

TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM CABRAS NATURALMENTE INFECTADAS PELO LENTIVÍRUS CAPRINO

EMBRYO TRANSFER IN NATURALLY INFECTED GOATS WITH CAPRINE LENTIVIRUS

Alice Andrioli¹

Aurora Maria Guimarães Gouveia²

Pedro Alves Moura-Sobrinho³

Raimundo Rizaldo Pinheiro¹

Hévila Oliveira Salles¹

RESUMO - Com o objetivo de avaliar a transmissão do lentivírus caprino (LVC) pela transferência de embriões (TE), foram coletados embriões de dez cabras, soropositivas para o LVC e transferidos para 18 receptoras soronegativas. A comprovação da soronegatividade das receptoras foi obtida, após três repetições do teste de microimunodifusão em gel de agarose (MIDGA), com intervalo de seis meses. Trinta e cinco embriões, com zona pelúcida íntegra e submetidos à lavagem, segundo normas da IETS, foram transferidos às receptoras, sendo que vinte e sete foram inovulados a fresco e oito após criopreservação: Cinco ficaram prenhes (taxa de prenhez - 27,8%) nascendo seis crias. Realizou-se o monitoramento sorológico das crias pelos testes de MIDGA uma semana após o parto e com um, três, seis, doze e dezesseis meses de idade e nas receptoras a cada seis meses, também a partir do parto. Foi realizada a prova de PCR no sangue das crias aos 16 meses de idade. As receptoras e crias mantiveram-se soronegativas à prova de MIDGA durante todo o experimento e as crias também foram negativas aos 16 meses à técnica de PCR. Os resultados indicam a potencialidade da TE como uma técnica segura para obtenção de crias negativas de cabras soropositivas para o LVC.

PALAVRAS - CHAVE - Caprino, transferência de embriões, lentivírus caprino.

ABSTRACT - Aiming to research the caprine lentivirus (CLV) transmission by embryo transfer (ET), embryos of ten goats seropositives for CLV were collected and inovulated in 18 goats soronegatives. The establishment of the seronegativity of the receptors was obtained after three receptions in agar gel microimmunodiffusion test (AGMID), with an interval of six months between then. Thirty five embryos with intact zona pellucida were washed, according to IETS norms and theses, twenty-seven embryos were fresh inovulated, in fourteen goats and eight embryos were frozen / thaw inovulated in four recipients. Five goats became pregnant (pregnancy rate - 27,8%) resulting in the birth of six kids. The presence of antibodies after TE in the serum of the Kids it was evaluated by AGMID test one week after birth and it was repeated in the kids at one, three, six, twelve and sixteen months of age, and in all receptors every six months. It Was also realized PCR test on the blood of the kids 16 months age. No receptors goats and the kids were positive for AGMID and PCR tests. The results indicate the TE potentiality of the embryo transfer as a safe technique for obtaining kids negatives form goats seropositive for CLV.

KEY WORDS - Goat, embryos transfer, caprine lentivirus.

INTRODUÇÃO

A criação de caprinos leiteiros no Brasil tem crescido nos últimos anos como uma atividade econômica rentável. No entanto, a ausência de um programa nacional de melhoramento genético

tem levado os caprinocultores a importar animais sem adequada supervisão, acarretando graves problemas sanitários, como foi o caso da entrada e disseminação da artrite encefalite caprina - CAE no Brasil (Assis & Gouveia, 1994). Em adição, os avanços

das técnicas de criopreservação de gamoplasma favorecem ainda mais o intercâmbio internacional de material genético, apesar das pesquisas sobre a transmissão de doenças pelo sêmen e embrião ainda serem pouco conclusivas (Kahrs *et al.*, 1980; Wrathall, 1995).

¹ - EMBRAPA - Caprinos, Estrada Sobral - Groaíras, Km 4, Ceará, Brasil, e-mail- alice@cnpc.embrapa.br;

² - UFMG - Escola de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva - Núcleo de Pesquisa em Saúde Animal, Cx. Postal 567, Cep 30161-970, Belo Horizonte, MG. e-mail - aurora@vet.ufmg.br

³ - Bolsista CNPq

O que se observa é que o desenvolvimento de legislações visando o controle de enfermidades, nem sempre acompanham os avanços científicos e tecnológicos; desta forma as implicações epidemiológicas da TE devem ser cuidadosamente estudadas e medidas de prevenção devem ser implantadas (Stringfellow & Seidel, 1999).

