Flavio José Minieri Marchese

Perfil bioquímico de bezerros da raça nelore, originados por meio da técnica de transferência nuclear de célula somática (TNCS) - clonagem

São Paulo
2014

Flavio José Minieri Marchese

**Perfil bioquímico de bezerros da raça nelore, originados por meio da técnica de
transferência nuclear de célula somática (TNCS) - clonagem**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Junior

São Paulo
2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3011
FMVZ

Marchese, Flavio José Minieri
Perfil bioquímico de bezerros da raça nelore, originados por meio da técnica de transferência nuclear
de célula somática (TNCS) - clonagem / Flavio José Minieri Marchese. -- 2014.
93 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Junior.

1. Perfil bioquímico. 2. Clonagem animal. 3. Parto normal. 4. Bovino. I. Título.

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 25 de fevereiro de 2014

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Perfil bioquímico de bezerros da raça nelore, originados por meio da técnica de transferência nuclear de célula somática (TNCS) - Clonagem", protocolado sob o CEUA nº 1209241013, utilizando 20 Bovinos (20 machos), sob a responsabilidade de Eduardo Harry Birgel Junior, foi aprovado na reunião de 13/11/2013, e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "", protocol number CEUA 1209241013, utilizing 20 Bovines (20 males), under the responsibility Eduardo Harry Birgel Junior, was approved in the meeting of day 11/13/2013, and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MARCHESE, Flavio José Minieri

Título: Perfil bioquímico de bezerros da raça nelore, originados por meio da
técnica de transferência nuclear de célula somática (TNCS) - Clonagem

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____

Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____

Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Regina e Flavio que sempre me apoiaram e permaneceram ao meu lado, durante a minha vida toda, obrigado por tudo.

Senhor fazei-me instrumento de vossa paz. Onde houver ódio, que eu leve o amor; Onde houver ofensa, que eu leve o perdão; Onde houver discórdia, que eu leve a união; Onde houver dúvida, que eu leve a fé; Onde houver erro, que eu leve a verdade; Onde houver desespero, que eu leve a esperança; Onde houver tristeza, que eu leve a alegria; Onde houver trevas, que eu leve a luz. Ó Mestre, Fazei que eu procure mais Consolar, que ser consolado; compreender, que ser compreendido; amar, que ser amado. Pois, é dando que se recebe, é perdoando que se é perdoado, e é morrendo que se vive para a vida eterna.

Ao meu avô Doutor Arthur Marchese, in memoriam, por ter herdado a simplicidade da vida e a vontade de ajudar o próximo no meu caso os animais.

A minha querida Tia Rosa que considero minha segunda mãe, e minha irmã Fabiana, por fazer parte da minha vida e ajudar a trilhar meus caminhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por todas as oportunidades que apareceram na minha vida.

Ao meu orientador *Porf. Dr. Eduardo Harry Birgel Junior* pela atenção, paciência e conhecimentos adquiridos ao longo dos estágios e da pós-graduação.

A amiga *Melina Marie Yasuoka*, pelas aulas de inglês, risadas e brincadeiras durante os momentos mais difíceis.

Aos professores da *Universidade de Guarulhos*, que participaram da minha formação.

A amiga *Vanessa Martins Storillo*, que tanto pegava no meu pé e não me deixava em paz, sucesso e força no doutorado. “O único lugar aonde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário”. Albert Einstein

Aos meus amigos da *República Piramodels*, Frodo, Xibungo, Inútil, Perna, Caio e Komixão valeu por tudo, vocês fizeram parte de tudo isso!

Aos amigos da pós-graduação, *André, William, Silke e Renan* “Não existe um caminho para a felicidade. A felicidade é o caminho”. Mahatma Gandhi

Ao grande amigo *Eduardo Marques “DUDU”*, pelas nossas farras e conversas de madrugada. Foi muito bom à parceria que fizemos.

A todos os funcionários do Hospital Veterinário, e do Campus FZEA/USP, que me ajudaram direta ou indiretamente não seria capaz se não fossem a ajuda de vocês.

Ao amigo *Paulinho Fantinato Neto* pela ajuda recebida em diversas situações durante a pós-graduação.

Ao Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres em especial a *Profa. Dra. Maria Angélica Miglino* pela concessão da bolsa.

RESUMO

MARCHESE, F. J. M. **Perfil bioquímico de bezerros da raça nelore, originados por meio da técnica de transferência nuclear de célula somática (TNCS) – clonagem.** [Biochemical profile of Nelore calves, originated by the technique of somatic cell nuclear transfer (SCNT) - Cloning]. 2014. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O perfil metabólico é usado na clínica médica com a finalidade de ajudar o diagnóstico e permite o diagnóstico precoce de alterações metabólicas e também a funcionalidade dos principais órgãos. A transferência nuclear de células somáticas (TNCS - clonagem), apesar de apresentar resultados positivos, ainda possui baixa eficiência, com alta mortalidade embrionária, fetal e pós-natal. Observa-se na primeira semana de vida principalmente nas primeiras 24-48 horas um grande número de bezerros que morrem, devido a distúrbios de adaptação neonatal. Essas alterações placentárias e más formações determinam alterações bioquímicas que são as causas de muitos óbitos verificados nos clones. Este trabalho teve como objetivo estudar o perfil bioquímico de bezerros Nelore clonados durante os 30 primeiros dias de vida, procurando verificar as possíveis modificações no metabolismo de animais obtidos por transferência nuclear de células somáticas (TNCS - clonagem). Foram utilizados 20 bezerros Nelores e realizou-se de cada animal 13 coletas de sangue nos seguintes momentos: ao nascimento, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 240, 360, 480 e 720 horas de vida. Determinou-se de cada amostra os valores séricos para função renal, função hepática, proteinograma, lipidograma e minerais. As amostras foram analisadas em analisador bioquímico automático, da marca Randox, modelo RX Daytona. Observou-se, ureia $22,78 \pm 0,84$ mg/dL e $29,03 \pm 0,92$ mg/dL, creatinina $1,61 \pm 0,05$ mg/dL e $1,39 \pm 0,03$ mg/dL, relação ureia/creatinina $16,07 \pm 0,76$ e $21,16 \pm 0,75$ mg/dL; aspartato alanina quinase (AST), $57,84 \pm 3,06$ U/L e $22,91 \pm 0,99$ U/L; gama-glutamil transferase (GGT) $1294,05 \pm 152,37$ U/L e $287,26 \pm 28,05$ U/L; fosfatase alcalina (FA) $2311,63 \pm 146,22$ e $836,05 \pm 41,07$ U/L e creatina quinase (CK) $223,47 \pm 30,73$ mg/dL e $64,82 \pm 9,18$ mg/dL; proteína total $6,43 \pm 0,09$ g/dL e $5,68 \pm 0,05$ g/dL; albumina $2,82 \pm 0,02$ g/dL e $2,63 \pm 0,01$ g/dL; globulina $3,61 \pm 0,09$ g/dL e $3,06 \pm 0,05$ g/dL e relação albumina/globulina $0,90 \pm 0,04$ e $0,90 \pm 0,02$; colesterol $74,00 \pm 3,63$ mg/dL e $56,31 \pm 2,84$ mg/dL; triglicérides $35,18 \pm 1,98$ mg/dL e $38,71 \pm 2,79$ mg/dL; glicose $126,72 \pm 3,30$ mg/dL e $106,70 \pm 2,88$ mg/dL e lactato $26,27 \pm 0,98$ mg/dL e $30,71 \pm 1,61$ mg/dL ; cálcio $10,74 \pm 0,07$ mg/dL e $10,63 \pm 0,08$ mg/dL; fósforo $8,96 \pm 0,13$

mg/dL e $9,87 \pm 0,20$ mg/dL, para o grupo de bezerros de parto normal e bezerros clonados, respectivamente. Apesar de bezerros clonados da raça Nelore apresentaram perfil bioquímico dentro dos valores fisiológicos descritos na literatura observou-se importantes e significativas diferenças no seu metabolismo, principalmente, na primeira semana de vida.

Palavras-chave: Perfil bioquímico. Clonagem animal. Parto normal. Bovino.

ABSTRACT

MARCHESE, F. J. M. **Biochemical profile of Nellore calves, originated by the technique of somatic cell nuclear transfer (SCNT) – cloning.** [Perfil bioquímico de bezerros da raça nelore, originados por meio da técnica de transferência nuclear de célula somática (TNCS) - Clonagem]. 2014. 93 f Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The metabolic profile is used in clinical medicine with the purpose of assisting in the study of metabolic diseases origin, allowing early diagnosis of metabolic abnormalities and also aids the evaluation of major organs functionality. The somatic cell nuclear transfer (SCNT - cloning), despite showing positive results, still has low efficiency and it is associated with high embryonic, fetal and postnatal mortality. It has been observed in the first week of life, especially in the first 24-48 hours, that a large number of calves die due to neonatal adaptation disorders. Among these, placental disorders and malformations have been related to biochemical changes, possibly being the major cause of deaths in clones. This study aimed to evaluate the influence of age on the concentrations of serum biochemical parameters of Nellore calves born through normal delivery, compared with cloned ones, from birth to 30 days of life. Twenty Nellore calves were used in this study and 13 blood samples of each animal were collected at the following periods: at birth, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 240, 360, 480 and 720 hours of life. Serum values for kidney and liver function, proteins, lipid and minerals were determined. The samples were analyzed with a biochemical automatic analyzer, Randox brand, model RX Daytona. It was observed: urea 22.78 ± 0.84 mg/dL and 29.03 ± 0.92 mg/dL, creatinine 1.61 ± 0.05 mg/dL and 1.39 ± 0.03 mg/dL urea / creatinine 16.07 ± 0.76 and 21.16 ± 0.75 mg/dL; alanine aspartate kinase (AST) 57.84 ± 3.06 U/L and 22.91 ± 0.99 U/L; gamma-glutamyl transferase (GGT) 1294.05 ± 152.37 U/L and 287.26 ± 28.05 U/L; alkaline phosphatase (ALP) 2311.63 ± 146.22 and 836.05 ± 41.07 U/L and creatine kinase (CK) 223.47 ± 30.73 mg/dL and 64.82 ± 9.18 mg/dL ; total protein 6.43 ± 0.09 g/dL and 5.68 ± 0.05 g/dL; albumin 2.82 ± 0.02 g/dL and 2.63 ± 0.01 g/dL; globulin 3.61 ± 0.09 g/dL and 3.06 ± 0.05 g/dL and the albumin/globulin 0.90 ± 0.04 and 0.90 ± 0.02 ; cholesterol 74.00 ± 3.63 mg/dL and 56.31 ± 2.84 mg/dL; triglycerides 35.18 ± 1.98 mg/dL and 38.71 ± 2.79 mg/dL; glucose 126.72 ± 3.30 mg/dL and 106.70 ± 2.88 mg/dL; lactate 26.27 ± 0.98 mg/dL and 30.71 ± 1.61 mg/dL; Calcium 10.74 ± 0.07 mg/dL and 10.63 ± 0.08 mg/dL; phosphorus 8.96 ± 0.13 mg/dL and 9.87 ± 0.20 mg/dL for the group of normal

delivery and cloned calves, respectively. Although cloned calves Nellore showed biochemical profile within the physiological range described in the literature and observed important differences in their metabolism, especially in the first week of life.

Keywords: Biochemical profile. Animal cloning. Normal delivery. Bovine.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	TRANSFERÊNCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS	17
2.2	DISTÚRBIOS RELACIONADOS À GESTAÇÃO	18
2.3	ALTERAÇÕES CLÍNICAS PÓS-NATAL.	19
2.4	IMPORTÂNCIA DO PERFIL BIOQUÍMICO.....	21
2.4.1	Avaliações laboratoriais dos lipídeos	22
2.4.2	Avaliações laboratoriais das proteínas	24
2.4.3	Avaliações laboratoriais dos metabólitos	27
2.4.4	Avaliações laboratoriais das enzimas séricas.....	28
2.5	VALORES DE REFERÊNCIA PARA PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	30
2.5.1	Valores de referência dos lipídeos dos bovinos.....	30
2.5.2	Valores de referência das proteínas dos bovinos	32
2.5.3	Valores de referência dos metabólitos dos bovinos	34
2.5.4	Valores de referência das enzimas séricas dos bovinos.....	36
2.5.5	Valores de referência dos minerais	38
3	OBJETIVOS	40
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1	COLETA DE SANGUE.....	43
4.2	AVALIAÇÃO DA PROTEINOGRAMA	43
4.2.1	Determinação dos teores séricos de proteína total.....	43
4.2.2	Determinação dos teores séricos de albumina.....	44
4.2.3	Determinação dos teores séricos de globulinas	44
4.3	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO HEPÁTICA	45

4.3.1	Determinação da atividade sérica da aspartato-aminotransferase (AST)	45
4.3.2	Determinação da atividade sérica da gama glutamiltransferase (GGT)	45
4.3.3	Determinação da atividade sérica da creatina quinase (CK)	46
4.3.4	Determinação da atividade sérica da fosfatase alcalina (FA)	46
4.4	AVALIAÇÃO DO LIPIDOGRAMA	47
4.4.1	Determinação dos teores séricos de colesterol	47
4.4.2	Determinação dos teores séricos de triglicérides	47
4.4.3	Determinação dos teores plasmáticos de glicose	47
4.5	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL	48
4.5.1	Determinação dos teores séricos de ureia	48
4.5.2	Determinação dos teores séricos de creatinina	49
4.6	DETERMINAÇÃO DOS TEORES SÉRICOS DE LACTATO	49
4.7	DETERMINAÇÃO DOS TEORES SÉRICOS DOS MINERAIS	49
4.7.1	Determinação dos teores séricos de cálcio	49
4.7.2	Determinação dos teores séricos de fósforo inorgânico	50
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1	FUNÇÃO RENAL	53
5.2	FUNÇÃO HEPÁTICA	57
5.3	PROTEINOGRAMA	64
5.4	LIPIDOGRAMA	69
5.5	MINERAIS	76
6	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIA	80

1 INTRODUÇÃO

A transferência nuclear de células somáticas (TNCS - clonagem), apesar de apresentar resultados positivos, ainda possui baixa eficiência, com alta taxa de mortalidade embrionária, fetal e pós-natal. A principal causa das mortes são as alterações observadas no feto e placenta que ainda precisam de esclarecimento (WELLS et al., 2004). Nos primeiros dias de vida tem um grande número de óbito de bezerros, principalmente nas primeiras 48 horas após o nascimento, relacionada a distúrbios de adaptação neonatal.

Deficiências decorrentes de má formação congênita em tecidos como coração, rins, vasos umbilicais, é uma das alterações observadas em bezerros clonados peri e pós-natais. Alguns distúrbios são consequência de hipoxemia, hipóxia tecidual e parecem ter origem ainda no intra-parto, decorrência de uma situação de sofrimento fetal provocado pela deficiência placentária, dificuldade na regulação da glicemia, temperatura e pressão arterial, além de distúrbios nas funções digestiva e hepática logo após o parto (WELLS et al., 2004).

Durante o nascimento, no momento da separação do cordão umbilical do feto, várias funções fisiológicas anteriormente suportadas pela mãe através da placenta devem ser assumidas pelo neonato a fim de assegurar a sua sobrevivência (BENESI, 1993).

Essa adaptação a vida extrauterina é estudada em bezerros clonados, sendo comum observar prostração, letargia, ausência do reflexo de sucção, nos primeiros 15 minutos de vida eliminação do mecônio e taxa de mortalidade pós-nascimento em cerca de 50%. Existe, ainda, episódio de graves distúrbios cardiopulmonares acompanhados por taquicardia, hiperfonese, presença de sopros cardíacos, episódios de arritmia, bradicardia associados a dispnéias, respiração rude e estertores, devido ao não fechamento do Forâmen de Botal e do ducto arterioso resultando na mistura de sangue arterial e venoso, comprometendo a capacidade de oxigenação do sangue dos bezerros clonados (BIRGEL JUNIOR et al., 2011a).

Nunes (2009) relatou alterações no exame de tococardiografia, decorrente de sofrimento fetal e hipóxia intrauterina de grau variável nos últimos dias de gestação. A gravidade da hipóxia intrauterina explicaria a evolução do quadro clínico dos bezerros. Em resultado a essa ocorrência, observou que os fetos dos bezerros clonados nasceram tingidos por mecônio (BIRGEL JUNIOR et al., 2011a).

Afora isso, desde o início do desenvolvimento da técnica de fertilização “in vitro” de embriões e da clonagem de bovinos e ovinos, foram descritas as Síndromes dos bezerros gigantes (CHAVATTE-PALMER et al., 2006; BATCHELDER et al., 2007). A macrossomia

foi relatada em 20,9 % (9/43) dos bezerros, observou que 69,8 % (30/43) apresentaram peso dentro da normalidade e 9,3 % (4/43) apresentaram peso menor do que o esperado para a raça Nelore (MEIRELLES et al., 2010). A média de peso dos animais da raça Nelore ao nascimento foi de 38 kg, com amplitude de variação entre 14 e 62 kg (MEIRELLES et al., 2010).

Em bezerros clonados observaram-se em 23% dos animais hipoglicemia e/ou distúrbios de termorregulação nas primeiras 24 horas de vida (MEIRELLES et al., 2010, BIRGEL JUNIOR et al., 2011a, BIRGEL JUNIOR et al., 2011b). Esses distúrbios podem estar relacionados à macrosomia (síndrome do bezerro grande), mimetizando quadro de diabetes gestacional observado em mulheres ou poderiam estar relacionado ao consumo das reservas de glicogênio hepático, decorrentes da hipóxia gerada na vida intrauterina e perinatal, predispondo os animais a hipoglicemia e hipotermia (BIRGEL JUNIOR et al., 2011b).

Alguns pesquisadores observaram alterações hormonais em bezerros clonados logo após o nascimento, relatam um aumento dos teores plasmáticos de insulina (GARRY et al., 1996) e leptina (CHAVATTE-PALMER et al., 2004) e uma queda dos teores plasmáticos de tiroxina (GARRY et al. 1996; CHAVATTE-PALMER et al., 2004), triiodotirosina (GARRY et al., 1996) e IGF-2 (CHAVATTE-PALMER et al., 2004) sendo um indício de distúrbio na regulação de energia intra-útero, responsável pela macrosomia e pelos distúrbios observados nos clones.

As diversas alterações placentárias e as más formações resultam em alterações bioquímicas e muitas vezes óbito em clones. A existência de poucas informações na literatura referente ao perfil bioquímico de bezerros clonados da raça Nelore e, principalmente, a ausência de pesquisas no Brasil relacionada à caracterização do perfil metabólico de bezerros clonados da raça Nelore motivou a realização da presente pesquisa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TRANSFERÊNCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS

A bovinocultura hoje, responde pela maioria dos clones produzidos comercialmente. Segundo Heyman (2005), aproximadamente 1500 animais nasceram pela técnica de TNCS por todo mundo, especialmente América do Norte, Japão, Nova Zelândia, Europa, e também Ásia e América do Sul.

O primeiro mamífero clonado através da técnica de TNCS, gerada a partir de núcleo doador proveniente da glândula mamária de um adulto de seis anos de idade, foi a ovelha Dolly que nasceu após 267 tentativas de clonagem reprodutiva, em 5 de julho de 1996, sobreviveu até os seis anos e meio de idade, onde foi submetida a eutanásia por problemas pulmonares e artrites. Este caso ficou mundialmente conhecido (WILMUT et al., 1997).

Após o nascimento de Dolly, vários outros mamíferos de espécies diferentes foram clonados pelo mesmo procedimento de transferência nuclear tais como bovinos Cibelle et al. (1998), caprinos Baguisi et al. (1999), suínos Betthauser et al. (2000), felinos Shin et al. (2002), ovinos Campbell et al. (1996) e caninos Lee et al. (2005). Apesar das tentativas, a maioria dos animais veio a óbito antes de completar seis meses de idade (CHAVATTE-PALMER et al., 2004).

Na Nova Zelândia, foi usada com sucesso a transferência nuclear de células somáticas para clonar 20 fêmeas bovinas extintas da raça “Enderby Island” (HEYMAN, 2005). No Brasil, em março de 2001, ocorreu o nascimento da bezerra Vitória, primeiro animal produzido por transferência nuclear de células somáticas, na Embrapa Recursos Genéticas e Biotecnologia (NEVES; MIRANDA; TORTORELLA, 2010).

Vários laboratórios vêm aplicando a transferência nuclear, para produzir clones de diferentes espécies. O processo caminha para uma eficiência satisfatória, mas alguns resultados da TNCS são baixos, decorrente das taxas de gestação (MEIRELLES et al., 2007).

A clonagem é indiscutivelmente uma das mais importantes descobertas da biologia moderna (BUCZINSKI et al., 2009). Em 1950 teve início à biotecnologia da reprodução com o surgimento da inseminação artificial em bovinos, o uso de transferência de embriões veio

logo após em 1970, considerado assim um grande avanço da biotecnologia (HEYMAN, 2005). A transferência nuclear de células somáticas (TNCS) clonagem, é uma biotécnica que permite a geração de um organismo geneticamente igual ao outro e tem sido usada com êxito para a produção de animais viáveis (CAMPBELL et. al., 1996).

O grande interesse na produção de animais clonados está relacionado com a possibilidade de reproduzir animais com alta produtividade ou características desejáveis em um determinado rebanho, além da conservação de espécies em risco de extinção (HEYMAN, 2005).

2.2 DISTÚRBIOS RELACIONADOS À GESTAÇÃO

As falhas no desenvolvimento da placenta estão entre as causas mais comuns de perdas gestacionais de clones, consequência à inadequada passagem da nutrição do saco vitelínico e causas de hipóxia em decorrência da falta de vascularização, à rejeição imune e alterações de placentomas WELLS (1999); (HILL et al., 1999); (BUCZINSKI et al., 2009).

Em gestações de conceitos clonados, os tamanhos e números de placentônios, sofrem variação, observado por MIGLINO et al. (2007), eles são maiores em tamanho e menores em quantidade. Relatou também, a união de pequenos placentônios, provavelmente por fusão de várias carúnculas, sendo que algumas eram visíveis ao corte, este evento também foi observado por Batchelder et al. (2007).

Chavatte-Palmer et al. (2002), também observaram em gestações de clones, placentomegalia, um número reduzido de placentomas em relação a gestações de animais controle, produzidos *in vitro* (PIV).

É muito comum em vacas prenhas de clones terem uma gestação prolongada, decorrentes dos níveis reduzidos de cortisol encontrados nestes animais que seriam insuficientes para preparar o sistema IGF (fator de crescimento insulina-dependente) resultando em dificuldades durante o parto (MATSUZAKI & SHIGA (2002).

Quando o feto atinge o final da gestação, a receptora não apresenta os sinais do parto, como a dilatação da cérvix mesmo quando o feto já está apresentando sinais de sofrimento fetal, então recomenda o uso da cirurgia cesariana (HILL et al. 1999).

Nunes (2009) observou hipóxia/sofrimento fetal em cerca de 40% dos animais clonados, sendo que esses distúrbios estão associados com a aspiração de mecônio na vida intrauterina.

Em gestações de bezerros clonados da raça Nelore tem-se optado pela realização de cesariana entre 290 a 292 dias de gestação como foi observada a gestação do Nelore dura, em média 10 dias a mais do que na raça Holandesa (BIRGEL et al., 2011a).

