

Possibilidades de aplicação de biotecnologias reprodutivas em animais de produção acometidos por agentes víricos

Possibility of application of reproductive biotechnologies in production animals infected with viral agents

Aracely Rafaelle Fernandes Ricarte^{1,3}, Suzana Aparecida Costa de Araújo¹, Tânia Valeska Medeiros Dantas¹, Edmara Chaves Costa¹, Jean Berg Alves da Silva², Maria Fátima da Silva Teixeira¹

¹Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil. Avenida Paranjana, nº1700, Campus do Itaperi, Fortaleza-CE, CEP: 60.740-903

²Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró, RN, Brasil

³Correspondência: aracelyrfr@yahoo.com.br

Resumo

As biotécnicas reprodutivas são empregadas com o intuito de potencializar o aproveitamento do material genético dos animais com melhores desempenhos. No entanto, quando um reprodutor é acometido por algum agente vírico, é automaticamente descartado da reprodução, o que representa grande perda de material genético. É necessário, antes do uso de qualquer biotécnica, que seja confirmada a ausência de patógenos, utilizando-se algumas técnicas moleculares no auxílio do diagnóstico sanitário dos gametas, evitando, assim, a veiculação de patógenos por meio dessas técnicas. Objetivou-se neste trabalho fazer um levantamento bibliográfico e apontar perspectivas de utilização dos gametas de animais acometidos por agentes víricos, empregando diferentes biotecnologias reprodutivas.

Palavras-chave: biotecnologias, reprodução, agentes víricos.

Abstract

Reproductive biotechnologies have been used with the intention of exploiting genetic material of more productive animals. However, when a viral agent infects a sire, the animal is automatically discarded from the process, which represents great loss of genetic material. It has been seen that these biotechnologies may be used, when gametes are proved to be free of viral agents using molecular techniques to make the diagnose, preventing, by this way, propagation of infectious agents. The objective of this study was to do a bibliographic survey and to show how germplasm of animals infected by viral agents could not be discarded using different reproductive biotechnologies.

Keywords: biotechnologies, reproduction, viral agents.

Introdução

Ao longo de centenas de anos, o homem tem procurado potencializar o aproveitamento do material genético dos seus melhores animais domésticos, no intuito de obter descendentes com características semelhantes ou melhores do que as dos seus genitores (Hafez e Hafez, 2004). Dentre as biotecnologias utilizadas com maior frequência na produção animal, destacam-se a inseminação artificial, a transferência de embriões e a fecundação *in vitro*. Além dessas, existem técnicas que apresentam boas perspectivas para aplicação em larga escala no futuro, como a manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA), a transgênese e a clonagem (Figueiredo *et al.*, 2001).

Porém, para que o animal expresse melhor seu desempenho produtivo e reprodutivo, é necessário que ele tenha um bom manejo e que esteja livre de enfermidades, uma vez que o acometimento de um reprodutor por agentes infecciosos pode impedir sua utilização para fins reprodutivos, além de levá-lo à morte, acarretando sérios prejuízos econômicos e perda de material genético de qualidade (Andrioli *et al.*, 2003). Com o objetivo de reduzir essas consequências, as biotecnologias reprodutivas vêm surgindo como uma alternativa para o resgate e a utilização do material genético desses animais.

Dentre as biotécnicas, a transferência de embriões vem sendo utilizada com segurança em animais acometidos por algumas enfermidades infecto-contagiosas. Após vários estudos, a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) sugeriu a utilização de algumas técnicas padronizadas na manipulação dos embriões, as quais poderiam reduzir o risco de transmissão de enfermidades, demonstrando ser esta técnica, na atualidade, a que apresenta um menor risco de transmissão de patógenos quando aplicada com material genético de animais enfermos (Guerin *et al.*, 1997). Desse novo potencial biotecnológico, surge a necessidade de se realizarem pesquisas aprofundadas com as demais biotécnicas no intuito de se averiguar a possibilidade de utilização dessas técnicas com segurança nesses animais. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi fazer um levantamento bibliográfico sobre o risco de transmissão de patógenos pela reprodução e avaliar a

possibilidade de multiplicação de material genético dos animais de elevado valor zootécnico, acometidos por enfermidades infecto-contagiosas, utilizando diferentes biotecnologias reprodutivas.

Utilização de material genético de animais com infecções víricas em biotecnologias reprodutivas

Os vírus são capazes de infectar, tanto o homem, como os animais. Para que consigam infectar um determinado tipo celular, é necessário que a célula possua receptores para o vírus, o que determina a patogenia do mesmo (Kreutz, 2001).