A CAE é uma enfermidade crônica, multisistêmica, causada por um lentivírus caprino (LVC) da família Retroviridae, tendo sido primeiramente descrita nos Estados Unidos da América, sob a forma de leucoencefalomielite dos cabritos (Cork *et al.*, 1974). A enfermidade apresenta sinais clínicos de evolução lenta, incluindo artrite, pneumonia e mastite em animais adultos (Adams & Crawford, 1980), sendo os animais jovens de dois a quatro meses de idade mais susceptíveis à doença na forma nervosa (Norman & Smith, 1983). As perdas econômicas são decorrentes da morte de animais jovens, diminuição da produção láctea e perda de peso dos animais devido à dificuldade de locomoção.

A manutenção de animais infectados no rebanho representa sérias perdas econômicas, porém a eliminação de todos os animais infectados é, muitas vezes, inviável, pois grande parte do rebanho pode estar acometida, além de representar grande perda de material genético. Desta forma, têm sido implantados antes de sacrificá-los (EMPRABA, 1994).

Com distribuição cosmopolita a CAE ocorre de forma endêmica, com alta prevalência em vários países com produção leiteira intensiva (Pérez *et al.*, 1994), sendo seu controle complexo devido ao caráter, permanente, crônico e ao longo período de incubação (Zink *et al.*, 1990). Como a principal via de transmissão é através da ingestão do colostro ou leite de cabras infectadas (Adams *et al.*, 1983; Rowe *et al.*, 1992), o controle da enfermidade nos rebanhos tem se baseado, principalmente, em separar as crias logo após o parto, evitando o contato com a saliva da mãe e ingestão do colostro e leite. Porém este método, mesmo associado às técnicas de sincronização do estro e consequentemente dos partos, e à indução de parto, impõe a necessidade de controle rigoroso do manejo, sendo, portanto passível de falhas. Outra medida de controle consiste na separação entre os animais sadios e os portadores do LVC, visto que pode ocorrer a transmissão horizontal pelo contato entre os animais, através de secreções e excreções como fezes, saliva,

secreções urogenitais e respiratórias. Apesar da adoção destas medidas nos programas sanitários de controle da CAE, casos de animais positivos continuam ocorrendo, indicando a possibilidade de transmissão do LVC por outras vias.

A transmissão através da monta natural foi sugerida por Russo (1983), como também por Andrioli *et al.* (1999) e Travassos *et al.* (1999), os quais comprovaram por PCR a presença do LVC no sêmen de animais naturalmente infectados.

A transmissão vertical do LVC foi também apontada por Ali (1987), que verificou lesões histopatológicas com grande infiltrado de células mononucleares, similares às descritas para CAE no útero de cabras infectadas, que sugerem que este órgão possa ser um foco de replicação viral, e desta forma represente uma fonte de infecção perinatal. East *et al.* (2000) isolaram o LVC das secreções uterinas recolhidas juntamente com o PBS, na colheita de embriões de cabras infectadas pelo LVC, o que está em acordo com trabalho de Loussert-Ajaka *et al.* (1997) com HIV é bem documentada (Working Group, 1995).

As possíveis vias de infecção dos embriões são os gametas ou fluidos *in vivo* (oviduto ou útero) ou *in vitro* (meio a colheita, lavagem, cultivo e congelamento de embriões) (Wrathall, 1995). Os agentes infecciosos, se presentes nas secreções do trato reprodutivo, podem ficar aderidos à zona pelúcida do embrião, porém esta tem sido considerada uma barreira aos patógenos (Singh, 1987; Wrathall, 1987), e baseado neste fato, a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) recomenda a lavagem dos embriões após a colheita, objetivando a remoção dos possíveis patógenos aderidos à zona pelúcida (Stringfellow & Seidel, 1999). As soluções de lavagem podem ter sua eficiência aumentada pela adição ao meio de antibióticos e de tripsina (Singh, 1988), sendo que esta só é eficiente para a remoção de vírus que são envelopados, como é o caso dos lentivírus. Outros agentes, que aderem firmemente à zona pelúcida podem não ser removidos pela lavagem (Singh, 1987).

O uso de animais ou germoplasma contaminados pode reduzir as respostas reprodutivas a estas técnicas, acarretando perda do investimento, como foi observado por Guérin *et al.* (1992), que verificaram redução significativa dos resultados de FIV, quando se utilizou sêmen de touros portadores de diarreia viral bovina (BVD). Portanto o custo-benefício do uso de animais doentes em programas reprodutivos deve ser criteriosamente analisado.