Segundo Chavatte-Palmer (2007), um dos maiores obstáculos a serem vencidos durante o desenvolvimento desta técnica, são as grandes perdas durante a gestação (PANARACE et al., 2007; KOHAN-GHADR et al., 2008; MEIRELLES et al., 2007).

2.3 ALTERAÇÕES CLÍNICAS PÓS-NATAL.

Altas taxas de morbidade e mortalidade em bezerros ocorrem nos primeiros dias de vida, sendo associadas à ocorrência de asfixia neonatal por falha na adaptação destes animais à vida extra-uterina (BENESI, 1992). Muitas das alterações e dos processos mórbidos observados no período neonatal são relacionadas à hipóxia por alterações na circulação útero-placentária e/ou do cordão umbilical durante as contrações uterinas intensas e prolongadas (SIRISTATIDIS et al., 2003).

Pesquisas realizadas na Universidade de São Paulo mostram que a adaptação a vida extrauterina está particularmente afetada em bezerros clonados, sendo comum observar prostração, letargia, ausência do reflexo de sucção, eliminação do mecônio nos primeiros 15 minutos de vida e taxa de mortalidade pós-nascimento em cerca de 50%. Observa, ainda, a ocorrência de distúrbios cardiopulmonares marcados por taquicardia, hiperfonese, presença de sopros cardíacos na 1ª e 2ª bulha, episódios de arritmia, bradicardia associados a dispnéias, respiração rude e estertores, devido ao não fechamento do Forâmen de Botal e do ducto arterioso ocasionando mistura de sangue arterial e venoso, comprometendo a capacidade de oxigenação do sangue dos bezerros clonados (BIRGEL JUNIOR et al., 2011a). As principais “causas mortis” observadas após o nascimento dos bezerros clonados foram decorrentes de fatores relacionados às alterações cardíacas, respiratórias e renais (SANTOS, 2008).

Birgel Junior et al. (2011a) em estudos com bezerros clonados observaram que nas primeiras 24 horas de vida 23% dos bezerros apresentaram hipoglicemia e/ou distúrbios de termorregulação. Esses distúrbios podem estar relacionados à síndrome que mimetiza a

diabete gestacional humana ou a distúrbios decorrentes da hipóxia que aumenta o consumo de reservas de glicogênio hepático. Observou em neonatos humanos, que sofrem hipóxia prolongada que ocorrem mudanças nos níveis circulantes de glicose e cortisol sérico, reduz o metabolismo da termorregulação ocasionando danos ao sistema nervoso central e simpático dos recém-nascidos, além de aumento dos teores de lactato (BELLOWS; LAMMOGLIA, 2000).

Segundo Panarace et al. (2007) observaram em bezerros clonados que, 42% em média dos animais morreram entre o nascimento e 6 meses de vida; as anormalidades mais comuns foram: cordão umbilical (37%), problemas respiratórios (19%), bezerros em decúbito prostrado (20%) e tendões flexores (21%).

Chavatte-Palmer et al. (2002), avaliaram as características hematológicas de bezerros produzidos por TNCS, e não observaram diferenças entre o grupo controle, composto por animais de FIV. Verificaram ainda que o volume celular dos eritrócitos dos animais eram maiores ao nascimento ($P<0,01$) do que no grupo controle. O Volume Corpuscular Médio (VCM) elevado indicaria que não foi completa a maturação hematológica nestes animais.

Lanza et al. (2001), ao estudaram 24 bovinos clonados verificaram o exames hematológico e bioquímico normais, entretanto o estudo não continha grupos comparativos. Batchelder et al. (2007), ao compararem o quadro hematológico e bioquímico de bezerros clonados da raça Holandesa e Hereford e não clonados (controle), observaram que o número de hemácias foram menores no grupo de bezerros clonados, do nascimento até a primeira hora de vida já para a maioria dos parâmetros bioquímicos estudados, não houve diferença entre os grupos.

Komninou (2008) observou nos 4 grupos a ocorrência de anemia de grau moderado a grave, do tipo normocítico e normocrômico, 100 % (5/5) dos 5 bezerros clonados pelo Laboratório A, enquanto nos bezerros clonados pelo Laboratório B foi igual a 14,2 % (1/7), nos bezerros obtidos por fertilização *in vitro* foi igual a 50,0 % (2/4) e em bezerros obtidos por monta natural foi igual a 50,0 % (2/4).

Birgel Junior et al. (2011b), observaram anemia ferropriva em bezerros clonados com uma significativa diminuição dos teores séricos de ferro, relacionada a diminuição do índice de saturação da transferrina (IST). Wells et al. (2004), relataram alterações bioquímicas em bezerros clonados com até 2 anos de idade, observaram diferenças significativas em parâmetros hematológicos, indicadores de lesão muscular, função hepática, proteínas séricas e função renal.

2.4 IMPORTÂNCIA DO PERFIL BIOQUÍMICO

O perfil metabólico é usado desde 1970, com o objetivo de auxiliar o estudo das doenças de origens metabólicas, este exame permite o diagnóstico precoce de alterações metabólicas e também a funcionalidade dos principais órgãos. O plasma sanguíneo revela a situação metabólica dos tecidos, funcionamento dos órgãos, adaptação do animal diante de desequilíbrio metabólico específica ou de origem nutricional. É um exame complementar que tem uma grande importância para auxiliar o diagnóstico clínico, identificar e tratar desequilíbrios nutricionais e metabólicos (GONZÁLEZ; SCHEFFER 2002a).

A correta interpretação dos achados laboratoriais depende do conhecimento de cada teste e dos sinais clínicos apresentados pelos animais juntamente com seu processo fisiológico (THRALL et al., 2007). Para a análise do perfil é importante o conhecimento dos valores de referência, idade do animal, raça, espécie, condições climáticas de manejo e alimentação que mudam conforme a região (MUNDIM, 2008).

A determinação e interpretação dos compostos químicos no sangue são algumas das principais aplicações práticas da bioquímica clínica. Os perfis bioquímicos podem ser úteis na veterinária, para avaliação clínica do animal, mas também para avaliar as condições nutricionais e metabólicas. (GONZÁLEZ; SCHEFFER, 2002a).

Existe um grande número de metabólitos a serem analisados no perfil sanguíneo, pois fornecem informações nos processos adaptativos do organismo, no metabolismo energético, protéico e mineral, além de oferecer informações para interpretação do funcionamento hepático, renal, pancreático, ósseo e muscular (GONZÁLEZ; SCHEFFER, 2002b).

No metabolismo energético, são considerados os níveis sanguíneos de glicose, colesterol e ácidos graxos livres. Em ruminantes, também são estudados os níveis de β -hidroxibutirato (BHB). O metabolismo protéico determina os níveis de proteínas totais, albumina, globulinas e em ruminantes, ureia. Para o metabolismo mineral, são pesquisados, entre outros, os níveis de cálcio, fósforo, magnésio, potássio, ferro, cobre, zinco e cobalto, bem como indicadores para selênio (glutation peroxidase) e para iodo (tiroxina). O perfil metabólico pode incluir a determinação do quadro hemático, para avaliar anemias, estados de desidratação e quadros infecciosos, bem como enzimas e outros metabólitos que permitam avaliar o funcionamento de diferentes sistemas do organismo (GONZALEZ; SILVA, 2006).

Ao analisarmos os componentes do metabolismo energético temos a relação entre as variáveis, creatina fosfoquinase (CK), lactato, glicose, beta-hidroxibutirato e temperatura

retal. Quando há demanda por energia e o ATP celular não é suficiente, o organismo passa a utilizar fosfocreatina para fornecer energia, pois ela quando clivada pela enzima creatina quinase (CK) libera um íon fosfato e energia, que são utilizados para converter o ADP em ATP (LEHNINGER, 1993). Após a utilização dos estoques de fosfocreatina, a fonte mais importante a ser utilizada para fornecer energia é o glicogênio, armazenado nas células musculares (GUYTON, 1997; MURRAY et al., 2003).

A degradação do glicogênio a ácido pirúvico ocorre quando há suprimento adequado de oxigênio, porém quando este não está presente o metabólito gerado é o lactato. Esta adaptação é vantajosa, pois mantém a contração muscular mesmo na ausência do oxigênio (GUYTON, 1997; MURRAY et al., 2003).

A última fonte de energia a ser mobilizada é derivada do metabolismo oxidativo, onde ocorre a combinação de oxigênio com diversos nutrientes celulares para formar ATP. Esses nutrientes seriam: gorduras, proteínas e carboidratos. Sendo o último grupo o mais mobilizado, onde está inclusa a glicose (GUYTON, 1997; MURRAY et al., 2003). Os produtos finais da glicólise, em condições de aerobiose, são: um átomo de ácido pirúvico e dois de hidrogênio (GUYTON, 1997; LEHNINGER, 1993; MURRAY et al., 2003).

O acúmulo destes metabólitos no meio reagente levaria a diminuição ou parada da reação química. Com isso o processo glicolítico seria impedido e consequentemente haverá a formação de ATP. Porém, quando as quantidades desses produtos aumentam, eles reagem entre si e forma o ácido láctico, este se difunde rapidamente das células para o líquido extracelular. Desta forma, o ácido láctico permite que a glicólise continue por mais tempo. Quando o oxigênio torna-se novamente disponível o ácido láctico é reconvertido em ácido pirúvico (GUYTON, 1997; MURRAY et al., 2003).

No fígado, a glicose sanguínea é repostada a partir do lactato sanguíneo pela neoglicogênese e transferida aos músculos para reabastecer o seu glicogênio (LEHNINGER, 1993).

2.4.1 Avaliações laboratoriais dos lipídeos

Quando o alimento entra no aparelho digestivo dos ruminantes é logo atacado por enzimas celulolíticas, amilolíticas, glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas produzidas por

bactérias, protozoários e fungos, os quais são responsáveis pelos processos da digestão fermentativa ruminal. Basicamente todos os nutrientes têm sua biodisponibilidade alterada para serem utilizados como energia (CUNNINGHAM, 2008).

Nos ruminantes, a energia utilizada no seu metabolismo é obtida de ácidos graxos voláteis (acetato, propionato e butirato) provenientes da fermentação ruminal, a síntese de glicose a partir dos ácidos graxos voláteis é dependente do fígado, uma vez que este órgão é o regulador da concentração de glicose no sangue e da oferta de glicose aos tecidos, sendo essencialmente o único local para a gliconeogênese (formação de glicose a partir de compostos carbônicos), ainda que exista uma pequena contribuição do córtex renal (HERDT, 2000).

O butirato é convertido no epitélio ruminal em betahidroxibutirato (β -HBO), e quando entra na corrente sanguínea, pode ser utilizado como energia ou fonte de ácidos graxos de cadeia longa (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008a). Normalmente, o β -HBO plasmático é resultado da fermentação ruminal uma vez que os ruminantes são diferentes de outros animais monogástricos na medida em que grandes quantidades de corpos cetônicos alimentares são liberadas na veia porta (MARUTA, 2005).

O acetato (forma dissociada), ou ácido acético (forma em que é absorvido pelo epitélio ruminal), atinge a circulação sanguínea e é capturado pelo tecido adiposo principalmente presente na gordura subcutânea e na glândula mamária. Apesar do fígado também ter essa função em ruminantes, é bem mais expressivo em animais não ruminantes (CUNNINGHAM, 2008).

O propionato, também pode ser utilizado para a formação de AGCL nas mitocôndrias do fígado e para formação de glicerol no tecido adiposo, é muito utilizado para a formação de glicose. Quando em excesso, a glicose é estocada no organismo sob a forma de glicogênio (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008b).

Os lipídeos participam de várias funções orgânicas importantes. Comparados com carboidratos e proteínas, eles propiciam uma forma altamente calórica de estocagem de energia, necessária para a sobrevivência do animal durante períodos prolongados de jejum e para a efetiva função em atividades aeróbicas (THRALL et al., 2007). Participa também como isolante térmico, controle da permeabilidade da membrana celular. Entre os lipídios mais importantes no organismo animal podemos citar os ácidos graxos não esterificados, os triglicérides, os fosfolipídios e colesterol (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 1997).

Os lipídeos não exercem força osmótica em razão da insolubilidade em água, podendo ser estocados em grandes quantidades no tecido adiposo. Ainda que a maioria das células

consiga sintetizar triglicérides, o fígado, tecido adiposo, glândula mamária e intestino delgado são os mais adaptados para esta síntese. O colesterol, sintetizado e catabolizado no fígado precursor de hormônios esteróides, vitamina D, ácidos biliares, e é constituinte de membranas celulares e micelas biliares (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008a).

Anormalidades no metabolismo de lipídeos podem ter sérias consequências, até com risco de morte. Tais distúrbios podem decorrer de vários fatores, desde ingestão calórica excessiva até disfunções metabólicas que prejudicam o transporte e a movimentação de lipídeos. Os lipídeos normalmente presentes no sangue são ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), triglicerídeos e colesterol. Eles são transportados ligados à proteína; no caso de triglicerídeos e colesterol, o complexo lipídeo-proteína resultante é denominado lipoproteína (THRALL et al., 2007).

Três moléculas de AGCL se combinam com uma molécula de glicerol para formar uma molécula de triglicerídeo. Os ácidos graxos de cadeia longa podem ser absorvidos no trato digestório, onde são incorporados aos triglicerídeos nas células do epitélio intestinal; eles não entram na corrente sanguínea como molécula de AGCL isoladas. Além disso, são sintetizados em tecidos, como fígado, tecido adiposo e glândula mamária, a partir de glicose ou de acetato. Enquanto que o acetato é o principal precursor em ruminantes (THRALL et al., 2007).

Os triglicérides são menos solúveis que os ácidos graxos não esterificados (NEFA) e também devem se ligar a proteína, formando lipoproteínas para serem transportados através do plasma (BRUSS, 1997). As outras lipoproteínas presentes no plasma dos ruminantes podem ser classificadas em: lipoproteínas de alta densidade (HDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e VLDL, variando de maior densidade, quando têm proporcionalmente grande quantidade de proteínas, até a menor densidade, quando carregam basicamente lipídios, como é o caso dos quilomícrons e do VLDL (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008a).

2.4.2 Avaliações laboratoriais das proteínas

A avaliação laboratorial dos teores de proteínas do plasma e do soro sanguíneo é parte integrante dos exames hematológicos e bioquímicos em animais. Alterações na concentração

plasmática ou sérica de proteínas são as principais anormalidades laboratoriais em algumas doenças; geralmente notam-se alterações nos teores de proteínas em várias enfermidades (THRALL et al., 2007).

As proteínas são indispensáveis à vida, representando a base da estrutura de células, tecidos e órgãos. Funcionam como catalisadores enzimáticos nas reações bioquímicas, como hormônios na regulação endócrina, como nutrientes, como carreadora de muitos constituintes do plasma e mesmo na defesa orgânica, como anticorpos (LEAL et al., 2003).

No estudo do balanço nutricional protéico dos animais, os perfis metabólicos podem auxiliar no diagnóstico clínico com um aumento significativo na concentração sanguínea de alguns metabolitos. Geralmente, os metabolitos mais utilizados são: ureia, albumina, hemoglobina e para alguns casos as globulinas, cujo valor é obtido por diferença entre as concentrações de proteína totais e albumina. A albumina é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo, correspondendo aproximadamente a 50% das proteínas circulantes. (GONZÁLEZ et al., 2000).

As proteínas de fase aguda (PFAs) são geradas devido à resposta de fase aguda (onde nem sempre é possível observar sinais clínicos) como mediadores de inflamação, pelos hepatócitos, mas também devido à estimulação extra-hepática ocorre produção nas células epiteliais, endoteliais e tecido conectivo, e estas PFAs podem ser classificadas em relação à sua concentração plasmática, modo de ação e de acordo com o mecanismo de síntese (CERÓN; ECKERSALL; MARTINEZ-SUBIELA 2005; JAIN; GAUTAM; NASEEM 2011).

As PFAs positivas apresentam aumento na concentração sérica na inflamação, promovem a destruição ou inibição do crescimento de microorganismos, atuam nos estados de inflamação sistêmica associado à anorexia e alterações metabólicas e feedback negativo da resposta inflamatória, como: proteína C reativa, dímero-D, proteína ligadora de manose, alfa-1 antitripsina, alfa-1 antitripsina, alfa-2 macroglobulina, fibrinogênio, protrombina, fator VIII, fator de Von Willebrand, plasminogênio, fatores do complemento, ferritina, amiloide A sérica, ceruloplasmina, haptoglobina e alfa-1 glicoproteína ácida (CERÓN; ECKERSALL; MARTINEZ-SUBIELA 2005; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008a; JAIN; GAUTAM; NASEEM 2011).

As PFAs negativas são as proteínas que tem sua concentração sérica diminuída, como a albumina, transferrina, transtiretina (pré- albumina), proteína de ligação do retino e transcortina (JAIN; GAUTAM; NASEEM 2011). Pode ocorrer diminuição da concentração sérica de albumina em processos inflamatórios, devido à inibição da sua síntese pelas

citocinas pró-inflamatórias (PEREIRA; BURINI, 1992) e ao aumento da permeabilidade vascular, portanto saída para o espaço extravascular (CORRÊA; BURINI, 2000).

Albuminas e globulinas são os dois principais tipos de proteínas do plasma. A albumina é sintetizada pelo fígado e representa a maior fração das proteínas totais. Tem como funções a manutenção da pressão oncótica do sangue, fonte primária de aminoácidos de reservas para as proteínas tissulares, desintoxicação e inativação de compostos tóxicos, transporte de ácidos graxos e de alguns minerais (MORAIS et al., 2000).

O único órgão que sintetiza albumina é o fígado, portanto a hipoalbuminemia pode indicar falha em sua síntese, relacionado principalmente a lesões hepáticas, como na absorção de endotoxinas de infecções uterinas (COLES, 1984; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 1997b).

A albumina tem seus teores séricos diminuídos em distúrbios metabólicos e hepáticos como ocorre no periparto de vacas Holandesas (CURTIS et al., 1983; CURTIS; ERB; SNIFFEN 1983; NAOUM, 1999). No periparto a presença desses distúrbios metabólicos e hepáticos sugere a diminuição do aporte de energia e nutrientes para a síntese hepática de proteínas, ou até a promoção de lesões hepáticas que diminuam ou até inibam a síntese de proteínas pelo fígado. Contudo a diminuição da albumina, por ser uma proteína de fase aguda negativa, também pode ser justificada pela resposta orgânica a processos que estimulam a resposta inflamatória de fase aguda, por exemplo, a retenção de secundinas, assim diminuindo a presença da albumina na circulação sanguínea (ECKERSALL; CONNER, 1988; JAIN, 1989; KANEKO et al., 1997; LEBLANC; DUFFIELD; LESLIE, 2002).

Especula-se que a diminuição dos componentes do eritrograma no período neonatal poderia estar relacionada ao efeito hemodiluidor da absorção das proteínas do colostro quando chegam a circulação sanguínea (Adams; Garry, 1993; Benesi, 1992; Jain, 1989) e provavelmente a metabolização, não compensada, dos eritrócitos fetais por produção e renovação, este fenômeno é conhecido como "anemia fisiológica" (WISE, 1947; TENNANT 1969). Ou a ocorrência de uma resposta diminuída da medula do neonato, principalmente relacionado ao aumento dos níveis sanguíneos de oxigênio em relação aos do período fetal (BIRGEL, 1972; ADAMS et al., 1992, JAIN, 1993).

Kaneko; Harve e Bruss (2008a) relataram valores de referência para espécie bovina, sendo: Proteína total, 6,74 a 7,46 g/dL; Albumina, 3,03 a 3,55 g/dL; Globulina, 3,00 a 3,48 g/dL; Relação A:G, 0,84 a 0,94; Creatinina 1,00 a 2,00 mg/dL; Ureia, 20,00 a 30,00 mg/dL; Triglicérides, 0,00 a 14,00 mg/dL; Colesterol 80,00 a 120,00 mg/dL; Cálcio, 9,7 a 12,4 mg/dL; Fósforo, 5,6 a 6,5 mg/dL; Magnésio, 1,8 a 2,3 mg/dL; ALP, 0,00 a 488,0 U/L; GGT, 6,1 a 13,4 U/L; AST, 78,0 a 132,0 U/L; ALT 11,0 a 40,0 U/L.

2.4.3 Avaliações laboratoriais dos metabólitos

O colesterol nos animais pode ser de origem exógena, proveniente dos alimentos, que poderá ser sintetizado ou absorvido no intestino como endógena, sendo sintetizado, a partir do acetil-CoA, no fígado, nas gônadas, no intestino, na glândula adrenal e na pele. Seu principal local de síntese é o fígado, como não é hidrossolúvel, ele é transportado no sangue ligado à proteína (THRALL et al., 2007). A biossíntese de colesterol no organismo é inibida com a ingestão de colesterol exógeno. O colesterol circula no plasma ligado as lipoproteínas (HDL, LDL, VLDL), sendo que cerca de 2/3 dele está esterificado com ácidos graxos. Os níveis de colesterol plasmático são indicadores adequados do total de lipídios no plasma (GONZÁLEZ, SCHEFFER, 2002b).

Na formação do colesterol, por exemplo, o AGCL, o principal substrato é a acetil-CoA. Nos momentos de ingestão de alimento, aumento de insulina, aumento da leptina, baixo glucagon, e baixo adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) intracelular, ou seja, momentos em que o organismo está em desfosforilação (menor desdobramento hidrolítico do ATP por ação da adenilciclase), estimula-se a produção de colesterol, ou este evento pode ocorrer inclusive quando há presença de maiores concentrações de hormônio da tireóide. Já em momentos de inanição fisiológica (periparto) ou patológica (doença), diabetes ou jejum, observa-se diminuição da insulina e a leptina, já glucagon e AMPc estarão aumentados, ou seja, o organismo está em fosforilação, compromete-se a formação de colesterol, isto também pode acontecer quando há aumentos nas quantidades de glicocorticoide (endógenos ou exógenos) (CHILLIARD et al., 2001; CHILLIARD et al., 2005; KANEKO, 2008).

A eliminação do colesterol é feita na forma de ácidos biliares, portanto a hipercolesterolemia pode estar relacionado com obstrução biliar extra-hepático, fibrose hepática e hiperplasia de ductos biliares (KANEKO; HARHEY; BRUSS, 1997).

Além da secreção de hormônios, outra função dos rins é a excreção de produtos residuais do metabolismo e a regulação do volume e da composição do líquido extracelular (REECE, 1996).

A creatinina é formada a partir da condensação e desidratação espontânea da creatina muscular em uma estrutura anelar. A produção diária de creatinina é relativamente constante, não sendo influenciada por fatores extrarenais, como acontece com a ureia (THRALL et al., 2007).

A creatinina plasmática é derivada, praticamente em sua totalidade, do catabolismo da creatina presente no tecido muscular. É um metabólito utilizado para armazenar energia no músculo, na forma de fosfocreatina e sua degradação para creatinina ocorre de maneira constante, ao redor de 2% do total de creatina diariamente. A excreção desta só se realiza por via renal, uma vez que ela não é reabsorvida nem reaproveitada pelo organismo. Por isso, os níveis de creatinina plasmática refletem a taxa de filtração renal, de forma que níveis altos indicam uma deficiência na funcionalidade renal (GONZÁLEZ, SCHEFFER, 2002a).

