of influenza A and B viruses

- by liquid and powder components of leaves from the subtropical plant *Melia azedarach* L. *Arch. Virol.* 163, 2099–2109.
- Nisole, S., Saïb, A., 2004. Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology* 1, 9.
- Nolkemper, S., Reichling, J., Sensch, K.H., Schnitzler, P., 2010. Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. *Phytomedicine* 17, 132–138.
- Nováková, L., Pavlík, J., Chrenková, L., Martinec, O., Červený, L., 2018a. Current antiviral drugs and their analysis in biological materials—Part II: Antivirals against hepatitis and HIV viruses. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147, 378–399.
- Nováková, L., Pavlík, J., Chrenková, L., Martinec, O., Červený, L., 2018b. Current antiviral drugs and their analysis in biological materials—Part I: Antivirals against respiratory and herpes viruses. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147, 400–416.
- Parida, M.M., Upadhyay, C., Pandya, G., Jana, A.M., 2002. Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* Juss) leaves on dengue virus type-2 replication. *J. Ethnopharmacol.* 79, 273–278.
- Peixoto, R.M., da Silva Teixeira, M.F., Andrioli, A., Pinheiro, R.R., de Sousa Silva, A.A., de Freitas Aguiar, T.D., de Azevedo, D.A.A., de Sousa, A.L.M., 2018. Perspectivas do uso de fitoterápicos no tratamento do sêmen caprino infectado pelo vírus da Artrite Encefalite Caprina. *Med. Veterinária* 12, 193–201.
- Petrera, E., Coto, C.E., 2014. Effect of the Potent Antiviral 1-Cinnamoyl-3, 11-Dihydroxymeliacarpin on Cytokine Production by Murine Macrophages Stimulated with HSV-2. *Phyther. Res.* 28, 104–109.
- Pisoni, G., Bertoni, G., Manarolla, G., Vogt, H.-R., Scaccabarozzi, L., Locatelli, C., Moroni, P., 2010. Genetic analysis of small ruminant lentiviruses following lactogenic transmission. *Virology* 407, 91–99.
- Pizzolatti, M.G., Cunha, A., Szpoganicz, B., De Sousa, E., Braz-Filho, R., Schripsema, J., 2003. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). *Quim. Nova* 26, 466–469. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000400003>
- Reed, L.J., Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 27, 493–497 (1938).method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 27, 493–497.
- Reina, R., Andrés, D. De, Amorena, B., 2013. Immunization against small ruminant lentiviruses. *Viruses* 5, 1948–1963.
- Sanna, G., Madeddu, S., Giliberti, G., Ntalli, N.G., Cottiglia, F., De Logu, A., Agus, E., Caboni, P., 2015. Limonoids from *Melia azedarach* fruits as inhibitors of flaviviruses and *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 10.
- Shikalepo, R., Mukakalisa, C., Kandawa-Schulz, M., Chingwaru, W., Kapewangolo, P., 2018. In vitro anti-HIV and antioxidant potential of *Bulbine frutescens* (Asphodelaceae). *J. Herb. Med.* 12, 73–78.

- Shimizu, J.F., Lima, C.S., Pereira, C.M., Bittar, C., Batista, M.N., Nazaré, A.C., Polaquini, C.R., Zothner, C., Harris, M., Rahal, P., 2017. Flavonoids from *Pterogyne nitens* inhibit hepatitis C virus entry. *Sci. Rep.* 7, 1–9.
- Sousa, A.L.M., Pinheiro, R.R., Araújo, J.F., Santos, V.W.S., Azevedo, D.A.A., Peixoto, R.M., Souza, V. de, Andrioli, A., Damasceno, E.M., Dantas, T.V.M., 2018. In vitro and in vivo evaluation of sodium dodecyl sulfate (SDS) as an inactivator of caprine lentivirus (CLV) in colostrum and milk. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* 70, 1459–1467.
- Strasfeld, L., Chou, S., 2010. Antiviral drug resistance: mechanisms and clinical implications. *Infect. Dis. Clin.* 24, 809–833.
- Sultana, S., Asif, H.M., Akhtar, N., Waqas, M., Rehman, S.U., 2014. Comprehensive Review on Ethanobotanical Uses, Phytochemistry and Pharmacological Properties of *Melia azedarach* Linn. *Asian J. Pharm. Res. Heal. Care* 6.
- Thormar, H., Balzarini, J., Debyser, Z., Witvrouw, M., Desmyter, J., De Clercq, E., 1995. Inhibition of visna virus replication and cytopathic effect in sheep choroid plexus cell cultures by selected anti-HIV agents. *Antiviral Res.* 27, 49–57.
- Urdaneta, S., Wigdahl, B., Neely, E.B., Berlin, C.M., Schengrund, C.-L., Lin, H.-M., Howett, M.K., 2005. Inactivation of HIV-1 in breast milk by treatment with the alkyl sulfate microbicide sodium dodecyl sulfate (SDS). *Retrovirology* 2, 28.
- Venturino, E., Collino, S., Ferreri, L., Bertolotti, L., Rosati, S., Giacobini, M., 2019. An effective management strategy for the control of two lentiviruses in goat breedings. *J. Theor. Biol.* 469, 96–106.
- Wachsman, M.B., Damonte, E.B., Coto, C.E., de Torres, R.A., 1987. Antiviral effects of *Melia azedarach* L. leaves extracts on Sindbis virus-infected cells. *Antiviral Res.* 8, 1–12.
- Younus, I., Ashraf, M., Fatima, A., Altaf, I., Javeed, A., 2017. Evaluation of cytotoxic and antiviral activities of aqueous leaves extracts of different plants against foot and mouth disease virus infection in farming animals. *Pak. J. Pharm. Sci.* 30.
- Younus, I., Siddiq, A., Ishaq, H., Anwer, L., Badar, S., Ashraf, M., 2016. Evaluation of antiviral activity of plant extracts against foot and mouth disease virus in vitro. *Pak. J. Pharm. Sci.* 29, 1263–1268.

9 CAPÍTULO IV

Antiviral in vitro activity ethanolic extracts of Azadirachta indica and Melia azedarach against the caprine lentivirus in colostrum and milk

Atividade antiviral in vitro de extratos etanólicos de Azadirachta indica e Melia azedarach contra o lentivírus caprino em colostro e leite

Artigo submetido ao periódico: Scientific Reports (ISSN: 2045-2322)

(Submetido para publicação em maio de 2020)

Qualis Capes: A1, Fator de impacto: 4.525

Antiviral *in vitro* activity ethanolic extracts of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* against the caprine lentivirus in colostrum and milk

Ana LÍdia Madeira de Sousa¹, Raymundo Rizaldo Pinheiro², Juscilânia Furtado Araújo¹, Renato Mesquita Peixoto², Dalva Alana Aragão de Azevedo¹, Ana Milena César Lima³, Samara Cristina Rocha⁴, Iane Sousa Brandão⁴, Ana Carolina Silva e Silva⁵, Selene Maia de Moraes⁵, Alice Andrioli², Maria Fátima da Silva Teixeira¹.

¹Ceará State University, Laboratory of Virology (LABOVIR) – Fortaleza (CE), Brazil

²Embrapa Goats and Sheep, Laboratory of Virology – Sobral (CE), Brazil

³Federal University of Piauí, Department of Animal Health and Reproduction – Teresina (PI), Brazil

⁴State University of Acaraú Valley – Sobral (CE), Brazil

⁵Ceará State University, Laboratory of Chemistry and Natural Products (LQPN) – Fortaleza (CE), Brazil

*Author for correspondence: analidiams10@yahoo.com.br

ABSTRACT: This study aimed to evaluate, *in vitro*, the use of leaf extracts of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* as antivirals against the caprine lentivirus (CLV) in colostrum and milk of goat nannies. Hence, these were collected from eight individuals and infected with standard strain of the CLV. Then, samples were subdivided in aliquots, treated with 150 µg/mL of crude extract, and with ethyl acetate and methanol fractions for 30, 60 and 90 minutes. Following, coculture of somatic cells from colostrum and milk with cells from ovine third eyelid was performed. After this step, viral titers of the supernatants collected from treatments with greater efficacy in coculture were assessed. The organic ethyl acetate fractions of both plants with 90 minutes possibly inhibited up to 1000 times the viral activity of the CLV in colostrum. In milk, this inhibition was up to 800 times for the respective Meliaceae. In conclusion, the ethanolic fraction of ethyl acetate from both plants demonstrated efficacy against CLV in samples from colostrum and milk when submitted to treatment for 90min, which was more effective in colostrum.

Keywords: Antirretroviral; Small Ruminant Lentivirus; Meliaceae; Lactogenic transmission

Introduction

Small Ruminant Lentiviruses (SRLV) compose a wide phylogenetic group of retroviruses¹. These are commonly divided in Caprine Lentivirus (CLV), which include strains that cause Caprine Arthritis Encephalitis (CAE)² in goats, and Ovine Lentivirus (OLV), which include those that cause Maedi-Visna (MV) disease in sheep^{3,4}. However, these viral agents have high mutagenic potential and frequently cross the interspecies barrier between ruminants^{5,6}. In addition, these infections are contagious and incurable diseases that cause great economic losses in goat and sheep production^{7,8,3}. Currently, there are no effective treatments and/or vaccines available^{9,10}, and the search for novel strategies to prevent these conditions is a necessity.

CAE can be transmitted in several ways. Among these, the lactogenic pathway is an important manner by which this disease may pass between animals, which may occur through the ingestion of infected colostrum and milk, either by free viral particles or by viruses contained in monocytes/macrophages^{11,12}. Hence, blocking this form of transmission is important due to the large dissemination of the virus in flocks¹². Among the techniques used with this objective¹³, thermization is the most used option and consists of heating the colostrum/milk to 56°C for 60min^{14,13,15}. However, this method requires equipment and trained staff, which makes it laborious to execute¹⁴. Therefore, it is important to research new practical alternatives that have low cost for the producers and are effective in avoiding dissemination of the disease via the lactogenic pathway in flocks.

In this context, validation of antivirals for the treatment of curable, incurable, chronic and acute viral infections is in constant evolution^{15,16,17,18,19}. Among medicines, the use plants of the Meliaceae Family, such as *Azadirachta indica* (neem) and *Melia azedarach* (chinaberry tree), have demonstrated several medicinal applications in human and veterinary medicine, such as insecticides, bactericides and antivirals^{18,19,20}. Leaf extracts of *Azadirachta indica* were tested against the human immunodeficiency virus (HIV) in the form of vaginal tablets and promising results for the control and dissemination of this pathogen in India were found²¹. In addition, neem demonstrated effects on dengue virus, inhibiting protease activity by means of bioflavonoids, which could contribute to the development of an effective drug against the viral infection²⁰.

Melia azedarach was able to inhibit multiplication of herpes simplex virus type 2 (HSV-2) in epithelial cells and increased the production of cytokines in macrophages, which are important traits for viral elimination²². Furthermore, it also presented potent

antiviral activity against several strains of influenza virus (H₅N₁, H₁N₁, H₃N₂, H₅N₁, H₇N₉ and H₉N₂) in *in vitro* and *in vivo* studies¹⁹. Therefore, this study aimed to evaluate *in vitro* the use of ethanolic leaf extracts of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* as antivirals against CLV in goat colostrum and milk.

Results

Potential antiviral activity of leaf extracts of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach*

Cell destruction and syncytium formation, which are cytopathic effects (CPE) typically caused by CLV, were observed in ovine third eyelid (OTE) cells during culture even after the effect of both ethanolic leaf extracts. However, a gradual reduction of CPE was verified, directly proportional to the different times (30, 60 and 90min) in which phytocompounds were in contact with cells (Table 1).