O uso da TE como método de controle da transmissão de diversas doenças infecciosas tem sido avaliada em ovinos (Gilbert *et al.*, 1987; Dawson *et al.*, 1988; Hare *et al.*, 1988; Parker *et al.*, 1991) com resultados controversos para língua azul onde Gilbert *et al.* (1987) observaram a soroconversão das receptoras após a transferência e Hare *et al.*, (1988) não detectaram a transmissão da doença para receptoras e crias. Em caprinos Chemineau *et al.*, (1986) também não detectou não detectou a transmissão da língua azul para receptoras e crias e Wolfe *et al.*, (1987) e Cavalcante *et al.* (1998) também não detectaram a transmissão do LVC pela TE, no entanto estes autores utilizaram poucas receptoras e obtiveram apenas uma cria viva para análise, e as crias só foram acompanhadas até 4 e 6 meses de idade, sendo que há relatos na literatura do LVC apresentar soroconversão tardia (Rowe *et al.*, 1992; East *et al.*, 1993).

A infecção pelo lentivírus é persistente, havendo expressão recorrente dos genes virais estimulando o sistema imune (Cheevers *et al.*, 1988), com conseqüente presença de níveis variáveis de anticorpos circulantes. O teste de imunodifusão para detecção de anticorpos precipitantes permanece sendo o mais utilizado no diagnóstico da infecção pelo lentivírus de pequenos ruminantes em função de seu baixo custo e alta especificidade, entretanto a ocorrência de falsos negativos é possível, estando dependente do nível de anticorpos, estado fisiológico, via de infecção, tempo de pós-infecção, tipo de antígeno e sensibilidade da técnica de MIDGA, que é inferior à dos testes imunoenzimáticos (ELISA) e de PCR.

A TE torna possível a obtenção de grande número de crias em curto intervalo de tempo e tem sido considerada a mais segura técnica para o trânsito internacional de material genético (Betteridge, 1977; Castro *et al.*, 1992; Philpott, 1993; Thibier, 1994). Desta forma supriria a necessidade de rápida reposição dos animais puros infectados, com obtenção de crias sadias e manutenção da qualidade genética do plantel, e possibilitaria importação de material genético com segurança, mesmo utilizando as fêmeas infectadas, obtendo ao mesmo tempo resultados positivos na esfera econômica, sanitária, reprodutiva e de melhoramento genético. Assim o objetivo do experimento

foi avaliar se há possibilidade de transmissão do LVC pela TE.

MATERIALE MÉTODOS

Animais

Como doadoras de embriões foram utilizadas dez cabras, sendo cinco da raça Saanen e cinco mestiças das raças Pardas Alpina e Moxotó, todas soropositivas para o LVC; e 18 cabras SRD soronegativas como receptoras. A soronegatividade das receptoras foi determinada pela obtenção de três resultados negativos consecutivos em repetições do teste sorológico; com intervalo de seis meses.

As doadoras foram cobertas com reprodutor soropositivo para o LVC. Após o parto, as crias foram mantidas junto às receptoras até o desmame, tendo livre acesso ao colostro e leite. Durante toda a fase experimental, receptoras e crias foram mantidas em local isolado de outros animais, sobre controle constante para não ocorrer nenhum contato com animais infectados.

Sincronização do estro, superovulação e transferência de embrião

Doadoras e receptoras tiveram o estro sincronizado com esponjas vaginais (11 dias) impregnadas com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona⁴, sendo aplicados 50µg de cloprostenol⁵ no nono dia da sincronização. No mesmo dia iniciou-se a superovulação das doadoras com 9 mg de hormônio folículo estimulante suíno (FSHp)⁶, fracionados em seis aplicações, em doses decrescentes, com intervalo de 12 horas. No terceiro dia após a retirada das esponjas foi administrado, durante qua-

tro dias, Flunixin Meglumine na dosagem de 1,1mg/Kg de peso vivo, a cada 12 horas (oito aplicações), visando diminuir a regressão prematura de corpos lúteos após a superovulação (Soares *et al.*, 1995).