Com o advento da biologia molecular, tem se estudado de forma mais precisa a patogenia de vários microrganismos. Alguns vírus que anteriormente se imaginava infectar um determinado tipo celular têm demonstrado predileção também por células do trato reprodutivo. Devido ao tamanho dos vírus e à sua forma de infecção, esses são de difícil controle, diagnóstico e tratamento. Por esses aspectos, a principal forma de controle de várias enfermidades víricas é a separação e o sacrifício dos animais acometidos nos rebanhos, o que pode levar a um atraso no melhoramento genético e a graves perdas econômicas.

Neste sentido, o aproveitamento de gametas de animais acometidos por agentes víricos utilizando diferentes biotecnologias reprodutivas surge como uma alternativa para se evitar a perda de material genético de animais de alto valor zootécnico. Cada biotécnica tem seus entraves, mas vale ressaltar aqui algumas possibilidades para a aplicação das biotécnicas com segurança em animais enfermos.

Inseminação Artificial (IA)

A inseminação artificial é uma técnica que tem como objetivo depositar o sêmen diretamente no trato genital da fêmea após a sua obtenção (Silva, 1999). Essa técnica pode ser utilizada como um meio alternativo quando da impossibilidade de realização de monta natural, devido a problemas anatômicos e comportamentais, ou ainda, quando se utiliza sêmen congelado (Feldman e Nelson, 1996). Essa biotécnica também apresenta como vantagens a possibilidade de armazenamento de sêmen por tempo indefinido e a disseminação mais rápida do material genético de machos, bem como a redução de custos e de estresse com transporte de animais (Silva *et al.*, 2001).

A transmissão de patógenos pelo sêmen é bastante relevante, uma vez que na IA várias fêmeas são inseminadas com um único ejaculado, havendo, dessa forma, a possibilidade de introdução de novas cepas de microrganismos mais virulentas em um rebanho inteiro (Andrioli *et al.*, 2003). Sendo assim, a utilização de sêmen requer um cuidado redobrado, visto que este pode ser contaminado de várias formas.

O sêmen pode ser contaminado por microrganismos procedentes dos testículos, do epidídimo, das glândulas anexas, da uretra e do prepúcio, ou os patógenos podem ganhar acesso ao sistema reprodutor, pelo sangue e líquidos tissulares extravasados para esse sistema, nas bacteremias ou viremias, ou no caso de qualquer inflamação ou infecção nesses órgãos. Além disso, o sêmen pode contaminar-se no meio externo, por agentes presentes no ambiente, na pele do reprodutor, nos materiais utilizados (caso não sejam adequadamente esterilizados) na coleta e manipulação do sêmen, e, no caso da congelação do sêmen em *pellets*, pode ocorrer contaminação no nitrogênio líquido a partir de outras amostras de *pellets* contaminados (Hare, 1985; Thibier e Guérin, 2000).

Fatores como lesões, inflamações e infecções no órgão reprodutor podem desencadear maior fluxo de células sangüíneas para o sêmen e, juntamente com estas células, podem ser carreados patógenos. Outros aspectos importantes como o estágio da doença, o estado imunológico ou nutricional e a associação com outras enfermidades podem ser relevantes para a contaminação seminal (Concha-Bermejillo *et al.*, 1996; Pinheiro *et al.*, 2001).

Atualmente, o comércio de sêmen é mais procurado do que o de animais, em virtude do desenvolvimento das técnicas de criopreservação desses materiais associado a vantagens como praticidade, economia e aspectos sanitários do comércio de germoplasma. Porém, as pesquisas sobre o risco de disseminação de patógenos via sêmen não foram totalmente elucidativas, sendo uma necessidade atual o incremento dessa linha de pesquisa para um melhor controle do avanço das enfermidades víricas, principalmente daquelas de caráter crônico, em que o aparecimento de sintomas é tardio (Andrioli *et al.*, 2003).

Pelo fato de se ter observado que alguns vírus, como os lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) apresentam-se no sêmen de forma intermitente, ou seja, apenas alguns ejaculados apresentam o patógeno (Concha-Bermejillo *et al.*, 1996; Andrioli-Pinheiro, 2001), uma alternativa para utilizar o material genético desses animais seria o de testar alíquotas de sêmen por meio de técnicas moleculares mais sensíveis, como a PCR, e utilizar apenas as amostras seminais negativas para o patógeno. Essa conduta é recomendada até mesmo para aqueles reprodutores tidos como saudáveis, uma vez que estes podem estar com alguma virose de caráter crônico e ainda não se terem soroconvertido e, conseqüentemente, não demonstrarem sinais clínicos (Andrioli *et al.*, 2003).