Viral cytopathic effects														
Samples	Time (min.)	Cell destruction						Presence of syncytium						
		C-	CEE	EAF	MF	C+T.	C+P	C-	CEE	EAF	MF	C+T.	C+P	
Colostrum	<i>A. indica</i>	30	-	++++	+++	+++	+++	+++	-	+	+++	+++	+++	+++
		60	-	+++	++++	++++	++++	++++	-	++	+++	+++	++++	++++
		90	-	+	-	-	+	++	-	++	-	-	+++	+++
	<i>M. azedarach</i>	30	-	++++	++++	++++	++++	++++	-	+++	+++	+++	+++	++++
		60	-	++	+++	+++	+++	+++	-	+++	++	++	+++	+++
		90	-	-	-	+	++	++	-	-	-	++	++	++
Milk	<i>A. indica</i>	30	-	+	+	++	+++	+++	-	+++	+++	+++	++++	++++
		60	-	+	+	++	++++	++++	-	+++	+++	+++	+++	++++
		90	-	++	-	++	++	++	-	++	-	++	+++	+++
	<i>M. azedarach</i>	30	-	++	+	+	++++	++++	-	++	++	++	+++	+++
		60	-	-	-	+	+++	+++	-	-	-	++	+++	++++
		90	-	-	-	+	++	++	-	-	-	+	+++	++++

Table 1. Levels of cytopathic effects in ovine third eyelid (OTE) cells after coculture with somatic cells of goat colostrum and milk (SCC/SMC) treated with crude ethanolic extract (CEE) and the respective organic ethyl acetate (EAF) and methanol (MF) fractions of *Azadirachta indica* (*A. indica*) and *Melia azedarach* (*M. azedarach*) leaves.

C-: negative control (only OTE cells); C+T.: positive control for the treatment (OTE and SCC or SMC cells infected with CLV strain without the addition of extracts), C+P.: positive slide control (OTE cells infected with CLV strain); -: absence of cytopathic effects; +: very light effects; ++: light effects; +++: moderate effects; ++++: intense effects.

Great destruction of cellular monolayers and moderate presence of syncytia occurred in colostrum samples submitted for 30min to crude extracts of *A. indica* and *M.*

azedarach and respective ethyl acetate and methanol fractions. These CPEs were constant in treatments for 60min in the three variations of *A. indica* extracts. However, a light reduction in CPE was observed with the same period for all the tested *M. azedarach* fractions. In 90min, all the extracts caused greater reduction of CPEs.

Concerning milk samples, the three fractions tested for 30min presented light reduction in cell destruction with moderate presence of syncytia. In the 60min treatment, CPE results of all *A. indica* extracts were similar to the previous period. On the other hand, no CPE was observed after the use of crude extract and ethyl acetate fraction of *M. azedarach* for 60min. In 90min, only samples submitted to ethyl acetate fraction of *A. indica* presented CPE while the remaining, and with respect to *M. azedarach*, only in the methanolic fraction a slight formation of EPCs characteristic for goat lentivirus was observed.

These results demonstrated that the efficacy of both Meliaceae plants against CLV was presented more significantly in the 90min treatments for both colostrum and milk. In tests with colostrum, initially, there is cell culture of OTE, which represent the negative control culture, this without the presence of CPE (Fig.1-a). Then, light levels of cell destruction and syncytium formation was observed in OTE cells submitted to crude ethanolic extract of *A. indica* (Fig.1-b, arrow). Nonetheless, no typical CLV CPE was observed with the use of crude extract of *M. azedarach* (Fig.1- e). Ethyl acetate fraction from both plants did not present typical CPE (Fig.1- c, f). Furthermore, methanol fraction of *A. indica* provided reduction of CPE, which were not observed (Fig.1- d). However, there was syncytium formation with the methanol fraction of *M. azedarach* (Fig.1- g, arrows). Regarding the positive controls of the tests, the colostrum without previous treatment and the culture with the standard CAEVCo strain are shown in Fig. 1, in items 1h and 1i, respectively.

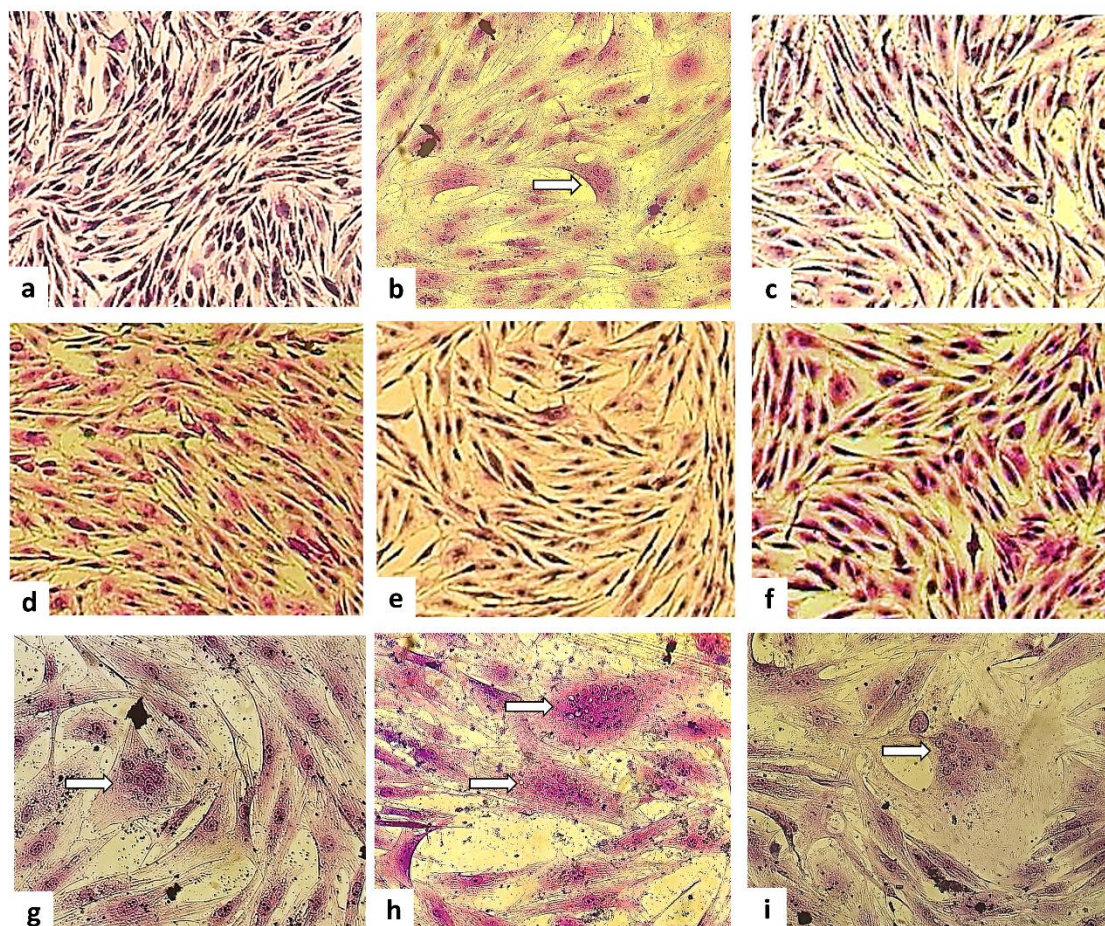


Figure 1. Coculture of ovine third eyelid (OTE) cells and somatic cells of caprine colostrum. a: Negative control of OTE cell culture (100x magnification). b, c, and d: coculture of cells submitted to treatment for 90min with crude ethanolic extract of *Azadirachta indica* leaves, and ethyl acetate and methanol fractions (100x/200x magnification). h: Coculture of OTE and colostrum cells with syncytia (arrows) (control treatment with no addition of extracts) (200x magnification). i: positive control of OTE cells infected with CAEV_{CO} presenting syncytia (arrows) (100x magnification).

The antiviral activity of the extracts was also observed in milk samples treated with both plants for 90min. Initially, there is cell culture of OTE, which represents the negative control culture, this without the presence of CPE (Fig.2-a). The treatment with crude extract and methanol fraction of *A. indica* indicates presented light CPE levels, including syncytia in the culture (Fig.2. b, d - arrows). Only the ethyl acetate fraction of this plant completely inhibited the occurrence of typical CLV cytopathic effects (Fig.2.c). Concerning *M. azedarach* treatments, with the use of crude extract and ethyl acetate fraction, CEP characteristic for goat lentivirus were not identified, and very light CEP were seen in the methanolic fraction (Fig.2-e, f, g). This data may indicate an antiretroviral potential of the fractions that inhibited the formation of CPE in the coculture. Lastly, the positive controls of the tests, the colostrum without previous

treatment and the culture with the standard CAEV_{Co} strain are shown in Fig. 2, in items 2h and 2i, respectively.

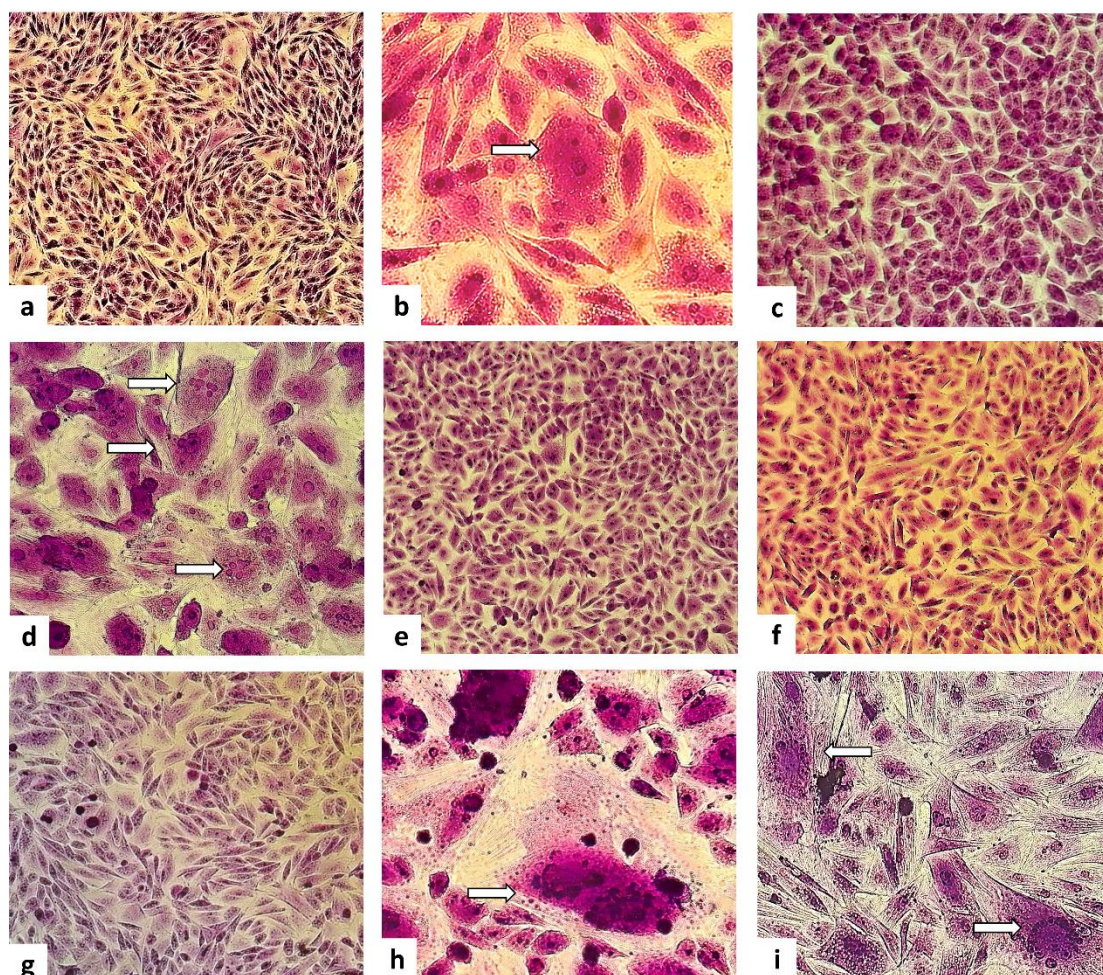


Figure 2. Coculture with ovine third eyelid (OTE) cells and milk somatic cells. a: Negative control of culture with OTE cells (100x magnification). b, c and d: coculture of cells submitted to treatment by crude ethanolic extract of *Azadirachta indica* leaves and organic fractions of ethyl acetate and methanol for 90min (100x/200x magnification). e, f, g: coculture of cells submitted to treatment for 90min with crude ethanolic extract of *Melia azedarach* leaves and organic fractions of ethyl acetate and methanol (100x/200x magnification). h: coculture of OTE and colostrum cells with syncytia (arrows) (control treatment with no extract) (200x magnification). i: positive control of OTE cells infected by CAEV_{Co} with syncytia (arrows) (100x magnification).

