PAULO FANTINATO NETO

**Provas de função pulmonar para avaliação da capacidade pulmonar e de trocas
gasosas em neonatos bovinos**

Pirassununga

2015

PAULO FANTINATO NETO

Provas de função pulmonar para avaliação da capacidade pulmonar e de trocas gasosas em neonatos bovinos

Tese 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 Doutor em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Junior

Pirassununga

2015

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.3093
FMVZ

Fantinato Neto, Paulo
Provas de função pulmonar para avaliação da capacidade pulmonar e de trocas gasosas em neonatos
bovinos / Paulo Fantinato Neto. -- 2015.
90 f. :il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2015.

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. Clone bovino. 2. Distúrbios cardiorrespiratórios. 3. Hemogasometria. 4. Hipertensão da artéria pulmonar.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Provas de função pulmonar para avaliação da capacidade pulmonar e de trocas gasosas em neonatos bovinos a termo, prematuros e clonados", protocolado sob o nº 2442, utilizando 38 (trinta e oito) bovinos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Junior (FZEA), 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 e foi aprovado em reunião de 21/9/2011.

We certify that the Research "Pulmonary function tests to evaluate gas exchanges and pulmonary capacity in pré-term, term and cloned bovine neonate", protocol number 2442, utilizing 38 (thirty eight) bovine, under the responsibility Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Junior (FZEA), agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 9/21/2011.

São Paulo, 21 de setembro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Autor: Fantinato Neto, Paulo

Título: Provas de função pulmonar para avaliação da capacidade pulmonar e de trocas gasosas em neonatos bovinos

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

O meu primeiro agradecimento, e nada mais justo, é feito aos animais, principalmente aos que eu tive a oportunidade de trabalhar, a grande prova da existência de Deus. Sem eles, nada teria sentido até hoje, profissionalmente, não teria conseguido chegar até aqui da mesma maneira e não teria aprendido tanto.

Meus pais, Cleiton Célio Fantinato e Neide Maria Golghetto Fantinato, que sempre me apoiaram na minha profissão mesmo quando a minha escolha era a “errada”, para eles, eu ainda sou uma criança – acho que isso não vai mudar nunca. Assim como eles, minha irmã Fernanda Golghetto Fantinato (Fê) sempre foi uma grande conselheira e amiga para toda e qualquer circunstância, agradeço muito seus valiosos conselhos e ensinamentos, e apesar de mais nova sempre teve uma maturidade invejável.

Ao professor Eduardo Harry Birgel Junior, primeiramente pela orientação, não somente na realização do projeto e tese, mas pelos ensinamentos na conduta clínica, na maneira de pensar no atendimento, ensinamentos valiosos que não serão esquecidos. Depois, pela confiança depositada em mim, sempre na esperança de eu poder fazer o meu melhor. Agradeço também sua esposa, Daniela Becker Birgel, por tudo, pelas ajudas no laboratório e no campo, pela organização do ambiente de trabalho, pelos ensinamentos também tão valiosos.

O professor Flávio Vieira Meirelles, que esteve muito presente no período de doutorado, estimulando o pensamento científico. Muito obrigado pela confiança na execução de projetos e trabalhos, pelos conselhos e, principalmente, pelas inúmeras ajudas em diversos momentos. Aos grandes amigos e professores Adriano Bonfim Carregaro, André Furugen César de Andrade, Heidge Fukumasu e Ricardo Strefezzi, pelas orientações, conselhos ajudas e discussões dos mais variados assuntos e por toda ajudada prestada durante o doutorado.

Gostaria de agradecer aos colegas de doutorado, Mel Yasuoka e Vanessa Storillo, principalmente pela paciência e ajudas imprescindíveis para a realização dos experimentos presentes nessa obra, e pedir desculpas pelos desentendimentos. Aqui fica um agradecimento especial ao grande companheiro de pós graduação e amigo Flávio José Minieri Marchese, provou ser um verdadeiro parceiro, trabalhamos muito, trabalhamos pesado, algumas vezes em condições realmente complicadas, e é quando você realmente sabe que tem um amigo do seu lado - Flavinho, muito obrigado mesmo!

À professora Anneliese de Souza Traldi (Kiky) por permitir a realização de experimentos com seus animais, e pelos valiosos ensinamentos sobre obstetrícia. Da mesma forma, gostaria de

agradecer ao professor Luis Felipe Prada e Silva e seus pós graduandos, em especial Matheus Orlandin Frasseto, Dannylo Oliveira de Souza, Rafael Teixeira de Souza, Viviani Borba Ferrari e Juliane Diniz Magalhães, pela imensurável ajuda com os animais, sem vocês não seria possível a conclusão desse trabalho.

À Fundação de Apoio à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado (processo 2011/19543-9).

Os velhos e novos companheiros de pós graduação, pelos trabalhos realizados juntos, pelas parcerias e pelas bebedeiras, Mateus Maldonado, Gabriel Moreira, Pedrinho Ratto, Ju Sangalli, Rafão Sampaio, André Nicolai, Wil “Jabuti” Leal, Thais Bressan, Sahyne Bisetto e Renan Grigoletto. Vocês fizeram parte dessa etapa, assim como as tardes de tereré no LMMD e UDCH!

Por fim, como não poderia deixar de ser, agradeço à minha grande amiga, amante e companheira pra vida inteira, Fabiana Fernandes Bressan, pelo apoio, pelos conselhos, pelas broncas, pelas ajudas, ou simplesmente por estar junto! Essa conquista é sua também!