Transferência de Embriões (TE)

A transferência de embriões é uma biotécnica que permite recolher embriões de uma fêmea doadora e transferi-los para fêmeas receptoras com a finalidade de completarem o período de gestação. Sua importância básica para a produção animal consiste na possibilidade de uma fêmea produzir um número de descendentes muito superiores ao que seria possível obter fisiologicamente durante sua vida reprodutiva. Para o melhoramento zootécnico, essa biotécnica é um importante instrumento porque acelera e confere maior precisão no processo de seleção animal (Reichenbach *et al.*, 2001).

Um pouco diferente do que acontece com o sêmen, para que ocorra a transmissão de um patógeno pelo embrião, é necessário que o patógeno esteja presente dentro do oócito, em associação ou mesmo aderido à zona pelúcida (ZP), ou que esteja presente nos fluidos no quais os embriões são recolhidos, manipulados, criopreservados ou transferidos (Singh, 1987; Wrathall, 1995).

Outro fator importante na transmissão de agentes pelo embrião é a patogenia da doença, especialmente quanto à predileção do patógeno pelo trato genital. Agentes carregados pelo sangue podem, também, ganhar acesso ao trato genital, aumentando o risco no caso de qualquer hemorragia uterina, o que ocorre, inevitavelmente, durante a colheita de embriões. No caso de outros agentes de doenças que têm predileção por pele ou vísceras, a probabilidade de contaminação do embrião é remota, todavia tais agentes, ocasionalmente, produzem infecções generalizadas, e mesmo as localizadas podem causar contaminação dos meios, das soluções e do equipamento (Andrioli *et al.*, 2003).

A TE torna possível a obtenção de um grande número de crias em um curto intervalo de tempo e tem sido considerada a técnica mais segura para o trânsito internacional de material genético (Castro *et al.*, 1992; Philpott, 1993). Isto se deve à utilização das normas sanitárias da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) as quais têm o intuito de minimizar os riscos de transmissão de patógenos. Dentre essas normas, está a não utilização de embriões com zona pelúcida rompida, pois essa região se caracteriza como uma barreira natural contra a entrada de patógenos no embrião. Outra técnica adotada é a lavagem dos embriões, a qual visa retirar por lavagem qualquer patógeno que possa estar aderido à zona pelúcida, podendo se utilizar para isto meios de lavagem que contenham enzimas que facilitem essa remoção, como a tripsina (Pinheiro *et al.*, 2001).

Desta forma, a TE pode suprir a necessidade de rápida reposição dos animais puros infectados, com obtenção de crias sadias e manutenção da qualidade genética do plantel, possibilitando a importação de material genético com segurança, mesmo se utilizando fêmeas infectadas, obtendo, com isso, resultados satisfatórios no âmbito econômico, sanitário, reprodutivo e do melhoramento genético (Andrioli *et al.*, 2003).

Produção in vitro de embriões (PIV)

Essa é uma biotécnica utilizada, alternativamente, para acelerar a produção de animais geneticamente superiores e impedir o descarte precoce de fêmeas geneticamente privilegiadas e que não podem reproduzir de forma natural ou até mesmo pela transferência de embriões. A PIV consiste nas etapas de colheita, maturação, fecundação de oócitos e cultivo de zigotos (Gonçalves *et al.*, 2001).

Para essa biotecnologia, são levados em consideração os mesmos riscos de contaminação do sêmen ou dos embriões citados anteriormente. Valendo ressaltar que o espermatozóide pode, na ocasião da fecundação, carrear o patógeno consigo para dentro do oócito, podendo o agente da doença estar no interior do espermatozóide, na sua superfície ou no líquido seminal, o que irá comprometer todo o esforço para produzir embriões em larga escala.

Atualmente, para o uso dessas biotécnicas, existe um controle bem maior de infecções bacterianas, tanto dos gametas que são submetidos a lavagens com soluções assépticas para remover microrganismos que possam estar aderidos a eles, quanto dos meios e soluções utilizadas na manipulação, que são produzidos com assepsia adequada e contém antibióticos na sua formulação. Uma vez que diversos estudos foram realizados com sucesso, testando-se o uso de antibióticos nos meios de coleta, maturação, fecundação e cultivo, os profissionais da área passaram a utilizar este recurso rotineiramente para prevenir possíveis contaminações (Gonçalves *et al.*, 2001).