Viral titration of samples

The evidence found in the analysis of presence or absence of cytopathic effects typical of CLV in treatments with leaf extracts of *A. indica* and *M. azedarach* was confirmed with viral titration. A decrease in the number of infectious viral particles in cell suspension of milk and colostrum samples submitted to 90min treatment with ethanolic extracts of the plants was observed in comparison to the controls (Fig. 3).

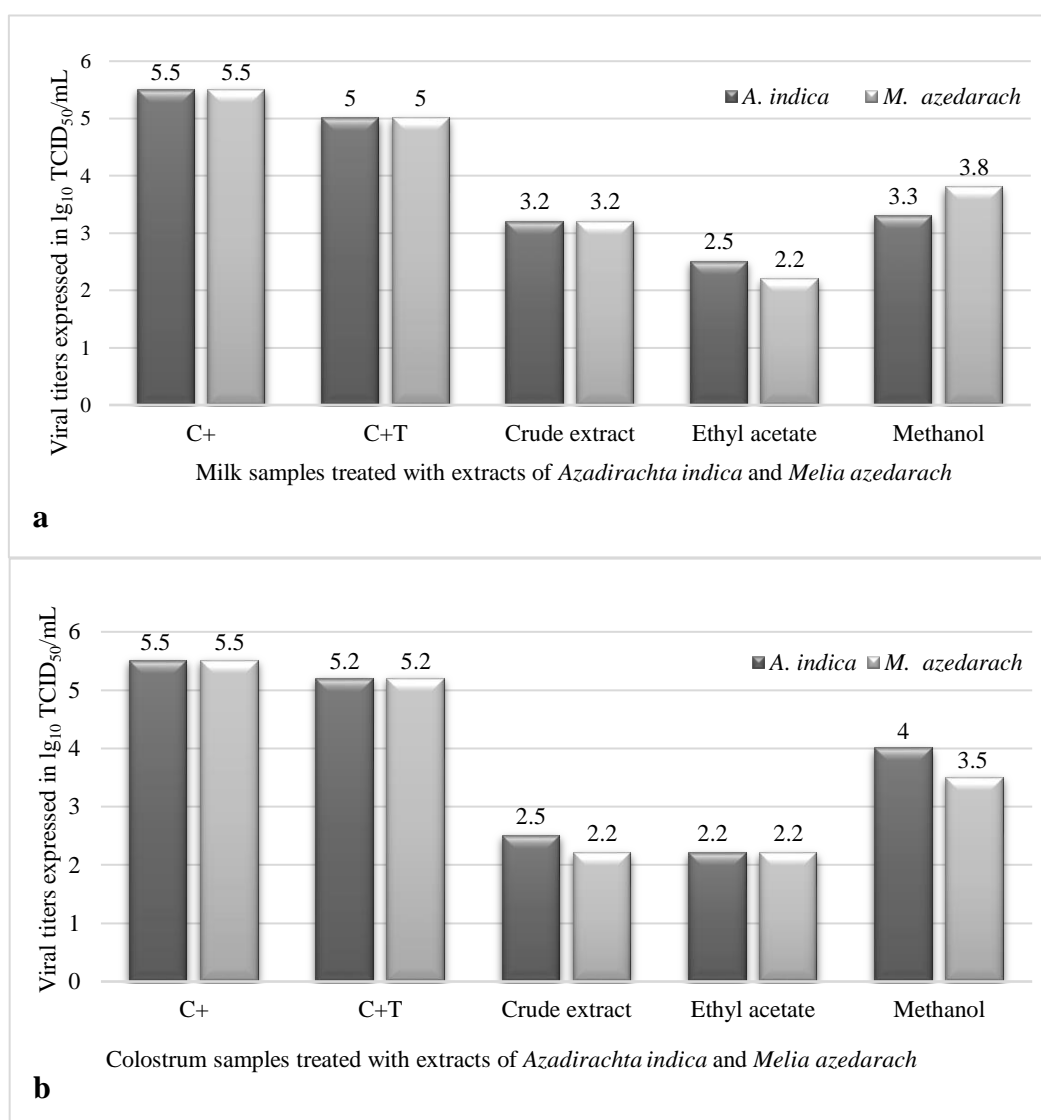


Figure 3. Viral titers of milk and colostrum samples cocultured with ovine third eyelid (OTE) cells submitted to 90min treatment composed of ethanolic leaf extracts of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach*. a: colostrum samples treated with crude extract of *A. indica* and *M. azedarach* leaves and respective ethyl acetate and methanol fractions. b: milk samples treated with crude extract of *A. indica* and *M. azedarach* leaves and respective ethyl acetate and methanol fractions. *TCID₅₀/mL: tissue culture infection dose is the highest dilution that presented, at 14 days post-inoculation, syncytia in 50% of inoculated wells, C+: positive control of standard CAEV_{CO} strain, C+T.: positive control of treatments.

In goat infected colostrum samples (C+T), the initial viral titer was $10^{-5.2}$ TCID₅₀/mL, which was close to the result observed in the positive control of CAEV_{CO} (C+), $10^{-5.5}$ TCID₅₀/mL. Concerning treatments, after the effect of plant extracts, decreases in viral titers were observed to $10^{-2.5}$, $10^{-2.2}$ and 10^{-4} TCID₅₀/mL in samples treated with crude extract, ethyl acetate fraction and methanol fraction of *A. indica*, respectively (Fig. 3.a). Extracts of *M. azedarach* presented similar results, which were

$10^{-2.2}$, $10^{-2.2}$, $10^{-3.5}$ TCID₅₀/mL for crude extract, ethyl acetate fraction and methanol fraction, respectively. Furthermore, ethyl acetate fraction presented the best results in both tests in comparison to C+T control with a logarithmic difference of 3 lg between viral titers, demonstrating a relevant and promising antiviral potential.

In milk samples, the antiviral potential of ethyl acetate fractions of *A. indica* and *M. azedarach* were constant, which presented values of $10^{-2.5}$ and $10^{-2.2}$ TCID₅₀/mL, respectively. These values also demonstrated that there was logarithmic difference of 2.3 lg and 2.8 lg, respectively, between titers in comparison to the positive milk control (C+T), which was 10^{-5} TCID₅₀/mL (Fig. 3.b). Crude extracts and organic methanol fractions from both plants demonstrated more elevated titer values, $10^{-3.2}$ and $10^{-3.2}$ TCID₅₀/mL for crude extract and $10^{-3.3}$ and $10^{-3.8}$ TCID₅₀/mL for methanol fraction of *A. indica* and *M. azedarach*, respectively. These values demonstrated lower efficacy when compared to those from ethyl acetate fractions of both plants.

Hence, the 150 µg/mL concentration of ethyl acetate fractions of ethanolic extracts from *A. indica* and *M. azedarach* leaves were possibly capable of reducing 1000 times the viral titer of CLV in colostrum. The inhibition in milk was 500 to 800 times for the respective plants.

Chemical composition of *A. indica* and *M. azedarach* leaf extracts

In the analysis, secondary metabolites were found, such as: phenols, flavonones, flavonols, xanthonones, steroids, flavonoids, triterpenoids, saponins and alkaloids in all extracts.

Discussion

Since long, researches with bioactive substances have been performed to investigate possible antiviral effects against infections in humans and animals. In this context, plants from several botanical families and their parts, such as leaves, roots, flowers and seeds have been studied and revealed possess promising substances in their composition²³. Many compounds from plants present antiviral activity for example flavonoids²⁴ or other classes²⁵, which are present in both plant extracts showed action against several types of virus. Quercetin is a flavonoid present in extracts of *A. indica*²⁶ which present antiviral activity against several viruses.

Hence, data obtained in this study performed with coculture of SCC/SMC and OTE cells after use of ethanolic extracts of *A. indica* and *M. azedarach* may reveal a possible antiviral activity of these against CLV. This fact was more observed with the ethyl acetate fraction when used for 90min that successfully provided an intense inhibition of syncytium formation and cell destruction, which are the main typical cytopathic effects of CLV¹⁵.

Thus, the virulence of positive colostrum and milk samples for CLV was affected by treatments with leaf extracts of *A. indica* and *M. azedarach*, as observed in coculture, since coculture has several applications in biology and in the study of natural or synthetic interactions among cell populations. This technique may be defined as a variation of cell culture, in which two or more different cell populations are incubated with some degree of contact between them²⁷. Therefore, free viral transmission may occur in the extracellular environment or in cell-to-cell interactions, involving direct contact between them²⁸.

Concerning antiviral activity, reported findings consolidate the use of these Meliaceae as promising herbal medicines. Antiviral activity of *A. indica* have been reported against coxsackievirus (group B) using ketone extracts²⁹ and against dengue virus using aqueous extracts³⁰ and specific isolates, such as triterpenoids³¹. HIV is also inhibited by neem when administered via intravaginal tablets in women, as demonstrated by studies in India performed *in vivo*²¹ and *in vitro*³² with CD4+. This plant have also been tested against PV-1³³ and HSV³⁴ in experiments performed with polysaccharides. In addition, aqueous extracts of this herbal medicine have presented effects against foot-and-mouth disease^{20,35}. Furthermore, the use of flavonoids from this species of Meliaceae was able to inhibit viral activity of several influenza strains (H₁N₁, H₁N₂, H₂N₂, H₂N₃, H₅N₁, H₇N₂, H₇N₃, H₇N₇ and H₉N₂)³⁶.

Basic studies performed with extracts of *M. azedarach* report antiviral activity against Sindbis virus³⁷. In 1998, Castilla *et al* inhibited multiplication of the Junin virus with the meliacine peptide³⁸. More recent findings demonstrated that extracts from chinaberry tree affect DNA synthesis, maturation and egress of HSV-1^{39,40} and inhibit viral multiplication of HSV-2²². In addition, fruit extracts of *M. azedarach* inactivated dengue virus, yellow fever virus and West Nile virus⁴¹. Furthermore, strains of influenza virus (H₅N₁, H₁N₁, H₃N₂, H₅N₁, H₇N₉ and H₉N₂)¹⁹ and HSV-3⁴² were inhibited by aqueous and ethanolic extracts of the same plant, respectively.

The viral titration method used in this study after coculture investigated antiviral activity of the ethanolic leaf extracts from *A. indica* and *M. azedarach* in colostrum and milk samples infected by CLV. The use of these plants reduced CLV titers, which means a decreased number of viral particles in cell supernatant, in the order of 1000 times in colostrum and 800 times in milk. However, complete elimination of CLV in these samples did not occur. Yet, these plants may be considered efficient herbal medicines in antiretroviral control. Similar data was reported by Narovlianskiĭ *et al*, which studied antiviral effects of sodium polyprenyl phosphate (PPP) against hepatitis C virus (HCV) in swine embryo kidney cells (SPEV) and demonstrated that 60 µg of PPP decreased HCV titers with a 3.5 lg difference⁴³.