Usualmente, os valores de ureia e creatinina são indicados para a avaliação da função renal dos animais domésticos, fornecendo subsídios, quer sejam para o diagnóstico e/ou prognóstico de inúmeras nefropatias (KANEKO, 1997).

A ureia é sintetizada no fígado a partir da amônia proveniente do catabolismo dos aminoácidos e da reciclagem de amônia do rúmen. Os níveis de ureia são analisados em relação ao nível de proteína e na dieta e ao funcionamento renal. A ureia é excretada principalmente pela urina e, em menor grau, pelo intestino. Na maioria dos animais o nível de ureia é indicador de funcionamento renal (GONZÁLEZ, SCHEFFER, 2002b).

Nitrogênio da ureia sanguínea (NUS) é um dos parâmetros sanguíneos tradicionalmente utilizados na avaliação da filtração glomerular. A maior parte da ureia produzida pelo organismo é excretada na urina por meio de filtração glomerular (TFG) ocasiona aumento no valor de NUS, no entanto, o NUS é influenciado pela taxa de produção hepática de ureia e pela taxa de excreção renal e extra-renal (THRALL et al., 2007).

A excreção urinária de ureia é influenciada não apenas pela TFG, pois a ureia é reabsorvida nos túbulos renais para contribuir na manutenção do gradiente de concentração medular nos rins (THRALL et al., 2007).

2.4.4 Avaliações laboratoriais das enzimas séricas

A atividade da célula é o resultado de inúmeras reações químicas que ocorrem e que se tornaram possíveis graças a proteínas especiais, as enzimas, que, como catalisadoras que são, aceleram reações químicas por diminuir a energia de ativação necessária para a síntese ou cisão de determinada ligação química (BACILA, 2003).

Em processos corporais as funções do fígado incluem participação no metabolismo de carboidratos, lipídeos, proteínas, na desintoxicação, excreção de catabólitos, substância tóxicas, na digestão e na síntese de vários fatores de coagulação. Devido à importante função

do fígado suas alterações patológicas podem ocasionar várias mudanças nos resultados dos testes bioquímicos sanguíneos. A análise das enzimas implica na determinação de suas atividades, pois elas catalisam reações bioquímicas convertendo um substrato em um produto (THRALL et al., 2007).

Muitas enzimas são específicas de determinado órgão, deste modo o surgimento desta enzima no plasma indica a definição exata do local lesionado. Em outros casos, as enzimas, estão presentes em vários tecidos diferentes, dificultando a interpretação clínica do exame. Quando permanece esta dificuldade para definir o órgão lesionado, pode ser útil fazer uso das isoenzimas (GONZÁLEZ; SCHEFFER, 2002a). As enzimas Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), gama glutamiltransferase (GGT) e creatina fosfoquinase (CK) são algumas das enzimas utilizadas na clínica veterinária.

Segundo Thrall et al. (2007) a Alanina aminotransferase (ALT) é uma enzima de extravasamento que está livre no citoplasma. A atividade de ALT no músculo é menor que no fígado, porém como a massa muscular total é maior que a do fígado, o músculo constitui uma fonte significativa de extravasamento. Quantidade moderada de ALT é encontrada em músculo de ruminantes, nos quais nota-se aumento moderado na atividade sérica dessa enzima.

A enzima Aspartato aminotransferase (AST) localiza-se principalmente no citoplasma ou mitocôndria dos hepatócitos e nas fibras musculares esqueléticas e cardíacas. O aumento da atividade sérica de AST pode ser causado por necrose e lesão subletal de hepatócitos e dessas células. Essa é a enzima de escolha para detecção na rotina laboratorial de lesão de hepatócitos em ruminantes, nos quais o aumento de sua atividade sérica pode resultar das mesmas doenças hepáticas mencionadas para ALT (THRALL et al., 2007). Segundo Maderova et al. (1963) o aumento da enzima poderia estar relacionado a composição do colostro e sua absorção, de injúria muscular causada durante o parto (BOYD, 1989), ou por maior atividade física dos animais ao levantarem-se nas primeiras horas de vida para a ingestão do colostro (FEITOSA et al. 2009).

Considerada uma enzima de indução, a fosfatase alcalina (FA) tem ampla distribuição no organismo, sintetizada no fígado, osteoblastos, placenta, células renais e mucosas intestinal. Entretanto os hepatócitos respondem pela maior parte da atividade sérica normal dessa enzima. O aumento da produção de FA e de sua concentração sérica pode ser notado em casos de maior atividade osteoblástica, colestase, indução por drogas e doenças crônica, inclusive neoplasias. Nos distúrbios hepáticos observa o aumento de sua atividade sérica em

decorrência de colestase tanto por obstrução dos canalículos intra como extrabiliares (THRALL et al., 2007).

A enzima gama glutamiltransferase (GGT) é considerada uma enzima de indução, ela é sintetizada por quase todos os tecidos corporais, sendo sua maior concentração no pâncreas e rins. Está presente em baixa concentração nos hepatócitos, no epitélio de ductos biliares, na mucosa intestinal e em alta quantidade nas glândulas mamaria de vacas, ovelhas e cadelas por isso estão presentes em quantidade relativamente elevada no colostro de vacas e ovelhas e juntamente com os anticorpos colostrais é transferida ao bezerro recém-nascido. Ruminantes neonatos apresentam elevação significativa das atividades séricas das enzimas GGT, ALP, AST, após ingerirem o colostro (THRALL et al., 2007). Thompson e Pauli (1981) afirmaram que a atividade sérica da (GGT), em bezerros que mamaram o colostro, atingiram, após cinco a seis semanas de vida, os valores de concentração encontrados em bovinos adultos.

A enzima creatina fosfoquinase também é conhecida por CK possui quatro isoenzimas, presente nos músculos esquelético, cardíaco e no cérebro. A isoenzima encontrada no coração, é uma enzima mitocondrial que responde por até 15% da atividade da CK cardíaca (KRAMER; HOFFMAN, 1997). A CK é mais sensível para indicar lesão muscular. Pode acontecer um aumento da enzima decorrente a injeção intramuscular, decúbito prolongado, necrose, tremores, traumas, excesso de exercício, convulsões, cirurgias, choque, esforço do parto, miopatias nutricionais que envolvam deficiência de vitamina E e selênio. Em problemas musculares, é recomendado dosar também a enzima AST. A CK aparece elevada antes da AST e também desaparece primeiro. Assim, o padrão enzimático dessas enzimas pode indicar o estágio do problema. Ao observar um aumento da CK com baixa AST indica lesão recente, níveis altos persistentemente das duas indicam lesão continuada, enquanto que níveis baixos de CK e altos de AST indicam processo de recuperação.

2.5 VALORES DE REFERÊNCIA PARA PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

2.5.1 Valores de referência dos lipídeos dos bovinos

Segundo Kaneko (1997) os teores séricos de triglicérides considerados adequados para bovinos saudáveis oscilam entre zero e 14 mg/dL, enquanto para os teores plasmáticos de glicose variam entre 45 e 75 mg/dL.

Pogliani (2007), observou teores séricos de colesterol para bezerros lactentes com até 3 meses de idade de 86,5 a 120,8 mg/dL, e valores entre 46,3 e 79,7 mg/dL para bezerros de 3 a 12 meses de idade. Ainda, Pogliani e Birgel Junior (2007) observaram valores superiores em bezerros de até 3 meses de idade ($103,64 \pm 36,69$ mg/dL) comparados a bezerros de 3 à 6 meses ($63,03 \pm 35,69$ mg/dL).

Kurz e Willet (1991) estudaram os teores séricos de colesterol e triglicérides de bezerros entre nascimento até 6 dias de vida, onde observou-se aumento de glicose ao nascimento, devido a ingestão do colostro, permanecendo estável após 12 horas de ingestão. Ao nascimento valores de colesterol e triglicérides foram: ($3,0 \pm 1,0$ e $29,0 \pm 5,0$ mg/dL), após 12 horas de vida ($8,0 \pm 3,0$ e $34,0 \pm 4,0$ mg/dL) ao final do experimento com 6 dias ($56,0 \pm 13,0$ e $90,0 \pm 6,0$ mg/dL).

Pogliani (2007) observou que os teores séricos de triglicérides, são maiores em animais mais jovens, 16,30 a 34,80 mg/dL e de 14,90 a 24,00 mg/dL para animais com mais de 48 meses de idade.

Silva et al. (2012), com o intuito de avaliar as concentrações séricas de lipídios, observou em 34 bezerros na semana do nascimento, colesterol total cujo valor foi de $44,11 \pm 24,81$ mg/dL.

Segundo Paiva et al. (2006), observaram o nascimento de 18 bezerros da raça Holandesa, constatando valores de triglicérides de $282,82 \pm 21,55$ mg/dL. Após 24 horas de vida, $205,47 \pm 18,21$ mg/dL, 48 horas de vida $211,03 \pm 16,43$ mg/dL, 72 horas de vida $201,90 \pm 9,95$ mg/dL e 96 horas de vida $192,38 \pm 16,40$ mg/dL.

Moraes (2011), ao observar 30 bezerros mestiços durante 360 dias de vida, constatou para um a três dias de vida os seguintes valores para triglicérides, $30,3 \pm 20,1$ mg/dL, e para trinta dias de vida $26,9 \pm 16,9$ mg/dL. Para colesterol, bezerros com um a três dias de vida, $37,3 \pm 16,8$ mg/dL e aos trinta dias $68,5 \pm 6,6$ mg/dL.

Segundo Shannon e Lascelles (1966), ao realizarem experimentos em bezerros com até seis meses de idade, observaram no nascimento valores para triglicérides 6,8 mg/dL, aos 2 dias 33,5 mg/dL, aos 6 dias 25 mg/dL, aos 10 dias 29,3 mg/dL e aos 30 dias 13,4 mg/dL.

Para os valores de colesterol, ao nascimento 37,2, 67,5 mg/dL aos 2 dias, aos 6 dias 103,3 mg/dL, aos 10 dias 131,8 mg/dL e aos 30 dias 161,3 mg/dL.

Segundo Batchelder et al. (2007), ao realizarem experimento com 8 bezerros clonados e 6 bezerros controle, observaram ao nascimento que os valores de glicose dos animais controle foi de 73,6 mg/dL, valores que foram duas vezes maior encontrado em bezerros clonados 39,4 mg/dL durante a primeiras doze horas. Às 36 horas de vida concentrações de glicose atingiu um pico de 126,4 mg/dL para bezerros controle e para animais clonados o pico foi de 48 horas atingindo 116,4 mg/dL.

2.5.2 Valores de referência das proteínas dos bovinos

Em estudo realizado por Perino et al. (1995), determinaram as concentrações séricas da proteína total em 143 bezerros, encontrando valores de $5,20 \pm 1,00$ g/dL e $5,8 \pm 1,20$ g/dL para os momentos de 10 e 24 horas de vida.

Segundo Feitosa (1998), observou em 40 bezerros da raça Holandesa, um aumento no teor de proteína total no nascimento até 48 horas de vida, em função da ingestão do colostro seguindo de um decréscimo até completar 30 dias de vida.

Em pesquisa comparando bezerros neonatos taurinos, zebuínos e bubalinos, Fagliari et al. (1998), observaram que em 40 bezerros (machos e fêmeas) da raça Holandesa as seguintes taxas de níveis séricos de proteína total: no dia do nascimento $6,52 \pm 0,94$ g/dL; aos 15 dias $6,65 \pm 0,87$ g/dL e aos 30 dias de idade $6,66 \pm 0,80$ g/dL.

Segundo Costa et al. (2007), foram observados 10 bezerras da raça Holandesa durante 150 dias de vida, aonde constataram que a proteína sérica total (g/dL) apresentou variações significativas ($P < 0,05$) com o desenvolvimento etário, sendo que os menores valores foram obtidos ao nascimento ($6,19 \pm 1,10$) e aos 15 dias de idade ($6,27 \pm 1,21$). A seguir, houve uma estabilização aos 60 dias ($7,08 \pm 0,68$) e aos 90 dias ($6,78 \pm 0,60$), elevando aos 120 dias ($7,34 \pm 0,53$) e aos 150 dias ($7,37 \pm 0,53$).

Paiva et al. (2006), observaram que os valores de proteína total de bezerro da raça Holandesa foram ao nascimento $3,99 \pm 0,54$ g/dL, 24 horas de vida $4,33 \pm 0,75$ g/dL, 48 horas de vida $4,39 \pm 0,47$ g/dL, 72 horas de vida $4,93 \pm 0,87$ g/dL e 96 horas de vida $5,53 \pm 0,77$ g/dL.

Segundo Leal et al. (2003), ao observarem 300 bezerras da raça Holandesa constataram que os valores para proteína total ao nascimento até 8 horas de vida foi de $5,12 \pm 1,9$ g/dL, com 24 horas os valores foram $6,77 \pm 1,93$ g/dL, aos 2 dias $7,11 \pm 1,59$ g/dL, com 3 dias $6,79 \pm 1,13$ g/dL, com 4 dias $7,10 \pm 1,35$ g/dL, com 5 dias $6,43 \pm 0,90$ g/dL, com 7 dias

6,95 $\pm$ 1,52 g/dL, com 10 dias 7,01 $\pm$ 1,31 g/dL, com 15 dias 6,73 $\pm$ 1,06 g/dL, com 20 dias 6,65 $\pm$ 0,74 g/dL e com 30 dias de vida 6,15 $\pm$ 0,69 g/dL.

Costa et al. (2007) observaram menores valores para albumina sérica (g/dL) logo ao nascimento (2,26 $\pm$ 0,33), uma elevação aos 15 dias (2,80 $\pm$ 0,61) e 30 dias de idade (3,24 $\pm$ 0,51). Em seguida, os valores demonstraram uma estabilização nos demais momentos, obtendo-se um valor de 3,20 $\pm$ 0,33 aos 150 dias de idade.

Pires Junior et al. (2013) constataram que albumina foi a fração predominante no soro no momento, que precedeu a ingestão do colostro (2,39 g/dL) em bezerros aumentando gradativamente na primeira semana de vida ainda verificaram que a concentração média mais elevada ($P < 0,05$) aos 8 dias de vida (2,88 g/dL), não observaram influência da ingestão do colostro sobre os valores desta variável. Segundo os autores este aumento ocorreu provavelmente em consequência da síntese hepática e da ingestão do leite.

Segundo Moraes (2011), ao observar 30 bezerros mestiços durante 360 dias de vida, relatou os seguintes valores, de um a três dias de vida, a proteína foi de 6,6 $\pm$ 1,9 g/dL, com 30 dias de vida foi de 6,5 $\pm$ 2,2 g/dL. Para albumina, foi de 2,1 $\pm$ 0,6 g/dL aos primeiros dias de vida e 3,4 $\pm$ 1,4 g/dL com 30 dias de vida.

Batchelder et al. (2007), em estudo com bezerros clonados observaram concentrações de albumina plasmática de 2,0 $\pm$ 2,5 g/dL.

Leal et al. (2003), ao observar 300 bezerras da raça Holandesa constatou que os valores para albumina, ao nascimento até 8 horas de vida foram de 2,3 $\pm$ 0,28 g/dL, com 24 horas os valores foram 2,32 $\pm$ 0,24 g/dL, aos 2 dias 2,43 $\pm$ 0,35 g/dL, com 3 dias 2,60 $\pm$ 0,51 g/dL, com 4 dias 2,63 $\pm$ 0,35 g/dL, com 5 dias 2,52 $\pm$ 0,31 g/dL, com 7 dias 2,58 $\pm$ 0,52 g/dL, com 10 dias 2,62 $\pm$ 0,34 g/dL, com 15 dias 2,66 $\pm$ 0,39 g/dL, 20 dias 2,77 $\pm$ 0,29 g/dL e com 30 dias de vida 2,78 $\pm$ 0,21 g/dL.

Com relação albumina/globulina Leal et al. (2003), observaram um valor médio máximo nos animais com até oito horas pós-nascimento de 0,97 $\pm$ 0,34 g/dL, sendo seguido por quedas significativas até o segundo dia de idade, 0,64 $\pm$ 0,28 g/dL. Posteriormente, os valores mantiveram-se relativamente estáveis até os 15 dias de idade, 0,68 $\pm$ 0,18 g/dL, quando então, demonstraram tendência de aumentos até o trigésimo dia de idade, 0,85 $\pm$ 0,18 g/dL, chegando próximo aos valores pós-nascimento.

Segundo Moraes (2011), observou o valor de globulina ao nascimento até 3 dias de vida de 4,4 $\pm$ 1,8 g/dL e aos 30 dias de vida foi de 3,2 $\pm$ 0,9 g/dL.

Hill et al. (2007) observaram bezerras, 30 horas após o nascimento constatando que os valores médios de globulina foram de 4,107 $\pm$ 0,161 g/dL.

Segundo Pires Junior et al. (2013) a concentração inicial da proteína total antes da ingestão do colostro foi de 4,19 g/dL. Observou-se elevação significativa ($P<0,05$) na concentração da proteína total a partir das 12h de vida, atingindo concentração máxima às 48h de vida do bezerro 5,45 g/dL.

2.5.3 Valores de referência dos metabólitos dos bovinos

Batchelder et al. (2007) em estudo com bezerros clonados e não clonados observaram uma queda gradual nos valores de creatinina em ambos os grupos após o nascimento, embora o grupo dos animais clonados tivesse os valores elevados no intervalo de 36 a 48 horas de vida comparando com o grupo controle.

Coelho (2002) observou teores de creatinina no soro sanguíneo de bezerros não clonados de $3,60 \pm 1,69$ mg/dL e $2,00 \pm 0,50$ mg/dL, respectivamente, ao nascimento e as 24 horas de vida, situados dentro da normalidade.

Ainda, Feitosa et al. (2009) em estudos com bezerros não clonados observaram que os teores de creatinina apresentaram-se mais elevados até as 24 horas de vida, discreta e progressiva diminuição dos seus valores médios até os 30 dias idade. Os menores e maiores valores individuais de creatinina foram, respectivamente, de 1,3 e 3,7 mg/dL, entre seis e 12 horas; de 1,0 e 2,6 mg/dL, às 24 horas; de 0,5 e 1,7 mg/dL, às 48 horas; de 0,8 e 1,7 mg/dL, às 96 horas; de 0,6 e 1,6 mg/dL, aos nove dias; de 0,5 e 1,8 mg/dL, entre o 10º e 15º dias, e de 0,3 e 1,7 mg/dL, entre o 16º e 30º dias.

A determinação dos teores de creatinina de bezerro foram de $3,60 \pm 1,69$ mg/dL e $2,00 \pm 0,50$ mg/dL ao nascimento e as 24 horas de vida (GASPARELLI et al., 2008).

Ainda, Feitosa et al (2009), observaram os maiores valores séricos de ureia às 24 horas de vida dos animais ($29,14 \pm 11,65$ mg/dL), o que vem ao encontro aos resultados descritos por (STEINHARDT et al., 1993). Não observaram diferença nos teores às seis horas até os 30 dias de idade, permanecendo os seus valores médios quase que inalterados com o passar do tempo. Os menores e maiores valores individuais de ureia foram, respectivamente, de 11 e 55 mg/dL, entre seis e 12 horas; de 12 e 51 mg/dL, às 24 horas; de 7 e 14 mg/dL, às 48 horas; de 6,6 a 56 mg/dL, às 96 horas; de 6,6 e 54 mg/dL, aos nove dias; de 10 e 120 mg/dL, entre o 10º e 15º dias, e de 6,8 e 60,7 mg/dL, entre o 16º e 30º dias.

Os teores médios para ureia relatado por Gasparelli et al. (2008), dos animais recém nascidos foram de $30,4 \pm 10,90$ mg/dL ao nascimento e de $33 \pm 1,01$ mg/dL as 24 horas de vida, valores que se encontram dentro da faixa de normalidade (RADOSTITIS et al., 2002).

Moraes (2011), ao observar 30 bezerros mestiços durante 360 dias de vida, observou os seguintes valores para ureia e creatinina, de um a três dias de vida e com 30 dias de vida respectivamente. $29,1 \pm 14,1$ mg/dL e $33,4 \pm 15,7$ mg/dL e $1,7 \pm 0,7$ mg/dL e $0,8 \pm 0,3$ mg/dL.

Benesi et al. (2002) verificaram que bezerras da raça holandesa apresentaram os seguintes valores para ureia ao nascimento até 8 horas de vida foi de $23,50 \pm 1,83$ mg/dL, 24 horas de vida $29,20 \pm 2,97$ mg/dL, 48 horas $29,40 \pm 3,43$ mg/dL, 3 dias de vida $20,60 \pm 2,21$ mg/dL, 4 dias $31,85 \pm 4,10$ mg/dL, 5 dias $25,60 \pm 3,73$ mg/dL, 7 dias de vida $21,75 \pm 1,88$ mg/dL, 11 dias $22,30 \pm 0,90$ mg/dL, 15 dias de vida $23,70 \pm 1,93$ mg/dL e 30 dias de vida $20,35 \pm 1,24$ mg/dL. Para os valores de creatinina ao nascimento até 8 horas de vida foi de $2,65 \pm 0,24$ mg/dL, 24 horas de vida $2,12 \pm 0,19$ mg/dL, 48 horas $1,66 \pm 0,06$ mg/dL, 3 dias de vida $1,44 \pm 0,06$ mg/dL, 4 dias de vida $1,40 \pm 0,09$ mg/dL, 5 dias de vida $1,32 \pm 0,05$ mg/dL, 7 dias de vida $1,51 \pm 0,05$ mg/dL, 11 dias de vida $1,46 \pm 0,05$, com 15 dias $1,32 \pm 0,04$ mg/dL, e com 30 dias $1,28 \pm 0,05$ mg/dL.

Segundo Gregory et al. (2004), observaram os valores de referência dos teores séricos da ureia de bezerras fêmeas sadias com menos de três meses de idade da raça Jersey, criadas no Estado de São Paulo, foi de $18,49 \pm 4,50$ mg/dL. Para a creatinina foi de $1,25 \pm 0,26$ mg/dL.

Batchelder et al. (2007), em estudo com bezerros clonados e não clonados, observaram que o valor de ureia até as 24 horas de vida, não diferiram entre os grupos estudados, Porém às 48 horas de vida houve diferença nos valores $13,4$ mg/dL e $7,4$ mg/dL respectivamente.

Jenkins et al. (1982), demonstraram que a idade teve influência sobre os valores séricos de ureia em bovinos, onde bezerros com 4-8 semanas de vida apresentavam valores séricos médios de ureia igual a $25,7$ mg/dL.

Paiva et al., (2006), observaram para glicose os seguintes valores; nascimento $67,57 \pm 5,39$ mg/dL as 12 horas $89,47 \pm 7,19$ mg/dL as 24 horas $105,4 \pm 6,14$ mg/dL as 48 horas $115,11 \pm 5,74$ mg/dL, as 72 horas $115,85 \pm 8,20$ mg/dL, as 96 horas $106,70 \pm 6,99$ mg/dL.