RESUMO

FANTINATO NETO, P. **Provas de função pulmonar para avaliação da capacidade pulmonar e de trocas gasosas em neonatos bovinos.** [Pulmonary function tests to evaluate gas exchange and pulmonary capacity in neonatal cattle]. 2015. 90 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

As principais causas de morte perinatal em bezerros estão de alguma forma relacionadas a problemas cardiorrespiratórios. A maior parte de morte de bezerros ocorre justamente no período de até 48h após o nascimento, quando ainda estão sendo feitos os ajustes fisiológicos necessários à vida extrauterina. Com o aumento de animais advindos das técnicas de produção *in vitro*, também aumentaram os problemas de sobrevivência e sobrevida dos recém nascidos. Este estudo teve como objetivo geral padronizar valores de referência de hemogasometria e espirometria de bezerros a termo, nascidos por parto espontâneo, e prematuros, nascidos por cesariana, da raça Nelore concebidos por inseminação artificial (IA), assim como estabelecer protocolos de cuidados intensivos neonatais aos animais prematuros. Objetivamente, o estudo compreendeu: 1. A avaliação dos valores de pressão invasiva de átrio direito, ventrículo direito, artéria pulmonar e artéria pulmonar ocluída, hemogasometria, espirometria e capnografia de bezerros da raça Nelore, a termo, nascidos por parto espontâneo; 2. A avaliação e padronização da hemogasometria arterial de bezerros raça Nelore, a termo, nascidos de partos espontâneos; 3. A avaliação da pressão invasiva da artéria pulmonar e dos efeitos do sildenafil sobre os valores de pressão de artéria pulmonar em bezerros da raça Nelore, prematuros, nascidos por cesariana; 4. Diferenças hemodinâmicas (utilizando o cateter de Swan-Ganz), na função pulmonar e nas trocas gasosas entre bezerros a termo nascidos por parto espontâneo e prematuros nascidos por cesariana; 5. O estabelecimento de protocolos de cuidados neonatais para bezerros advindos de gestações complicadas com risco de morte neonatal prematura, onde foram realizadas 3 cesarianas em bezerros concebidos por IA e 16 concebidos por transferência nuclear por de células somática (clonagem), sendo estabelecidos protocolos de terapia neonatal com sildenafil, surfactante e oxigenoterapia. Bezerros da raça Nelore a termo nascidos por parto espontâneo estabilizam seus parâmetros de hemogasometria a valores de animais adultos em até 48 horas após o nascimento e têm valores de hemogasometria mais próximos dos valores normais para a espécie, enquanto os bezerros prematuros, nascidos por cesariana, têm valores mais deslocados em relação a normalidade. A padronização da hemogasometria de bezerros da raça Nelore nascidos por eutocia, pode fomentar as pesquisas com animais advindos de técnicas de PIV, assim como aumentar a sobrevida e sobrevivência além de diminuir a mortalidades desses animais. Já o sildenafil não

apresenta efeitos adversos significativos quanto a oxigenação dos bezerros em que foi usado, mesmo quando houve alterações não desejadas da PAP. Dessa forma, quando não existe a possibilidade de se aferir a PAP e suspeita-se de hipertensão, o sildenafil é pode ser usado sem maiores consequências para a saúde do paciente.

Palavras-chave: Clone bovino. Distúrbios cardiorrespiratórios. Hemogasometria. Hipertensão da artéria pulmonar.

ABSTRACT

FANTINATO NETO, P. **Pulmonary function tests to evaluate gas exchange and pulmonary capacity in neonatal cattle.** [Provas de função pulmonar para avaliação da capacidade pulmonar e de trocas gasosas em neonatos bovinos]. 2015. 90 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The main causes of perinatal death in cattle are frequently related to cardiorespiratory distress. A great number of losses are placed during the first 48h after birth, when important physiological adjustments to the extra-uterine life are still in progress. Recent increase of offspring derived from assisted reproductive *in vitro* biotechnologies resulted in diminished survival rates of the newborn. The present study aimed to obtain standard values of hemodynamic evaluation, blood gas and spirometry of Nelore calves conceived by artificial insemination (AI) born at term, spontaneously, or from premature calves born by cesarean delivery, as well as to establish protocols of neonatal intensive care focusing on premature animals. Objectively, the study comprised: 1. The evaluation of invasive pressure values from right atrium, right ventricle, pulmonary artery and pulmonary wedge pressure, blood gas, spirometry and capnography of Nelore calves born spontaneously; 2. Evaluation and standardization of arterial blood gas of Nelore calves born at term spontaneously; 3. Evaluation of invasive pressure of pulmonary artery (PAP) and effects of sildenafil administration on its values from Nelore premature calves born by cesarean; 4. The comparison of hemodynamic, blood gas and spirometry of calves born at term spontaneously or premature calves born by cesarean delivery, during the first 30 days of life; 5. The establishment of neonatal care protocols focusing on complicated pregnancies at risk of premature neonatal death, when 3 cesarean sections of calves conceived by AI and 16 conceived by nuclear transfer of somatic cells (cloning) were monitored, and therefore protocols involving neonatal therapy with sildenafil, surfactant and oxygen therapy were established. Nelore calves born at term spontaneously have their blood gas stabilized in values similar to adult cattle until 48 hours after birth, and present a blood gas profile more similar to the expected for the species, whereas premature calves born from cesarean delivery present values different from normality. The standardization of blood gas of Nelore calves born at term from eutocic deliveries may promote better perinatal survival rates in offspring derived from *in vitro* production. The treatment with sildenafil does not present adverse effects related to the oxygen levels of calves even when adverse alterations were observed in PAP. Therefore, whenever hypertension is suspected and measurement of PAP is impaired, the sildenafil treatment may be used without major consequences to the patient health.