As colheitas dos embriões foram realizadas entre o quinto e sexto dia após a primeira fertilização pelo método de laparotomia, segundo metodologia descrita por Andrioli-Pinheiro (1993), utilizando solução salina tampão de Dulbecco's (PBS) acrescida de garamicina e 1% de soro fetal bovino (SFB). Os animais foram submetidos a jejum de 24 horas e anestesia epidural cranial com cloridrato de lignocaina a 2%⁷ (1mL para cada 5 Kg de peso vivo) associado a cloridrato de xilazina⁸ - 0,1mg/kg via intra muscular e sulfato de atropina - 0,1 mg/kg., sendo que todas as drogas foram administradas com intervalos de 10 minutos.

Após a colheita os embriões foram avaliados, sendo os embriões de grau I a III, com zona pelúcida íntegra, submetidos à lavagem, segundo normas da IETS (Stringfellow Seidel, 1999), a qual consistiu da passagem dos embriões por cinco banhos em solução de PBS, acrescido de antibiótico e 0,4% de albumina sérica bovina (BSA) e depois, através de dois banhos de tripsina, pH 7,6-7,8 por 60 a 90 segundos. Foi utilizada tripsina estéril (Trypsin 1:250 com atividade tal que 1g hidrolisa 250g de caseína a 25°C, pH 7,6 em 10 minutos) em solução balanceada de Hank, sem cálcio e magnésio, na concentração de 0,25%. Após tratamento com tripsina, os embriões foram passados através de cinco banhos em PBS contendo antibiótico e 2% de SFB. Na

passagem de cada banho foi utilizada micropipeta nova (estéril). Somente os embriões de uma mesma doadora foram lavados em conjunto, até o máximo de dez embriões.

Os embriões foram inovulados, a fresco ou após congelação e descongelação através do método clássico utilizando etilenoglicol como crio-protetor. As inovulações foram realizadas pela técnica de semi-laparoscopia (Salles *et al.* 1996), sendo depositados dois embriões em cada receptora, no corno uterino adjacente ao ovário que apresentou maior número de corpos lúteos. O diagnóstico de prenhez foi realizado aos 30 dias após inovulação, por ultrassonografia.

Monitoramento sorológico

O monitoramento sorológico dos animais foi obtido através do teste de microimunodifusão em gel de agarose (MIDGA). As coletas do sangue, para realização do MIDGA, das receptoras e de suas crias foram realizadas uma semana após o parto, e repetida nas crias um, três, seis, doze e dezesseis meses após o nascimento e nas receptoras a cada seis meses até 18 meses após o parto (3 testes).

Para detecção de anticorpos contra o LVC pela técnica de MIDGA utilizou-se ágar Noble⁹ a 1% em tampão borato pH 8,6, perfurador hexagonal com sete orifícios (um central e seis periféricos) medindo 4mm de diâmetro, com capacidade de 30 µL de soro/antígeno por orifício. Os orifícios 1 e 4 foram preenchidos com soro-padrão; 2, 3, 5 6 com os soros-teste e o orifício central, com o antígeno. Foi utilizado antígeno comercial¹⁰ derivado de cul-

⁴ - Promone E - Upjohn

⁵ - Ciosin - Coopers

⁶ - Folltropin V - Vetrepharm

⁷ - Anestésico Bravet - Bravet

⁸ - Rompum - Bayer

⁹ - Sigma®

¹⁰ - *Caprine Arthritis-Encephalitis/Ovine Progressive Pneumonia Antidy Test Kit*. Veterinary Diagnostic Technology, Inc®, USA. Este kit é composto por 1 mL de antígeno (p28 e gp135) produzido com o MVV, 3 mL de soro reagente (soro rico em anticorpos contra a glicoproteína gp 135, 0,5mL de soro positivo (soro rico em anticorpos contra as proteínas p28 e gp135), 0,5 mL de soro fraco-positivo (soro pobre em anticorpos contra a gp135 e sem anticorpos contra a p28) e soro negativo (soro sem anticorpos contra as proteínas p28 e gp135).

turas de células de membrana sinovial infectadas pelo lentivírus ovino - Maedi Visna contendo as proteínas: glico-proteína gp135 (envoltório viral) e proteína estrutural p27 (capsídeo). O soro padrão foi obtido a partir de *pool* de sangue coletado de quatro caprinos sabidamente soropositivos oriundos de um rebanho caprino leiteiro e testados frente ao antígeno comercial demonstrando na leitura, a formação de duas linhas de precipitação visivelmente nítidas, correspondentes à presença de anticorpos específicos para as proteínas p27 e gp135 do antígeno. A leitura definitiva, foi feita 72 horas após, empregando-se luz indireta sob fundo escuro.