Kurz e Willet (1991), observaram os valores de glicose nos bezerros ao nascimento até 144 horas de vida, os teores plasmáticos de glicose foram influenciados pelo momento da mamada do colostro às 0 horas foi de $3,0 \pm 1,0$ mg/dL, com 1 hora $6,0 \pm 2,0$ mg/dL, as 3 horas de vida foram de $10,0 \pm 3,0$ mg/dL, as 6 horas de vida foram de $6,0 \pm 3,0$ mg/dL, as 12

horas $8,0 \pm 3,0$ mg/dL, 24 horas de vida $35,0 \pm 9,0$ mg/dL, as 72 horas $41,0 \pm 10,0$ mg/dL, as 120 horas $53,0 \pm 9,0$ mg/dL e 144 horas $56,0 \pm 13,0$ mg/dL.

2.5.4 Valores de referência das enzimas séricas dos bovinos

Segundo Feitosa et al. (2009) observaram em 880 bezerros Holandês e Mestiço que a fosfatase alcalina, demonstrou influência do fator etário, observaram maior atividade entre seis e 12 horas de vida nos animais ($667,24 \pm 550,43$ U/L), com acentuada redução entre 16 a 30 dias de idade. Contudo, foram menores aos observados em bezerros nelores (GASPARELLI, 2007).

Ainda, Feitosa et al. (2009) ao analisar os valores individuais de FA, observaram que 4,76% (8/84) e 14% (7/50) dos animais possuíam valores séricos de até 100 U/L, às 24 e 48 horas, respectivamente. Cerca de 45% (38/84) dos bezerros com 24 horas de vida, e 44% (22/50) dos animais com 48 horas de idade tinham entre 101 e 300 U/L. A atividade sérica média de fosfatase alcalina maior do que 300 U/L foi constatada em 42 animais, às 24 horas, e em 21 animais, com 48 horas de vida. A maior parte das amostras analisadas possuía valores menores do que 500 U/L. Os menores e maiores valores individuais da atividade sérica de FA foram, respectivamente, de 116 e 2524 U/L, entre seis e 12 horas; de 96 e 1913 U/L, às 24 horas; de 11 e 670 U/L, às 48 horas; de 33 e 567 U/L, às 96 horas; de 52 e 452 U/L, aos nove dias; de 37 e 332 U/L, entre o 10º e 15º dias, e de 19 e 281 U/L, entre o 16º e 30º dias.

Fagliari et al. (1996) analisaram 140 amostras de soro sanguíneo de bezerro da raça Holandesa, com o objetivo de verificar a FA no primeiro dia de vida (de $309,05 \pm 74,70$ para $388,30 \pm 94,56$ U/L) em seguida, houve uma redução até o sexto dia de vida para ($310,00 \pm 69,53$ U/L).

Os valores da atividade de FA sofrem variações significativas em decorrência da idade, mas não foi observado em relação ao tipo de nascimento (parto eutócico e distócico), onde puderam observar os valores de $615,70 \pm 335,30$ U/L e $2494,40 \pm 1750,10$ U/L no momento do nascimento até as 24 horas de vida (GASPARELLI et al., 2008).

Fagliari et al. (1998) relataram que houve um aumento na atividade da FA ao nascimento com uma taxa de $415,93 \pm 114,62$ U/L reduzindo a taxa aos 30 dias de vida, cujo valor foi inferior ($280,31 \pm 75,38$ U/L).

Para os valores de FA, Moraes (2011), observou os seguintes valores, 255 ± 270 U/L com idade de um a três dias de vida, já aos 30 dias o valor foi de $75,0 \pm 31,3$ U/L.

A maior atividade sérica da GGT foi verificada nas amostras de 37 bezerros holandeses e mestiços, com seis a 12 horas de vida, com valor médio de $875,63 \pm 618,66$ U/L. A seguir, a atividade sérica da GGT foi decrescendo drasticamente e, a partir dos 16 a 30 dias de vida, seu valor era cerca de 17 vezes menor do que aquele observado entre seis e 12 horas de vida. A rápida diminuição da atividade sérica da GGT ocorreu provavelmente, pela degradação biológica e/ou filtração renal acentuadas dessa enzima (FEITOSA et al., 2009).

Gasparelli et al. (2008), observaram em 251 bezerros a atividade da GGT nas amostras avaliadas, sendo de $35,10 \pm 14,60$ U/L ao nascimento, com uma elevação as 24 horas de vida para $3.125,00 \pm 2.300,60$ U/L, um aumento de 175 vezes comparando com (Kaneko et al., 1989).

Feitosa et al. (2009) observaram menores e maiores valores individuais da atividade sérica de GGT respectivamente, de 12 e 2888 U/L entre seis e 12 horas; de 14 e 2410 U/L, às 24 horas; de 11 e 1063 U/L, às 48 horas; de 8 e 1241 U/L, às 96 horas; de 8 e 1928 U/L, aos nove dias; de 6 e 1152 U/L, entre o 10º e 15º dias, e de 6 e 719 U/L, entre o 16º e 30º dias.

Segundo Pires Junior et al. (2013) verificaram elevação significativa ($P < 0,05$) na atividade enzimática da gama glutamiltransferase, observando-se inicialmente valores de 15,91 U/L e logo após 6h atividade de 292,70 U/L, com valores máximos de 976,50 U/L, às 24 horas, correspondendo elevação de mais de sessenta vezes ao valor encontrado ao nascimento. Após o primeiro dia de vida verificou-se decréscimo progressivo nos valores desta variável até o oitavo dia pós nascimento (225,85 U/L). A atividade enzimática da GGT, comumente empregada para o diagnóstico de doenças hepáticas, é recomendada como indicador de transferência imunoglobulinas, por estar presente em grande quantidade no colostro dos ruminantes, sendo absorvida através da barreira intestinal dos bezerros após o nascimento. Perino et al. (1993), que observaram o valor limite de 200 U/L como indicadores de diagnóstico de falha de transferência passiva de imunidade.

Moraes (2011) observou para os valores séricos de GGT em bezerros mestiços de um a três dias de vida, $862,9 \pm 911,9$ U/L e com 30 dias de vida, $22,1 \pm 9,0$ U/L.

Gasparelli et al. (2008) avaliaram a atividade sérica da AST, de bezerros recém-nascidos observaram 186 ± 87 U/L ao nascimento. Às 24 horas de vida, observaram que a enzima sofreu variações significativas em decorrência ao tipo de parto, uma vez que foram obtidos valores de $596,54 \pm 160,85$ U/L para bezerros nascidos de parto normal e de $828,44 \pm 266,03$ U/L para distócicos. O aumento da atividade da AST pode estar relacionado com lesão muscular durante o processo do parto.

Segundo Doornenbal; Tong; Murray, (1988) em estudo com 48 bezerros na primeira semana de vida aonde puderam observar que a média para AST foi de 103,0 U/L.

Moraes (2011), ao observar 30 bezerros mestiços durante 360 dias de vida, observou os seguintes valores para AST, $73,2 \pm 25,4$ U/L até três dias de vida, $64,4 \pm 23,5$ U/L aos 30 dias de vida.

Paiva et al. (2006), ao observarem os teores de lactato de bezerro ao nascimento encontraram valores de $60,7 \pm 7,51$ mg/dL e 12 horas de vida foi de $46,86 \pm 5,19$ mg/dL, com 24 horas $44,71 \pm 4,36$ mg/dL, com 48 horas $34,83 \pm 3,53$ mg/dL, com 72 horas $34,37 \pm 3,76$ mg/dL e com 96 horas $40,32 \pm 4,09$ mg/dL.

Batchelder et al. (2007), estudaram as concentrações sanguíneas de creatina quinase, em bezerros clonados e não clonados (controle), observaram um aumento nos clones (141-296 U/L) e controles (137-264 U/L) desde o nascimento até 12 horas de vida.

2.5.5 Valores de referência dos minerais

Moraes (2011), ao analisar os teores séricos de fósforo em bezerros com até 360 dias de vida observou que com um a três dias de vida o valor foi de $7,0 \pm 2,1$ mg/dL e aos 30 dias $8,0 \pm 2,1$ mg/dL. Para cálcio observou ao nascimento, $9,6 \pm 1,9$ mg/dL e $9,8 \pm 1,9$ aos 30 dias de vida. O cálcio ionizável foi de $6,0 \pm 0,9$ mg/dL e $5,2 \pm 0,8$ mg/dL aos 30 dias. A relação cálcio/fosforo ficou em $1,5 \pm 0,4$ mg/dL do dia 1 a três dias de vida e $1,3 \pm 0,4$ mg/dL com 30 dias de vida.

Segundo Rocha et al., (2009), foram analisadas amostras de sangue de 16 bezerros ao nascimento, oito deles provenientes do cruzamento das raças Canchim e Nelore, sendo quatro filhos de vacas primíparas (Grupo 1) e quatro de vacas pluríparas (Grupo 2), e oito da raça Holandesa, sendo quatro filhos de vacas primíparas (Grupo 3) e quatro de vacas pluríparas (Grupo 4), observaram nos seguintes momentos: 12-24h após o nascimento grupo (M1) e aos 7 (M2), 15 (M3) e 30 (M4) dias de vida. Nos bezerros dos Grupos 1, 2 e 3 não constatou diferença significativa nos teores séricos de cálcio total entre os momentos, com variações de $10,2 \pm 0,9$ a $11,3 \pm 0,3$ mg/dL, $10,8 \pm 0,1$ a $11,5 \pm 0,3$ mg/dL e $8,21 \pm 1,0$ a $9,2 \pm 0,8$ mg/dL, respectivamente. Nos animais do Grupo 4 constatou-se diferença significativa entre os momentos, com decréscimo gradual dos teores séricos de cálcio total desde o nascimento ($11,2 \pm 2,1$ mg/dL) até aos 30 dias de vida ($8,75 \pm 0,9$ mg/dL). Notou-se diferença

significativa entre os grupos, com menores valores no Grupo 3 ($9,36 \pm 1,8$ mg/dL no M1; $9,7 \pm 0,8$ mg/dL no M2; $9,2 \pm 0,8$ mg/dL no M3; e $8,21 \pm 1,0$ mg/dL no M4), em todo o período de estudo, e no Grupo 4 aos 15 e 30 dias de idade ($9,4 \pm 0,6$ mg/dL aos 15 dias e $8,75 \pm 0,9$ mg/dL aos 30 dias). Os maiores valores foram verificados em bezerros do Grupo 2, do nascimento aos 30 dias de idade ($10,8 \pm 0,1$ mg/dL, no M1, a $11,5 \pm 0,3$ mg/dL no M2).

Com relação à concentração sérica de fósforo, não foram constatadas diferenças entre os momentos nos Grupos 1, 2 e 3 os valores variaram entre $7,26 \pm 0,9$ mg/dL e $9,69 \pm 0,6$ mg/dL. No Grupo 4 observou-se decréscimo no teor de fósforo do nascimento ($9,20 \pm 2,2$ mg/dL) aos 30 dias de vida ($7,14 \pm 0,2$ mg/dL), mesma tendência notada para o teor sérico de cálcio total (ROCHA et al., 2009).

3 OBJETIVOS

Em continuidade as pesquisas relacionadas aos distúrbios na adaptação neonatal de bezerros desenvolvidos desde 2005 na Universidade de São Paulo, a presente pesquisa tem a finalidade de estudar o perfil bioquímico de bezerros Nelore clonados durante os 30 primeiros dias de vida, procurando verificar as possíveis modificações no metabolismo de animais obtidos por transferência nuclear de células somáticas (TNCS - clonagem).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização desta pesquisa, foram utilizadas 260 amostras de sangue e soro sanguíneo de 20 bezerros durante o primeiro mês de vida, sendo os animais divididos em dois grupos experimentais: 12 bezerros da raça Nelore obtidos por meio da técnica de clonagem e 8 bezerros obtidos por meio de monta natural também da Raça Nelore por parto normal. Os Nelores de parto normal utilizados na realização deste projeto de pesquisa foram escolhidos aleatoriamente, de acordo com as necessidades para a formação do grupo experimental.

Na tabela 1 está apresentada a constituição dos grupos experimentais utilizados. As amostras coletadas foram submetidas à determinação da função renal, função hepática, lipidograma, proteinograma e minerais.

Tabela1 - Constituição dos grupos experimentais para avaliar o quadro bioquímico, de bezerros da raça Nelore.

Momento da colheita das amostras	Grupos	
	Clones Nelore	Bezerros Nelore
	N	N
1º dia de vida		
Imediatamente após o nascimento	12	8
1º dia de vida		
6 horas após o nascimento	12	8
1º dia de vida		
12 horas após o nascimento	12	8
1º dia de vida		
24 horas após o nascimento	12	8
2º dia de vida		
48 horas após o nascimento	12	8
3º dia de vida		
72 horas após o nascimento	12	8
4º dia de vida		
96 horas após o nascimento	12	8
5º dia de vida		
120 horas após o nascimento	12	8
7º dia de vida		
168 horas após o nascimento	12	8
10º dia de vida		
240 horas após o nascimento	12	8
15º dia de vida		
360 horas após o nascimento	12	8
20º dia de vida		
480 horas após o nascimento	12	8
30º dia de vida		
720 horas após o nascimento	12	8

Fonte: (MARCHESE, 2014).

Nota: N – Número de animais utilizados

4.1 COLETA DE SANGUE

As amostras de sangue foram colhidas através da punção da veia jugular externa, utilizando-se o Sistema Vacutainer[®]. Sendo 3,0 ml para a realização de hemograma (em tubo com anticoagulante EDTA) e 3,0 ml sem anticoagulante para a obtenção do soro. As amostras para avaliação do colesterol e triglicérides foram colhidas em tubos de vidro siliconados de 9 ml sem anti-coagulantes, e mantidas em temperatura ambiente para facilitar a retração do coágulo. As amostras para a determinação dos teores plasmáticos de glicose foram colhidas em tubos de vidro siliconados de 4 ml contendo fluoreto de sódio e mantidas refrigeradas durante o transporte.

No laboratório Multiusuário de Análises Clínicas Veterinárias do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, da Universidade de São Paulo as amostras foram centrifugadas com força real de centrifugação igual a 3300 g, durante 15 minutos, para a ocorrência da sinérese do coágulo ou sedimentação dos elementos figurados do sangue, sendo, a seguir, o soro e o plasma sanguíneos separados por aspiração em três alíquotas cada, totalizando seis alíquotas de tubos tipo Eppendorf por animal.

Para as amostras de plasma sanguíneo para determinação dos teores plasmáticos de lactato foram colhidas em tubos de vidro siliconizados contendo fluoreto de sódio a 1% providos com tampa plástica e com vácuo suficiente para aspirar 4 ml, sendo as amostras mantidas refrigeradas durante o transporte. A seguir, as amostras foram centrifugadas com força real de centrifugação igual a 1000 g, durante 15 minutos, para a sedimentação dos elementos figurados do sangue. O plasma sanguíneo foi separado por aspiração em uma alíquota, sendo o material acondicionado em tubos plásticos providos de tampas com capacidade para 4 ml. As alíquotas de plasma foram conservadas em freezer a menos 20°C até a realização das provas.

4.2 AVALIAÇÃO DA PROTEINOGRAMA

4.2.1 Determinação dos teores séricos de proteína total

A determinação dos teores séricos de proteína total foi feita pelo método do biureto, de acordo com a técnica preconizada por Gornall et al. (1949) e modificada por Strufaldi (1987), com leitura da coloração da reação utilizando-se comprimento de onda de 550nm em Analisador Bioquímico Automático da marca Randox Daytona[®] - Randox Laboratories, Reino Unido utilizando-se kit comercial da marca Randox[®] referência TP4001. O princípio desta técnica baseia-se na reação entre os tripeptídeos, polipeptídeos e proteínas existentes no soro sanguíneo com íons de cobre presentes no reativo de biureto, em meio alcalino, formando um complexo de coloração violeta, cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de proteína presente na amostra, sendo os resultados expressos em g/dL.

4.2.2 Determinação dos teores séricos de albumina

A determinação dos teores séricos de albumina foi feita pelo método do verde de bromocresol em analisador bioquímico automático da marca Randox Daytona[®] - Randox Laboratories, Reino Unido utilizando-se kit comercial da marca Randox[®] referência AB3800, de acordo com a técnica preconizada por Doumas et al. (1971), sendo a leitura da coloração da reação realizada utilizando comprimento de onda de 630nm. O princípio desta técnica baseia-se na reação entre a albumina, presente na amostra, e o verde de bromocresol, em meio ácido, originando um complexo cuja intensidade de coloração é diretamente proporcional à concentração de albumina presente na amostra e os resultados expressos em g/dL.

4.2.3 Determinação dos teores séricos de globulinas

A determinação dos teores séricos de globulinas foi obtida pela subtração dos teores séricos de proteína total e albumina, sendo os valores expressos em g/dL. Com a determinação dos teores séricos de globulinas, dividia-se a albumina pela globulina obtendo a relação entre as variáveis.

4.3 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO HEPÁTICA

4.3.1 Determinação da atividade sérica da aspartato-aminotransferase (AST)

A atividade enzimática sérica da aspartato-aminotransferase foi determinada segundo metodologia cinética otimizada em conformidade com o European Committee for Clinical Laboratory Standards (ECCLS), em Analisador Bioquímico Automático da marca RX Daytona® - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando-se kit comercial da marca Randox® referência AS3804.

O princípio do método está baseado na ação catalítica da AST sobre o 2-oxoglutarato, originando glutamato e oxalacetato, sendo este último convertido a L-malato pela enzima malato-desidrogenase e, nesta reação acoplada, ocorre simultaneamente, a oxidação de NADH para NAD⁺, ocasionando diminuição na quantidade de NADH e o desenvolvimento de coloração quantificada em 340nm a uma temperatura igual a 25°C, cuja intensidade é diretamente proporcional à atividade de AST presente na amostra (SCHIMID; FOSTNER, 1986) e expressas em U/L.

4.3.2 Determinação da atividade sérica da gama glutamiltransferase (GGT)

A atividade enzimática sérica da gama glutamiltransferase foi determinada segundo metodologia cinética otimizada em conformidade com o European Committee for Clinical Laboratory Standards (ECCLS), em Analisador Bioquímico Automático da marca RX Daytona® - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando-se kit comercial da marca Randox® referência GT3817.

Segundo essa técnica, a enzima gama-glutamiltransferase cataliza a transferência do resíduo gama-glutamil da L-gama-glutamil-3-carboxi-4-nitrobenzoato para glicilglicina e a quantidade de 3-carboxi-4nitroanilina formada na reação é diretamente proporcional à atividade enzimática existente na amostra. Na realização desta prova quantificou-se o aumento da densidade óptica em 405nm, sendo os resultados expressos em U/L e considerando a temperatura de reação para expressão dos valores igual a 25°C.

4.3.3 Determinação da atividade sérica da creatina quinase (CK)

A atividade enzimática sérica da creatina-quinase foi determinada segundo metodologia cinética otimizada preconizada pelo Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie, em Analisador Bioquímico Automático da marca RX Daytona® - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando-se kit comercial da marca Randox® referência CK NAC 110.

O princípio do método está baseado na ação catalítica da CK sobre a creatina fosfato e ADP, originando creatina e ATP; durante a ocorrência desta reação outras duas reações ocorrem simultaneamente, dando origem a NADPH que confere cor ao composto, cuja intensidade, determinada utilizando-se comprimento de onda igual a 340nm, é diretamente proporcional a atividade de CK existente na amostra (SCHIMID; FOSTNER, 1986), sendo os resultados expressos em U/L e a temperatura de reação considerada para a expressão deste valor igual a 25°C.

4.3.4 Determinação da atividade sérica da fosfatase alcalina (FA)

A atividade enzimática sérica Fosfatase Alcalina foi determinada segundo metodologia cinética otimizada em conformidade com o European Committee for Clinical Laboratory Standards (ECCLS), em Analisador Bioquímico Automático da marca RX Daytona® - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando-se kit comercial da marca Randox® referência AP3803.

O princípio está baseado no método colorimétrico, Fosfatase Alcalina, em meio alcalino, promove a hidrólise do substrato p-Nitrofenilfosfato liberando p-Nitrofenol. O substrato é incolor e o radical p-Nitrofenol liberado é amarelado. A intensidade de cor é proporcional à concentração da enzima no soro. A atividade enzimática é determinada pela velocidade de formação do p-Nitrofenol, medida em 405nm. (SCHIMID; FOSTNER, 1986) e expressas em U/L.

4.4 AVALIAÇÃO DO LIPIDOGRAMA

4.4.1 Determinação dos teores séricos de colesterol

A determinação dos teores séricos de colesterol foi quantificada por metodologia enzimática colorimétrica em Analisador Bioquímico Automático da marca RX Daytona[®] - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando-se kit comercial da marca Randox[®] referência CH3810, conforme método descrito por (ALLAIN et al., 1974).

O princípio do método está baseado na ação das enzimas colesterol-esterase e colesterol-oxidase sobre o colesterol, originando um composto intermediário e água oxigenada. Na presença de peroxidase, a água oxigenada formada na reação anterior, reage com 4-arnino-antipirina e fenol dando origem a um complexo que desenvolve coloração, cuja intensidade medida em comprimento de onda igual a 500nm mantém relação direta com a quantidade de colesterol presente na amostra, sendo os resultados expressos em mg/dL..

4.4.2 Determinação dos teores séricos de triglicérides

A determinação dos teores séricos de triglicérides foi quantificada por metodologia enzimática colorimétrica em Analisador Bioquímico Automático da marca RX Daytona[®] - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando-se kit comercial da marca Randox[®] referência TR3823, conforme técnica descrita por (FOSSATI et al., 1982).

O princípio do método está baseado na hidrólise dos triglicérides pela ação da enzima lipase liberando glicerol; a ação da enzima glicerol-quinase e glicerol-fosfato-oxidase sob o glicerol formado na reação anterior, promove a formação de peróxido de hidrogênio e este por sua vez, sofre ação da peroxidase, produzindo quinolaimina que desenvolve coloração, cuja intensidade medida em comprimento de onda igual a 500nm, mantém relação direta com a quantidade de triglicérides presente na amostra, sendo os resultados expressos em mg/dL.

4.4.3 Determinação dos teores plasmáticos de glicose

Para a determinação dos teores plasmáticos de glicose foi utilizado o método descrito por Barhan et al. (1972), em Analisador Bioquímico Automático da marca RX Daytona[®] - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando-se kit comercial da marca Randox[®] referência GL3815.

O princípio do método está baseado na oxidação da glicose em ácido glicurônico e peróxido de hidrogênio pela enzima glicose-oxidase; na presença de peroxidase o peróxido de hidrogênio, formado na reação anterior, reage com a 4-aminofenazona e com o 2,4-diclofenol, produzindo um corante quinoneiminico de coloração rósea, cuja intensidade mantém relação direta com a quantidade de glicose presente na amostra, sendo a leitura da coloração realizada utilizando comprimento de onda igual a 505nm e os resultados expressos em mg/dL.

4.4.4 Determinação dos teores séricos de lactato

O teor sérico de lactato foi obtido por determinação enzimática, correlacionando a ação catalítica da Lactato Oxidase que é diretamente proporcional à quantidade de lactato na amostra. A leitura por espectrofotometria utilizando comprimento de onda igual a 340 nm, foi realizada pelo Analisador Bioquímico Automático da marca RX Daytona[®] - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando kit comercial da marca Randox[®] referência LC3980. Os resultados foram expressos em mg/dL.