Keywords: Blood gas. Cloned bovine. Cardiorespiratory disturbances. Pulmonary hypertension.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	MORFOGÊNESE DO APARELHO RESPIRATÓRIO	16
2.2	CIRCULAÇÃO DO FETO AO NEONATO	18
2.3	PERÍODO DE TRANSIÇÃO PARA VIDA EXTRAUTERINA	20
2.4	TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA E MORTALIDADE NEONATAL	21
3	AVALIAÇÃO DOS VALORES DE PRESSÃO INVASIVA DE ÁTRIO DIREITO, VENTRÍCULO DIREITO, ARTÉRIA PULMONAR E ARTÉRIA PULMONAR OCLUÍDA, HEMOGASOMETRIA, ESPIROMETRIA E CAPNOGRAFIA DE BEZERROS DA RAÇA NELORE NASCIDOS POR EUTOCIA	24
3.1	RESUMO	24
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.2.1	Avaliação da pressão invasiva	25
3.2.2	Hemogasometria	27
3.2.3	Espirometria	28
3.2.4	Capnografia	28
3.2.5	Análise estatística	29
3.3	RESULTADOS	29
3.3.1	Avaliação das pressões invasivas de átrio e ventrículo direito, artéria pulmonar e artéria pulmonar ocluída de bezerros da raça Nelore.	30
3.3.2	Hemogasometria	31
3.3.3	Espirometria e capnografia	34
3.4	DISCUSSÃO	37
3.5	CONCLUSÕES	41
4	AVALIAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DA HEMOGASOMETRIA ARTERIAL DE BEZERROS DA RAÇA NELORE NASCIDOS POR PARTO ESPONTÂNEO E CRIADOS EM SISTEMA EXTENSIVO DE PASTAGEM.	43
4.1	RESUMO	43
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	44
4.2.1	Hemogasometria	44
4.2.2	Análise estatística	45
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.4	CONCLUSÃO	49
5	DIFERENTES EFEITOS DO SILDENAFIL SOBRE OS VALORES DE PRESSÃO DE ARTÉRIA PULMONAR EM BEZERROS DA RAÇA NELORE PREMATUROS NASCIDOS POR CESARIANA	51
5.1	RESUMO	51
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	52
5.2.1	Animais	52
5.2.2	Aferição das pressões invasivas	53
5.2.3	Hemogasometria	53

5.2.4	Análise estatística	54
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.4	CONCLUSÃO	58
6	DIFERENÇAS NA FUNÇÃO PUMONAR E DE TROCAS GASOSAS ENTRE BEZERROS A TERMO NASCIDOS POR PARTO ESPONTÂNEO E PREMATUROS NASCIDOS POR CESARINA	60
6.1	RESUMO	60
6.2	MATERIAL E MÉTODOS	61
6.2.1	Delineamento experimental	61
6.2.2	Avaliação hemodinâmica	62
6.2.3	Análise da hemogasometria	63
4.2.2	Análise estatística	63
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
6.4	CONCLUSÃO	69
7	ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO DE CUIDADOS NEONATAL PARA BEZERROS ADVINDOS DE GESTAÇÕES COMPLICADAS COM RISCO DE MORTE NEONATAL PREMATURA	71
7.2	MATERIAL E MÉTODOS	71
7.2.1	Estabelecimento de protocolo de cuidados ao neonato	71
7.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
7.3.1	Estabelecimento de protocolo de cuidados ao neonato bovino	72
7.4	CONCLUSÃO	79
8	CONCLUSÕES GERAIS	81
9	REFERÊNCIAS	84

Capítulo 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

Durante o nascimento, uma série de ajustes fisiológicos começam a ocorrer, de modo que estes são imprescindíveis na vida extrauterina (BRUMBAUGH, 2003). O mais adequado exemplo de ajuste que ocorre durante o parto, de importância extrema na vida extrauterina e que muitas vezes determina, inclusive, a saúde perinatal do indivíduo é o início da respiração pelo uso dos próprios pulmões. Na vida intrauterina, quando o indivíduo ainda está no útero, a oxigenação e nutrição dos tecidos fetais são totalmente dependentes da circulação materno fetal, ou seja, a nutrição e devida oxigenação fetal estão diretamente relacionadas à nutrição da mãe e à adequada placentação (SCHRÖDER, 1995; CARTER, 1999; MESS; FERNER, 2010; TIVANE et al., 2013). Assim, o indivíduo recém-nascido precisa estabelecer sua termorregulação por mecanismos termogênicos próprios (BRUMBAUGH, 2003); além de ter que aprender a se alimentar de forma que seus tecidos permaneçam devidamente nutridos, no lugar daquela nutrição parenteral recebida da mãe antes do nascimento. Afora as adaptações neonatais, o indivíduo, que agora se encontra em um ambiente hostil, desafia sua imunidade e capacidade de combater antígenos. Dessa forma, a maior parte de morte de bezerros ocorre justamente no período de até 48h após o nascimento (SZENCI; TAVERNE; TAKÁCS, 1989; MEE, 2008), quando ainda estão sendo feitos os ajustes fisiológicos tão necessários à vida (extrauterina). De acordo com Meyer; Berger e Koehler (2000), citado por Mee (2008), morte perinatal é a morte de bezerros até 48 horas após o nascimento, decorridos pelo menos 260 dias de gestação, independentemente da causa da morte ou das circunstâncias do nascimento. E apesar disso, as distocias, sendo as distocias sem algum tipo de assistência consideradas mais graves, são as principais causas da mortalidade perinatal de bezerros (SZENCI; TAVERNE; TAKÁCS, 1989; NAGY, 2009).

Dentre as causas mais comuns de morbidade e mortalidade perinatal de bezerros estão, em ordem decrescente de importância: acidose metabólica e respiratória combinadas, contusão da vaca gestante, hipoglobulinemia, infecções ou deficiências congênitas e onfaloflebites (MEE, 2008). Correlacionando as informações é possível notar que uma vez que as distocias são fator predisponente para a morte perinatal, e a acidose respiratória/metabólica é a causa mais comum de morte em bezerros. Pode-se afirmar que gestações de risco, onde as chances de distocias são maiores, predispoem à acidose (metabólica ou respiratória) do recém nascido. Probo et al. (2012) relataram que bezerros nascidos por cesariana apresentavam valores de pH, excesso de base (BE), pressão parcial de oxigênio (pO_2) e saturação de oxigênio (sO_2) do sangue venoso significativamente menores quando

comparados com animais nascidos por parto normal. Assim, gestações de risco como de animais clonados, onde há deficiência placentária, o processo de hipóxia/sofrimento fetal/acidose apresenta-se como algo corriqueiro na clínica neonatal desses animais. Em especial, bovinos clonados apresentam diversos problemas cardiorrespiratórios ao nascimento, especialmente hipertensão pulmonar, com persistência do ducto arterioso e forame oval (CHAVATTE-PALMER et al., 2004).