Moreover, the more intense reduction in viral titers of colostrum samples may possibly be attributed to the interaction of secondary metabolites with proteins that naturally occur more frequently in this type of biological sample. One example is lactoferrin, which is a glycoprotein that presents variable concentrations according to the animal species⁴⁴ and contributes to the development of the immune system⁴⁵. This protein have been reported in the effective control against rotavirus⁴⁶ due to the possible role in stopping the entrance of this pathogen in host cells after blocking viral receptors or in direct ligation with viral particles⁴⁷. This fact may have been potentiated through synergistic activity of components found in ethanolic leaf extracts of the investigated plants and may have favored an improved antiretroviral activity of fractions in goat colostrum, considering that flavonoids are capable of interacting with lactoferrin in secretions of ruminants⁴⁸.

In this study, a higher concentration of the distinct ethanolic fractions from both Meliaceae plants was used in comparison to other studies. Values of 12.1 to 80 µg /mL of *A. indica* were effective against PV-1³³, while 63.5 µg /mL of *M. azearach* was efficient in inhibiting herpes simplex virus type 1 (HSV-1)⁴⁰. However, the effective dose of a substance against a strain varies, in general, according to the viral type. This occurs due to the high capacity of mutation of viruses and the necessity for greater concentrations of substance for satisfactory inhibiting effects against viral agents^{49,20,15}.

Chemical analysis of the different fractions used in this study revealed a composition of phenols, flavonones, flavonols, xanthones, steroids, flavonoids, triterpenoids, saponins and alkaloids. These components are usually reported in plants from Meliaceae family⁴⁰, and the antiviral effect is attributed to the secondary metabolites that may act alone or synergistically^{50,51,52}. Furthermore, when acting in consonance,

these substances present great pharmacological variability and may, in the future, be used as broad-spectrum antimicrobial agents^{53,54}.

In addition, the vast majority of phytochemicals with antiviral activity are derived from aqueous and ethanolic extracts^{30,41,20,19,35,42}. The study of pharmacological applications of plant components, such as alkaloids, flavonoids and terpenoids, are fundamental in researching efficient antivirals. Moreover, flavonoids are bioactive substances with antiviral activity in isolated preparations or in distinct vegetable extracts^{55,36,51,56}. These phytochemicals may act in the inhibition of proteases and enzymes, such as the reverse transcriptase^{36,56}, which is responsible for catalyzing the reverse transcription of the viral RNA in dsDNA molecules that may be integrated to the host cell genome⁵⁷.

Studies involving antiretroviral therapy are focused mostly in the development of novel formulations or combinations of drugs. However, infections by HIV-1 and SLRVs are incurable by current therapies. Therefore, new drug approaches are constantly needed⁵⁸ which makes researches with phytochemicals crucial for the development of effective treatment protocols. Furthermore, the biodiversity of the Brazilian flora is a great opportunity for development of researches for the use of plant compounds, including those with antiviral potential that may be used in human and veterinary medicine in alternative or complementary manners⁵⁹. In conclusion, the ethanolic ethyl acetate fraction from both Meliaceae in the concentration of 150 µg/mL demonstrated efficacy against CLV in colostrum and milk when submitted to treatment for 90min with a more potentiated antiviral effect in the former. Despite the lack of complete CLV elimination, *A. indica* and *M. azedarach* are interesting alternatives for treatment of retroviral infections, considering that their extracts reduced efficiently the viral load. Hence, more deep studies on these herbal medicines are necessary to validate and optimize the technique and, as a consequence, the efficacy of these compounds as antiretrovirals.

Material and methods

Bioethical aspects

This project was submitted and approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA) of Embrapa Goats and Sheep with protocol number 002/2018 following

guidelines of the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA, law 11794 of October 8, 2008) and subsequent normative resolutions.

Collection and processing of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* ethanolic extracts

Azadirachta indica and *Melia azedarach* leaves were collected in Ceará and Piauí states, respectively, in a total volume of 5kg each. Then, these were identified in exsiccates with vouchers 18898 and 18897, respectively, in Professor Francisco José Abreu de Matos herbarium, State University of Acaraú Valley (UVA), Sobral, Brazil.

Following identification, leaves were separated from branches and dried in environmental temperature. Then, 2.025kg of *A. indica* and 1.26kg of *M. azedarach* were submerged in 12L and 13L of 96% ethyl alcohol, respectively, and maintained for seven days in sealed recipients. Afterwards, the obtained solutions were submitted to roto-evaporation process until 80% to 90% of solvent was evaporated. The concentrate was maintained in water bath to evaporate the remaining solvent until a pasty consistency was obtained, which formed the crude ethanolic leaf extracts of both plants.

The organic fractions of ethyl acetate and methanol were obtained via preparative vacuum filtration chromatography. Thus, 25g of each crude extract was added to 50g of silica gel (1:2 proportion). Then, with the aid of a Buchner funnel, these mixtures were submitted to vacuum filtration and eluted with the organic solvents ethyl acetate and methanol, resulting in the respective fractions. The products were roto-evaporated and submitted to water bath for complete evaporation of solvents and the ethyl acetate and methanol fractions from both Meliaceae plants were obtained and stored at 4°C until use.

Phytochemical test of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* extracts

Ethanolic extracts were submitted to phytochemical test according to the methodology described by Matos⁶⁰. The extracts were subjected to chemical reactions with specific reagents, which resulted in color change, characteristic precipitation and / or foam formation.

Colostrum and milk samples

The experiment was performed with animals from the dairy flock of Embrapa Goats and Sheep in Sobral City, Ceará, Brazil. Approximately 100mL of colostrum was collected in sterile recipient from eight goat nannies that recently gave birth and were positive for SRLV via nested-Polymerase Chain Reaction (nested-PCR)⁶¹ and Western

Blot⁶². Then, samples were combined in a pool. This solution was reinfected with 450 μ L of standard CLV strain (CAEV_{Co}, kindly provided by the Federal Rural University of Pernambuco – UFRPE and derived from the Laboratoire Associé de Recherches sur les Petits Ruminants – INRA – ENVL - France) with initial titer of 10^{4.8} TCID₅₀/mL for 60min at 37°C under agitation. Following, the same methodology was conducted with goat milk samples.

Treatment of colostrum and milk samples

Crude ethanolic leaf extracts from *A. indica* and *M. azedarach* and ethyl acetate and methanol fractions were diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) at 0.5%. Then, these solutions were added to colostrum/milk samples in the concentration of 150 μ g/mL for 30, 60 and 90min, individually. In addition, control treatments for colostrum/milk (no addition of extracts) were prepared. Following, samples were centrifugated at 3,000g for 15min at 4°C. Somatic cells from colostrum/milk (SCC/SMC) were obtained with the methodology described by Karanikolaou *et al.*⁶³ and submitted to coculture with ovine third eyelid (OTE) cells.

Coculture with third eyelid (OTE) cells

For the coculture, twelve 24-well plates were prepared 72h before the beginning of this step with the addition of OTE⁶⁴ cells in the concentration of 2.5x10⁵ cells/mL. After confluence of approximately 80% of OTE cells, SCC/SMC were distributed in plates in the same concentrations with four repetitions. In wells, 500 μ L of minimum essential medium (MEM) was added along with 2% amphotericin B, 3% penicillin and streptomycin, 1% of gentamycin and 5% of fetal calf serum (FCS). Per plate, eight control wells were divided in a part with only OTE cells, negative control wells (C⁻), and the other half with positive controls (C^{+P}) composed by OTE cells infected with CLV standard strain. Plates were incubated in 5% CO₂ environment at 37°C. Media was replaced in seven-days intervals and cellular trypsinization every 21 days. After the 63 days of culture, cell supernatant was collected and wells were stained with crystal violet (0.1%) for visualization of viral cytopathic effects¹⁵.

Titration of samples with antiviral activity

After the visualization of viral cytopathic effects, samples with best antiviral results in colostrum and milk were submitted to viral titration⁶⁵.

For this procedure, supernatants from last collection of OTE+SCC/SMC coculture cells were submitted to titration in microplate via decimal dilutions in MEM without FCS in four repetitions per dilution. For every 50uL of viral dilution, 50 uL of OTE cell suspension in the concentration of 2.5×10^5 cells/mL was added. Positive (OTE cells, MEM and CLV with known titer) and negative (OTE cells and MEM) control wells were prepared. Microplates were incubated at 37°C with 5% CO₂ for 14 days with daily observations for typical cytopathic effects (CPE) and, after this period, fixated with methanol and stained with crystal violet at 0.1%. The titer was calculated according to Reed & Muench. It was defined as the reciprocal of the highest dilution that presented, 14 days after inoculation, syncytia in 50% of the inoculated wells⁶⁵.

References

1. Olech, M., Rachid, A., Croisé, B., Kuźmak, J. & Valas, S. Genetic and antigenic characterization of small ruminant lentiviruses circulating in Poland. *Virus Res.* **163**, 528–536, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.11.019> (2012).
2. Bertolotti, L. *et al.* Characterization of new small ruminant lentivirus subtype B3 suggests animal trade within the Mediterranean Basin. *J. Gen. Virol.* **92**, 1923–1929, DOI: [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(85\)90033-6](https://doi.org/10.1016/0163-7258(85)90033-6) (2011).
3. Molaee, V. *et al.* phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses in Germany and iran suggests their expansion with domestic sheep. *Sci. Rep.* **10**, 1–12, DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58990-9> (2020).
4. Kuhar, U., Barlič-Maganja, D. & Grom, J. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses detected in Slovenia. *Vet. Microbiol.* **162**, 201–206, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.08.024> (2013).
5. Minguijón, E. *et al.* Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Vet. Microbiol.* **181**, 75–89, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.08.007> (2015).
6. Michiels, R., Adjadj, N. R. & De Regge, N. Phylogenetic Analysis of Belgian Small Ruminant Lentiviruses Supports Cross Species Virus Transmission and Identifies New Subtype B5 Strains. *Pathogens* **9**, 183, DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens9030183> (2020).
7. Azevedo, D. A. A. de *et al.* Small ruminant lentiviruses: economic and productive losses, consequences of the disease. *Arq. Inst. Biol. (Sao. Paulo)*. **84**, DOI: <https://doi.org/10.1590/1808-1657000552016> (2017).
8. de Figueiredo Guilherme, R. *et al.* Characterization and typology of sheep and goat production systems in the State of Paraíba, a semi-arid region of northeastern Brazil. *Semin. Ciências Agrárias* **38**, 2163–2178, DOI: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n4p2163> (2017).