4.5 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL

4.5.1 Determinação dos teores séricos de ureia

A determinação dos teores séricos de ureia foi realizada por meio de método cinético enzimático, sendo a leitura da reação obtida pelo analisador bioquímico automático RX Daytona[®] - Randox Laboratories, Reino Unido utilizando-se kit comercial da marca Randox[®] referência UR3825.

A uréia da amostra é hidrolisada pela enzima urease com produção de gás carbônico e íons amônio. Estes são captados por uma segunda enzima, a glutamato desidrogenase, a qual

em presença de outros substratos como o NADH_2 e α - cetoglutarato produz NAD e glutamato. A diminuição da concentração de NADH_2 pode ser medida por espectrofotometria utilizando comprimento de onda igual a 340 nm, sendo sua diminuição proporcional à concentração de ureia na amostra. Os resultados foram expressos em mg/dL.

4.5.2 Determinação dos teores séricos de creatinina

A determinação dos teores séricos de creatinina foi realizada por método colorimétrico e sua intensidade de cor processada pelo Analisador Bioquímico Automático da marca RX Daytona[®] - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando kit comercial da marca Randox[®] referência CR3814.

A reação da creatinina em solução alcalina com o picrato, origina um complexo de cor, cuja intensidade, determinada utilizando-se comprimento de onda igual a 340nm, é diretamente proporcional a atividade de creatinina existente na amostra, sendo os resultados expressos em mg/dL.

4.6 DETERMINAÇÃO DOS TEORES SÉRICOS DE LACTATO

O teor sérico de lactato foi obtido por determinação enzimática, correlacionando a ação catalítica da Lactato Oxidase que é diretamente proporcional à quantidade de lactato na amostra. A leitura por espectrofotometria utilizando comprimento de onda igual a 340 nm, foi realizada pelo Analisador Bioquímico Automático da marca RX Daytona[®] - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando kit comercial da marca Randox[®] referência LC3980. Os resultados foram expressos em mg/dL.

4.7 DETERMINAÇÃO DOS TEORES SÉRICOS DOS MINERAIS

4.7.1 Determinação dos teores séricos de cálcio

A determinação dos teores séricos de cálcio será quantificada por metodologia enzimática colorimétrica, em Analisador Bioquímico Automático, Randox, modelo Rx daytona, United Kingdom – RANDOX Laboratories Ltda.

Por esse método, o cálcio liga-se ao arsenazo III, dando origem a um complexo colorido, cuja intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração de cálcio presente na amostra, em 660 nm (TIETZ, 1976). Os resultados serão expressos em mg/dL.

4.7.2 Determinação dos teores séricos de fósforo inorgânico

A determinação dos teores séricos de fósforo inorgânico será quantificada por metodologia enzimática colorimétrica, em Analisador Bioquímico Automático, Randox, modelo Rx daytona, United Kingdom – RANDOX Laboratories Ltda.

Por esse método, o fósforo inorgânico reage com o molibdato de amônio na presença de ácido sulfúrico para formar um complexo de fósfomolibdato, dando origem a um complexo colorido, cuja intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração de fósforo inorgânico presente na amostra, em 340 nm (HENRY, 1974). Os resultados serão expressos em mg/dL.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados bioquímicos dos animais foram analisados pelo programa Statistical Analysis System (Versão 9.3, 2012) utilizando o procedimento MIXED, sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias comparada pelo teste de Hartley. Estes dados foram submetidos à análise de variância, que contemplou como causas de variação o efeito fixo de tratamento (animal) e fator medidas repetido no tempo, referentes aos diferentes momentos de coleta. A análise por tempo somente foi realizada quando as interações entre efeito de tempo e efeito de tratamentos foram significativas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso da avaliação do perfil bioquímico sanguíneos é de extrema importância para o auxílio no diagnóstico e tratamento de doenças, atualmente facilitado pela automatização de várias destas determinações. Para o presente estudo, foram utilizados alguns trabalhos sobre valores de referência e perfil bioquímico em bezerros na fase neonatal, como, Fagliari et al., (1998); Feitosa et al., (2009); Gasparelli et al., (2008); e Moraes, (2011), bezerros clonados como, Batchelder et al. (2007); e Brisville et al. (2013), e clones adultos Lanza et al. (2008).

Os resultados obtidos no presente estudo serão apresentados em forma de tabela e gráficos com a finalidade de facilitar a visualização e interpretação dos resultados obtidos sobre o perfil bioquímico de bezerros da raça Nelore, originados por meio da técnica de transferência nuclear de células somáticas (TNCS) – Clonagem, comparados com bezerros de parto normal.

Na tabela 2 está demonstrado a variação do perfil bioquímico de bezerros da Raça Nelore, clonados e normais durante o primeiro mês de vida e a interação entre estes fatores. Os parâmetros apresentados abaixo que tiverem um valor de significância ($P>0,05$) foram apresentados em forma de gráficos e discutidos. Para a melhor interpretação durante a discussão, foi dividido por tópicos em relação a cada função.

Tabela 2 - Valores médios e erro padrão da média para os parâmetros bioquímicos para bezerros de parto normal e clonado

Parâmetros	Grupos		Probabilidade		
	Normal	Clone	Grupo	Tempo	Interação Grupo e Tempo
<i>Função Renal</i>					
Ureia mg/dL	22,78 ± 0,84	29,03 ± 0,92	0,0053	0,0001	0,0120
Creatinina mg/dL	1,61 ± 0,05	1,39 ± 0,03	0,0001	0,0001	0,0001
Relação Ureia/Creatinina	16,07 ± 0,76	21,16 ± 0,75	0,0029	0,0001	0,1483
<i>Função Hepática</i>					
AST U/L	57,84 ± 3,06	22,91 ± 0,99	0,0001	0,0001	0,0001
GGT U/L	1294,05 ± 152,37	287,26 ± 28,05	0,0009	0,0001	0,0085
CK U/L	223,47 ± 30,73	64,82 ± 9,18	0,0001	0,0001	0,0002
FA U/L	2311,63 ± 146,22	836,05 ± 41,07	0,0001	0,0001	0,1899
<i>Proteinograma</i>					
Proteína total g/dL	6,43 ± 0,09	5,68 ± 0,05	0,0012	0,0001	0,0001
Albumina g/dL	2,82 ± 0,02	2,63 ± 0,01	0,0001	0,0001	0,0126
Globulina g/dL	3,61 ± 0,09	3,06 ± 0,05	0,0170	0,0001	0,0001
<i>Lipidograma</i>					
Colesterol mg/dL	74,00 ± 3,63	56,31 ± 2,84	0,0009	0,0001	0,0001
Triglicérides mg/dL	35,18 ± 1,98	38,71 ± 2,79	0,8620	0,0001	0,0750
Glicose mg/dL	126,72 ± 3,30	106,70 ± 2,88	0,0003	0,0001	0,0004
Lactato mg/dL	26,27 ± 0,98	30,71 ± 1,61	0,3446	0,0001	0,0001
<i>Minerais</i>					
Cálcio mg/dL	10,74 ± 0,07	10,63 ± 0,08	0,4330	0,0001	0,0001
Fósforo mg/dL	8,96 ± 0,13	9,87 ± 0,20	0,0001	0,0001	0,0001

Fonte: (MARCHESE, 2014).

Nota: FA: Fosfatase alcalina; AST: Aspartato amino transferase; CK: Creatina quinase; GGT: Gama-glutamil transferase; mg/dL: miligrama por decilitro; g/dL: grama por decilitro; U/L: Unidade por litro.

5.1 FUNÇÃO RENAL

No gráfico 1 estão apresentados os resultados da uréia sérica de bezerros nelore clonados e bezerros controle. Houve interação entre grupo e tempo ($P = 0,0120$). Em amostras colhidas imediatamente após o nascimento, 6, 72, 96 e 360 horas de vida observou-se que os teores séricos de ureia eram maiores no grupo de bezerros clonados do que grupo controle (33,25 vs 24,76; 32,21 vs 23,93; 40,73 vs 28,51; 36,65 vs 23,83; 28,29 vs 17,45 respectivamente).

Gráfico 1- Valores séricos de ureia de bezerros clonados e de parto normal nos primeiros 30 dias de vida

Fonte: (MARCHESE, 2014).

*Efeito significativo de grupo $P < 0,05$.

Os valores médios da concentração sérica da ureia em ambos os grupos foram menores do que os valores de referência para bovinos adultos (42,8-64,2 mg/dL) relatados por Kaneko et al. (1997), porém maiores do que os valores de referência de bezerros lactentes (14,39 mg/dL) e desmamados (15,97 mg/dL) da raça Nelore relatados por Fagliari et al. (1998). Ao comparar os valores de ureia com aqueles descritos por Feitosa et al., (2009),

Gasparelli et al. (2008), Moraes (2011), observou-se similaridade com os valores encontrados na presente pesquisa.

Relata-se em parte da literatura referências da influência do fator etário sobre os níveis de ureia sérica, com diminuição dos seus valores, principalmente, no período neonatal, em virtude do fluxo sanguíneo renal aumentar imediatamente após o rompimento do cordão umbilical, do rim do neonato assumir a função excretora previamente realizada pela placenta e da crescente melhoria da eficiência da função renal com a evolução da idade (BENESI et al., 2005). Entretanto outras pesquisas não puderam demonstrar essas variações da função renal de forma clara (GASPARELLI et al., 2008, FEITOSA et al., 2009).

Apesar do nitrogênio da ureia sanguínea (NUS) ser um dos parâmetros sanguíneos tradicionalmente utilizados na avaliação da função renal (GONZALEZ, SCHEFFER, 2002b), seus valores sofrem influência de diversos fatores como nível de proteína na dieta, taxa de produção hepática de ureia, excreção de ureia pela urina e, em menor grau, pelo intestino (THRALL et al., 2007). Em bezerros, Souza (2012) relatou que a concentração de ureia tem oscilação em razão do consumo e degradação de proteína colostrais.

Esses fatores poderiam explicar as maiores concentrações de ureia encontradas nos bezerros clonados por nós examinados (imediatamente após o nascimento, 6, 72, 96 e 360 horas de vida), e por Batchelder et al. (2007) que observaram às 48 horas de vida teores séricos de ureia igual a 13,4 mg/dL para bezerros clonados e 7,4 mg/dL para bezerros controle.

No gráfico 2 estão apresentados os resultados da creatinina sérica, sendo possível observar a diminuição abrupta dos valores nas primeiras 24 horas de vida. Houve interação entre grupo e tempo ($P = 0,0001$). Em amostras colhidas imediatamente após o nascimento, 6, 12, 24, 480 e 720 horas de vida observou-se que os valores de creatinina eram maiores no grupo de animais controle (3,0 vs 2,0; 2,6 vs 1,8; 2,2 vs 1,7; 1,5 vs 1,1; 1,3 vs 1,1 respectivamente) enquanto no grupo de animais com 96 horas de vida os valores creatinina foram menores nos animais controles (1,29 vs 1,1 respectivamente).

Os valores da concentração sérica de creatinina nos bezerros Nelores clonados e grupo controle com mais de 24 horas de vida foram semelhantes aos encontrados por Benesi et al. (2002), Coelho (2002) e Gregory et al. (2004) e estão dentro dos valores de normalidade (1,0 – 2,0 mg/dL) sugeridos por Kaneko et al. (1997). De forma similar ao observado nesta pesquisa, Gasparelli et al. (2008) relataram, imediatamente após o nascimento, teores de creatinina elevados ($3,60 \pm 1,69$ mg/dL) que diminuía nas primeiras 24 horas de vida.

Após o nascimento, em animais saudáveis, há decréscimo dos valores séricos, devido à ação renal (EGLI; BLUM, 1998). Segundo Doornenbal, Tong e Murray (1998) animais jovens tendem a ter valores maiores, sendo esse comportamento dos teores séricos de creatinina sugestivo de melhora da capacidade funcional renal aonde vai sendo gradativamente assumida pelo neonato

Gráfico 2 - Valores séricos de creatinina de bezerros clonados e de parto normal nos primeiros 30 dias de vida

Fonte: (MARCHESE, 2014).

*Efeito significativo de grupo $P<0,05$.

Por outro lado, o alto teor de creatinina sérica ao nascimento poderia estar associado a pobre remoção placentária e não ao mau funcionamento fetal dos rins (ADAMS et al., 1993). Souza (2012) observou em cordeiros a diminuição em até quatro vezes de creatinina após 72 horas de vida, semelhante ao observado por Lupke et al. (1967) em bezerros, que sugeriram que níveis mais elevados ao nascimento seriam provenientes de acúmulo de creatinina ingerida do fluido alantóico durante a gestação. Na presente pesquisa foi observada uma diminuição de 57% para os bezerros de parto normal e 35% para os bezerros clonados o que difere do observado.

Fato muito importante observado nesta dissertação está relacionada aos teores séricos de creatinina, no momento do nascimento, serem significativamente menores nos bezerros

clonados ($2,02 \pm 0,39$ mg/dL) do que nos bezerros do grupo controle ($2,99 \pm 0,59$ mg/dL). Encontra-se na literatura dado semelhante apresentado por Brisville et al. (2013) que observaram em amostras colhidas nos primeiro 5 minutos de vida de 27 bezerros clonados teores de creatinina iguais a $2,04 \pm 0,43$ mg/dL.

Esses menores valores de creatinina poderiam estar relacionados aos distúrbios de placentação observados nos clones e/ou a hidropsia dos envoltórios fetais, pois o hidroalantoide é frequentemente observado em gestações de clones (BIRGEL JUNIOR et al.; 2011a). Nessa situação haveria maior produção de urina fazendo com que a creatinina fosse diluída e carreada para a cavidade alantoideana, facilitando a sua eliminação.

Como a creatinina é uma pequena molécula produzida por degradação da creatina e a creatina-fosfato, uma molécula de armazenamento de energia principalmente presente nos músculos esquelético poder-se-ia supor que os baixos valores de creatinina nas primeiras 24 horas de vida seriam reflexo de distúrbio da síntese e/ou catabolismo de creatina durante a vida fetal.

A creatinina plasmática é derivada, praticamente em sua totalidade, do catabolismo da creatina presente no tecido muscular. É um metabólito utilizado para armazenar energia no músculo, na forma de fosfocreatina e sua degradação para creatinina ocorre de maneira constante, ao redor de 2% do total de creatina diariamente. A excreção desta só se realiza por via renal, uma vez que ela não é reabsorvida nem reaproveitada pelo organismo. Por isso, os níveis de creatinina plasmática refletem a taxa de filtração renal, de forma que níveis altos indicam uma deficiência na funcionalidade renal (GONZALEZ, SCHEFFER, 2002a).

Usualmente, os valores de ureia e creatinina são indicados para a avaliação da função renal dos animais domésticos, fornecendo subsídios, quer sejam para o diagnóstico e/ou prognóstico de inúmeras nefropatias (KANEKO, 1997). Assim os resultados obtidos para ureia e creatinina, apresentados nos gráficos 1 e 2, indicam que não existe nefropatia nos bezerro clonados. Dessa forma os resultados por nós obtidos reforçam as observações de pesquisadores que não detectaram alterações na função renal de bezerros clonados (BATCHELDER et al., 2007) e de clones adultos (LANZA et al., 2001).

A análise dos resultados apresentados no gráfico 3 evidenciaram que para a relação ureia/creatinina houve diferenças estatísticas entre os grupos e tempo, sendo os valores dessa relação maiores nos bezerros clonados do que nos bezerro do grupo controle.

Gráfico 3 - Valores para relação ureia/creatinina para bezerros clonados e de parto normal durante 30 dias de vida

Fonte: (MARCHESE, 2014).

5.2 FUNÇÃO HEPÁTICA

A análise dos resultados, apresentados no gráfico 4, mostra que para a Aspartato amino transferase (AST) houve diferenças estatísticas entre os grupos e tempo, sendo os valores obtidos para bezerros clonados significativamente menores do que os obtidos no grupo controle. Considerando-se os primeiros 30 dias de vida dos animais observou-se que as concentrações séricas de AST eram iguais a $22,91 \pm 0,99$ U/L para bezerros clonados e iguais a $57,84 \pm 3,06$ U/L para animais de parto normal (Tabela 2), sendo as maiores diferenças observadas às 24 horas de vida (bezerros clonados - $41,62 \pm 13,38$ U/L; grupo controle - $123,83 \pm 57,60$ U/L).

Batchelder et al. (2007) em estudo com bezerros clonados da raça holandesa e hereford não observaram diferenças no comportamento da AST, pois observaram que as concentrações de AST aumentavam nas primeiras 12 horas de vida de 17 para 52 U/L em clones e de 14 para 50 U/L em bezerros não clones, permanecendo nesses patamares até os 2 dias de vida. Encontra-se na literatura dado semelhante apresentado por Brisville et al. (2013) que observaram em amostras colhidas nos primeiro 5 minutos de vida de 27 bezerros

clonados teores de AST iguais a 16 ± 5 U/L. Ao comparar esses resultados com os obtidos por nós evidencia-se que a atividade da AST é menor em bezerros clonados, sendo que suas variações acompanham aquelas observadas para a CK. Mendonça (2007) não observou diferença significativa entre bezerros fertilizados *in vitro* e *in vivo* para concentrações de AST.

Segundo Benesi et al. (2003) o aumento da enzima AST pode estar relacionado com lesão muscular, pelo aumento da atividade metabólica do animal. Fatos estes provavelmente encontrados no presente estudo aonde observaram um aumento da enzima AST nos bezerros de parto normal, devido aos processos fisiológicos do parto, lesão muscular e maior metabolismo animal ao nascimento. Gasparelli et al. (2008), avaliaram a atividade sérica da AST, onde observaram variações significativas nas 24 horas em decorrência ao tipo de parto já que se obtiveram valores de $596,54 \pm 160,85$ U/L para bezerros nascidos de parto normal e de $828,44 \pm 266,03$ para distócicos e a relacionaram com lesão muscular durante o processo do parto. Maderova; Neuman e Kozumplik (1963) observaram um intenso e temporário aumento da atividade sérica da AST em bezerros recém-nascidos e atribuíram tal fato à mamada do colostro.

A influência dos fatores etários pôde ser observada no presente estudo, pois houve aumento das concentrações sérico de AST ate 24 horas de vida em ambos os grupos estudados e um decréscimo e estabilizou durante os 30 dias de vida. Gregory et al. (1999), estudaram bezerros do nascimento aos 72 meses de idade, encontrando diferenças significativas dos fatores etários nas concentrações desta enzima. Fato este estudado por Moraes (2011) que observou um aumento nos três primeiros dias, após este período houve um decréscimo durante os 30 dias de vida. Nos neonatos de ruminantes ocorre aumento nas concentrações séricas de AST principalmente por injúria muscular causada pelo parto (BOYD, 1989), ou por esforço físico apresentado para se levantar nas primeiras horas de vida (FEITOSA et al., 2009) e até o desenvolvimento fisiológico da idade (GASPARELLI et al., 2008).

Gráfico 4 - Valores séricos de Aspartato amino transferase, para bezerros clonados e de parto normal durante 30 dias de vida

Fonte: (MARCHESE, 2014).

*Efeito significativo de grupo $P < 0,05$.

Os valores médios da concentração de AST sérico observado durante os 30 dias de vida, no presente estudo, tanto dos animais clonados como os de parto normal foram semelhantes aos achados por Fagliari et al. (1998) trabalhando com bezerros Nelores de parto normal (41,25 U/L), porém foram menores do que os relatados por Kaneko; Harvey e Bruss (1997) para bovinos (78-132 U/L) e Moraes et al. (2000) para Nelores adultos (48,0-88,8 U/L).

A análise dos resultados, apresentados no gráfico 5, mostra que para a gama-glutamil transferase (GGT) houve diferenças estatísticas entre os grupos e tempo, sendo os valores obtidos para bezerros clonados significativamente menores do que os obtidos no grupo controle. Entre 6 e 48 horas de vida observou-se que as concentrações séricas de GGT variaram entre $231,171 \pm 195,01$ e $452,03 \pm 200,54$ U/L para bezerros clonados e entre $2.327,78 \pm 2.438,78$ e $1.828,43 \pm 1.191,76$ U/L para animais do grupo controle, sendo as maiores diferenças observadas às 12 horas de vida (bezerros clonados – $876,57 \pm 376,42$ U/L; grupo controle – $4.408,94 \pm 3.514,37$ U/L).

No presente estudo animais clonados tiveram uma menor concentração de GGT em relação animais de parto normal principalmente nas primeiras 48 horas, fato este pode ter ocorrido pela menor eficiência de absorção de imunoglobulinas colostrais.

Batchelder et al. (2007) observaram que os neonatos clonados não possuem a mesma eficiência na absorção de imunoglobulina em relação aos de parto normal. Pesquisa realizada por NUNES (2009) demonstrou, em clones, alterações na tococardiografia compatíveis com a ocorrência de sofrimento fetal/hipóxia intrauterina, de grau variável nos últimos 90 dias de gestação. A gravidade da hipóxia intrauterina poderia explicar, em parte, a evolução do quadro clínico dos bezerros. Verifica-se, em bezerros clonados, que a adaptação neonatal está particularmente afetada, sendo comumente observado prostração, letargia, ausência do reflexo de sucção e eliminação do mecônio nos primeiros 15 minutos de vida (BIRGEL JUNIOR et al., 2011b). Em decorrência a falta de reflexo de sucção os animais ingerem menores quantidades de colostro. Segundo Cabello e Levieux (1978) para adquirir a imunidade passiva devido à ingestão de colostro é necessária a mamada nas primeiras 24 horas de vida, sendo que a maior eficiência é nas primeiras 6 horas de vida. Em bezerros clonados muito frequentemente a ingestão espontânea de colostro e leite ocorre somente a partir de 24 horas de vida.

Gráfico 5 - Valores séricos de Gama-glutamil transferase de bezerros clonados e de parto normal durante 30 dias de vida

Fonte: (MARCHESE, 2014).

*Efeito significativo de grupo $P<0,05$.

Com relação à atividade da enzima GGT, constatou influência dos fatores etários na presente pesquisa. Tal afirmação condiz com os achados de Feitosa et al. (2009) e Gregory et al. (1999), os quais encontraram maior atividade sérica desta enzima nas primeiras horas de vida dos animais, e sua diminuição a partir do primeiro mês de vida. Benesi et al. (2003) e Gasparelli et al. (2008), encontraram as maiores taxas de GGT nas primeiras horas de vida, e conferiram tais valores à ingestão do colostro. A atividade sérica da GGT em bezerros que mamaram o colostro atinge, após cinco semanas de vida, concentrações semelhantes a bovinos adultos (FEITOSA et al. 2009).

A análise dos resultados, apresentados no gráfico 6, demonstrou que para a creatina quinase (CK) existem diferenças estatísticas entre os grupos e tempo, sendo os valores obtidos para bezerros clonados significativamente menores do que os obtidos no grupo controle. Considerando-se os primeiros 30 dias de vida dos animais observou-se que as concentrações séricas de CK eram iguais a $64,82 \pm 9,18$ U/L para bezerros clonados iguais a $223,47 \pm 30,73$ U/L para animais de parto normal (Tabela 2), sendo as maiores diferenças observadas às 24 horas de vida (bezerros clonados – $131,63 \pm 45,44$ U/L; grupo controle – $868,77 \pm 681,76$ U/L).