Nesse âmbito, são vários os estudos que mostram alta mortalidade perinatal como resultado da produção *in vitro* (HASLER et al., 1995; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW; AERTS; DEN DAAS, 1998; JACOBSEN et al., 2000), da transferência nuclear de células embrionárias (BONDIOLI; WESTHUSIN; LOONEY, 1990; WILSON et al., 1995; KRUIP; DEN DAAS, 1997) e da transferência nuclear de células somáticas (KATO et al., 1998; MEIRELLES et al., 2006; BATCHELDER et al., 2007). E apesar dos esforços realizados nos últimos anos, a taxa de mortalidade permanece alta, em cerca de 50%, o que torna necessários estudos mais aprofundados em neonatologia bovina. Assim, o entendimento da patogenia dos distúrbios cardiorrespiratórios provê subsídios para criação de protocolos de cuidados aos neonatos bovinos, principalmente aqueles advindos de gestações de riscos, como no caso de animais clonados. O estabelecimento e consequente utilização de tais protocolos e procedimentos, ainda inéditos, são necessários não somente para o aumento da produção de animais derivados de biotecnologias reprodutivas, como também deverá fornecer novas informações sobre a fisiologia neonatal resultando em uma prática terapêutica adequada e precisa na neonatologia bovina.

Capítulo 2

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MORFOGÊNESE DO APARELHO RESPIRATÓRIO

Nos mamíferos domésticos o desenvolvimento bronquial e pulmonar pode ser dividido em basicamente três fases cronológicas: embrionária, quando são formados os brônquios e pulmões primitivos; fetal, quando ocorre a ramificação dos brônquios e as estruturas para trocas gasosas são formadas; e a fase pós natal, quando as estruturas definitivas de trocas gasosas, os alvéolos, estão desenvolvidos e o pulmão assume sua função respiratória. Dentro disso, a fase fetal pode ser ainda subdividida em estágios pseudoglandular, canalicular, sacular e alveolar (ALCORN et al., 1981; MARTINEAU et al., 2013). Na fase embrionária, a traqueia está totalmente separada do esôfago, surge o primeiro segmento traqueal, mais cranial a carina traqueal, o brônquio traqueal – presente somente em bovinos e suínos, sendo que, nos animais adultos, esse brônquio tem a função de ventilação do lobo cranial direito – e a principal divisão traqueal (carina traqueal), nos brônquios principais, direito e esquerdo, em seguida formando os brônquios secundários, que formam os ramos lobares (MESS; FERNER, 2010).

No estágio pseudoglandular, por volta dos 45 dias, há início de intensa vascularização ao redor das estruturas formadas pelas divisões traqueais, e dos brônquios secundários surgem os brônquios segmentares e destes os intersegmentares. Na vida adulta, do lado direito, existe o brônquio traqueal responsável por ventilar o lobo cranial direito; o brônquios lobares que irão ventilar os lobos médio, caudal e acessório; no lado esquerdo tem-se somente os brônquios lobares cranial e caudal responsáveis pela ventilação dos lobos cranial e caudal respectivamente. O estágio canalicular do desenvolvimento pulmonar é caracterizado por aumento da luz de brônquios e bronquíolos terminais assim como aumento da vascularização do tecido pulmonar. Há formação de bronquíolos respiratórios e ductos alveolares, que possuem paredes delgadas, comuns a maturação final do pulmão (MCGOWAN, 1992). O estágio sacular é o desenvolvimento mínimo de maturação dos pulmões para nascimento. Nesse estágio, há formação de sacos terminais (alvéolos primitivos) com células epiteliais muito delgadas (THURLBECK, 1975), células alveolares tipo I ou pneumócitos tipo I, formando epitélio pavimentoso, de origem mesodérmica, onde as células endoteliais dos capilares, em íntimo contato, formarão a barreira hematoaérea que, por sua vez, permitirá as trocas gasosas. A rede capilar prolifera intensamente no mesênquima em torno dos alvéolos e ocorre formação de vasos linfáticos, robustos o

suficientes para que, por ocasião do nascimento, sejam capazes de drenar parte do líquido amniótico presente no pulmão. Entre os pneumócitos tipo I estão espalhadas células secretoras, os pneumócitos tipo II. A principal função dos pneumócitos tipo II é produzir e secretar o surfactante pulmonar, um complexo fosfolipídio que irá formar uma fina camada sobre a superfície interna dos alvéolos diminuindo a tensão ar/alvéolo (BRASCH et al., 2004; MESS; FERNER, 2010). No estágio alveolar, que é o último estágio de formação do pulmão na fase fetal, é quando ocorre o início da formação dos alvéolos propriamente ditos, com expansão da área alveolar e consequente aumento da área de trocas gasosas, processo que continua até a fase pós natal, quando o pulmão termina sua maturação (MARTINEAU et al., 2013).

Toquetti et al. (2009) em estudos com diferentes idades gestacionais reportaram que fetos bovinos a partir do 7º mês de gestação, que estão passando pelo estágio sacular terminal de desenvolvimento pulmonar, já apresentavam bandas de proteína surfactante com aspecto similar ao lavado bronco alveolar de animais recém nascidos. Segundo os autores, o perfil das bandas do lavado bronco-alveolar dos recém nascidos foi igual ao de animais adultos, sugerindo que um bezerro nascido a partir dos 7 meses de idade gestacional seria capaz de sobreviver devido à possibilidade da capacidade de síntese de proteínas surfactantes. Porém, o surfactante consiste em 90% de lipídios e 10% de proteínas (WRIGHT et al., 1987; VELDHUIZEN et al., 1998). De acordo com Goerke (1998) e Veldhuizen et al. (1998), a porção lipídica do surfactante está associada à manutenção da tensão superficial dos pulmões na interação ar-líquido, para que não haja o colapamento. Já a porção proteica parece estar associada a passagem de algumas moléculas para dentro e fora dos alvéolos assim como a renovação da porção lipídica em conjunto com os pneumócitos do tipo II (GOERKE, 1998). Mesmo assim, animais recém nascidos pré-maturos podem não ter quantidades adequadas de surfactante para que seja mantida, de forma devida, a tensão superficial alveolar (VELDHUIZEN et al., 1998; LU et al., 1999). Depois de secretado o surfactante é armazenado nos corpos lamelares dentro do espaço alveolar e o conteúdo sofre uma transformação estrutural dentro da mielina tubular (BRASCH et al., 2004; ZIMMERMANN et al., 2005; BLEUL, 2009). Os fosfolipídios, formadores primários da porção lipídica do surfactante, são os componentes críticos para a redução da tensão superficial pulmonar (BLEUL, 2009). O surfactante, então, recobre toda superfície alveolar e dos bronquíolos distais na interface ar – líquido, e é sintetizado, estocado, secretado e reabsorvido pelos pneumócitos tipo II (BRASCH et al., 2004; ZIMMERMANN et al., 2005). Assim, o surfactante impede o colapamento alveolar, diminuindo a tensão superficial na interação líquido-ar nos alvéolos.