9. Reina, R., Andrés, D. De & Amorena, B. Immunization against small ruminant lentiviruses. *Viruses* **5**, 1948–1963, DOI: <https://doi.org/10.3390/v5081948> (2013).
10. Venturino, E. *et al.* An effective management strategy for the control of two lentiviruses in goat breedings. *J. Theor. Biol.* **469**, 96–106, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2019.02.018> (2019).
11. Herrmann-Hoesing, L. M., Palmer, G. H. & Knowles, D. P. Evidence of proviral clearance following postpartum transmission of an ovine lentivirus. *Virology* **362**, 226–234, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.12.021> (2007).
12. Pisoni, G. *et al.* Genetic analysis of small ruminant lentiviruses following lactogenic transmission. *Virology* **407**, 91–99, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.08.004> (2010).
13. de Sousa, A. L. M. *et al.* Sodium dodecyl sulfate as a viral inactivator and future perspectives in the control of small ruminant lentiviruses. *Arq. Inst. Biol. (Sao Paulo)*. **86**, DOI: <https://doi.org/10.1590/1808-1657000752018> (2019).
14. Peretz, G., Asso, J. & Devillechaise, P. Le CAEV: Revue des connaissances actuelles et conséquences pratiques. *Rev. Méd. Vét* **144**, 93–98 (1993).
15. Sousa, A. L. M. *et al.* In vitro and in vivo evaluation of sodium dodecyl sulfate (SDS) as an inactivator of caprine lentivirus (CLV) in colostrum and milk. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* **70**, 1459–1467, DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9556> (2018).
16. Amirian, E. S. & Levy, J. K. Current knowledge about the antivirals remdesivir (GS-5734) and GS-441524 as therapeutic options for coronaviruses. *One Heal.* 100128, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100128> (2020).
17. Zheng, Y., Ma, S., Xiong, Y. & Fan, X. The Efficacy and Safety of Direct-Acting Antiviral Regimens for HCV/HIV Co-infection: A Systematic review and Network meta-analysis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* DOI: <https://doi.org/10.1111/jgh.15051> (2020).
18. Kharwar, R. N. *et al.* Harnessing the Phytotherapeutic Treasure Troves of the Ancient Medicinal Plant *Azadirachta indica* (Neem) and Associated Endophytic Microorganisms. *Planta Med.* DOI: <https://doi.org/10.1055/a-1107-9370> (2020).
19. Nerome, K. *et al.* Functional growth inhibition of influenza A and B viruses by liquid and powder components of leaves from the subtropical plant *Melia azedarach* L. *Arch. Virol.* **163**, 2099–2109, DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3830-x> (2018).
20. Younus, I., Ashraf, M., Fatima, A., Altaf, I. & Javeed, A. Evaluation of cytotoxic and antiviral activities of aqueous leaves extracts of different plants against foot and mouth disease virus infection in farming animals. *Pak. J. Pharm. Sci.* **30**, (2017).
21. Joshi, S. N. *et al.* Phase I safety study of Praneem polyherbal vaginal tablet use

- among HIV-uninfected women in Pune, India. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **99**, 769–774, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.01.007> (2005).
22. Petrera, E. & Coto, C. E. Effect of the Potent Antiviral 1-Cinnamoyl-3, 11-Dihydroxymeliacarpin on Cytokine Production by Murine Macrophages Stimulated with HSV-2. *Phyther. Res.* **28**, 104–109, DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.4974> (2014).
 23. Peixoto, R. M. *et al.* Perspectivas do uso de fitoterápicos no tratamento do sêmen caprino infectado pelo vírus da Artrite Encefalite Caprina. *Med. Veterinária* **12**, 193–201, DOI: <https://doi.org/10.26605/medvet-v12n3-2395> (2019).
 24. Zakaryan, H., Arabyan, E., Oo, A. & Zandi, K. Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. *Arch. Virol.* **162**, 2539–2551, DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3417-y> (2017).
 25. Abubakr, M. D., Mandal, S. C. & Banerjee, S. Natural compounds against flaviviral infections. *Nat. Prod. Commun.* **8**, 1934578X1300801039 (2013).
 26. Chourasiya, A., Upadhyay, A. & Shukla, R. N. Isolation of quercetin - from the leaves of *Azadirachta indica* and anti-diabetic study of the crude extracts. **25**, 179–182 (2012).
 27. Goers, L., Freemont, P. & Polizzi, K. M. Co-culture systems and technologies: Taking synthetic biology to the next level. *J. R. Soc. Interface* **11**, DOI: <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0065> (2014).
 28. Zhong, P. *et al.* Cell-to-Cell Transmission Can Overcome Multiple Donor and Target Cell Barriers Imposed on Cell-Free HIV. *PLoS One* **8**, DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053138> (2013).
 29. Badam, L., Joshi, S. P. & Bedekar, S. S. 'In vitro' antiviral activity of neem (*Azadirachta indica*. A. Juss) leaf extract against group B coxsackieviruses. *J. Commun. Dis.* **31**, 79–90 (1999).
 30. Parida, M. M., Upadhyay, C., Pandya, G. & Jana, A. M. Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* Juss) leaves on dengue virus type-2 replication. *J. Ethnopharmacol.* **79**, 273–278, DOI: [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(01\)00395-6](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(01)00395-6) (2002).
 31. Dwivedi, V. D., Tripathi, I. P. & Mishra, S. K. In silico evaluation of inhibitory potential of triterpenoids from *Azadirachta indica* against therapeutic target of dengue virus, NS2B-NS3 protease. *J. Vector Borne Dis.* **53**, 156 (2016).
 32. Mbah, A. U. *et al.* Fractionated neem leaf extract is safe and increases CD4+ cell levels in HIV/AIDS patients. *Am. J. Ther.* **14**, 369–374, DOI: <https://doi.org/10.1097/MJT.0b013e3180a72199> (2007).
 33. Faccin-Galhardi, L. C. *et al.* The in vitro antiviral property of *Azadirachta indica* polysaccharides for poliovirus. *J. Ethnopharmacol.* **142**, 86–90, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.04.018> (2012).

34. Faccin-Galhardi, L. C. *et al.* Assessment of antiherpetic activity of nonsulfated and sulfated polysaccharides from *Azadirachta indica*. *Int. J. Biol. Macromol.* **137**, 54–61, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.129> (2019).
35. Li, S.-F. *et al.* In vitro and in vivo antiviral activity of mizoribine against foot-and-mouth disease virus. *Molecules* **24**, 1723, DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24091723> (2019).
36. Ahmad, A., Javed, M. R., Rao, A. Q. & Husnain, T. Designing and screening of universal drug from neem (*Azadirachta indica*) and standard drug chemicals against influenza virus nucleoprotein. *BMC Complement. Altern. Med.* **16**, 519, DOI: <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1469-2> (2016).
37. Wachsman, M. B., Damonte, E. B., Coto, C. E. & de Torres, R. A. Antiviral effects of *Melia azedarach* L. leaves extracts on Sindbis virus-infected cells. *Antiviral Res.* **8**, 1–12, DOI: [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(87\)90083-0](https://doi.org/10.1016/0166-3542(87)90083-0) (1987).
38. Castilla, V., Barquero, A. A., Mersich, S. E. & Coto, C. E. In vitro anti-Junin virus activity of a peptide isolated from *Melia azedarach* L. leaves. *Int. J. Antimicrob. Agents* **10**, 67–75, DOI: [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(98\)00011-9](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(98)00011-9) (1998).
39. Alché, L. E., Barquero, A. A., Sanjuan, N. A. & Coto, C. E. An antiviral principle present in a purified fraction from *Melia azedarach* L. leaf aqueous extract restrains herpes simplex virus type 1 propagation. *Phyther. Res.* **16**, 348–352, DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.895> (2002).
40. Bueno, C. A., Lombardi, M. G., Sales, M. E. & Alché, L. E. A natural antiviral and immunomodulatory compound with antiangiogenic properties. *Microvasc. Res.* **84**, 235–241, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2012.09.003> (2012).
41. Sanna, G. *et al.* Limonoids from *Melia azedarach* fruits as inhibitors of flaviviruses and *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* **10**, DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141272> (2015).
42. Angamuthu, D., Purushothaman, I., Kothandan, S. & Swaminathan, R. Antiviral study on *Punica granatum* L., *Momordica charantia* L., *Andrographis paniculata* Nees, and *Melia azedarach* L., to Human Herpes Virus-3. *Eur. J. Integr. Med.* **28**, 98–108, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2019.04.008> (2019).
43. Narovlianskiĭ, A. N., Deriabin, P. G., Sedov, A. M., Sanin, A. V & Pronin, A. V. Antiviral activity of polyprenylphosphates in experimental infection caused by hepatitis C virus in vitro. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 81–84 (2012).
44. Lonnerdal, B. & Lyer, S. LACTOFERRIN : MOLECULAR STRUCTURE AND BIOLOGICAL FUNCTION. *Annu. Rev. Nutr.* **15**, 93–110, DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.15.070195.000521> (1995).
45. Giansanti, F., Panella, G., Leboffe, L. & Antonini, G. Lactoferrin from milk: Nutraceutical and pharmacological properties. *Pharmaceuticals* **9**, 1–15, DOI: <https://doi.org/10.3390/ph9040061> (2016).
46. Arnold, D. *et al.* Antiadenovirus activity of milk proteins: Lactoferrin prevents

- viral infection. *Antiviral Res.* **53**, 153–158, DOI: [https://doi.org/10.1016/s0166-3542\(01\)00197-8](https://doi.org/10.1016/s0166-3542(01)00197-8) (2002).
47. Van der Strate, B. W. A., Beljaars, L., Molema, G., Harmsen, M. C. & Meijer, D. K. F. Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Res.* **52**, 225–239, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(01\)00195-4](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(01)00195-4) (2001).
 48. Huang, J. *et al.* Studies on the Interaction between Three Small Flavonoid Molecules and Bovine Lactoferrin. *Biomed Res. Int.* **2018**, DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/7523165> (2018).
 49. Thormar, H. *et al.* Inhibition of visna virus replication and cytopathic effect in sheep choroid plexus cell cultures by selected anti-HIV agents. *Antiviral Res.* **27**, 49–57, DOI: [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(94\)00082-j](https://doi.org/10.1016/0166-3542(94)00082-j) (1995).
 50. Nolkemper, S., Reichling, J., Sensch, K. H. & Schnitzler, P. Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. *Phytomedicine* **17**, 132–138, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.07.006> (2010).
 51. Moradi, M.-T., Karimi, A., Rafieian-Kopaei, M. & Fotouhi, F. In vitro antiviral effects of Peganum harmala seed extract and its total alkaloids against Influenza virus. *Microb. Pathog.* **110**, 42–49, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.06.014> (2017).
 52. Shikalepo, R., Mukakalisa, C., Kandawa-Schulz, M., Chingwaru, W. & Kapewangolo, P. In vitro anti-HIV and antioxidant potential of *Bulbine frutescens* (Asphodelaceae). *J. Herb. Med.* **12**, 73–78, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2017.09.007> (2018).
 53. Gupta, S. C., Prasad, S., Tyagi, A. K., Kunnumakkara, A. B. & Aggarwal, B. B. Neem (*Azadirachta indica*): An indian traditional panacea with modern molecular basis. *Phytomedicine* **34**, 14–20, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.07.001> (2017).
 54. Sultana, S., Asif, H. M., Akhtar, N., Waqas, M. & Rehman, S. U. Comprehensive Review on Ethanobotanical Uses, Phytochemistry and Pharmacological Properties of *Melia azedarach* Linn. *Asian J. Pharm. Res. Heal. Care* **6**, (2014).
 55. Kumazawa, S. *et al.* Antiangiogenic activity of flavonoids from *Melia azedarach*. *Nat. Prod. Commun.* **8**, 1934578X1300801215 (2013).
 56. Shimizu, J. F. *et al.* Flavonoids from *Pterogyne nitens* inhibit hepatitis C virus entry. *Sci. Rep.* **7**, 1–9, DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16336-y> (2017).
 57. Malik, O., Khamis, H., Rudnizky, S. & Kaplan, A. The mechano-chemistry of a monomeric reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res.* **45**, 12954–12962, DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1168> (2017).
 58. Bedoya, L. M. *et al.* Promiscuous, Multi-Target Lupane-Type Triterpenoids Inhibits Wild Type and Drug Resistant HIV-1 Replication Through the Interference With Several Targets. *Front. Pharmacol.* **9**, 358, DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00358> (2018).

59. Simoni, I. Plantas com poder curativo na saúde animal. *Inst. Biológico* **155**, (2011).
60. Matos, F. J. de A. *Introdução à fitoquímica experimental*. (edições UFC, 2009).
61. Barlough, J. *et al.* Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk, and tissues of infected goats. *J. Virol. Methods* **50**, 101–113, DOI: [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(94\)90167-8](https://doi.org/10.1016/0166-0934(94)90167-8) (1994).
62. Rodrigues, A. S. *et al.* Padronização do Elisa indireto e Western Blot para diagnóstico da artrite-encefalite caprina. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* **66**, 417–424, DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-41626303> (2014).
63. Karanikolaou, K. *et al.* Detection of small ruminant lentiviruses by PCR and serology tests in field samples of animals from Greece. *Small Rumin. Res.* **58**, 181–187, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2004.10.001> (2005).
64. de Azevedo, D. A. A. *et al.* Produção de antígeno de lentivírus de pequenos ruminantes através da cultura celular de membrana nictitante caprina. *Brazilian J. Vet. Med.* **37**, 316–320 (2015).
65. Reed, L. J. & Muench, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* **27**, 493–497, DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408> (1938).