Gráfico 6 - Valores séricos de Creatina quinase observado em bezerros clonados e de parto normal durante 30 dias de vida

Fonte: (MARCHESE, 2014).

*Efeito significativo de grupo $P<0,05$.

Apesar de podermos justificar que os menores valores de CK obtidos para os bezerros clonados no momento do nascimento podem estar relacionados ao fato do tipo de parto empregado (cesariana) determinar menor esforço muscular, é necessário encontrar outra explicação com o evoluir da idade. Nas primeiras 48 horas de vida as diferenças de atividade de CK entre os bezerros clonados e bezerros controle são muito grandes, mas permanecem, em menor magnitude, durante todo o primeiro mês de vida. O fato dos bezerros clonados serem mantidos estabulados e serem, em consequência a asfixia neonatal, letárgicos quando comparados com os bezerros do grupo controle poderiam justificar que os valores de CK fossem menores.

Os aumentos dos valores da enzima CK, assim como o aumento da AST são de origem muscular. A CK possui quatro isoenzimas, que está presente nos músculos esquelético e cardíaco, presente no cérebro, e a isoenzima encontrada no coração, é uma enzima mitocondrial que responde por até 15% da atividade da CK cardíaca (KRAMER; HOFFMAN, 1997). Podemos observar um aumento da enzima decorrente a injeção intramuscular, decúbito prolongado, convulsões, tremores, traumas, excesso de exercício, necrose, cirurgias, choque, esforço do parto, miopatias nutricionais que envolvam deficiência de vitamina E e selênio.

Os maiores valores de CK observados no primeiro dia de vida de bezerros também foram reportados nos trabalhos de Anderson, Berrett e Patterson (1976), Boyd (1989) e Adams et al. (1993). Segundo esses autores, as taxas mais elevadas observadas nas primeiras horas de vida dos bezerros de parto normal estariam relacionadas ao início ou aumento da atividade muscular.

Para o grupo de bezerros de parto normal, os valores séricos de CK observados no presente estudo, foram significativamente maiores do que aqueles achados por Benesi et al., (2003).

Mendonça (2007) observou que não houve diferença significativa no estudo para os valores da enzima CK, em animais FIV e não-FIV que foram superiores aos observados por Kaneko et al. (1997) (4,8-12,1 U/L), porém semelhantes aos encontrados por Moraes et al. (2000) (45,1-165,3 U/L) e Paes (2005) (41,4 -135,0 U/L) nas raças Nelore e mestiços, fato que pode ser atribuído a diferenças de metodologias utilizadas, especialmente a temperatura do teste, fato que não ocorreu neste estudo.

Gráfico 7 - Valores séricos de Fosfatase alcalina observado durante 30 dias para bezerros clonados e de parto normal

Fonte: MARCHESE, 2014.

A análise dos resultados, apresentados no gráfico 7, mostra que para a fosfatase alcalina (FA) houve diferenças estatísticas entre os grupos e tempo, sendo os valores obtidos para bezerros clonados significativamente menores do que os obtidos no grupo controle. Considerando-se os primeiros 30 dias de vida dos animais observou-se que as concentrações séricas de fosfatase alcalina eram iguais a $836,05 \pm 41,07$ U/L no grupo de bezerros clonados e iguais a $2.311,63 \pm 146,22$ U/L no grupo de animais controle (Tabela 2), sendo as maiores diferenças observadas às 24 horas de vida (bezerros clonados – $1.167,01 \pm 606,38$ U/L; grupo controle – $4.519,73 \pm 3.168,68$ U/L).

Acredita-se que os valores significativamente menores obtidos para bezerros clonados do que os obtidos no grupo controle sejam decorrentes de falha na adaptação neonatal que determinam prostração, letargia e ausência do reflexo de sucção (BIRGEL JUNIOR et al., 2011b). O retardo na ingestão de colostro a menor quantidade ingerida explicaria as diferenças observadas entre os dois grupos.

Ruminantes recém-nascidos apresentam elevação significativa das atividades séricas das enzimas, como a GGT, ALP e AST, após ingerirem o colostro (THRALL et al., 2007), sendo os elevados valores de FA observados na semana do nascimento relacionadas diretamente com a quantidade de colostro ingerido (FAGLIARI et al., 1998). Segundo Gasparelli (2008), os valores da atividade de FA sofrem variações significativas em

decorrência da idade, mas não são observadas alterações relacionadas ao tipo de nascimento (cesariana ou parto normal). Fagliari et al. (1998) e Silva et al. (2012) relataram que após o aumento relacionado com a ingestão de colostro ocorria nos 30 primeiros dias de vida uma redução dos teores séricos de FA.

Diferentemente do que foi observado na presente pesquisa, Betchelder et al. (2007) não relataram diferenças maiores diferenças entre clones e não clones. Esses autores observaram que no momento do nascimento os valores da FA eram semelhantes no clones e não clones (228 e 235 U/L, respectivamente) e que sofriam um aumento durante as primeiras 12 horas após o nascimento (465 e 553 U/L; respectivamente).

Finalizando a avaliação da função hepática cabe ressaltar que as variações observadas no comportamento de enzimas hepáticas como a AST, GGT e FA estão relacionadas a falhas na transferência da imunidade passiva e são decorrentes da maior ou menor ingestão de colostro ou associadas à menor atividade muscular decorrente a falhas na adaptação neonatal e prostração e letargia observada nos bezerros clonados. Os resultados obtidos ao nascimento, antes da ingestão de colostro e aqueles obtidos entre 48 horas e 720 de vida não permitem supor a existência de hepatopatias ou alterações na função hepática dos bezerros clonados, pois a atividade enzimática da AST, GGT e FA foram sempre menores do que as observadas em bezerros controle e dentro dos valores de referência encontrados na literatura.

5.3 PROTEINOGRAMA

A análise dos resultados, apresentados no gráfico 8 mostra que para os teores séricos de proteína total existem diferenças estatísticas entre os grupos e tempo, sendo os valores obtidos para bezerros clonados significativamente menores do que os obtidos no grupo controle. Considerando-se os primeiros 30 dias de vida dos animais observou-se que as concentrações séricas de proteína total eram iguais a $5,68 \pm 0,05$ g/dL para bezerros clonados e iguais a $6,43 \pm 0,09$ g/dL para animais de parto normal (Tabela 2), sendo as maiores diferenças entre os grupos observadas entre 24 horas (bezerros clonados $-5,87 \pm 0,63$ g/dL; grupo controle $-7,17 \pm 1,16$ g/dL) e 48 horas de vida (bezerros clonados $-5,73 \pm 0,56$ g/dL; grupo controle $7,14 \pm 0,98$ g/dL).

Gráfico 8 - Valores séricos de Proteína total observado em bezerros clonados e de parto normal durante 30 dias de vida

Fonte: (MARCHESE, 2014).

*Efeito significativo de grupo $P < 0,05$.

O aumento dos teores séricos de proteína total após a mamada de colostro é descrita para bezerros de diversas raças (Perino et al., 1995; Fagliani et al., 1998; Costa et al., 2007; Leal et al., 2003; Rocha et al., 2010). Nas primeiras 24 horas de vida foi possível em nosso estudo observar esse significativo aumento dos teores séricos de proteína total em decorrência da absorção intestinal de imunoglobulinas presentes no colostro (TENNANT et al., 1969; BUSH et al., 1971; HUSBAND et al., 1972; RIBEIRO et al., 1983; MACHADO NETO et al., 1986).

Teores de proteína sérica maiores do que 6,0 g/dL, em animais que não estejam desidratados, são indicativos de transferência passiva bem-sucedida (NAYLOR e KRONFELD, 1977), sendo que teores de proteína sérica menor do que 5,0 g/dL indicam falha da transferência de imunidade passiva (BISWAL et al., 1993; SELIM et al., 1995; WITTUM & PERINO, 1995 e ROUSSEL & WOODS, 1999).

Apesar dos cuidados com a administração do colostro nos bezerros clonados, incluindo ingestão forçada por meio de mamadeiras e/ou sondagem os valores os valores obtidos para proteína total de bezerros clonados entre 5,0 e 6,0 g/dL, indicam falha parcial na transferência da imunidade passiva. Independente da forma de administração do colostro, via mamadeira ou por meio da mamada direta na própria mãe (RIZZOLI et al., 2006; BORGES et

al., 2001) falhas de transferência de absorção passiva podem ocorrer em situações que haja asfixia neonatal. Batchelder et al. (2007) encontraram em bezerros clonados ao nascimento valores de proteínas totais de 4,1 g/dl e após a ingestão de colostro e administração intravenosa de plasma valores de 7,1 g/dl após 24 horas de vida. O valor ao nascimento observado por Batchelder et al (2007) é semelhante ao encontrado no grupo de animais clonados do presente estudo (4,4 g/dl), porém o valor após 24 horas é superior (5,9 g/dl), provavelmente é decorrente da administração intravenosa de plasma.

A análise dos resultados, apresentados no gráfico 9 mostra que para os teores séricos de albumina existem diferenças estatísticas entre os grupos e tempo. Ao nascimento os teores de albumina são menores dos bezerros clonados ($2,68 \pm 0,12$ g/dL) do que nos bezerros do grupo controle ($2,99 \pm 0,26$ g/dL), sendo que esses valores diminuem nas primeiras 24 horas e atingem valores semelhantes tanto no grupo de bezerros clonados ($2,43 \pm 0,08$ g/dL) como no grupo controle ($2,45 \pm 0,17$ g/dL). .

Os valores de proteína plasmática em bezerros no nascimento são baixos, devido aos teores mínimos das globulinas e da albumina, ocorrendo um rápido aumento da fração globulina com a ingestão do colostro, como resultado da absorção das imunoglobulinas maternas, consequentemente havendo um efeito de diluição nas concentrações de albuminas principalmente nas primeiras 24 horas de vida (ADAMS et al. 1992; BENESI, 1992 e KANEKO, 1997).

Afora essa modificação transitória dos teores de albumina decorrente a ingestão de colostro, observou-se, nas amostras colhidas imediatamente após o nascimento e a partir de 48 horas de vida, que os teores de albumina são significativamente menores no grupo de bezerros clonados em relação ao grupo de bezerros controle. A tendência foi que essa diferença aumentasse até os 30 dias de vida.

A ocorrência de hipoalbuminemia em bezerros clonados imediatamente após o nascimento foi relatado por Batchelder et al. (2007) que observaram as concentrações de albumina plasmática para bezerros clonados da raça Holandesa e Hereford variavam entre 2,0 e 2,5 g/dL e por Brisville et al. (2013) que observaram em 27 bezerros clonados valores médios para albumina iguais a $2,2 \pm 0,2$ g/dL. Hipoalbuminemia imediatamente após o nascimento, também, foi descrita e observada em bezerros holandeses e mestiços de holandês (Costa et al., 2007, Pires Junior et al., 2013).

Os resultados obtidos imediatamente após o nascimento poderiam ser reflexos das disfunções placentárias nos clones, pois foram relatadas na gestação de receptoras de clones diminuição do número de placentônios, presença de placentônios gigantes, presença de

microcotiledones acessórios com diâmetro menor do que 1,0 cm, extensas áreas na membrana corioalantóide desprovidas de placentônios, edema das membranas placentárias, aumento na espessura do cordão umbilical e formação de hidroalantóide (CHAVATTE-PALMER et al., 2002, MIGLINO et al, 2007).

Bezerros recém nascidos originados de transferência de célula somática (clonagem) sofrem frequentemente de síndromes respiratórias (BIRGEL JUNIOR et al., 2011a, MEIRELLES et al., 2010), sendo descrito ocorrência de hipertensão pulmonar persistente em bezerros clonados a partir da transferência nuclear de células somáticas adultas (Chavatte-Palmer et al. 2004). O aumento resistência na rede capilar pulmonar determinada pela hipertensão da artéria pulmonar impede a expansão pulmonar adequada e estão associadas às alterações respiratórias descritas nos clones (BIRGEL JUNIOR et al., 2011a, MEIRELLES et al., 2010).

A albumina, importante proteína sérica, é uma proteína de fase aguda negativa, cuja concentração reduz gradualmente e de forma mais evidente nas doenças inflamatórias crônicas, em razão da síntese preferencial de globulinas e outras proteínas pelos hepatócitos (ECKERSALL 2008).

Pode ocorrer diminuição da concentração sérica de albumina em processos inflamatórios, devido à inibição da sua síntese pelas citocinas pró-inflamatórias (PEREIRA & BURINI, 1992) e ao aumento da permeabilidade vascular, portanto saída para o espaço extravascular (CORRÊA & BURINI, 2000).

Gráfico 9 - Valores séricos de albumina para bezerros clonados e de parto normal aos 30 dias de vida

Fonte: (MARCHESE, 2014).

*Efeito significativo de grupo $P < 0,05$.

A análise dos resultados, apresentados no gráfico 10 mostra que para os teores séricos de globulinas acompanham as variações observadas para a proteína total e existem diferenças estatísticas entre os grupos e tempo, sendo os valores obtidos para bezerros clonados significativamente menores do que os obtidos no grupo controle. O aumento dos teores séricos de globulinas após a mamada de colostro é descrita para bezerros de diversas raças (Perino et al., 1995; Fagliani et al., 1998; Costa et al., 2007; Leal et al., 2003; Rocha et al., 2010) e são decorrentes da absorção intestinal de imunoglobulinas presentes no colostro (TENNANT et al., 1969; BUSH et al., 1971; HUSBAND et al., 1972; RIBEIRO et al., 1983; MACHADO NETO et al., 1986).

Considerando-se os primeiros 30 dias de vida dos animais observou-se que as concentrações séricas de globulinas eram iguais a $3,06 \pm 0,05$ g/dL para bezerros clonados e iguais a $3,61 \pm 0,09$ g/dL para animais de parto normal (Tabela 2), sendo as maiores diferenças entre os grupos observadas entre 24 horas (bezerros clonados $3,35 \pm 0,41$ g/dL; grupo controle $4,73 \pm 1,21$ g/dL) e 48 horas de vida (bezerros clonados $3,30 \pm 0,57$ g/dL; grupo controle $4,61 \pm 1,01$ g/dL).

Gráfico 10 - Valores séricos de globulina para bezerros clonados e de parto normal durante 30 dias de vida

Fonte: (MARCHESE, 2014).

*Efeito significativo de grupo $P < 0,05$.

5.4 LIPIDOGRAMA

A análise dos resultados, apresentados no gráfico 11, mostra que para os teores séricos de colesterol existem diferenças estatísticas entre os grupos e tempo, sendo os valores obtidos para bezerros clonados significativamente menores do que os obtidos no grupo controle. Considerando-se os primeiros 30 dias de vida dos animais observou-se que as concentrações séricas de colesterol eram iguais a $56,31 \pm 2,84$ mg/dL para bezerros clonados e iguais a $74,00 \pm 3,63$ mg/dL para animais de parto normal (Tabela 2).

Gráfico 11 - Valores para colesterol de bezerros clonados e de parto normal durante 30 dias de vida

Fonte: (MARCHESE, 2014).

*Efeito significativo de grupo $P<0,05$.

Apesar de serem menores comparados com os bezerros não clonados nos primeiros 30 dias de vida, os valores séricos de colesterol obtidos na presente pesquisa para os bezerros não clonados e clonados estão dentro de valores considerados como de normalidade e podem ser considerados semelhantes aqueles relatados por Kurz e Willet (1991); Piccione et al. (2010); Silva et al. (2012) e Shannon e Lascelles (1966).

Silva et al. (2012) apresentaram concentrações de colesterol diferentes nas várias fases de crescimento dos bezerros, sendo os menores valores encontrados nos primeiros dias de vida, com o aumento progressivo com o passar dos dias. A influência dos fatores etários, também, foi observada na presente pesquisa.

A diferença entre os grupos estudados (clone e controle) poderiam ser reflexo da dieta dos bezerros e/ ou das variações da quantidade de colostro ingerido nos primeiros momentos de vida. Por ser rico em colesterol, Piccione et al. (2010) relataram aumento significativo do colesterol total da primeira semana de vida até um mês de idade e afirmou que isso se deve ao fato do colostro ser rico em colesterol. Entretanto pesquisa realizada por Gregory et al. (2010) e Kurz & Willet (1991) mostraram que além de aumentar os teores de colesterol a ingestão de colostro determinaria aumento da glicemia e dos triglicérides. Outra possibilidade da menor síntese de colesterol nos bezerros clonados estaria relacionada a distúrbios do seu metabolismo energético. Sabe-se que a acetil-CoA é o principal substrato na formação do

colesterol e que em situações que o organismo está em fosforilação, compromete-se a formação de colesterol (CHILLIARD et al., 2001; CHILLIARD et al., 2005; KANEKO, 2008). Alguns pesquisadores descreveram alterações hormonais em bezerros clonados recém-nascidos caracterizados por aumento dos teores plasmáticos de insulina (Garry et al. 1996) e leptina (Chavatte-Palmer et al. 2004) e diminuição dos teores plasmáticos de tiroxina (Garry et al. 1996; Chavatte-Palmer et al. 2004), triiodotirosina (Garry et al. 1996) e IGF-2 (Chavatte-Palmer et al. 2004) e interpretaram esses achados como sendo um indício de distúrbio na regulação de energia intra-útero responsável pela macrossomia e pelos distúrbios de saúde observados nos clones (Garry et al. 1996).

A análise dos resultados, apresentados no gráfico 12, mostra que para os teores séricos de triglicérides não foram influenciados pelos grupos, sendo os valores obtidos para bezerros clonados ($38,71 \pm 2,79$ mg/dL) similares aos obtidos no grupo controle ($35,18 \pm 1,98$ mg/dL).

Gráfico 12 - Valores séricos de triglicérides durante os 30 dias de vida para bezerros clonados e de parto normal.

Fonte: (MARCHESE, 2014).

Ambos os grupos estudados apresentaram aumento progressivo no decorrer dos 30 dias de vida não diferindo valores entre eles. Este aumento progressivo também foi observado por Paiva et al. (2006), porém observaram valores de até 206,32 mg/dL estando acima ao

observado no presente estudo que alcançou o valor máximo de 77,3 mg/dL nos bezerros clonados.

Haga et al. (2008) em estudo não observaram diferença entre os diferentes grupos de bezerros nas concentrações de triacilglicerol e como neste estudo obteve concentrações progressivos com o passar dos dias de vida. Segundo os autores isto ocorre devido à maior ingestão de triglicerídios pela dieta no decorrer do desenvolvimento dos animais.

A análise dos resultados, apresentados no gráfico 13 mostra que para a glicemia existem diferenças estatísticas entre os grupos e tempo. Ao nascimento a glicemia dos bezerros clonados ($81,42 \pm 63,03$ g/dL) são maiores do que as observadas para o controle ($43,01 \pm 13,30$ g/dL). Diferente do que foi por nós encontrados, relata-se na literatura hipoglicemia em bezerros clonados no momento do nascimento. Batchelder et al. (2007) em estudo com bezerros clonados da raça holandesa e hereford que ao nascimento os bezerros clonados apresentaram em termos médios glicemia igual 39,4 mg/dL., enquanto Brisville et al. (2013) que observaram em amostras colhidas nos primeiros 5 minutos de vida de 27 bezerros clonados glicemia igual a $50,4 \pm 25,2$ mg/dL. Segundo Zaconeta (2004), os neonatos em asfixia perinatal apresentam o quadro de hiperglicemia devida à descarga adrenérgica ou hipoglicemia por depleção das reservas de glicogênio durante a asfixia com glicólise anaeróbia (portanto o aumento do lactato).

A partir de 6 horas de vida existe uma inversão nesse comportamento, ou seja, a glicemia de bezerros clonados foi menor. Os valores de glicemia em amostras colhidas com 12, 24, 72, 96, 120, 168, 360 e 720 horas de vida variou entre $74,36 \pm 18,23$ e $117 \pm 31,32$ mg/dL para bezerros clonados e entre $102,93 \pm 37,27$ e $160,68 \pm 34,97$ mg/dL para bezerros do grupo controle.

Gráfico 13 - Valores de glicose plasmática para bezerros clonados e de parto normal durante 30 dias de vida

Fonte: (MARCHESE, 2014).

*Efeito significativo de grupo $P < 0,05$.

Da mesma forma que o observado na presente pesquisa, foi relatado por Paiva et al., (2006) que os teores plasmáticos de glicose aumentam gradativamente com o passar dos dias de vida e são influenciados pela ingestão do colostro. Kuhne, Hammon e Bruckmaier (2000), observaram bezerros que permanecem com suas mães durante os três primeiros dias de vida apresentam maior glicemia do que bezerros que são separados no nascimento, ou seja, a concentração plasmática de glicose dos bezerros depende diretamente da quantidade ingerida de colostro e da concentração de lactose presente na secreção láctea. Esses fatos poderiam sugerir que a maior glicemia observada nos bezerros do grupo controle estaria relacionada a maior quantidade e melhor eficiência e/ou aproveitamento da lactose ingerida com o colostro / leite.

Por outro, lado desde o início do desenvolvimento da técnica de fertilização “in vitro” de embriões e da clonagem de bovinos e ovinos foi descrita a Síndrome do bezerro gigante (CHAVATTE-PALMER et al., 2006; BATCHELDER et al., 2007). A macrosomia foi observada em 20,9 % (9/43) dos bezerros da raça Nelore, ao passo que 69,8 % (30/43) apresentavam peso dentro da normalidade e 9,3 % (4/43) apresentavam peso significativamente menor do que o esperado para a raça Nelore (MEIRELLES et al, 2010). A

média de peso dos animais da raça Nelore ao nascimento foi de 38 kg, com amplitude de variação entre 14 e 62 kg (MEIRELLES et al., 2010).

Acredita-se que essa síndrome esteja associada a distúrbios do metabolismo de carboidratos na placenta e/ou do feto. Alguns pesquisadores descreveram alterações hormonais em bezerros clonados recém-nascidos caracterizados por aumento dos teores plasmáticos de insulina (GARRY et al. 1996) e leptina (CHAVATTE-PALMER et al. 2004) e diminuição dos teores plasmáticos de tiroxina (GARRY et al. 1996; CHAVATTE-PALMER et al. 2004), triiodotirosina (GARRY et al. 1996) e IGF-2 (CHAVATTE-PALMER et al. 2004) e interpretaram esses achados como sendo um indício de distúrbio na regulação de energia intra-útero responsável pela macrosomia e pelos distúrbios de saúde observados nos clones (GARRY et al. 1996).

Associado a essa síndrome observa-se em 23,0 % dos bezerros clonados hipoglicemia e/ou distúrbios de termoregulação nas primeiras 24 horas de vida (MEIRELLES et al. 2010, BIRGEL JUNIOR et al, 2010b, BIRGEL JUNIOR et al, 2011a). Esses distúrbios podem estar relacionados à macrosomia (síndrome do bezerro grande), mimetizando quadro da diabetes gestacional da mulher ou estar relacionado ao consumo das reservas de glicogênio hepático decorrentes a hipóxia durante a vida intra-uterina e perinatal, predispondo os animais a hipoglicemia / hipotermia (BIRGEL JUNIOR et al, 2011a).