Pensando nisso, Givens *et al.* (2006) testaram a utilização de um composto antiviral o 2-(4-[2-imidazolil] fenil)-5-(4-metoxifenil) furano (DB606) contra o vírus da diarreia viral bovina (BVDV), na produção *in vitro* de embriões bovinos, observando que a utilização do antiviral não interferiu no sistema de cultivo dos embriões, nem nas taxas de prenhez, nascimento e viabilidade de neonatos. Esse experimento demonstra a possibilidade de utilização de agentes antivirais como medida preventiva contra contaminações por vírus em meios de maturação, fecundação e de cultivo de oócitos, espermatozóides e embriões manipulados *in vitro*. Semelhante ao que já ocorre com a utilização de antimicrobianos contra bactérias e fungos nas biotecnologias reprodutivas, os antivirais podem ser também utilizados preventivamente em todas as manipulações, necessitando para isto da realização de pesquisas para elucidar a ação efetiva dos antivirais e avaliação dos efeitos citotóxicos deles para as células reprodutivas, o que poderá possibilitar no futuro a utilização de material genético de animais com infecção viral.

Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA)

A MOIFOPA é uma biotécnica que consiste no isolamento ou resgate de folículos pré-antrais (FOPAS) a partir de ovários, seguido das etapas de conservação e/ou cultivo folicular, visando ao crescimento, maturação e fecundação *in vitro* dos oócitos previamente inclusos em FOPAS. As vantagens do emprego atual e futuro dessa biotécnica vão desde o aumento da eficiência reprodutiva de animais de alto valor zootécnico, passando pela utilização de ovários de animais portadores de patologias graves de ovidutos e/ou útero, até a recuperação de rebanhos eliminados por problemas sanitários (Figueiredo *et al.*, 2001).

Recentemente, em cabras portadoras do vírus da artrite encefalite caprina, Silva (2006) observou pela técnica de PCR *nested* a presença desse vírus nos folículos pré-antrais desses animais, porém, ainda não se sabe a localização exata desse vírus no folículo, se no oócito, ou nas células da granulosa, as quais já demonstraram ser permissivas a esse vírus *in vitro* (Lamara *et al.*, 2001).

Para se evitar a contaminação de folículos pré-antrais em cultivo, o ideal seria realizar um teste diagnóstico molecular nas amostras do tecido ovariano e, ainda assim, mesmo com o resultado negativo para algum patógeno, seria aconselhável realizar o cultivo dos folículos isoladamente, para que um único folículo contaminado não venha a comprometer os demais.

Criopreservação

A técnica de criopreservação de gametas foi desenvolvida com intuito de formar bancos de germoplasma animal. Esta tem sido protocolada e utilizada para a preservação de material genético como sêmen (Storey *et al.*, 1998), embriões (Otoi *et al.*, 1998) e oócitos oriundos de folículos antrais (Bosch *et al.*, 2004; Mochida *et al.*, 2003) e pré-antrais (Amorim *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2004) de alguns animais domésticos.

O objetivo da preservação consiste em garantir que as células permaneçam com uma baixa taxa metabólica durante um determinado período de estocagem, podendo, durante esse período, serem resgatadas a fim de continuar o seu desenvolvimento normal. Entretanto, para que isso seja possível mesmo após longos períodos de preservação, alguns fatores essenciais para a sobrevivência das células devem ser levados em consideração, tais como: temperatura, tempo de preservação, tipo e concentração do crioprotetor, dentre outros (Santos *et al.*, 2004).

Já foi citada a possibilidade de contaminação de amostras seminais criopreservadas em *pellets* por meio de nitrogênio líquido, a partir de outras amostras de *pellets* contaminados inseridos em tal cultura, o que também poderia acontecer com embriões ou oócitos (Hare, 1985; Thibier e Guérin, 2000). A conservação de material genético também pode ser feita por meio de fragmentos de ovário, sendo esta uma opção estratégica para conservar as funções gametogênicas e esteroidogênicas, porém esses fragmentos são utilizados posteriormente para transplante, seja para o mesmo animal ou não (Santos *et al.*, 2004), podendo conter patógenos que venham a contaminar outras amostras por meio do nitrogênio líquido e também as receptoras do fragmento transplantado.