10 CONCLUSÕES

Nos estudos com SDS, *in vitro*, observou-se a inibição do lentivírus caprino no leite apenas na concentração de 1% de SDS. Na avaliação *in vivo*, o SDS no colostro/leite, em nenhuma das concentrações testadas, promoveu a inativação do lentivírus caprino. Além disso, ocorreram complicações gastrointestinais, como diarreia profusa.

Em relação aos estudos com os extratos de *A. indica* A. Juss e de *M. azedarach* nos LVPRs. No estudo com as cepas CAEV_{CO} e MVV_{K1415} com os distintos extratos das meliáceas, ajudou a elucidar a atuação desses nas fases do ciclo replicativo viral dos LVPRs, inibindo parcialmente a ação do vírus.

Nas amostras de colostro e leite, a fração etanólica de acetato de etila, na concentração de 150 µg/mL, de ambas as meliáceas, demonstraram eficácia contra LVC, quando submetido a tratamento por 90 minutos, com efeito antiviral potencializado principalmente no colostro.

11 PERSPECTIVAS

Embora estes antivirais não ocasionaram a eliminação completa dos LVPRs são alternativas interessantes no combate a retrovírus, já que reduziram a carga viral, sendo assim, necessário estudos mais aprofundados para validar e otimizar a técnica, e consequentemente, a eficácia dos mesmos como antirretrovirais

REFERÊNCIAS

- AHMAD, A.; JAVED, M. R.; RAO, A. Q.; HUSNAIN, T. Designing and screening of universal drug from neem (*Azadirachta indica*) and standard drug chemicals against influenza virus nucleoprotein. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 16, n.1, p. 519, 2016.
- ALCHÉ, L. E.; BARQUERO, A. A.; SANJUAN, N. A.; COTO, C. E. An antiviral principle present in a purified fraction from *Melia azedarach* L. leaf aqueous extract restrains herpes simplex virus type 1 propagation. **Phytotherapy Research**, v.16, n.4, p. 348–352, 2002.
- ALCHÉ, L. E.; FERREK, G. A.; MEO, M.; COTO, C. E.; MAIER, M. S. An antiviral meliacarpin from leaves of *Melia azedarach* L. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 58, n. 3–4, p. 215–219, 2003.
- ANDRIOLI, A. **Vírus da artrite encefalite caprina: PCR e isolamento viral em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões**. 2001. 68 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte - MG.
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; MOURA SOBRINHO, P. A.; PINHEIRO, R. R.; SALLES, H. O. Transferência de embriões em cabras naturalmente infectadas pelo lentivírus caprino. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 24, n.5, p. 215–220, 2002.
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; MARTINS, A. de S.; PINHEIRO, R. R.; SANTOS, D. O. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 8, p. 1313–1319, 2006.
- ANGAMUTHU, D.; PURUSHOTHAMAN, I.; KOTHANDAN, S.; SWAMINATHAN, R. Antiviral study on *Punica granatum* L., *Momordica charantia* L., *Andrographis paniculata* Nees, and *Melia azedarach* L., to Human Herpes Virus-3. **European Journal of Integrative Medicine**, v.28, p. 98–108, 2019.
- ARAÚJO, S A C; PINHEIRO, R. R.; DANTAS, T. V. M.; ANDRIOLI, A.; LIMA, F. E. S.; DIAS, R. P.; CAMPELLO, C. C.; RICARTE, A. R. F.; DE MELO, V. S. P.; ROLIM, B. N. Inibição dos lentivírus de pequenos ruminantes por drogas antivirais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 2, p. 225-232, 2010.
- ARAÚJO, S. A. C. **Estudo histológico de pulmões de ovinos sorologicamente positivos para Maedi-Visna**. 2004. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias - Reprodução e Saúde de Pequenos Ruminants) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.
- AZEVEDO, D. A. A. de; SANTOS, V. W. S. dos; SOUSA, A. L. M. de; PEIXOTO, R. M.; PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI, A.; TEIXEIRA, M. F. da S. Small ruminant lentiviruses: economic and productive losses, consequences of the disease. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, p. 1–10, 2017.
- BADAM, L.; JOSHI, S. P.; BEDEKAR, S. S. 'In vitro' antiviral activity of neem

(*Azadirachta indica*. A. Juss) leaf extract against group B coxsackieviruses. **The Journal of communicable diseases**, v. 31, n. 2, p. 79–90, 1999.

BANG, S.; HA, T. K. Q.; LEE, C.; LI, W.; OH, W.-K.; SHIM, S. H. Antiviral activities of compounds from aerial parts of *Salvia plebeia* R. Br. **Journal of ethnopharmacology**, v. 192, p. 398–405, 2016.

BLACKLAWS, B. A. Small ruminant lentiviruses: immunopathogenesis of Visna-Maedi and Caprine Arthritis and Encephalitis Virus. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 35, n.3, p. 259–269, 2012.

BLACKLAWS, B. A.; HARKISS, G. D. Small ruminant lentiviruses and human immunodeficiency virus: cousins that take a long view. **Current HIV research**, v. 8, n. 1, p. 26–52, 2010.

BRITO, R. L. L. **Implicações da artrite-encefalite caprina na reprodução, produção e na qualidade do leite de cabras**. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia. Área de Concentração: Produção de Ruminantes) - Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), Sobral, CE.

BUENO, C. A.; ALCHE, L. E.; BARQUERO, A. A. 1-Cinnamoyl-3, 11-dihydroxymeliacarpin delays glycoprotein transport restraining virus multiplication without cytotoxicity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 393, n.1, p.32–37, 2010.

BUENO, C. A.; LOMBARDI, M. G.; SALES, M. E.; ALCHE, L. E. A natural antiviral and immunomodulatory compound with antiangiogenic properties. **Microvascular research**, v. 84, n.3, p.235–241, 2012.

CANTINO, P. D. Plant Systematics. A Phylogenetic Approach. **Systematic Biology**, v. 48, n.4, p.826, 1999.

CAPUCCHIO, M. T.; SANNA, E.; SANNA, M. P.; FARIGU, S.; MINELLI, R.; GUARDA, F. Maedi-visna virus detection in ovine third eyelids. **Journal of Comparative Pathology**, v. 129, n.1, p. 37–43, 2003.

CASTILLA, V.; BARQUERO, A. A.; MERSICH, S. E.; COTO, C. E. In vitro anti-Junin virus activity of a peptide isolated from *Melia azedarach* L. leaves. **International journal of antimicrobial agents**, v. 10, n.1, p. 67–75, 1998.

COUTINHO, A. **Extração de tanino em folhas, sementes e frutos verdes de cinamomo (*Melia azedarach* L.) com diferentes tipos de solventes**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 25 abri. 2013. Disponível: <<http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/1424>>, Acesso em: 25 fev.2020.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 4, p. 564–582, 1999.

EAST, N. E.; ROWE, J. D.; DAHLBERG, J. E.; THEILEN, G. H.; PEDERSON, N. C.

Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Small Ruminant Research**, v. 10, n. 3, p. 251–262, 1993.

FACCIN-GALHARDI, L. C.; YAMAMOTO, K. A.; RAY, S.; RAY, B.; LINHARES, R. E. C.; NOZAWA, C. The in vitro antiviral property of *Azadirachta indica* polysaccharides for poliovirus. **Journal of ethnopharmacology**, v. 142, n. 1, p. 86–90, 2012.

FENG, H.; FAN, J.; YANG, S.; ZHAO, X.; YI, X. Antiviral activity of phosphorylated Radix *Cyathulae officinalis* polysaccharide against Canine Parvovirus in vitro. **International journal of biological macromolecules**, v. 99, p. 511–518, 2017.

FIENI, F.; ROWE, J.; VAN HOOSEAR, K.; BURUCOA, C.; OPPENHEIM, S.; ANDERSON, G.; MURRAY, J.; BONDURANT, R. Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) proviral DNA in genital tract tissues of superovulated dairy goat does. **Theriogenology**, v. 59, n. 7, p. 1515–1523, 2003.

FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: UFSM, 2007. 888p.

FORIM, M.R. **Estudo Fitoquímico do Enxerto de *Azadirachta indica* sobre a *Melia azadirach*: Quantificação de substâncias Inseticidas**. 2006. 325f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

GLATTHAAR-SAALMÜLLER, B.; FAL, A. M.; SCHÖNKNECHT, K.; CONRAD, F.; SIEVERS, H.; SAALMÜLLER, A. Antiviral activity of an aqueous extract derived from *Aloe arborescens* Mill. against a broad panel of viruses causing infections of the upper respiratory tract. **Phytomedicine**, v. 22, n. 10, p. 911–920, 2015.

GREGORY, L.; HASEGAWA, M. Y.; LARA, M.; CASTRO, R. S.; RODRIGUES, J. N. M.; DURIGON, E. L. Detecção do vírus da artrite encefalite caprina em leite por PCR e nested-PCR. **Ars Veterinaria**, v. 25, n. 3, p. 142–146, 2010.

GROSSI, P.; GIUDICE, C.; BERTOLETTI, I.; CIOCCARELLI, G.; BROCCHI, E.; CAMMARATA, G.; GELMETTI, D. Immunohistochemical detection of the p27 capsid protein of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in bone-marrow cells of seropositive goats. **Journal of comparative pathology**, v. 133, n. 2–3, p. 197–200, 2005.

GUILHERME, F. R.; LIMA, A. M. C.; ALVES, J. R. A.; DA COSTA, D. F.; PINHEIRO, R. R.; ALVES, F. S. F.; DE AZEVEDO, S. S.; ALVES, C. J. Characterization and typology of sheep and goat production systems in the State of Paraíba, a semi-arid region of northeastern Brazil. **Semina: Ciências Agrária**, v. 38, n. 4, p. 2163–2178, 2017.

GUPTA, S. C.; PRASAD, S.; TYAGI, A. K.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B. Neem (*Azadirachta indica*): An indian traditional panacea with modern molecular basis. **Phytomedicine**, v. 34, p. 14–20, 2017.

HA, T. K. Q.; DAO, T. T.; NGUYEN, N. H.; KIM, J.; KIM, E.; CHO, T. O.; OH, W. K. Antiviral phenolics from the leaves of *Cleistocalyx operculatus*. **Fitoterapia**, v. 110, p. 135–141, 2016.

HERRMANN-HOESING, L. M.; PALMER, G. H.; KNOWLES, D. P. Evidence of proviral clearance following postpartum transmission of an ovine lentivirus. **Virology**, v. 362, n. 1, p. 226–234, 2007.

HIGHLAND, M. A. Small ruminant lentiviruses: Strain variation, viral tropism, and host genetics influence pathogenesis. **Vet Pathol**, v. 54, n. 3, p. 353–354, 2017.

KALOGIANNI, A. I.; BOSSIS, I.; EKATERINIADOU, L. V.; GELASAKIS, A. I. Etiology, Epizootiology and Control of Maedi-Visna in Dairy Sheep: A Review. **Animals**, v. 10, n. 4, p. 616, 2020.

KREBS, F. C.; MILLER, S. R.; MALAMUD, D.; HOWETT, M. K.; WIGDAHL, B. Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by nonoxynol-9, C31G, or an alkyl sulfate, sodium dodecyl sulfate. **Antiviral research**, v. 43, n. 3, p. 157–173, 1999.

KUMAZAWA, S.; KUBOTA, S.; YAMAMOTO, H.; OKAMURA, N.; SUGIYAMA, Y.; KOBAYASHI, H.; NAKANISHI, M.; OHTA, T. Antiangiogenic activity of flavonoids from *Melia azedarach*. **Natural product communications**, v. 8, n. 12, p. 1719-1720, 2013.

LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L.; TAINTURIER, D.; CHEBLOUNE, Y. Epithelial cells from goat oviduct are highly permissive for productive infection with caprine arthritis–encephalitis virus (CAEV). **Virus research**, v. 87, n. 1, p. 69–77, 2002.