Reação em cadeia da polimerase - PCR

Foi realizada a prova de PCR *Nested*, no sangue das crias aos dezesesseis meses de idade, segundo metodologia de Barlough *et al.* (1994), para a região *gag*, com algumas modificações. A extração do DNA viral foi realizada segundo metodologia descrita por Walsh *et al.* (1991). O volume total por reação de PCR foi 50µL, contendo: tampão Tris HCl (pH 83) - 10mM; KCL - 50mM; MgCl₂ 1,5mM; Gelatina - 0,001% (w/v); dNTP - 100µM de cada; TMAC - 5µM; *Primers* 20pmol de cada (Round 1 - *primer* 1 e 2; Round 2 - *primer* 3 e 4); Taq DNA polimerase 2 U; Target DNA: Round 1 - 3µL e Round 2 - 1µL e Round 2 - 1µL produto do round 1 e água livre de DNase, autoclavada 50µL q.s.p.

Foram utilizados dois pares de *primers* derivados a partir das sequências das regiões *gag* CAEV Cork (Saltarelli *et al.*, 1990), sendo os *primers* 1 (5CAAGCAGCAGGAGGGAGAAGCTG - 3', nucleotídeos 953 à 975) e 2 (5TCCTACCCCCATAATTTGATCCAC - 3', nucleotídeos 1249 à 1226), resultando na amplificação de um fragmento de DNA de 297pb. Os *primers* 3 (5'

GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG - 3' nucleotídeos 997-1024) e o *primer* 4 (5ACCTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC3' - nucleotídeos 1181 à 1154) foram utilizados na segunda amplificação, resultando um fragmento final de 187 pb (Barlough *et al.*, 1994).

As reações de amplificações foram realizadas em equipamento PTC-100, sendo realizados um ciclo inicial para desnaturar todas as fitas de DNA, de 94°C por 5 minutos; 35 ciclos: 94°C - 1 minuto, 56°C - 1 minuto, 72°C - 45 segundos; extensão final a 72°C por 7 minutos; 4°C - até a coleta de amostra. As amostras e os controles positivo e negativo (células de membrana sinovial de caprinos infectadas e não infectadas pelo LVC) foram submetidos, juntamente com o marcador molecular (100bp DNA Ladder¹¹), à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio adicionado ao gel (0,5µg/mL) e o resultado observado ao transiluminador de luz ultravioleta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As doadoras apresentaram ovulação média de 18,20 com taxa de recuperação de estruturas de 64,29%. No entanto, 36,75% das estruturas eram ovócitos e 63,25% eram embriões o que correspondeu a 74 embriões, sendo que estes, 43 (58,11%) eram viáveis para transferência (graus I a III). Os embriões apresentavam-se no estágio de mórula, mórula compacta, blastocisto inicial e blastocisto. Vinte e sete embriões foram inovulados a fresco em 14 receptoras, sendo que quatro ficaram prenhes (taxa de prenhez de 28,57%) dos quais nasceram cinco cabritos, sendo quatro fêmeas e um macho (taxa de natalidade de 18,56%). Dezesesseis embriões foram congelados (grau I e II), sendo que oito foram viáveis após o descongelamento e foram inovulados em quatro receptoras. Uma receptora tornou-se prenhe (taxa de prenhez de

25,0%) resultando no nascimento de um cabrito macho (taxa de natalidade de 12,50%).

O resultado de superovulação apresentado pelas fêmeas, neste experimento, está de acordo com o observado na literatura para cabras sadias superovuladas com FSH-p (Baril *et al.*, 1992) e acima do observado em cabras superovuladas e portadoras de CAE (Cavalcante *et al.*, 1998; Salles *et al.*, 1998). A taxa de recuperação de embriões e a porcentagem embriões viáveis para a transferência, está em acordo com Cavalcante *et al.* (1998) e Salles *et al.* (1998), porém contrapõe-se aos resultados de Wolfe *et al.* (1987) que conseguiram baixas taxas de ovulação e de embriões viáveis com cabras infectadas pelo LVC.

No entanto, as taxas de prenhez e de natalidade obtidas, tanto de embriões transferidos a fresco como congelados estão abaixo das descritas para a espécie caprina (Ishwar & Memon, 1996), e semelhantes às descritas por Wolfe *et al.* (1987) que obteve taxas de prenhez (12,5%) e de natalidade (6,25%), para cabras infectadas. Porém, faz-se necessário um estudo concomitante, com cabras sadias e infectadas com o LVC, utilizando os mesmos tratamentos hormonais e de colheita de embriões, bem como os mesmos fatores climáticos e de nutrição, para determinar se a infecção pelo LVC influencia negativamente nas taxas reprodutivas num programa de TE.