2.2 CIRCULAÇÃO DO FETO AO NEONATO

Em mamíferos o sistema cardiovascular é o primeiro sistema importante a funcionar no embrião, uma vez que o rápido crescimento desse exige um sistema eficiente de captação de nutrientes e oxigênio do sangue materno, assim como de remoção de dióxido de carbono e metabólitos. Dessa forma, o desenvolvimento e sobrevivência do embrião, assim como o acontecimento da gestação, são dependentes do estabelecimento funcional e adequado da interação materno-fetal (CHAVATTE-PALMER; GUILLOMOT, 2007; BRESSAN et al., 2009). Em bovinos, o desenvolvimento de vasos no embrião começa por volta do dia ou 20 do desenvolvimento embrionário pós inseminação ou monta (CHAVATTE-PALMER; GUILLOMOT, 2007; GUILLOMOT et al., 2010), de maneira que é possível a visualização de vasos no alantoide de conceptos zebuínos com aproximadamente 26 dias (ASSIS NETO et al., 2010). Por volta dos 32 dias de gestação, os vilos coriônicos dos cotilédones fetais penetram nas criptas das carúnculas endometriais formando os placentônios (ASSIS NETO et al., 2010; GUILLOMOT et al., 2010). Com aproximadamente 40 dias de gestação, há o início da implantação propriamente dita do embrião, já com veia e artérias umbilicais, concomitante com a regressão do saco vitelínico, e, assim, a placenta começa a se estabelecer, de maneira que placenta sinoepiteliocorial está funcional por volta dos 60 dias (ASSIS NETO et al., 2010). Na vida fetal, tanto o transporte de oxigênio e nutrientes para o feto, como o transporte de dióxido de carbono e metabólitos do feto são realizados via placenta. Na circulação materno-fetal, o sangue rico em nutrientes e oxigênio chega ao feto por meio da veia umbilical (POULSEN; MCGUIRK, 2009). O sangue passa pelo fígado e atinge o coração no átrio direito por meio da veia cava caudal e a partir desse órgão o sangue rico em nutriente e oxigênio é distribuído para todo corpo do embrião. Na passagem pelo fígado, aproximadamente metade do sangue vindo da veia umbilical vai diretamente para veia cava caudal através do ducto venoso, a outra metade do sangue vai para os sinusóides hepáticos e chegam a veia cava caudal através das veias hepáticas. Durante a vida fetal, a oxigenação pelos próprios pulmões faz-se desnecessária, grande parte do sangue que chega ao átrio cardíaco direito passa para o átrio esquerdo, por meio do forame oval. Este, por sua vez, é formado por uma membrana muscular ventrocranial (*septum secundum*) e uma fina membrana (*septum primum*) à esquerda de modo que o sangue que chega aos átrios fluam somente em uma única direção, do átrio direito para o átrio esquerdo. Por ocasião do nascimento, há aumento da pressão no átrio esquerdo e diminuição da pressão sanguínea no átrio direito, devido ao estabelecimento da grande e pequena circulações, de modo que o sangue não passa mais do pelo foram oval (POULSEN; MCGUIRK, 2009). Ainda na vida fetal, no momento da sístole, o sangue que do tronco pulmonar iria para as artérias

pulmonares seguem em direção à aorta, por meio do ducto arterioso, ou seja, apenas pequena parte, cerca de 10%, do sangue que chega no tronco pulmonar e vai para os pulmões, o suficiente para nutrir esse órgão (JENSEN; ROMAN; RUDOLPH, 1991). O sangue desviado do pulmão passa pelo ducto arterioso, ganha a aorta e é bombeado juntamente com o sangue que saiu do coração esquerdo para os outros tecidos do corpo, afim de nutrir esses tecidos. Por fim, o sangue retorna a circulação materna, dessa vez pobre em oxigênio e nutrientes e rico em dióxido de carbono e metabólitos, por meio das artérias uterinas.

A eutocia ou parto normal é o processo fisiológico pelo qual o feto e seus envoltórios são expulsos do útero, que se desenvolve gradativamente, acompanhado de modificações morfológicas e funcionais da fêmea gestante e compreende 3 fases ou estágios. A primeira fase é denominada prodrômica e caracteriza-se por afrouxamento das articulações e ligamentos da pelve, bem como relaxamento da musculatura da garupa e inicia-se 1 a 4 semanas antes do parto. A segunda fase, de insinuação ou de dilatação, inicia-se com as contrações uterinas e dilatação das vias fetais mole com insinuação dos envoltórios fetais, podendo durar cerca de 6 a 16 horas e termina com o rompimento das membranas fetais. A fase de expulsão inicia-se com o rompimento das membranas fetais, particularmente o saco amniótico e termina com o nascimento do feto, podendo durar de 4 até 6 horas nas primíparas, de 1 a 3 horas em vacas, sendo a expulsão de suas membranas até 12 horas após (GRUNERT; BIRGEL, 1982; LANDIM-ALVARENGA, 2006).