LARA, M.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; FERNANDES, M. A.; BIRGEL, E. H. Infecção experimental do vírus da artrite-encefalite dos caprinos em cabritos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 1, p. 51–54, 2003.

LERONDELLE, C.; GODET, M.; MORMEX, J. F. Infection of primary cultures of mammary epithelial cells by small ruminant lentiviruses. **Veterinary research**, v. 30, n.5, p. 467–474, 1999.

LI, S.-F.; GONG, M.-J.; SUN, Y.-F.; SHAO, J.-J.; ZHANG, Y.-G.; CHANG, H.-Y. In vitro and in vivo antiviral activity of mizoribine against foot-and-mouth disease virus. **Molecules**, v. 24, n. 9, p. 1723, 2019.

LUO, G.; GAO, S. Global health concerns stirred by emerging viral infections. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 4, p. 399–400, 2020.

MACIEL, M. V.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; COSTA, C. T. C.; CASTRO, C. M. S. Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary parasitology**, v. 140, n. 1–2, p. 98–104, 2006.

MALIK, O.; KHAMIS, H.; RUDNIZKY, S.; KAPLAN, A. The mechano-chemistry of a monomeric reverse transcriptase. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 22, p. 12954–12962, 2017.

MARTÍNEZ-NAVALÓN, B.; PERIS, C.; GÓMEZ, E. A.; PERIS, B.; ROCHE, M. L.; CABALLERO, C.; GOYENA, E.; BERRIATUA, E. Quantitative estimation of the

impact of caprine arthritis encephalitis virus infection on milk production by dairy goats. **The Veterinary Journal**, v. 197, n. 2, p. 311–317, 2013.

MARTINEZ, S. S. **O nim (*Azadirachta indica*) natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: Instituto Agronômico do Paraná, 2002. 142 p.

MINGUIJÓN, E.; REINA, R.; PÉREZ, M.; POLLEDO, L.; VILLORIA, M.; RAMÍREZ, H.; LEGINAGOIKOA, I.; BADIOLA, J. J.; GARCÍA-MARÍN, J. F.; DE ANDRÉS, D. Small ruminant lentivirus infections and diseases. **Veterinary Microbiology**, v. 181, n. 1–2, p. 75–89, 2015.

MODOLO, J. R.; STACCHISSINI, A. V. M.; CASTRO, R. S.; RAVAZZOLO, A. P. **Planejamento de Saúde para o controle da Artrite-encefalite caprina**. Botucatu: Cultura Acadêmica, 2003. 78p.

MORADI, M.-T.; KARIMI, A.; RAFIEIAN-KOPAEI, M.; FOTOUHI, F. *In vitro* antiviral effects of *Peganum harmala* seed extract and its total alkaloids against Influenza virus. **Microbial pathogenesis**, v. 110, p. 42–49, 2017.

MORALES-DELANUEZ, A.; MORENO-INDIAS, I.; SÁNCHEZ-MACÍAS, D.; CAPOTE, J.; JUSTE, M. C.; CASTRO, N.; HERNÁNDEZ-CASTELLANO, L. E.; ARGÜELLO, A. Sodium dodecyl sulfate reduces bacterial contamination in goat colostrum without negative effects on immune passive transfer in goat kids. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 1, p. 410–415, 2011.

MOSSINI, S. A. G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): múltiplos usos. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 24, n. 1, p. 139–148, 2005.

MULLER, L. D.; SYHRE, D. R. Influence of Chemicals and Bacterial Cultures on Preservation of Colostrum1. **Journal of Dairy Science**, v. 58, n. 6, p. 957–961, 1975.

NARWAL, S. S.; TAURO, P.; BISLA, S. S. **Neem in sustainable agriculture**. India: Scientific Publishers, 2003.

NEROME, K.; SHIMIZU, K.; ZUKERAN, S.; IGARASHI, Y.; KURODA, K.; SUGITA, S.; SHIBATA, T.; ITO, Y.; NEROME, R. Functional growth inhibition of influenza A and B viruses by liquid and powder components of leaves from the subtropical plant *Melia azedarach* L. **Archives of virology**, v. 163, n. 8, p. 2099–2109, 2018.

NGWIRA, K. J.; MAHARAJ, V. J.; MGANI, Q. A. *In vitro* antiplasmodial and HIV-1 neutralization activities of root and leaf extracts from *Berberis holstii*. **Journal of Herbal Medicine**, v. 5, n. 1, p. 30–35, 2015.

NOLKEMPER, S.; REICHLING, J.; SENSCH, K. H.; SCHNITZLER, P. Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. **Phytomedicine**, v. 17, n. 2, p. 132–138, 2010.

NOVÁKOVÁ, L.; PAVLÍK, J.; CHRENKOVÁ, L.; MARTINEC, O.; ČERVENÝ, L. Current antiviral drugs and their analysis in biological materials–Part II: Antivirals against hepatitis and HIV viruses. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 147, p. 378–399, 2018a.

NOVÁKOVÁ, L.; PAVLÍK, J.; CHRENKOVÁ, L.; MARTINEC, O.; ČERVENÝ, L. Current antiviral drugs and their analysis in biological materials—Part I: Antivirals against respiratory and herpes viruses. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 147, p. 400–416, 2018b.

PARIDA, M. M.; UPADHYAY, C.; PANDYA, G.; JANA, A. M. Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaves on dengue virus type-2 replication. **Journal of ethnopharmacology**, v. 79, n. 2, p. 273–278, 2002.

PEIXOTO, R. M.; DA SILVA TEIXEIRA, M. F.; ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R. R.; DE SOUSA SILVA, A. A.; DE FREITAS AGUIAR, T. D.; DE AZEVEDO, D. A. A.; DE SOUSA, A. L. M. Perspectivas do uso de fitoterápicos no tratamento do sêmen caprino infectado pelo vírus da Artrite Encefalite Caprina. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 12, n. 3, p. 193–201, 2018.

PETRERA, E.; COTO, C. E. Effect of the Potent Antiviral 1-Cinnamoyl-3, 11-Dihydroxymeliacarpin on Cytokine Production by Murine Macrophages Stimulated with HSV-2. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 1, p. 104–109, 2014.

PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F. Prevalência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, v. 31, n. 3, p. 449–454, 2001.

PIRET, J.; DÉSORMEAUX, A.; BERGERON, M. G. Sodium lauryl sulfate, a microbicide effective against enveloped and nonenveloped viruses. **Current drug targets**, v. 3, n. 1, p. 17–30, 2002.

PISONI, G.; BERTONI, G.; MANAROLLA, G.; VOGT, H.-R.; SCACCABAROZZI, L.; LOCATELLI, C.; MORONI, P. Genetic analysis of small ruminant lentiviruses following lactogenic transmission. **Virology**, v.407, n.1, p. 91–99, 2010.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W.; MCKENZIE, R. A. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 1098 – 1101.

REBENSBURG, S.; HELFER, M.; SCHNEIDER, M.; KOPPENSTEINER, H.; EBERLE, J.; SCHINDLER, M.; GÜRTLER, L.; BRACK-WERNER, R. Potent in vitro antiviral activity of *Cistus incanus* extract against HIV and Filoviruses targets viral envelope proteins. **Scientific reports**, v. 6, p. 20-39, 2016.

REINA, R.; ANDRÉS, D. De; AMORENA, B. Immunization against small ruminant lentiviruses. **Viruses**, v. 5, n. 8, p. 1948–1963, 2013.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira**. São Paulo: Editora Blucher, 1978.

RODRIGUES, A. de S.; PINHEIRO, R. R.; BRITO, R. L. L. de; OLIVEIRA, L. S.; OLIVEIRA, E. L. de; SANTOS, V. W. S. dos; ANDRIOLI, A.; SOUZA, T. S. de; DIAS, R. P.; TEIXEIRA, M. F. da S. Evaluation of caprine arthritis-encephalitis virus transmission in newborn goat kids. **Arquivos do Instituto Biológico**, vol. 84, p. 1-5,

2017.

SAIRAM, M.; ILAVAZHAGAN, G.; SHARMA, S. K.; DHANRAJ, S. A.; SURESH, B.; PARIDA, M. M.; JANA, A. M.; DEVENDRA, K.; SELVAMURTHY, W. Antimicrobial activity of a new vaginal contraceptive NIM-76 from neem oil (*Azadirachta indica*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 3, p. 377–382, 2000.

SALEEM, S.; MUHAMMAD, G.; HUSSAIN, M. A.; BUKHARI, S. N. A. A comprehensive review of phytochemical profile, bioactives for pharmaceuticals, and pharmacological attributes of *Azadirachta indica*. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 7, p. 1241–1272, 2018.

SANNA, E.; SANNA, M. P.; VITALI, C. G.; RENZONI, G.; SANNA, L.; SPANO, S.; ROSSI, G.; LEONI, A. Proviral DNA in the brains of goats infected with caprine arthritis-encephalitis virus. **Journal of comparative pathology**, v. 121, n. 3, p. 271–276, 1999.

SANNA, G.; MADEDDU, S.; GILIBERTI, G.; NTALLI, N. G.; COTTIGLIA, F.; DE LOGU, A.; AGUS, E.; CABONI, P. Limonoids from *Melia azedarach* fruits as inhibitors of flaviviruses and *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS One**, v. 10, n. 10, 2015.

SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual review of entomology**, vol. 35, no. 1, p. 271–297, 1990.

SCHNORR, K. L.; PEARSON, L. D. Intestinal absorption of maternal leucocytes by newborn lambs. **Journal of reproductive immunology**, v. 6, n. 5, p. 329–337, 1984.

SHIKALEPO, R.; MUKAKALISA, C.; KANDAWA-SCHULZ, M.; CHINGWARU, W.; KAPEWANGOLO, P. In vitro anti-HIV and antioxidant potential of *Bulbine frutescens* (Asphodelaceae). **Journal of Herbal Medicine**, v. 12, p. 73–78, 2017.

SHIMIZU, J. F.; LIMA, C. S.; PEREIRA, C. M.; BITTAR, C.; BATISTA, M. N.; NAZARÉ, A. C.; POLAQUINI, C. R.; ZOTHNER, C.; HARRIS, M.; RAHAL, P. Flavonoids from *Pterogyne nitens* inhibit hepatitis C virus entry. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.

SIDER, L. H.; BRITO, R. L. L. de; VERAS, A. K. A.; RODRIGUES, A. S.; SOUZA, K. C. de; OLIVEIRA, E. L. de; ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R. R. Processamento de líquido céfalo-raquidiano para extração de RNA genômico do vírus da artrite-encefalite caprina e diagnóstico molecular por RT-nested PCR. Sobral, CE: **Embrapa caprinos e ovinos**, 2010, 4p. (Comunicado técnico 114).

SIMONI, I. **Plantas com poder curativo na saúde animal**. São Paulo: Instituto Biológico, 2011. (Comunicado técnico, 155).

SINGH, U. P.; MAURYA, S.; SINGH, D. P. Phenolic Acids in Neem (*Azadirachta indica*) A Major Pre-Existing Secondary Metabolites. **Journal of herbal pharmacotherapy**, v. 5, n. 1, p. 35–43, 2005.

SOUZA, K. C.; PINHEIRO, R. R.; SANTOS, D. O.; DE BRITO, R. L. L.; DE SOUZA RODRIGUES, A.; SIDER, L. H.; PAULA, N. R. O.; AVILA, A. A.; CARDOSO, J. de

F. S.; ANDRIOLI, A. Transmission of the caprine arthritis–encephalitis virus through artificial insemination. **Small Ruminant Research**, v. 109, n. 2, p. 193–198, 2013.

SOUZA, T. S. de; PINHEIRO, R. R.; COSTA, J. N.; DE LIMA, C. C. V; ANDRIOLI, A.; DE AZEVEDO, D. A. A.; DOS SANTOS, V. W. S.; ARAÚJO, J. F.; SOUSA, A. L. M. de; PINHEIRO, D. N. S. Interspecific transmission of small ruminant lentiviruses from goats to sheep. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 867–874, 2015.