Quanto à transmissão do LCV pela TE, Wolfe *et al.* (1987) relatam que transferiram embriões de três cabras soropositivas para oito cabras soronegativas, resultando em um cabrito e um natimorto. Todas as receptoras permaneceram livres da doença, nenhum vírus foi isolado do feto natimorto e o cabrito permaneceu livre da infecção até quatro meses de idade quando foi feita a última avaliação por imunodifusão em gel de Ágar. O mesmo foi observado

¹¹ - Life TechnologiesTM

por Cavalcante *et al* (1998) em experimento semelhante obtendo uma cria sadia até os seis meses de idade de quatro cabras Saanen positivas para o LVC. No presente trabalho, por considerarmos que a soroconversão tardia (sete meses após a infecção), tem sido descrita em cabritos (Rowe *et al*, 1992; East *et al*, 1993), o monitoramento sorológico foi mais prolongado, ou seja até 16 meses de idade, não tendo sido observada soroconverção das crias, e nem das receptoras durante todo o experimento. Também não foi detectado no sangue das crias o DNA-proviral do LVC aos 16 meses de idade pela técnica de detecção direta do vírus garante maior segurança ao resultado negativo da transmissibilidade do LVC pela TE.

Resultados satisfatórios com a TE no controle de doenças infecciosas, também tem sido obtido por outros autores, sendo que todos realizaram, assim com neste experimento, a lavagem dos embriões (Bowen *et al*, 1983; Thomas *et al*, 1983; Digiacomio *et al*, (1987) realizaram a TE sem efetuar a lavagem dos embriões, com ovelhas positivas para Língua Azul, e observaram soroconversão em duas receptoras. Foster *et al*, (1992) observaram a infecção de 12 crias com Scrapie após transferir embriões de seis ovelhas infectadas, sem realizar a lavagem dos mesmos, para 16 receptoras sadias. Desta forma, reforçado pelo fato de LVC estar presente no fluido uterino (Andrioli *et al*, 2000) ressaltamos a importância da lavagem dos embriões logo após a colheita, para obtenção de crias sadias com a TE.

CONCLUSÃO

Os resultados alcançados neste experimento são promissores, indicando a potencialidade da transferência de embriões como técnica segura para obtenção de crias negativas procedentes de cabras soropositivas para o lentivírus caprino, desde que seguidas as normas sanitárias da IETS, tor-