A análise dos resultados, apresentados no gráfico 14 mostra que para os teores plasmáticos de lactato existem diferenças estatísticas entre os grupos e tempo. No presente estudo observou-se que imediatamente após o nascimento, as 12 e 24 horas de vida os teores plasmáticos de lactato em bezerros clonados (respectivamente iguais a $64,10 \pm 21,98$ mg/dL; $50,70 \pm 15,17$ mg/dL; $38,00 \pm 12,81$ mg/dL) eram significativamente maiores do que os observados no grupo de bezerros do grupo controle ($33,90 \pm 16,63$ mg/dL; $38,1 \pm 9,74$ mg/dL; $27,94 \pm 6,75$ mg/dL).

Segundo Steinhardt et al. (1995), altas concentrações de lactato, principalmente após o parto são consequência da hipóxia e refletem a intensa metabolização das reservas energéticas dos bezerros causada, em parte, pelo aumento da atividade simpática devido ao estresse adaptativo do nascimento.

Os elevados teores de lactato observados em bezerros clonados imediatamente após o nascimento pode ser, também, indicativo de hipóxia durante a vida intrauterina, pois em fetos humanos observou-se o aumento de teores plasmáticos de lactato em gestações complicadas nas quais os bebês estavam em situação de hipóxia crônica. É sabido, ainda, que a hipóxia prolongada em neonatos humanos acarreta mudanças nos níveis circulantes de glicose e

cortisol sérico, reduz o metabolismo da termorregulação e causa danos ao sistema nervoso central e simpático dos recém-nascidos (BELLOWS; LAMMOGLIA, 2000).

Após as primeiras 6 horas as concentrações de lactato dos bezerros clonados diminuem devido à utilização da oxigenioterapia e medidas terapêuticas com uso de surfactantes, aminofilina e drogas inibidoras das fosfodiesterases como o sildenafil. Entretanto, com o evoluir da idade, entre 12 e 24 horas de vida observa-se um aumento dos teores de lactato em relação ao grupo controle. Esse aumento provavelmente está relacionado à piora do quadro respiratório, na qual o aumento resistência na rede capilar pulmonar determinada pela hipertensão da artéria pulmonar (Kishi et al. 2000; Cibelli et al. 2002) impede a expansão pulmonar adequada e determinam síndromes respiratórias descritas nos clones (SANTOS 2010; BIRGEL JUNIOR et al., 2011a).

Gráfico 14 - Valores séricos de lactato observado em bezerros clonados e de parto normal durante os 30 dias de vida

Fonte: (MARCHESE, 2014).

*Efeito significativo de grupo $P<0,05$.

5.5 MINERAIS

A análise dos resultados, apresentados no gráfico 15 mostra que para os teores séricos de cálcio existem diferenças estatísticas entre os grupos e tempo. Os teores séricos de cálcio observados para bezerros clonados foram maiores até as 48 horas de vida em relação aos não clonados, a partir de 72 horas de vida observa-se inversão dos valores séricos de cálcio entre os animais clonados e não clonados. Apesar das concentrações de cálcio sérico observada no presente estudo ser diferente entre bezerros clonados e não clonados nos primeiros 30 dias de vida, verificou-se que os valores de ambos os grupos encontram-se dentro da normalidade referidos na literatura (Moraes, 2011; Rocha et al., 2009). Batchelder et al. (2007) em estudo com bezerros clonados da raça holandesa e hereford não observaram diferenças nos teores séricos de cálcio nas primeiras 50 horas de vida e Brisville et al. (2013), em amostras colhidas nos primeiro 5 minutos de vida de 27 bezerros clonados, obtiveram teores sérico de cálcio iguais a $12,8 \pm 0,8$ mg/dL.

Entre 48 e 120 horas de vida, para ambos os grupos, observou-se um aumento dos teores séricos de cálcio, a partir desse momento observa-se que os teores de cálcio diminuem progressivamente até 30 dias de vida. Segundo Doornenbal, Tong e Murray (1988) e Egli e Blum (1998) os valores de cálcio sérico apresentam redução progressiva do nascimento até seu primeiro ano de vida, pois a um grande requerimento deste mineral para ativação do metabolismo e crescimento. Segundo Haldar et al. (1995) as concentrações séricas de cálcio e fósforo em bezerros estão relacionadas diretamente a atividade osteoblástica no desenvolvimento ósseo durante o processo de crescimento.

O cálcio existe em duas formas, livre ionizado e associado a moléculas orgânicas, principalmente a albumina, estas formas se mantêm em equilíbrio e a distribuição depende do pH, concentração de albumina e relação ácido-base. As suas variações dependem do controle endócrino, envolvendo a vitamina D3, o paratormônio e a calcitonina, por exemplo, em situações de acidoses há aumento da forma ionizada e a diminuição dos teores séricos de albumina gera diminuição do valor do cálcio sanguíneo (GONZÁLEZ, 2003). Esse fato pode ser observado por Delfino et al. (2014) em bezerros da raça Senepol, nos quais a diminuição de cálcio sérico estava associado à hipoalbuminemia. Rizzoli et al. (2006) verificaram que o fornecimento de colostro em mamadeira ou diretamente da vaca não influencia a calcemia e fosfatemia nos primeiros 30 dias de vida e

Gráfico 15 - Valores séricos de cálcio para bezerros clonados e de parto normal, durante 30 dias de vida

Fonte: (MARCHESE, 2014).

*Efeito significativo de grupo $P < 0,05$.

A análise dos resultados, apresentados no gráfico 16 mostra que para os teores séricos de fósforo existem diferenças estatísticas entre os grupos e tempo. Os teores séricos de fósforo observados para bezerros clonados entre 12 e 48 horas de vida e entre 480 e 720 horas de vida foram maiores do que os observados no grupo de bezerros controle. Apesar das diferenças nas concentrações de fósforo sérico entre bezerros clonados e não clonados observada no presente estudo, verificou-se que os valores de ambos os grupos encontram-se dentro da normalidade referidos na literatura (Moraes, 2011; Rocha et al., 2009). Batchelder et al. (2007) em estudo com bezerros clonados da raça holandesa e hereford não observaram diferenças nos teores séricos de fósforo nas primeiras 50 horas de vida e Brisville et al. (2013), em amostras colhidas nos primeiro 5 minutos de vida de 27 bezerros clonados, obtiveram teores sérico de fósforo iguais a $6,8 \pm 0,6$ mg/dL.

Moraes (2011) e Rocha et al. (2004) observaram em estudo com bezerros recém-nascidos um aumento progressivo nas concentrações séricas a partir do nascimento. Fato este que foi observado no presente estudo até 30 dias de vida dos animais estudados. Segundo Rosol e Capen (1997), a maior concentração sérica de fósforo em bezerros, em comparação com bovinos adultos, se deve à ação do hormônio do crescimento, que possui alta atividade em animais jovens e que aumenta a reabsorção renal de fosfato.

Gráfico 16 - Valores sérios de fósforo para bezerros clonados e de parto normal durante 30 dias de vida

Fonte: (MARCHESE, 2014).

*Efeito significativo de grupo $P<0,05$.

6 CONCLUSÃO

Apesar de bezerros clonados da raça Nelore apresentaram perfil bioquímico dentro dos valores fisiológicos descritos na literatura observou-se importantes e significativas diferenças no seu metabolismo, principalmente, na primeira semana de vida .

Ao comparar-se o perfil bioquímico de bezerros clonados da raça nelore com bezerros nelores a termos observou-se, ao nascimento, que os bezerros clonados tem distúrbios do seu metabolismo energético representados por hipoglicemia , menores teores de colesterol e menores teores séricos de creatinina.

Verificou-se que os bezerros clonados são frequentemente vítimas de falhas de absorção passiva de imunoglobulinas, pois os teores de globulinas e GGT são menores do que os observados em bezerros do grupo controle.

As variações observadas no comportamento da CK e da AST estão associadas a menor atividade muscular decorrente a falhas na adaptação neonatal e subsequente prostração e letargia observada nos bezerros clonados.

As variações observadas no comportamento de enzimas hepáticas como a GGT e FA estão relacionadas a falhas na transferência da imunidade passiva, decorrentes a menor ingestão de colostro nos bezerros clonados.

Os resultados obtidos não permitem supor a existência de hepatopatias ou alterações na função hepática dos bezerros clonados, pois a atividade enzimática da AST, GGT e FA foram sempre menores do que as observadas em bezerros controle e dentro dos valores de referência encontrados na literatura.

A avaliação da função renal não indica a existência de nefropatias ao nascimento ou durante o primeiro mês de vida.

REFERÊNCIA

- ADAMS, R.; GARRY, F. B. Physiologic differences between twin and single born beef calves in the first two days of life. **Cornell Veterinarian**, v. 83, n. 1, p. 13-29, 1993.
- ADAMS, R.; GARRY, F. B.; ALDRIDGE, B. M.; HOLLAND, M. D.; ODDE, K. G. Hematologic values in newborn beef calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 6, p. 944-950, 1992.
- ANDERSON, P. H.; BERRETT, S.; PATTERSON, D. S. P. The significance of elevated plasma creatine phosphokinase active in muscle disease of cattle. **Journal Comparative Pathology**, v. 86, n. 4, p. 531-538, 1976.
- APERIA, A.; BROBERGER, O.; HERIN, P.; JOELSSON, I. Renal hemodynamics in the perinatal period: a study in lambs. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 99, n. 3, p. 99-261, 1977.
- ALLAIN, C. C.; POON, L. S.; CHAN, C. S. G.; RICHMOND, W.; FU, P. C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemistry**, v. 20, p. 470-475, 1974.
- BACILA, M. **Bioquímica veterinária**. 2.ed. São Paulo: Robe, 2003. 583p.
- BAGUISI, A.; BEHBOODI, E.; MELICAN, D. T.; POLLOCK, J. S.; DESTREMPES, M. M.; CAMMUSO, C.; WILLIAMS, J. L.; NIMS, S. D.; PORTER, C. A.; MIDURA, P.; PALACIOS, M. J.; AYRES, S. L.; DENNISTON, R. S.; HAYES, M. L.; ZIOMEK, C. A.; MEADE H, M.; GODKE, R. A.; GAVIN, W. G.; OVERSTROM, E. W.; ECHELARD, Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. **Nature Biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 456-461, 1999.
- BARHAM, D.; TRINDER, P. An improved color reagent for the determination of blood glucose by the oxadase system. **Analyst**, v. 97, p. 142-145, 1972.
- BATCHELDER, C. A.; BERTOLINI, M.; MASON, J. B.; MOYER, A. L.; HOFFERT, K. A.; PETKOV, S. G.; FAMULA, T. R.; ANGELOS, J.; GEORGE, L. W.; ANDERSON, G. B. Perinatal physiology in cloned and normal calves: hematological and biochemical profiles. **Cloning Stem Cells**, v. 9, n. 1, p. 83-96, 2007.
- BELLOWS, R. A.; LAMMOGLIA, M. A. Effects of severity of dystocia on cold tolerance and serum concentrations of glucose and cortisol in neonatal beef calves. **Theriogenology**, v. 53, n. 3, p. 803-813, 2000.
- BENESI, F. J. **Hematologia de bezerros recém nascidos, Influência da asfixia neonatal, do tipo de parto e da ingestão de colostro sobre a crase sanguínea**; tese (livre-docência) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; Universidade de São Paulo; São Paulo; 1992.
- BENESI, F.J. Síndrome asfixia neonatal dos bezerros: importância e avaliação crítica. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia**, v. 16, p. 38-48, 1993.

BENESI, F. J.; LEAL, M. L. R.; LISBOA, J.A. N; COELHO, S.C.; MIRANDOLA, R.M.S.; Parâmetros bioquímicos para avaliação da função hepática em bezerras sadias, da raça holandesa, no primeiro mês de vida. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 311-317, mar.-abr., 2002.

BENESI, F. J.; COELHO, C. S.; LEAL, M. L. R.; MIRANDOLA, R. M. S.; LISBOA, J. A. N. Parâmetros bioquímicos para avaliação da função renal e do equilíbrio hidroeletrólítico em bezerras sadias, da raça Holandesa, no primeiro mês de vida. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science** v. 42, n. 4, p. 291-298, 2005

BETTHAUSER, J.; FORSBERG, E.; AUGESTEIN, M.; CHILDS, L.; EILERTSEN, K.; ENOS, J.; FORSYTHE, T.; GOLUEKE, P.; JURGELLA, G.; KOPPANG, R.; LESMEISTER, T.; MALLON, K.; MELL, G.; MISICA, P.; PACE, M.; PFISTER-GENSKOW, M.; STRELCHENKO, N.; VOELKER, G.; WATT, S.; THOMPSON, N.; BISHOP, M. Production of cloned pigs from in vitro systems. **Nature Biotechnology**. v. 18, p. 1055-1059, 2000.

BIRGEL, E. H. **Hämatologische Untersuchungen bei Kälbern der Rasse “Deutsches Schwarzbuntes Rind” in den ersten 14 Lebenstagen**. Tese de Doutorado em Ginecologia e Obstetricia, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover. 89 p.. 1972.

BIRGEL JUNIOR, E. H.; MEIRELLES, F.V.; MAJORKA, P.C.; KUBRUSLY, F.S.; OLLHOF, R.D. Medicina interna de bezerros clonados: distúrbios clínicos observados nos primeiros 30 dias de vida. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 9, n. 1, p. 24-31, 2011a.

BIRGEL JUNIOR, E. H., MEIRELLES, F. V.; KOMNINOU, E. R.; NUNES, M. T.; POGLIANI, F. C.; FANTINATO NETO, P.; YASUOKA, M.M.; PIMENTEL, J. R. V.; KUBRUSLY, F. S.; MIGLINO, M.A. Distúrbios clínicos observados nos primeiros 30 dias de vida de bezerros clonados da raça Nelore. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, p. 243-252, 2011b. Supplement 1.

BISWAL, B.; BANDETTINI, P. A.; JESMANOWICZ, A.; HYDE, J. S. Time-frequency analysis of function EPI time-course series. In: **Annual Meeting of the Society of Magnetic Resonance in Medicine**, 12., 1993. **Proceedings...** New York: Society of Magnetic Resonance in Medicine, 1993. p. 722.

BRISVILLE, A. C.; FECTEAU, G.; BOYSEN, S.; DESROCHERS, A.; DORVAL, P.; BUCZINSKI, S.; LEFEBVRE, R.; HELIE, P.; BLONDIN, P.; SMITH, L. C. Neonatal morbidity and mortality of calves derived from somatic cloning. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 27, p. 1218-1227, 2013.

BORGES, A. S., FEITOSA, F. L. F., BENESI, F. J. Influência da forma de administração e da quantidade fornecida de colostro sobre a concentração de proteína total e de suas frações eletroforéticas no soro sanguíneo de bezerros da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 629-634, 2001.

BOYD, J. W. Serum enzyme changes in newborn calves fed colostrum. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 18, n. 2, p. 47-51, 1989.

BUSH, L. J.; AGHILERA, M. A.; ADAMS, G. D. Absorption of colostral immunoglobulins by newborn dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 54, n. 10, p. 1547-1549, Oct. 1971.

BLUM, J. W.; HADORN, U.; SALLMANN, H. P. Delaying colostrum intake by one day impairs the plasma lipid, essential fat acid, carotene, retinol and I-tocopherol status in neonatal calves. **Journal of Nutrition**, v.127, p.2024-2029, 1997.

BRUSS, M. L. Lipids and Ketones. In: KANEKO J. J. HARVEY, J. W.; BRUSS, L. M. **Clinical biochemistry of domestic animal**; 5 ed. New York: Elsevier, 1997. cap.4, p.81-115.

BUCZINSKI, S.; FECTEAU, G.; COMEAU, G.; BOYSEN, S. R.; LEFEBVRE, R. C.; SMITH, L. C. Ultrasonographic fetal well – being assessment, neonatal and postpartum findings of cloned pregnancies in cattle: a preliminary study on 10 fetuses and calves. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 50; p. 261-269, 2009.

CABELLO, G.; LEVIEUX, D. The effects of thyroxine and climatic factors on colostral gammaglobulin absorption in newborn calves. **Annales de Recherches Veterinaires**, v. 9, n. 2, p. 309-318, 1978.

CAMPBELL, K. H.; MCWHIR, J.; RITCHIEW, W. A.; WILMUT, I. Sheep cloned by nuclear transfer from a culture cell line. **Nature**, v. 380, n. 6569, p. 64-66, 1996.

CERÓN, J. J.; ECKERSALL, P. D.; MARTINEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, p. 85-99, 2005.

CHAVATTE-PALMER, P.; HEYMAN, Y.; RICHARD, C.; MONGET, P.; LE BOURHIS, D.; KANN, G.; CHILLIARD, Y.; VIGNON, X.; RENARD, J. P. Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei somatic cells. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1596-1603, 2002.

CHAVATTE-PALMER, P.; REMY, D.; CORDONNIER, N.; RICHARD, C.; ISSENMAN, H.; LAIGRE, P.; HEYMAN, Y.; MIALOT, J. P. Health status of cloned cattle at different ages. **Cloning Stem Cells**, v. 6, n.6, p. 94 - 100, 2004.

CHAVATE-PALMER, P.; SOUZA, N.; LAIGRE, P.; CAMOUS, S.; PONTER, A. A.; BEKERS, J. F.; HEYMAN, Y. Ultrasound fetal measurements and pregnancy associated glycoprotein secretion in early pregnancy in cattle recipients carrying somatic clones. **Theriogenology**, v. 66, p. 829-840, 2006.

CHAVATE-PALMER, P.; GUILLOMOT, M. ; ROIZ, J. ; HEYMAN, Y. ; LAIGRE, P. ;SERVELY, J. L. ; CONSTANT, F. ; HUE, I. ; ELLIS, S. A. Placental expression of major histocompatibility complex class I in bovine somatic clones. **Cloning and Stem Cells**, v. 9, n. 3, p. 346-356, 2007.

CIBELLI J. B.; STICE S. L.; GOLUEKE P. J.; KANE, J. J.; JERRY, J.; BLACKWELL, C.; PONCE DE LEON, F. A.; ROBL, J. L.; Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. **Science**, v. 280, p. 1256-1258, 1998.

COELHO, C.S. **Avaliação da função renal, do metabolismo ósseo e do equilíbrio hidroeletrólítico em bezerras sadias, da raça Holandesa, no primeiro mês de vida:**

influencia do fator etário. 2002. 125f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

COLES, E. H. **Patologia clínica veterinária.** 3. ed. Barueri: Manole, 1984. 486-566 p.

COSTA, J. N.; PEIXOTO, A. P. C.; KOHAYAGAWA, A.; SOUZA, T. S. Proteinograma sérico de bezerras da raça Holandesa do nascimento aos 150 dias de idade. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 4, p. 267-275, out/dez, 2007.

CORRÊA, C. R.; BURINI, R. C. Proteínas plasmáticas positivas à fase aguda. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 36, p. 48-56, 2000.

CUNNINGHAM, J.G.; **Tratado de fisiologia veterinária**, 3. ed. São Paulo, Guanabara Koogan, 2008.

CURTIS, C. R.; ERB, H. N.; SNIFFEN, C. J.; SMITH, R. D.; POWER, P. A.; SMITH, M. C.; WHITE, M. E.; HILLMAN, R. B.; PEARSON, E. J. Association of parturient hypocalcemia with eight periparturient disorders in Holstein cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 183, n. 5, p. 559-561, 1983

CURTIS, C. R.; ERB, H. N.; SNIFFEN, C. J. Pathanalysis of dry period nutrition, postpartum metabolic and reproductive disorders, and mastitis in Holstein cows, **Journal Dairy Science**, v.68, n.9, p. 2347-2360, 1985.

CHILLIARD, Y.; BONNET, M.; DELAVAUD, C.; FAULCONNIER, Y.; LEROUX, C.; DJIANE, J.; BOCQUIER, F. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 21, p. 271-295, 2001.

CHILLIARD, Y.; DELAVAUD, C.; BONNET, M. Review: leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 3-22, 2005.

DELFINO, J. L.; BARBOSA, V. M.; GONDIM, C. C.; OLIVEIRA, P. M.; NASCIUTTI, N. R.; OLIVEIRA, R. S. B. R.; TSURUTA, S. A.; MUNDIM, A. V.; SAUT, J. P. E. Perfil bioquímico sérico de bezerros senepol nos primeiros 120 dias de idade. **Semina Ciências Agrárias**, v. 35, n. 3, p. 1341-1350, maio/jun. 2014.

DOORNENBAL, H.; TONG, H. K. W.; MURRAY, N. L. Reference values of blood parameters in beef cattle of different ages and stages of lactation. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 52, n.1, p.99-105, 1988.

DOUMAS, B. T.; BIGGS, H. G.; WATSON, W. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. **Clinica Chimica Acta**, v. 31, p. 87-96, 1971.

DONKIN, S. S.; ARMENTANDO, L. E. Insulin and glucagon regulation of gluconeogenesis in preruminant and ruminant bovine. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 546-551, 1995.

EGLI, C. P.; BLUM, J. W. Clinical, haematological, metabolic and endocrine traits during the first three months of life of suckling Simmental calves held in a cow-calf operation. **Journal of Veterinary Medicine A**, v. 45, p. 99-118, 1998.

EDWARDS, J. L.; SCHRICK, F. N.; MCCracken, M.; AMSTEL VAN D.; HOPKINS, F.M.; WELBORN, M. G.; DAVIES, C. J. Cloning adult farm animals: a review of the possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 50, n. 2, p. 113-123, 2003.

ECKERSALL, P. D.; CONNER, J. G. Bovine and canine acute phase proteins. **Veterinary Research Communications**, v. 12, p. 169-178, 1988.

FAGLIARI, J. J.; OLIVEIRA, E. C.; PEGORER, M. F.; FERRANTE JUNIOR, L. C.; CAMPOS FILHO, E. Relação entre o nível sérico de gamaglobulinas e as atividades de gamaglutamiltransferase, fosfatase alcalina e aspartato aminotransferase de bezerro recém-nascidos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 48, n. 2, p. 105-112, 1996.

FAGLIARI, J. J.; SANTANA, A. E.; LUCAS, F. A.; CAMPOS FILHO, E.; CURI, P. R. Constituintes sanguíneos de bovinos lactentes, desmamados e adultos das raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*) e de bubalinos (*Bos bubalis*) da raça Murrah. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 3, p. 263-271, 1998.

FAGLIARI, J. J.; RIZOLLI, F. W.; SILVA, S. L. Proteinograma sérico de bezerros recém-nascidos da raça Holandesa obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 450-453, 2006.

FEITOSA, F. L. F. **Dinâmica do proteinograma e da atividade da gamaglutamiltransferase no soro sanguíneo de bezerros desde o nascimento até um ano de vida e de vacas antes e após o parto da raça Holandesa**. 1998. 219 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

FEITOSA, F.L.F. BIRGEL, E. H.; MENDES, L. C. M.; PERRI, S. H. V. Relação entre a concentração de imunoglobulinas colostrais e a transferência de imunidade passiva para bezerros da raça Holandesa após ingestão voluntária de colostro. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.2, n.3, p.160-168, 1999.