STRASFELD, L.; CHOU, S. Antiviral drug resistance: mechanisms and clinical implications. **Infectious Disease Clinics**, v. 24, n. 3, p. 809–833, 2010.

SULTANA, S.; ASIF, H. M.; AKHTAR, N.; WAQAS, M.; REHMAN, S. U. Comprehensive Review on Ethanobotanical Uses, Phytochemistry and Pharmacological Properties of *Melia azedarach* Linn. **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Health Care**, v. 6, n. 1, 2014.

URDANETA, S.; WIGDAHL, B.; NEELY, E. B.; BERLIN, C. M.; SCHENGRUND, C.-L.; LIN, H.-M.; HOWETT, M. K. Inactivation of HIV-1 in breast milk by treatment with the alkyl sulfate microbicide sodium dodecyl sulfate (SDS). **Retrovirology**, vol. 2, no. 1, p. 28, 2005.

VENTURINO, E.; COLLINO, S.; FERRERI, L.; BERTOLOTTI, L.; ROSATI, S.; GIACOBINI, M. An effective management strategy for the control of two lentiviruses in goat breedings. **Journal of theoretical biology**, v. 469, p. 96–106, 2019.

VERKERK, R. H. J.; WRIGHT, D. J. Biological activity of neem seed kernel extracts and synthetic azadirachtin against larvae of *Plutella xylostella* L. **Pesticide science**, v. 37, n. 1, p. 83–91, 1993.

WACHSMAN, M. B.; DAMONTE, E. B.; COTO, C. E.; DE TORRES, R. A. Antiviral effects of *Melia azedarach* L. leaves extracts on Sindbis virus-infected cells. **Antiviral research**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 1987.

YOUNUS, I.; ASHRAF, M.; FATIMA, A.; ALTAF, I.; JAVEED, A. Evaluation of cytotoxic and antiviral activities of aqueous leaves extracts of different plants against foot and mouth disease virus infection in farming animals. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 30, n. 6, 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE A – COMITÊ DE ÉTICA DO ESTUDO COM OS ANTIVIRAIS



Caprinos e Ovinos

**Comissão de Ética no Uso de Animais –
CEUA / CNPC**

CERTIFICADO DE AUTORIZAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação de fitocompostos e do dodecil sulfato de sódio (SDS) como antivirais para vírus da Artrite Encefalite Caprina em colostro e leite”, registrada com o número de protocolo 002/2018, sob a responsabilidade de Raymundo Rizado Pinheiro – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS (CEUA/CNPC), em reunião de 18 de abril de 2018.

FINALIDADE	() ENSINO (X) PESQUISA
Vigência do projeto	Maio de 2018 à 31 de dezembro de 2019
Espécie/linhagem/raça	Caprinos / Saanen e Anglo Nubianas
Número de animais	42 – 32 recém-nascidos e 10 matrizes
Peso/idade	Matrizes (40 a 60 Kg) e recém-nascidos (2 a 4Kg)
Sexo	Machos (recém-nascidos) e fêmeas (matrizes)
Origem	Rebanho do CNPC

Sobral, CE, 10 de maio de 2018.

Dra. Alice Andrioli Pinheiro
Coordenadora da CEUA-CNPC

APÊNDICE B – COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO DE REVISÃO

ANIMAL PATHOLOGY / REVIEW ARTICLE

DOI: 10.1590/1808-1657000752018

Sodium dodecyl sulfate as a viral inactivator and future perspectives in the control of small ruminant lentiviruses

Emprego do dodecil sulfato de sódio como inativador viral e suas perspectivas no controle de lentivírus de pequenos ruminantes

Ana Lídia Madeira de Sousa^{1*}, Raymundo Rizaldo Pinheiro², Juscelânia Furtado Araújo¹, Dalva Alana Aragão de Azevedo¹, Renato Mesquita Peixoto³, Alice Andrioli², Sabrina Tainah da Cruz Silva Bezerra¹, Maria Fátima da Silva Teixeira¹

ABSTRACT: Infections by small ruminant lentiviruses (SRLVs) affect goats and sheep causing chronic multisystemic diseases that generate great economic losses. The caprine lentivirus (CLV) and the ovine lentivirus (OLV) present tropism for cells of the monocyte/macrophage lineage, which are directly associated with the main route of transmission through the ingestion of milk and colostrum from infected animals. In this manner, controlling this route is of paramount importance. Currently, researches have investigated the use of chemical additives in milk that can preserve colostrum or milk and inactivate microbiological agents. Among the compounds, sodium dodecyl sulfate (SDS) has been shown to be satisfactory in the chemical inactivation of HIV and CLV in milk, and also as a biocide in goat colostrum.

KEYWORDS: colostrum; chemical inactivation; milk; monocyte/macrophage system.

RESUMO: As lentiviruses de pequenos ruminantes (LVPRs) são infecções que afetam caprinos e ovinos, causando doenças multissistêmicas crônicas, ocasionando grandes perdas econômicas. Os agentes causadores, lentivírus caprino (LVC) e o lentivírus ovino (LVO), apresentam tropismo por células da linhagem monocítico-fagocitária, as quais estão diretamente associadas à principal via de transmissão, por meio da ingestão de leite e colostro provindos de animais infectados. Desse modo, o controle por esta via é de suma importância. Atualmente, pesquisas vêm sendo desenvolvidas para o uso de aditivos químicos no leite, que possam conservar o colostro ou leite, e inativar agentes microbiológicos presentes. Dentre estes, o dodecil sulfato de sódio (SDS) vem apresentando resultados satisfatórios na inativação química do HIV e LVC em leite, e ainda como biocida em colostro caprino.

PALAVRAS-CHAVE: colostro; inativação química; leite; sistema monocítico-fagocitário.

¹Universidade Estadual do Ceará – Fortaleza (CE), Brazil

²Empresa Caprinos e Ovinos – Sobral (CE), Brazil

³Universidade Federal do Acre – Rio Branco (AC), Brazil

*Corresponding author: analidiana10@yahoo.com.br

Received on: 06/03/2018. Accepted on: 08/27/2019

APÊNDICE C- COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO TÉCNICO I

<http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-9556>



Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.70, n.5, p.1459-1467, 2018

***In vitro* and *in vivo* evaluation of sodium dodecyl sulfate (SDS) as an inactivator of caprine lentivirus (CLV) in colostrum and milk**

[*Avaliação in vitro e in vivo do dodecil sulfato de sódio (SDS) como inativador do lentivírus caprino (LVC) em colostro e leite*]

A.L.M. Sousa¹, R.R. Pinheiro², J.F. Araújo¹, V.W.S. Santos⁴, D.A.A. Azevedo¹, R.M. Peixoto¹, V. Souza², A. Andrioli², E.M. Damasceno³, T.V.M. Dantas², M.F.S. Teixeira¹

¹ Universidade Estadual do Ceará - Fortaleza, CE

² Embrapa Caprinos e Ovinos - Sobral, CE

³ Universidade Estadual Vale do Acaraú - Sobral, CE

⁴ Universidade Federal Rural do Semiárido - Mossoró, RN

⁵ Embrapa Tabuleiros Costeiros - Brasília, DF

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate *in vitro* and *in vivo* the effect of sodium dodecyl sulfate (SDS) on the caprine lentivirus (CLV) in colostrum and milk. This was performed to develop a practical and efficient method of blocking the lactogenic transmission of the virus. In the *in vitro* experiment, colostrum and milk were treated with 0.25%, 0.50% and 1% SDS. Then, somatic cells of colostrum and milk were submitted to co-culture with caprine synovial membrane cells (CSM). In the *in vivo* test, goats were fed with colostrum and milk provided from CLV-positive goats treated with SDS in the same concentrations used in the *in vitro* experiment. Animals were tested by nested polymerase chain reaction (nPCR) and Western blot (WB) assays. In the *in vitro* experiment, inhibitory activity against CLV without inactivation occurred in colostrum with all SDS concentrations. However, concentrations of 0.25 and 0.5% SDS presented only inhibitory activity against CLV in milk cells, and 1% concentration provided inactivation of the virus. In the *in vivo* tests, none of the three concentrations of SDS was effective in inactivating LVC in colostrum or goat milk, which was confirmed by seroconversion and presence of proviral DNA in animals afterwards.

Keywords: monocyte-phagocytic system, viral inactivation, surfactant, small ruminant lentiviruses

RESUMO

O objetivo da pesquisa foi avaliar *in vitro* e *in vivo* o efeito do dodecil sulfato de sódio (SDS) sobre o lentivírus caprino (LVC) no colostro e no leite, a fim de desenvolver um método prático e eficiente no bloqueio da via de transmissão lactogênica do vírus. No experimento *in vitro*, o colostro e o leite de cabras positivas foram tratados com SDS a 0,25%, 0,50% e 1,0%. Em seguida, as células somáticas do colostro e do leite foram obtidas e direcionadas ao cocultivo com células de membrana sinovial caprina (MSC). No teste *in vivo*, os cabritos foram alimentados com colostro e leite providos de cabras positivas para LVC, tratados com SDS nas mesmas concentrações usadas no teste *in vitro*. Os animais foram acompanhados pelos testes de reação em cadeia da polimerase nested (nPCR) e western blot (WB). Nos resultados *in vitro*, no colostro, observou-se que, em todas as concentrações de SDS, ocorreu uma atividade inibitória contra o LVC, sem a inativação. Em relação às células do leite, o SDS apresentou, nas concentrações de 0,25 e 0,5%, atividade inibitória contra o LVC, e na concentração de 1%, houve inativação viral. Nos testes *in vivo*, as três concentrações de SDS testadas não foram efetivas na inativação do LVC no colostro e no leite caprino, o que se comprovou pela seroconversão e pela presença de DNA proviral nos animais.

Palavras-chave: sistema monocitofagocitário, inativação viral, surfactante, lentiviruses de pequenos ruminantes

Recebido em 11 de novembro de 2016

Aceito em 8 de maio de 2018

E-mail: analidians10@yahoo.com.br

APÊNDICE D – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO TÉCNICO III

SPRINGER NATURE

SCIENTIFIC REPORTS

Log out

Review

Antiviral in vitro activity ethanolic extracts of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* against the caprine lentivirus in colostrum and milk

Success

Submission received

Thank you for submitting your manuscript to Scientific Reports.

Please note: you have submitted to our new peer-review system that does not currently have a manuscript tracking facility. However, we will contact you if we need you to take any action.

Give Feedback

29/05/2020

Yahoo Mail - Scientific Reports - Receipt of Manuscript "Antiviral in vitro..."

Scientific Reports - Receipt of Manuscript "Antiviral in vitro..."

De: Scientific Reports (srep@nature.com)

Para: analidiams10@yahoo.com.br

Data: sexta-feira, 29 de maio de 2020 15:26 BRT

COVID 19 and impact on peer review

As a result of the significant disruption that is being caused by the COVID-19 pandemic we are very aware that many researchers will have difficulty in meeting the timelines associated with our peer review process during normal times. Please do let us know if you need additional time. Our systems will continue to remind you of the original timelines but we intend to be highly flexible at this time.

Ref: Submission ID e4715f89-e427-4d1a-837e-eadc61ad35b9

Dear Dr de Sousa,

Thank you for submitting your manuscript to Scientific Reports.

Your manuscript is now at our initial Quality Check stage, where we look for adherence to the journal's submission guidelines, including any relevant editorial and publishing policies. If there are any points that need to be addressed prior to progressing we will send you a detailed email. Otherwise, your manuscript will proceed into peer review.

Please note you have submitted to a new peer review system which does not yet offer the ability to track your manuscript status.

Kind regards,

Peer Review Advisors
Scientific Reports

Springer Nature offers an open access support service to make it easier for our authors to discover and apply for APC funding. For further information please visit <http://www.springernature.com/gp/open-research/funding>