nando possível o melhor aproveitamento do patrimônio genético dos rebanhos caprinos, além de ser um instrumento nos programas de controle da CAE.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e FAPEMIG, pelo suporte financeiro ao trabalho de pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D. S.; CRAWFORD, T. B. LVC - A viral arthritis encephalitis syndrome in goats. *Internat. Goat Sheep Res.*, v. 1, n. 2, p. 168-172, 1980.
- ADAMS, D. S.; KLEVJER-ANDERSON, P. R.; CARLSON, J. L. *et al*. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am. J. Vet. Rec.*, v. 44, n.9, p. 1670-1675, 1983.
- ALI, O. A. Caprine arthritis encephalitis related changes in the uterus of goat. *Vet. Rec.*, v. 121, n. 6, p. 131-132, 1987.
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; PINHEIRO, R. R. *et al*. Detecção do DNA pró-viral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. *Rev. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v. 23, n.3, p. 420-421, 1999.
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; ANDRADE, J. S. *et al*. Isolamento do lentivírus caprino em estruturas embrionárias e solução de lavagem uterina: resultados preliminares. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v. 28, n. 1, p. 208, 2000.
- ANDRIOLI - PINHEIRO, A. *Métodos de colheita e de inervação de embriões caprinos (Capra hircus, LINNAEUS, 1758) e os efeitos de repetidas colheitas na vida reprodutiva de doadoras*. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1993. 100p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal).
- ASSIS, A. P. M.; GOUVEIA, A. M. G. Evidência de lentivírus (Maedi/Visna / Artrite Encefalite Caprina) em rebanhos nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia, Ceará. In CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23, 1994, Recife. *Anais ... Recife, 1994*, p. 104. Resumo.
- BARIL, G.; REMY, B.; LEBOEUF, B. *et al*. Comparison of porcine FSH, caprine FSH and ovine FSH to induce repeated superovulation in goats. In: SCIENTIFIC MEETING OF EUROPEAN EMBRYO TRANSFER ASSOCIATION, 8, 1992, France. *Anais ... France, 1992*, p. 126, abstract.
- 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, p. 101-114, 1994.
- BOWEN, R. A.; HOWARD, T. H.; ELSDEN, R. P. *et al*. Embryo transfer from cattle injected with blue tongue virus. *Am. J. Vet. Rec.*, v. 44, n. 9, p. 1625-27, 1983.
- CASTRO, R. S.; LEITE, R. C.; ABREU, J. J. Prevalence of antibodies to selected viruses in bovine embryo donors and recipients from Brazil, and its complications in international embryo trade. *Trop. Anim. Health Prod.*, v. 24, p. 173-176, 1992.
- CAVALCANTE, T. V.; SALLES, H. O.; FREITAS, V. J. F. Ovulatory response and embryo production after superovulatory treatment in goats seropositive for caprine encephalitis virus (CAEV): preliminary results. Abstract 136, 14th annual meeting AETE Venice September, 1998.
- CHEMINEAU, P.; PROCUREUR, R.; COGNIE, Y. *et al*. Production, freezing and transfer of embryos from a bluetongue infected goat herd without blue tongue transmission. *Theriogenology*, v. 26, n. 3, p. 279-290, 1986.
- CHEEVERS, W. P.; MCGUIRE, T. C. The lentivirus: Maedi/Visna, caprine arthritis-encephalitis and equine infectious anemia. *Adv. Virus Res.*, v. 34, p. 189, 1988.
- CORK, L. C.; HADLOW, W. J.; CRAWFORD, T. B. *et al*. Infection leukoencephalomyelitis of young goats. *J. Infect. Dis.*, v. 129, n. 2, p. 134-141, 1974.
- DAWSON, M. Lentivirus disease of domesticated animals. *J. Comp. Pathol.*, v. 99, p. 401-419, 1988.