Para que isto não venha a ocorrer, seria ideal que cada amostra, antes de ser criopreservada, fosse testada por meio de técnicas bastante sensíveis como a PCR, sendo as amostras positivas descartadas e somente as negativas preservadas para poderem posteriormente ser utilizadas com segurança (Silva, 2006).

Transgênese

O objetivo da biotécnica de transgênese é produzir animais que possuam uma incorporação estável de fragmento de DNA exógeno em sua linhagem germinativa. As técnicas atualmente adotadas na obtenção de animais transgênicos são: microinjeção de genes em pronúcleos de oócitos fecundados, transferência de DNA mediada por espermatozoides durante a fecundação *in vitro*, transferência nuclear com células somáticas, biobalística, dentre outras (Wheeler *et al.*, 2001).

A transgênese é a única biotecnologia da reprodução em que a presença de um vírus em alguns casos é de fundamental importância, isto porque um dos métodos de transferência de genes é utilizando-se retrovírus (Varmus, 1998).

Os retrovírus são vírus pertencentes à família Retroviridae; são RNA vírus que possuem a enzima transcriptase reversa, imprescindível para sua replicação, capaz de promover a síntese de uma cópia de DNA de fita dupla a partir do RNA viral. Pela ação da integrase, o DNA transcrito é integrado de forma estável ao genoma da célula hospedeira, comportando-se, então, como um gene celular residente, podendo permanecer dessa forma por longos períodos ou prosseguir a sua replicação com posterior tradução de proteínas, montagem da partícula viral e saída dessa da célula por brotamento (Peçanha *et al.*, 2002).

Por esta capacidade de tradução e integração ao genoma celular, os retrovírus são utilizados como um sistema natural de transferência para introduzir DNA em vários tipos de células de mamíferos. Tanto retrovírus naturais, quanto aqueles produzidos por engenharia genética podem ser utilizados para infectar células de embriões de mamíferos. A principal vantagem da transferência de genes, mediada por retrovírus, é a facilidade técnica de expor vírus a embriões em vários estádios de desenvolvimento. No entanto, o tamanho da seqüência

de DNA transferida é limitado, e o gene inserido não é sempre expresso na segunda geração (Varmus, 1998).

Apesar de se empregar agentes infecciosos, o controle sanitário nessa biotecnologia é imprescindível, mas vale ressaltar que o risco de contaminação é descartado quando se faz uso de retrovírus inespecíficos para a espécie animal em que se deseja empregar esta biotécnica. Desta forma, o vírus utilizado deve ser inofensivo para os embriões transgênicos.

A realização de estudos com o intuito de se averiguar a sanidade e a possibilidade de utilização do material genético de animais acometidos por enfermidades víricas é importante, as principais razões já foram citadas anteriormente. Porém, deve-se ter cuidado para que o uso de biotecnologias não venha a veicular ainda mais patógenos. Nesse contexto, o desenvolvimento de métodos de diagnóstico pelo uso da biologia molecular vem cada vez mais auxiliar o controle de enfermidades víricas nos rebanhos.