No momento do nascimento, há a necessidade do animal respirar por si só e dessa maneira deve-se ter o fechamento do ducto arterioso, afim de que o sangue que chega no coração direito siga para os pulmões e seja oxigenado (SZDZUY et al., 2008). Esse processo inicia-se com o “amadurecimento” da placenta, quando ocorrem apoptoses das células dos placentônios, o que diminui o fluxo sanguíneo – também de nutrientes e oxigênio – para circulação fetal (WILLIAMS et al., 1987; GROSS; WILLIAMS; RUSSEK-COHEN, 1991). Dessa maneira, há liberação de corticoides pela adrenal fetal, que estimula a enzima 17 α -hydroxylase a converter progesterona em estrógeno, que, por sua vez, aumenta a expressão de receptores por ocitocina e, por fim, liberação de prostaglandinas, ocorrendo a luteólise e o parto (FLINT; RICKETTS; CRAIG, 1979; GOFF; HORST, 1997). No momento em que o feto passa pelo canal vaginal, há expulsão de grande parte de líquido (amniótico) presente nos pulmões, e estímulo da respiração. A presença de ar nos pulmões aumenta a pressão parcial de oxigênio (pO₂) nas artérias e veias pulmonares e, por um mecanismo ainda não conhecido totalmente, faz com que se inicie o fechamento do ducto arterioso (WEIBEL, 1970). Com a expansão física dos pulmões, há diminuição da tensão de dióxido de carbono e aumento na pressão parcial de oxigênio, que estimula a ação da enzima Óxido Nítrico Sintase das células endoteliais (eNOS). Essa enzima, por sua vez, transforma a L-arginina em Óxido Nítrico (NO) que aumenta a atividade da enzima Guanilato

Ciclase (sGC), já na célula da musculatura lisa do vaso, a converter Guanosina Trifosfato (GTP) em Guanosina Monofosfato cíclica (cGMP). A cGMP diminui indiretamente os níveis de cálcio livre citoplasmáticos causando o relaxamento da musculatura lisa da artéria pulmonar aumentando o afluxo de sangue para os pulmões (FARROW; FLIMAN; STEINHORN, 2005). Por fim, a enzima fosfodiasterase 5 (PDE-5) converte o cGMP em GTP (Figura 1).

Figura 1– Esquema ilustrativo de vasodilatação via óxido nítrico (NO)

Fonte: (FARROW; FLIMAN; STEINHORN, 2005 adaptado por FANTINATO NETO, 2015)

Legenda: O NO é produzido pela enzima óxido nítrico sintase (eNOS) a partir da arginina, nas células do endotélio vascular. Em seguida o NO estimula a Guaninacilase solúvel (sGC), no citoplasma da célula da musculatura lisa dos vasos, a transformar Guanina Trifosfato (GTP) em Guanina Monofosfato cíclica (cGMP) que abaixa indiretamente os níveis de cálcio citoplasmáticos das células da musculatura lisa vascular causando vasodilatação. A Fosfodiasterase 5 (PDE-5) converte a cGMP em GTP.

Nas primeiras respirações, Bökenkamp et al. (2010), em estudo em neonatos humanos, reporta que a contração em resposta à tensão de oxigênio é intrínseco das células de músculo liso do ducto arterioso, onde a contração dessas células é regulada pela fosforilação/desfosforilação das cadeias de miosina leve (MLC). De forma que a inibição da cadeia da fosfatase da miosina leve (MLCP) e a ativação da cadeia quinase da miosina cálcio/calmodulina dependente (MLCK) aumentam a fosforilação e facilitam a interação miosina/actina e, conseqüentemente, a contração do ducto arterioso, aumentando o aporte sanguíneo para os pulmões via artérias pulmonares.

2.3 PERÍODO DE TRANSIÇÃO PARA VIDA EXTRAUTERINA

A pO_2 do sangue arterial diz respeito a capacidade de absorção do oxigênio pela respiração do próprio animal, de modo que a pCO_2 do sangue arterial mostra a capacidade do organismo em expirar

o dióxido de carbono, sendo que animais com função pulmonar prejudicada, ou com imaturidade pulmonar, podem apresentar falhas na excreção do CO₂. De qualquer forma a pCO₂ mais importante é a do sangue venoso, que pode ser um demonstrativo da adequada oxigenação dos tecidos corpóreos. Animais que não tem a correta oxigenação dos tecidos, apresenta pCO₂ abaixo do normal, sendo animais recém nascidos com pCO₂ aumentada sugestivos de sofrimento / hipóxia intrauterina, uma vez que o sangue venoso é resultado da oxigenação dos tecidos corporais.

Os medicamentos utilizados no protocolo de cuidados ao neonato têm como função melhorar e promover as chances de sobrevivência dos recém-nascidos. Os medicamentos usados nesse período visam, principalmente, melhorar a capacidade de trocas gasosas e a função pulmonar desses animais.

Os inibidores das fosfodiesterases (PDEi) melhoram e prolongam a ação da guanosina monofosfato cíclica (cGMP), o principal mediador da vasodilatação, seletivamente inibindo as PDEs específicas da cGMP (BOGDAN et al., 1998), causando vasodilatação. A inibição da degradação da cGMP pode ser particularmente eficaz na consecução da vasodilatação arterial pulmonar, sendo que o sildenafil diminui a pressão da artéria pulmonar, dependendo da dose usada (WEIMANN et al., 2000).

A terapia de reposição de surfactante, em crianças com a síndrome do desconforto respiratório, vem sendo estudada desde a década de 1960, e seu uso e estudos em modelos animais foram amplamente utilizados por muitos anos subsequentes (NOTTER et al., 1985). O surfactante pode ser usado com finalidades profiláticas ou terapêuticas, de forma que seu uso deve ser feito em até duas horas após o nascimento, para que seu efeito seja satisfatório.

2.4 TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA E MORTALIDADE NEONATAL

Técnicas de reprodução assistida (TRAs) como a fertilização in vitro (FIV) em humanos e animais, ou a transferência de núcleo de célula somática (TNCS ou clonagem) em animais são atualmente amplamente empregadas tanto na medicina veterinária quanto humana com o objetivo de corrigir condições de infertilidades ou baixa fertilidade, gerando proles que dificilmente seriam concebidas por meios naturais. Na produção animal, as TRAs são frequentemente utilizadas ainda para a geração de animais geneticamente diferenciados e com maior valor econômico em um menor intervalo entre gestações. Porém, maiores perdas gestacionais, assim como proles com alteração no peso ao nascimento são frequentemente observadas quando utilizadas as TRAs, (CEELEN; VERMEIDEN, 2001; URREGO; RODRIGUEZ-OSORIO; NIEMANN, 2014).