- DIGIACOMO, R. F.; MCGINNIS, L. K.; STUDER, E. *et al.* Failure of embryo transfer to transmit BLV in a dairy herd. *Vet. Rec.*, v.127, n.18, p.496, 1990.
- EAST, N.E.; ROWE, J.D.; DAHLBERG, J.E.; THEILEN, G.H.; PEDERSEN, N.C. Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Small Ruminant*, v.10, p.251-262, 1993.
- FOOTE, W. C.; CLARK, W.; MACIULIS, A. *et al.* Prevention of scrapie transmission in sheep, using embryo transfer. *Am. J. Vet. Res.*, v.54, n. 11, p. 1863-68, 1993.
- FOSTER, J. O.; MCKELVEY, W.A.C.; MYLNE, M.J.A. *et al.* Studies on maternal transmission of scrapie in sheep by embryo transfer. *Vet. Rec.*, v.130, p.341-43, 1992.
- GILBERT, R.O.; COUBROGH, R.J.; WEISS, K.E. The transmission of blue tongue virus by embryo transfer in sheep. *Theriogenology*, v.27, n.3, p.527-540, 1987.
- GUÉRIN, B.; CHAFFAUX, S.; ALLIETTA, M. *et al.* IVF and IV culture of bovine embryos using semen from a bull persistently infected with BVD. *Theriogenology*, v.31, p.217, 1992.
- HAREN, W.C.D.; LUEDERE, A. J.; THOMAS, F. C. *et al.* Nontransmission of bluetongue virus by embryos from blue tongue virus-infected sheep. *Vet. Bull.*, v.58, n.9, p.695, 1988.
- ISHWAR, A. K.; MEMON, M.A. Embryo transfer in sheep and goat: a review. *Small Rum. Res.*, v.19, p.35-43, 1996.
- KAHRS, R.F.; GIBBS, E.P.J.; LARSEN, R.E. The search for viruses in bovine semen, a review. *Theriogenology*, v.14, p.151-165, 1980.
- LOUSSERT-AJAKA, I.; MANDELBROT, L.; DELMAS, M.C. *et al.* HIV-1 detection in cervicovaginal secretions during pregnancy. *AIDS*, v.11, n.3, p.1575-1581, 1997.
- NORMAN, S.; SMITH, M.C. Caprine arthritis-encephalitis review of the neurologic form in 30 cases. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, v.182, n.12, p.1342-1345, 1983.
- PARKER, B.N.J.; WRATHALL, A.E.; SAUNDERS, E.W. *et al.* Embryo transfer (ET) in control of pulmonary adenomatosis of sheep (SPA) – progress report. *Proc. 11th Int. Congr. Anim. Reprod. Sci.*, Dublin, v.2, 1988, p.182-183.
- PÉRETZ, G.; BUGNARD, F.; CALAVAS, D. Study of a prevention programme for caprine arthritis-encephalitis. *Vet. Res.*, v.25, p.322-326, 1994.
- PHILPOTT, M. The danger of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. *British Vet. J.*, v.149, p.339-369, 1993.
- ROWE, J.D.; EAST, N.E.; THURMOND, M.C. Cohort study of natural transmission and two methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats on a California dairy. *Am. J. Vet. Res.*, v.53, n.12, p.2386-2395, 1992.
- RUSSO, P. Isolation of a virus in an outbreak of polyarthritis in goat. Preliminary serological survey. *Bull. Acad. Vét. France*, Paris, v.56, n.1 p.31-8, 1983.
- SALTARELLI, M.; QUERAT, G.; KONINGS, D.A.M.; VIGNE, R.; CLEMENTS, J.E. Nucleotide sequence and transcription analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology*, v.179, p.347-364, 1990.
- SALLES, H.O.; ANDRIOLI, A.; SOARES, A.T. *et al.* Utilização da semi-laparoscopia na transferência de embriões em caprinos. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v.24, p.215, 1996.
- SALLES, H.O.; ANDRIOLI, A.; SOARES, A.T. *et al.* Influência da artrite encefalite caprina na resposta superovulatória. *Ciência Animal*, v.8, n.1, p.37-40, 1998.
- SINGH, E.L. *Determining the diseases transmission potencial of embryos and semen.* In: WORLD CONFERENCE ON SHEEP AND BEEF CATTLE BREEDING, 3, 1988, Paris. *Proceedings...* Paris, 1988. p.659-72.
- SINGH, E.L. The disease control potential of embryos. *Theriogenology*, v.27, p.9-20, 1987.
- SOARES, A.T.; SIMPLÍCIO, A. A.; ANDRIOLI, A. *et al.* Eficiência do flunixin meglumine no controle da regressão lútea prematura em cabras superovuladas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, Belo Horizonte, v.50, n.1, p.35-39, 1998.
- STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões*, 3. ed. Illinois: International Embryo Transfer Society, 1999. Ed. SBTE, 180p.
- THIBIER, M.L. Originalité de la surveillance sanitaire et vétérinaire du transfert embryonnaire bovin. *Bull. Mens. Soci. Vét. Pract.*, v.78, p.193-204, 1994.
- THOMAS, F.C.; SINGH, E.L.; HARE, W.C.D. Embryo transfer as a means of controlling viral infections. III nontransmission of Blue tongue virus from viremic cattle. *Theriogenology*, v.19, n.3, p.425-31, 1983.
- TRAVASSOS, C.; BENOÎT, C.; VALAS, S. *et al.* Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. *Small Rum. Res.*, v.32, p.101-106, 1999.
- WALSH, P.S.; METZGER, D.A.; HIGUCHI, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, v.10, p.506-513, 1991.
- WHATHALL, A.E. Disease transmission by semen and embryo transfer techniques and applications for international trade. *State Vet. J.*, v.41, p.19-30, 1987.
- WHATHALL, A.E. Embryo transfer and disease transmission in livestock a review of recent research. *Theriogenology*, v.43, p.81-88, 1995.
- WORKING GROUP ON MOTHER-TO-CHILD TRANSMISSION OF HIV. Rates of mother-to-child transmission of HIV in Africa, America and Europe: results from 13 perinatal studies. *J. Acq. Immune Defic. Syndr.*, v.8, p.506-510, 1995.
- WOLFE, D.F.; NUSBAUM, E.E.; LAUERMAN, L.H. *et al.* Embryo transfer from goats seropositive for caprine arthritis-encephalitis virus. *Theriogenology*, v.28, n.3, p.307-16, 1987.
- ZINK, M.C.; YAGER, J.A.; MYERS, J.P. Pathogenesis of caprine arthritis encephalitis virus. Cellular localization of viral transcriptions in tissues of infected goats. *Am. J. Path.*, v.136, n.4, p.843-854, 1990.