Referências

- Amorim CA, Rondina D, Rodrigues APR, Costa SHF, Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Giorgetti A.** Isolated ovine primordial follicles cryopreserved in different ethylene glycol concentrations. *Theriogenology*, v.60, p.735-742, 2003.
- Andrioli-Pinheiro A.** Vírus da Artrite Encefalite Caprina: PCR e isolamento viral em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões. 2001. 68f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.
- Andrioli A, Gouveia AMG, Pinheiro RR.** Seleção de sêmen de reprodutores portadores do vírus da artrite encefalite caprina através da técnica de reação em cadeia da polimerase. Sobral, Comunicado técnico. EMBRAPA-CNPQ, 2003, n.50, 23 p.
- Bosch P, Hernandez-Fonseca HJ, Millen DM, Wininger JD, Massey B, Lamb SV, Brackett BG.** Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. *Theriogenology*, v.61, p.581-594, 2004.
- Castro RS, Leite RC, Abreu JJ.** Prevalence of antibodies to selected viruses in bovine embryos donors and recipients from Brazil, and its implications in international embryo trade. *Trop Anim Hlth Prod*, v.24, p.173-176, 1992.
- Concha-Bermejillo A, Magnus-Corral S, Brodie SJ, Demartini JC.** Veneral shedding of ovine lentivirus in infected rams. *Am J Vet Res*, v. 7, p.684-688, 1996.
- Feldman EC, Nelson RW.** *Canine and feline endocrinology and reproduction*. Philadelphia: WB Saunders, 1996.
- Figueiredo JR, Rodrigues APR, Amorim CA.** Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais - MOIFOPA. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Varela, 2001. p.227-260.
- Givens MD, Stringfellow DA, Riddell KP, Galik PK, Navarre CB.** Normal calves produced after transfer of in vitro fertilized embryos cultured with an antiviral compound. *Theriogenology*, v. 65, p. 344-355, 2006.
- Gonçalves PBD, Visitin JA, Oliveira MAL, Montagner MM, Costa LFS.** Produção *in vitro* de embriões. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Varela, 2001. p.195-226.
- Guerin B, Nibart M, Le Guienne B, Humblot P.** Sanitary risks related to embryo transfer in domestic species. *Theriogenology*, v.47, p.33-42, 1997.
- Hafez B, Hafez ESE.** Reprodução Animal, 7.ed. Barueri: Manole, 2004, p.97-103.
- Hare WCD.** *Enfermedades transmissibles por el semen y las tecnicas de transferencia de embriones*. Paris: Office International des Epizooties, 1985.
- Kreutz LC.** Imunidade contra vírus. In: Madruga CR, Araújo FR, Soares CO. *Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária*. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. p.19-45.
- Lamara A, Fieni F, Mselli-Lakhal L, Tainturier D, Chebloune Y.** Efficient replication of caprine arthritis encephalitis virus in goat granulose cell. *Virus Res*, v.79, p.165-172, 2001.
- Mochida Y, Takemura Y, Kanda T, Horie Y.** Fertilized eggs obtained from transplantation of frozen ovaries and parthenogenesis in combination with artificial insemination of frozen sêmen of the silkworm, *Bombyx mori*. *Criobiology*, v.46, p.153-160, 2003.
- Otoi T, Yakamoto K, Koyama N, Suzuki T.** Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws. *Criobiology*, v.37, p.77-85, 1998.
- Peçanha EP, Antunes OAC, Tanuri A.** Estratégias farmacológicas para a terapia anti-AIDS. *Quím Nova*, v.25, p.1108-1116, 2002.
- Philpott M.** The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. *Br Vet J*, v.149, p.339-369, 1993.
- Pinheiro RR, Gouveia AMG, Alves FSF.** Prevalência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no estado do Ceará, Brasil. *Ci Rur*, v.31, p.449-454, 2001.
- Reichenbach HD, Oliveira MAL, Lima PF, Santos Filho AS, Andrade JCO.** Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução*



animal.. São Paulo: Varela, 2001. p.127-177.

Rodrigues APR, Amorim CA, Costa SHF, Matos MHT, Santos RR, Lucci CM, Bão SN, Ohashi OM, Figueiredo JR. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. *Theriogenology*, v.61, p.1009-1024, 2004.

Santos RR, Rodrigues APR, Martins FS, Matos MHT, Celestino JJH, Figueiredo JR. Preservação de folículos pré-antrais de pequenos ruminantes. *Ci Anim*, v.14, p.7-19, 2004.

Silva JBA. *Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) em folículos pré-antrais de cabras naturalmente infectadas.* 2006. 90f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2006.

Silva LDM. Tecnologia do sêmen canino. *In: Simpósio Cearense de Ciência Animal*, 1, 1999, Fortaleza. Anais... Fortaleza: Sociedade Cearense de Ciência Animal, 1999. p.43-49.

Silva LDM, Silva AR, Cardoso RCS. Inseminação artificial em cães. *In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.* São Paulo: Varela, 2001. p.69-95.

Singh EL. The disease control potential of embryos. *Theriogenology*, v.27, p.9-20, 1987.

Storey BY, Noyles EE, Thompson KA. Comparison of glycerol, other polyols, trealose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Criobiology*, v.37, p.45-58, 1998.

Thibier M, Guérin B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.233-251, 2000.

Varmus H. Retroviruses. *Science*, v.240, p.1427-1435, 1998.

Wheeler MB, Choi SJ, Voelker GR, Walters EM, Cezar GG. Produção de animais transgênicos nas espécies domésticas: tecnologia e aplicações. *In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.* São Paulo: Varela, 2001. p.303-340.

Wrathall AE. Embryo transfer and disease transmission in livestock a review of recent research. *Theriogenology*, v.43, p.81-88, 1995.