Apesar de comprovadamente possível e bem estabelecida, a técnica de clonagem ainda é considerada ineficiente, sendo que somente aproximadamente 5% dos animais nascidos são saudáveis. Frequentemente as gestações que chegam a termo dão origem a animais que não sobrevivem ao período perinatal. Podem ser observados com frequência anomalias no sistema cardiorrespiratório, alterações na manutenção do metabolismo energético, entre outros problemas (BIRGEL JUNIOR et al., 2011).

Uma condição conhecida resultante destas tecnologias é o nascimento de crias gigantes, algumas vezes em situações incompatíveis com a vida. A síndrome da cria gigante (ou LOS, do inglês Large offspring syndrome; YOUNG; SINCLAIR; WILMUT, 1998) parece ter origem em alterações epigenéticas durante o desenvolvimento embrionário inicial, e os animais frequentemente necessitam de um suporte veterinário intensivo no período perinatal. A LOS assemelha-se à Síndrome Beckwith–Wiedemann (do inglês Beckwith–Wiedemann syndrome ou BWS) em humanos em causa e fenótipos resultantes. Outras diversas síndromes que interferem com o desenvolvimento durante a gestação como por exemplo, a síndrome de Silver-Russel, já foram reportadas em humanos e podem ter seus correspondentes em animais, apesar de ainda não bem descritos (CHEN et al., 2013; HILL, 2014) .

Desta maneira, espera-se que com a padronização dos testes de função pulmonar e estabelecimento de valores de referencia e protocolos de suporte neonatal adequados, a implementação de terapias e prognósticos adequados a bezerros bovinos que venham a nascer em situações de risco derivados ou não de biotecnologias acarrete em uma menor mortalidade perinatal.

Capítulo 3

3 AVALIAÇÃO DOS VALORES DE PRESSÃO INVASIVA DE ÁTRIO DIREITO, VENTRÍCULO DIREITO, ARTÉRIA PULMONAR E ARTÉRIA PULMONAR OCLUÍDA, HEMOGASOMETRIA, ESPIROMETRIA E CAPNOGRAFIA DE BEZERROS DA RAÇA NELORE NASCIDOS POR PARTO ESPONTÂNEO (EUTÓCICO)

Neste experimento fez-se a padronização das pressões invasivas de átrio direito (PAD), ventrículo direito (PVD), artéria pulmonar (PAP) e artéria pulmonar ocluída (PAPo – representativa da pressão do átrio esquerdo) de bezerros da raça Nelore, concebidos por inseminação artificial (IA), nascidos por eutocia e criados em sistema de pastejo juntamente com suas respectivas mães.

3.1 RESUMO

As principais causas de morte perinatal em bezerros estão de alguma forma relacionadas a problemas cardiorrespiratórios. O fechamento funcional do forame oval e do ducto arterioso deve acontecer o mais rápido possível após o nascimento, de maneira que esse processo implica na capacidade do recém nascido em assimilar o novo ambiente, extra uterino, e sua capacidade de realizar trocas gasosas. O objetivo desse estudo foi avaliar algumas mudanças que ocorrem no sistema cardiorrespiratório de bezerros recém nascidos até os 30 dias de vida. Foram avaliadas as pressões invasivas de artéria pulmonar (PAP), átrio direito (PAD), ventrículo direito (PVD) e artéria pulmonar ocluída (PAPo; que representa a pressão do átrio esquerdo), a pressão arterial sistêmica não invasiva (PNI), hemogasometria dos sangues arterial, venoso e venoso misto, capnografia e espirometria de dez bezerros da raça Nelore nascidos por eutocia. Os bezerros eram mantidos a pasto com suas mães sendo que a interferência humana era mínima. No primeiro dia (quando o bezerro tinha 6 horas de vida), 2º dia (bezerro entre 44 e 48 horas), 7º, 14º e 30º dias de vida, os bezerros eram retirados do pasto e das suas mães temporariamente, e levados ao hospital veterinário para o experimento, por um período não superior a 2 horas. Os valores de PAP e PVD tiveram diminuição no decorrer do tempo enquanto os valores de PNI aumentaram. Apesar de não terem sido encontradas diferenças no tempo ou entre os valores de PAD e PAPo, os valores de PAPo sempre foram numericamente maior que os valores de PAD. Bezerros sadios da raça Nelore nascidos por eutocia estabilizam seus parâmetros de hemogasometria a valores de animais adultos em até 48 horas após o nascimento.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram acompanhados partos de 9 vacas da raça Nelore em sistema de pastejo rotacionado de *Brachiaria brizantha*, suplementadas com sal mineral e água *ad libitum*, sem que fosse necessária a interferência humana para parição. Foram realizados, também, procedimentos de avaliação hemodinâmica por cateterização invasiva com cateter de Swan-Ganz nos tempos 6 e 48 horas e 7, 14 e 30 dias de vida, assim como espirometria, capnografia e hemogasometria dos sangues arterial, venoso e venoso misto nos mesmos horários.

3.2.1 Avaliação da pressão invasiva

A avaliação hemodinâmica invasiva com uso de cateter de termodiluição de Swan-Ganz tamanho 7F (Edwards LifeSciences LLC – Irvine, CA, EUA), tamanho usado para adultos humanos, conectado a um monitor multiparamétrico (GE - DASH 3000, GE Medical Systems Information Technologies, Inc., Freiburg, Germany). O procedimento de aferição de pressão invasiva foi realizado nos animais no 1º dia (com 6 horas de vida), 2º dia (entre 44 e 48 horas de vida), 7º, 14º e 30º dias de vida. Para introdução do cateter foi necessário a introdução prévia do kit introdutor tamanho 8,5F (IntroFlex Sheath, Edwards LifeSciences LLC – Irvine, CA, EUA; necessário para passagem do cateter de Swan-Ganz 7F por dentro deste) na veia jugular externa. Tanto o cateter como o kit introdutor foram preenchidos com solução fisiológica com heparina a 0,8%.