FEITOSA, F. L. F.; PEIRÓ, J. R.; MENDES, L. C. N.; CADIOLI, F. A. CAMARGO, D. G.; YANAKA, R.; BOVINO, F.; PERRI, S. H. V. Determinação do perfil bioquímico hepático sérico de bezerros holandeses e mestiços, na região de Araçatuba/SP. **Ciência Animal Brasileira**, p. 772-777, 2009. Suplemento 1. Trabalho apresentado a 8. Congresso Brasileiro de Buiatria, Belo Horizonte, 2009.

FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clinical Chemistry**, v. 28, p. 2077-2080, 1982

GASPARELLI, E. R. F. **Determinação da atividade sérica de enzimas hepáticas e da concentração de uréia e creatinina, cortisol e imunoglobulina G e dos valores hemogasométricos de bezerros da raça Nelore oriundos de fertilização in vivo (FV) e**

fertilização in vitro (FIV). 2007. 73f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, da Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2007.

GASPARELLI, E. F.; CAMARGO, D. G.; YANAKA, R.; FÉRES, F. C.; VIEIRA, R. F. C.; PERRI, S. H. V.; CIARLINI, P. C.; FEITOSA, F. L. F. Influência do tipo de parto nos valores das enzimas hepáticas e de uréia e creatinina de bezerros Nelore oriundos de fertilização *in vitro* (FIV) e *in vivo* (FV) ao nascimento e às 24 horas de vida. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 2, p. 360-389, 2008.

GARRY, F. B.; ADAMS, R.; MCCANN, J. P.; ODDE, K. G. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. **Theriogenology**, v. 45, p. 142-152, 1996.

GONZALEZ, F. H. D., BARCELLOS J., PATIÑO, H. O., RIBEIRO, L. A., **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais.** Porto Alegre: UFRGS, 2000. p. 108; 2000.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SCHEFFER, J. F. S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica metabólica e nutricional. Avaliação metabólito-nutricional de vacas leiteiras por meio de fluidos corporais (sangue, leite e urina) In: CONGRESSO NACIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29., 2002, Gramado,RS, Brasil. **Anais...** Gramado,RS: SBMV E SOVERGS, 2002. p. 5-17.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SCHEFFER, J. F. S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: CONGRESSO NACIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29., 2002, Gramado. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2002.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SCHEFFER, J.; Perfil sanguíneo : ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: SIMPÓSIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA DA REGIÃO SUL DO BRASIL, 1., 2003. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2003. P. 73-89.

GONZÁLEZ, F. H. D; SILVA, S. C. **Introdução a bioquímica clínica veterinária.** 2. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2006. 358 p.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 177, p. 751-766, 1949.

GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987.

GREGORY, L.; BIRGEL JÚNIOR, E. H.; D'ANGELINO, F. J.; BENESI, F. J. ; BIRGEL, E. H. Valores de referência dos teores séricos da uréia e creatinina em bovinos da raça Jersey criados no Estado de São Paulo: influência dos fatores etários, sexuais e da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, n. 3, p. 339-345, 2004

GREGORY, L. BARDESE, C. B.; BIRGEL JR, E. H.; MEIRA JR. E. B. S.; PIVA, F. M.; HASEGAWA, M. Y. Lipidograma e glicemia de caprinos da raça Saanen, durante os primeiros dias de vida. **ARS Veterinária**, v. 25, n. 3, p.109-115, 2009.

HAGA, S.; FUJIMOTO, S.; YONEZAWA, T.; YOSHIOKA, K.; SHINGU, H.; KOBAYASHI, Y.; TAKAHASHI, T.; OTANI, Y.; KATOH, K.; OBARA, Y. Changes in

hepatic key enzymes of dairy calves in early weaning production systems. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 8, p. 3156-3164, 2008.

HENRY, R. J. **Clinical chemistry, principles and technics**, 2. ed. New York: Harper and Row, 1974. 525 p.

HERDT, T. H. Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, v. 16, n. 2, p. 215-230, 2000.

HEYMAN Y. Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, p. 353-361, 2005.

HILL, J. R.; ROUSSEL, A. J.; CIBELLI, J. B.; EDWARDS, J. F.; HOOPER, N. L.; MILLER, M. W.; THOMPSON, J. A.; LOONEY, C. R.; WETSHUSIN, M. E.; ROBL, J. M.; STICE, S. L. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). **Theriogenology**, v. 51, p. 1451-1465, 1999.

HILL, J. R.; BURGHARDT, R. C.; JONES, K.; LONG, C. R.; LOONEY, C. R.; SHIN, T.; SPENCER, T. E.; THOMPSON, J. A.; WINGER, Q. A.; WESTHUSIN, M. E. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuse. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1787-1794, 2000.

HILL, J. A. G.; COSTA, D. W.; CASTRO, M. E. F.; HARTMANN, W.; BENESI, J. F.; Proteína total, proteinograma eletroforético e gamaglutamiltransferase de bezerras com 30 horas de vida no município de Campo largo, Paraná. **Revista Acadêmica**, v. 5, n. 3, p. 295-301, jul./set. 2007.

HUSBAND, A. J.; BRANDON, M. R.; LASCELLES, A. K. Absorption and endogenous production of immunoglobulins in calves. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v. 50, p. 491-498, Sept. 1972.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.

JAIN, N. Hematologic characteristics of anemia: Interpretive aspects. **Californian Veterinarian**, v. 2, pt. 2, p. 15-18, 1989

JAIN, S.; GAUTAM, V.; NASEEM, S. Acute-phase proteins: as diagnostic tool. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 3, p.118-127, 2011.

JENKINS, S. J.; GREEN, S. A.; CLARK, P. A. Clinical chemistry reference values of normal domestic animals in various age groups: as determined on the ABA-100. **Cornell Veterinarian**, v. 72, p. 403-415, 1982.

KANEKO, J. J; HARVEY, I.W; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animal**. 5.ed. San Diego: Academic Press, 1997a. 932p.

KANEKO, J. J. Serum proteins and the dysproteinemias. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997b. p. 117-138.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 2008a. 932p.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 7. ed. San Diego: Academic Press, 2008b. 912 p

KISHI, K.; PETERSEN, S.; PETERSEN, C.; HUNTER, N.; MASON, K.; MASFERRER, J. L.; TOFILON P. J.; MILAS, L. Preferential enhancement of tumor radioresponse by a cyclooxygenase-2 inhibitor. **Cancer Research**, v. 60, p. 1326–1331, 2000.

KOHAN-GHADR, H. R.; LEFEBVRE, R. C.; FECTEAU, G.; SMITH, L. C.; MURPHY, B. D.; SUZUKI JUNIOR, J.; GIRARD, C.; HÉLIE, P. Ultrasonographic and histological characterization of the placenta of somatic nuclear transfer-derived pregnancies in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 69, p. 218-230, 2008.

KOMNINOU, E. R. **Contribuição ao estudo da hematologia de bezerros da raça Nelore, originados por meio da técnica de transferência nuclear de células somáticas (TNCS) - Clonagem**. 2008. 145 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo - 2008.

KUHNE, S.; HAMMON, H. M.; BRUCKMAIER, R. M. Growth performance, metabolic and endocrine traits, and intestinal absorptive capacity in neonatal calves fed either colostrum or milk replacer at low and high intensities. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 3, p. 609-620, 2000.

KURZ, M. M.; WILLETT, L. B. Carbohydrate, enzyme and hematology dynamics in newborn calves. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 7, p. 2109-2118, 1991.

KRAMER, J. W.; HOFFMANN, W. E. Clinical enzymology. IN: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Ed.) **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5.ed. San Diego: Academic Press, 1997. cap.12, p. 303-325.

KNOWLES, T. G., EDWARDS J. E., BAZELEY K. J., BROWN S. N., BUTTERWORTH A.; WARRISS, P. D. Changes in the blood biochemical and haematological profile of neonatal calves with age. **Veterinary Record**, v. 147 n. 21 p. 593-598, 2000.

LANZA, R. P.; CIBELLI, J. B.; FABER, D.; SWEENEY R. W.; HENDERSON, B.; NEVALA, W.; WEST, M. D.; WETTSTEIN, P. J. Cloned cattle can be healthy and normal. **Science**, v. 294, p. 1893-1894, 2001.

LEAL, M. L. R.; BENESI, F. J.; LISBÔA, J. A. N.; COELHO, C. S.; MIRANDOLA, R. M. S. Proteinograma sérico de bezerras sadias da raça holandesa, no primeiro mês pós-nascimento. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 2, p. 138-145, 2003.

LEE, B. C.; KIM, M .K.; JANG, G.; OH, H. O.; YUDA, F.; KIM, J. J.; KANG, S. H.; SCHATTEN, G.; HWANG, W. S. Dogs cloned from adult somatic cell. **Nature**, v. 436, n 7051, p. 641, 2005.

LEBLANC, S. J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 9, p. 2223-2236, 2002.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1993. p. 725.

LUPKE, H.; MULLING, M.; SOHN, E. Investigations of materno fetal correlations of cattle: the content of total nitrogen, urea, uric acid and creatinine of the amniotic and allantoic fluid. **Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift**, v. 80, p. 449-450, 1967.

MACHADO NETO, R.; PACKER, I. U.; SUSIN, I. Concentração de imunoglobulina sérica, peso corporal e diarreia em bezerros da raça holandesa aleitados com diferentes dietas. **Turrialba**, v. 39, n. 1, p. 51-55, Mar. 1989.

MADEROVA, V.; NEUMAN, V.; KOZUMPLIK, F. Development of serum transaminase activity in very young calves. **Sborn Vyz SK Zemeldelsk Brno**, n. 11, p. 187-188, 1963.

MARUTA, C. A. **Perfil metabólico e ruminal de garrotes submetidos às condições de alimentação normal, jejum e realimentação**. 2005. 93 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MATSUZAKI, M.; SHIGA, K. Endocrine characteristics of cloned calves. **Cloning Stem Cells**, v. 4, p. 261-267, 2002.

MEIRELLES F.V., PROVIDELO F.D., PERECIN F., MERIGHE G.K.F., FERREIRA C.R., FERRAZ J.B.S., ELER J.P., MIRANDA M.S., CHIARATTI M.R., DE BEM T.H.C., Transferência de núcleo: potenciais aplicações no controle genético nuclear e citoplasmático. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p.382-390, jul./set. 2007.

MEIRELLES, F. V.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; PERECIN F.; BERTOLINI, M.; TRALDI, A. S.; PIMENTEL, J. R. V.; KOMNINOU, E. R.; SANGALI, J. R.; FANTINATO NETO, P.; NUNES, M. T.; POGLIANI, F. C.; MEIRELLES, F. D. P.; KUBRUSLY, F. S.; VANNUCCHI, C. I.; SILVA, L. C. G. Delivery of cloned offspring: experience in Zebu cattle (*Bos indicus*). **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 1 p. 88-97, 2010.

MENDONÇA, A. J. **Avaliação hematológica, bioquímica e hemostática de bezerros Brahman provenientes de produção in vitro (PIV) e bezerros Brahman de produção in vivo**. 2007. 107f. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

MEYER, D. J.; HARVEY, J. W. **Veterinary laboratory medicine: interpretation & diagnosis**. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 2004. 351p.

MIGLINO M.A., PEREIRA F.T.V., VISINTIN J.A., GARCIA J.M., MEIRELLES F.V., RUMPF R., AMBRÓSIO C.E., PAPA P.C., SANTOS T.C., CARVALHO A.F., LEISER R. & CARTER A.M. 2007. Placentation in cloned cattle: structure and microvascular architecture. **Theriogenology**, v. 68, p. 604-617, 2007.

MOHRI, M., SHARIFI, K.; EIDI, S. Hematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: age related changes and comparison with blood composition in adults. **Research in Veterinary Science**, v. 83, p. 30-39, 2007.

MORAES, D. V. **Perfil bioquímico sérico de bezerros mestiços durante o primeiro ano de vida**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2001

MORAIS, M. G.; RANGEL, J. M.; MADUREIRA, J. S.; SILVEIRA, A. C. Variação sazonal da bioquímica clínica de vacas aneloras sob pastejo contínuo de *Brachiaria decumbens*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 2, p.98-104, 2000.

MUNDIM, A. V. **Perfil bioquímico sérico em potros Bretão Posteir e cães Doberman em fase de crescimento e de cabras Saanen nos diferentes estádios de lactação**. 75 p. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) – Instituto Genético e Bioquímico. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2008.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper's Illustrated Biochemistry**. 26 ed. New York: McGraw-Hill Companies, 2003. p. 693.

NAOUM, P. C. **Eletroforese: técnicas e diagnósticos**. 2. ed. São Paulo: Livraria Santos Editora, 1999. 212 p.

NAYLOR, J.M.; KRONFELD, D.S. Refractometry as a measure of the immunoglobulin status of the newborn dairy calf. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.171, p.1331-1334, 1977.

NEVES, J. R.; MIRANDA K. L.; TORTORELLA R. D.; Processo científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 414-421, 2010 (suplemento Especial).

NUNES, M. T. **O uso da cardiocografia como método de diagnóstico da ocorrência de sofrimento fetal (hipóxia fetal) durante a vida intrauterina de fetos da raça Nelore originados por meio da técnica de transferência nuclear de células somáticas adultas – Clonagem**. 2009. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo. São Paulo.

PAIVA, F. A.; NEGRÃO, J. A.; BUENO, A. R.; SARAN-NETTO, A.; LIMA, C. Efeito do manejo de fornecimento de colostro na imunidade passiva, cortisol e metabólitos plasmáticos de bezerros Holandeses. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 739-743, 2006.

PAES, P. R. O. **A influência do desmame, do transporte rodoviário e da contenção em tronco, na etiologia, hematologia e bioquímica clínica de bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*)**. 2005. 124f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005

PARANACE, M.; AGUËRO, J. I.; GARROTE, M.; JAUREGUI, G.; SEGOVIA, A.; CANÉ, L.; GUTIÉRREZ, J.; MARFIL, M.; RIGALI, F.; PUGLIESE, M.; YOUNG, S.; LAGIOIA, J.;

GARNIL, C.; FORTE PONTES, J. E.; ERENO JUNIO, J. C.; MOWER, S.; MEDINA, N. How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. **Theriogenology**, v. 67, p. 142-151, 2007.

PEREIRA, P. C. M.; BURINI, R. C. Reação metabólica à infecção no hospedeiro. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina**. v. 47, p. 111-115, 1992.

PERINO, L. J.; SUTHERLAND, R. L.; WOOLEN, N. E. Serum gamma glutamyltransferase activity and protein concentration at birth and after sucking in calves with adequate and inadequate passive transfer of immunoglobulin G. **American Journal of Veterinary Research**, v.54, n.1, p.56-59, 1993.

PERINO, L. J.; WITTUN, T. E. Effects of various risk factors on plasma protein and serum immunoglobulin concentrations of calves at postpartum hours 10 and 24. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 9, p. 1144-1148, 1995.

PICCIONE, G.; CASELLA, S.; PENNISE, P.; GIANNETTO, C.; COSTA, A.; CAOLA, G. Monitoring of physiological and blood parameters during perinatal and neonatal period in calves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 1, p. 1-12, 2010.

PIRES JUNIOR, J. B.; BUONORA, C. R. A.; AFONSO, J. A. B.; DANTAS, F.R.; PEREIRA, A. L. L.; VIEIRA, A. C. S.; MENDONÇA, C. L. Transferência de imunidade passiva em bezerros oriundos de partos distócicos obtidos por cesariana. **Revista Brasileira Medicina Veterinária**, v. 35, n. 2, p. 111-116, abr./jun. 2013.

POGLIANI, F. C.; BIRGEL JUNIOR, E.H. Valores de referência do lipidograma de bovinos da raça holandesa, criados no Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, n. 5, p. 373-383, 2007.

POGLIANI, F. C. **Valores de referência e influência dos fatores etários, sexuais e da gestação no lipidograma de bovinos da raça Holandesa, criados no estado de São Paulo**. 2006. 134 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

RADOSTITS O.M., GAY C.C., BLOOD D.C. & HINCHCLIFF, K.W. 2002. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

RAUPRICH, A. B. E.; HAMMON, H. M.; BLUM, J. W. Influence of feeding different amounts of first colostrum on metabolic, endocrine, and health status and on growth performance in neonatal calves. **Journal Animal Science**, v. 78, p. 896- 908, 2000.

REECE, W. O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 521-545.

RENGIFO, S. A.; SILVA, R. A.; BOTTEON, R. C. C. M.; BOTTEON, P. T. L. Hemograma e bioquímica sérica auxiliar em bezerros mestiços neonatos e ocorrência de enfermidades. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 62, n. 4, p. 993-997, 2010.

RIBEIRO, M. F. B.; BELÉM, P. A. D.; PARARROYO, J. H. Hipogamaglobulinemia em bezerros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.35, n.4, p. 537-546, ago. 1983.

RIZZOLI, F. W.; FAGLIARI, J. J.; SILVA, D. G.; SILVA, S. L.; JORGE, R. L. N. Proteinograma e teores séricos de cálcio, fósforo, magnésio e ferro de bezerros recém-nascidos que mamaram colostro diretamente na vaca ou em mamadeira. **ARS Veterinária**, v. 22, n. 3, p. 198-202, 2006.

ROCHA, T. G.; FRANCIOSI, C.; NOCITI, R. P.; JORGE, R. L. N.; FAGLIARI, J. J. Concentrações séricas de cálcio, fósforo, magnésio, ferro, sódio e potássio em bezerros mestiços canchim-nelore e da raça holandesa do nascimento aos 30 dias de idade. **Ciência Animal Brasileira**, p. 214-219, 2009 Suplemento 1. Trabalho apresentado a 8. Congresso Brasileiro de Buiatria, Belo Horizonte, 2009.

ROCHA, T. G.; FRANCIOSI, C.; NOCITI, R. P.; NOGUEIRA, C. A. S.; FAGLIARI, J. J. Hemograma e proteínas do soro sanguíneo de bezerros Canchim-Nelore e da raça Holandesa nos primeiros 30 dias de vida. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 62, n. 5, p.1 250-1254, 2010.

ROCHA, T. G.; NOCITI, R. P.; SAMPAIO, A. A. M.; FAGLIARI, J. J. Hemograma e proteínas de fase aguda de bezerros sadios do nascimento aos 30 dias de idade. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v. 33, p. 25-31, dez. 2013. Suplemento 1.

ROSOL, T. J.; CAPEN, C. C. Calcium-regulating hormones and diseases of abnormal mineral (calcium, phosphorus, magnesium) metabolism. In: KANEKO, J. J. (Ed.). **Clinical biochemistry of domestics animals**. 5. ed. New York: Academic Press, 1997. p. 619-702.

ROUSSEL, A. J.; WOODS, P. R. Colostrum and passive immunity. In: HOWARD, J. L.; SMITH, R. A. **Current Veterinary Therapy Food Animal Practice**. 4 ed. London: W.B. Saunders Company, p. 53-56, 1999.

SANTOS, C. R. **Patologia de neonatos bovinos clonados**. 2008. 101f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SELIM, S. A.; SMITH, B. P.; CULLOR, J. S. Serum immunoglobulins in calves: Their effects and two easy reliable means of measurement. **Veterinary Medicine**, v. 90, p. 387-404, 1995.

SILVA, M. C. A.; MUNDIM, A. V.; MENDONÇA, G. A.; MORAES, D. V.; BUENO, J. P.; SOARES, D. B.; ANTUNES, M. M.; SANTOS, I. L. Perfil dos lipídios e enzimas séricas avaliadoras da função hepática de bezerros em crescimento. **Veterinária Notícias**, v. 18, n. 2, p. 8-14, jul.-dez. 2012. Suplemento.

SIRISTATIDIS, C.; SALAMOLEKIS, E.; KASSANO, D.; LOGHIST, C.; CREATSAS, G. Evaluation of fetal intrapartum hypoxia by middle cerebral and umbilical artery Doppler velocimetry with simultaneous cardiotocography and pulse oximetry. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 270, n. 4, p. 265-270, 2003.

SCHMID, M.; FOSTNER, L. A. **Laboratorie testing in veterinary medicine diagnosis in the clinical monitoring**. Mannheim: Boehringer, 1986. 253 p.

SHANNON, A. D.; LASCELLES, A. K. Changes in the concentration of lipids and some other constituents in the blood plasma of calves from birth to 6 months of age. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.19, n.5, 831-839, 1966

SHIN, T.; KRAEMER, D.; PYOR, J.; LIU, L.; RUGILA, J.; HOWE, L.; BUCK, S.; MURPHY, K.; LYONS, L.; WESTHURIN, M. A cat cloned by nuclear transplantation. **Nature**, v. 512, n. 6874, p. 859, 2002.

STEINHARDT, M.; GOLLNAST, I.; LANGANKE, M.; BÜNGER, U.; KUTSCHKE, J. Biochemical blood values in newborn calves. 1. Effects of some interior and exterior conditions. **Tierärztliche-Praxis**, v.21, p.295-301, 1993.

STEINHARDT, M.; THIELSCHER, H. H.; LEHR, A.; LADEWIG, J.; SZALONY, S.; SMIDT, D.; IHNEN, B. Clinical chemical and hematological blood values and adaptations during postnatal life in suckler calves. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift.**, v. 102, p. 399-405, 1995.

STRUFALDI, B. **Prática de bioquímica clínica**. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 1987.

SOUZA, D. F., **Parâmetros hematológicos e de bioquímica clínica de cordeiros em crescimento**, 2012. 77 p. Dissertação de Mestrado, em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

TENNANT, B.; HARROLD, D.; GUERRA, M. R. Neonatal alterations in serum gammaglobulin levels of Jersey and Holstein-Friesian calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 2, p. 345-354, Sep. 1969.

THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M.J.; LASSEN, E. D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. 580 p.

TIETZ, N. W. **Fundamentals of clinical chemistry** 2 ed. Philadelphia, N.B. Saunders, 1976.

THOMPSON, J. C.; PAULI, J. V. Colostral transfer of gamma glutamyl transpeptidase in calves. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 29, n. 12, p. 223-226, 1981.

WELLS, D. N. Animal cloning: current process, challenges and future prospects. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, p. 86-97, 1999.

WELLS, D. N.; FORSYTH, J. T.; MCMILLAN, V.; OBACK. B. The Health of Somatic Cell Cloned Cattle and Their Offspring. **Cloning and Stem Cells**. v. 6, n. 2, p. 101-110. 2004.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; MCWHIR, J; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H. S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, p. 810-813, 1997.

WITTUM, T. E.; PERINO, L. J. Passive immune status at post partum hour 24 and long-term health and performance of calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n 9, p. 1149-1154, 1995.

WISE, G.H.; CALDWELL, M.J.; PARRISH, D.B.; FLIPSE, R. J.; HUGHES, S. Changes in cell volume and concentration of hemoglobin and of several inorganic constituents of the blood of calves during early postnatal development. **Journal Dairy Science**, v. 30, p. 983-993, 1947.

ZACONETA, C. A. M. Asfixia perinatal. In: MARGOTTO, P. R. **Assistência ao recém-nascido de risco**. Brasília: Pórfiro, 2004. p. 383-391.