Durante o procedimento, os bezerros foram colocados em decúbito lateral esquerdo e amarrados com os membros pélvicos e torácicos levemente esticados, de modo a não causar desconforto para os animais, voltados caudal e cranialmente respectivamente. Foi realizada tricotomia no pescoço na região da veia jugular externa direita, sendo realizada anestesia local infiltrativa com 1,5mL de lidocaína 2% sem vaso constritor, por via subcutânea no local onde o cateter seria inserido. Após anestesia, foi realizada incisão de aproximadamente 1cm, para colocação do Kit introdutor. Uma vez que a pele de bovinos é espessa, foi necessário a realização de uma pequena incisão de pele antes da colocação do kit introdutor, que é uma espécie de cateter com aproximadamente 20cm de comprimento e que também tem uma parte de silicone, dentro da qual passará o cateter de termodiluição de Swan-Ganz. Feita a incisão, é colocado o Kit introdutor com consequente passagem

do cateter de termodiluição de Swan-Ganz (Figura 2). O cateter tem dois sensores de pressão: um na ponta e outro a 30cm da extremidade do cateter. Quando o sensor da ponta do cateter está na artéria pulmonar, o outro sensor está localizado no átrio direito. O cateter usado também apresentava um sensor para aferição da temperatura e um conector para inflar o balonete que existe em sua extremidade e que permite que a pressão da artéria pulmonar ocluída fosse aferida. A pressão da artéria pulmonar ocluída é semelhante a pressão do átrio esquerdo.

Figura 2 – Introdução do cateter de Swanz-Ganz

Fonte: (FANTINATO NETO, 2015).

Legenda: A. Incisão da pele do pescoço junto à veia jugular externa, com anestesia local prévia; B. Detalhe do kit introdutor acoplado na veia jugular externa; C. Visão geral da fixação do kit introdutor; D. Cateter de termodiluição de Swanz-Ganz 4 vias.

Desta maneira, o cateter de termodiluição de Swan-Ganz foi inserido observando-se a quantidade do cateter que era introduzida no bezerro através das marcas que o mesmo possui em sua superfície a cada 10cm, e pela observação das ondas mostradas no monitor multiparamétrico. Quando a ponta do cateter era posicionada no ventrículo direito, o balonete era inflado com 1 a 1,5mL de ar (dependendo do tamanho do animal), em seguida, o cateter era introduzido um pouco mais adiante, até

atingir a circulação pulmonar. O balonete então era esvaziado para aferição da pressão da artéria pulmonar não ocluída anterior a aferição da pressão da artéria pulmonar ocluída (Figura 3).

Figura 3 – Ondas observadas no monitor multiparamétrico

Fonte: (FANTINATO NETO, 2015)

Legenda: A. Transição da onda de artéria pulmonar (PAP) para artéria pulmonar ocluída (PAPo). B. Transição de onda de ventrículo (PVD) para artéria pulmonar ocluída (PAPo) e novamente onda de ventrículo.

Com o cateter inserido no bezerro, eram aferidas e anotadas das pressões do átrio direito (PAD), do ventrículo direito (PVD), da artéria pulmonar (PAP) e da artéria pulmonar ocluída (PAPo; que representa a pressão do átrio esquerdo).

3.2.2 Hemogasometria

Foram colhidos sangue arterial, venoso e venoso misto dos animais nos tempos 1º dia (com 6 horas de vida) e 2º (entre 44 e 48 horas de vida), 7º, 14º e 30º dias de vida. Foi usado o aparelho de hemogasometria portátil i-STAT® ONE (Abbott Point of Care Inc., Princeton, NJ, USA) com cartucho próprio para esse fim CG7+ (Abbott Point of Care Inc., Princeton, NJ, USA). O sangue arterial foi colhido da artéria auricular caudal, usando-se escalpe número 27 (BD Asepto® - Becton Dickinson Ind. Cir. Ltda., Juiz de Fora, MG, Brazil) e seringa própria para colheita de sangue para hemogasometria (Blood Gas Monovette® - Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany). O sangue venoso foi colhido da veia cava cranial, e o sangue venoso misto foi colhido da artéria pulmonar, pelo cateter de Swan-Ganz. Sabendo que o volume de solução dentro do cateter é de 1,5mL, foi necessário retirar entre 3 e 5mL de sangue antes da colheita do sangue para hemogasometria, afim de se retirar a solução heparinizada e sangue contendo heparina o que poderia comprometer a amostra. Todas hemogasometrias foram realizadas imediatamente após a colheita de sangue.

Depois da coleta, o sangue heparinizado, retirado antes do sangue a ser usado na hemogasometria era devolvido ao animal e, em seguida, era colocado um pouco de solução fisiológica com heparina, no intuito de deixar o cateter preenchido com essa solução. O cartucho utilizado para colheita realizava pH, pressões parciais de oxigênio (pO_2 ; mmHg) e dióxido de carbono (pCO_2 ; mmHg), excesso de base (BE; mEq/L), total de dióxido de carbono (tCO_2 ; mEq/L), saturação de oxigênio (sO_2 ; %), hematócrito (Hct; %), hemoglobina calculada a partir do hematócrito (Hb; g/dL) e íons de bicarbonato (HCO_3^- ; mmol/L), sódio (Na^+ ; mEq/L), potássio (K^+ ; mEq/L) e cálcio ionizado (Ca^{2+} ; mg/dL).

3.2.3 Espirometria

A espirometria é o exame capaz de avaliar objetivamente a função pulmonar de um indivíduo. O equipamento dotado de uma turbina volumétrica bidirecional com sensor rotacional óptico-eletrônico, por onde o ar inspirado e expirado passam. O aparelho usado foi o espirômetro portátil DATOSPIR MICRO C® (Sibelmed, Barcelona, Espanha) que além de facilitar o uso a campo, por ser portátil, tem capacidade de armazenar os dados para posterior análise, impressão e interpretação. A composição, temperatura ou humidade do ar não afetam as mensurações. O espirômetro foi acoplado a uma máscara totalmente vedada, por onde o bezerro respirava, fazendo com que o ar respirado obrigatoriamente passasse pela turbina do equipamento, realizando-se as mensurações. A máscara era colocada no bezerro em estação, esperava-se de 30 a 60 segundos para que ele se acostumasse, e as mensurações eram realizadas. Foram aferidos o volume expirado em cada respiração (V_{exp}) expresso em litros (L), o pico do fluxo expirado (PEF) expresso em litros por segundo (L/s) e foi calculado o volume minuto (V_{min}), multiplicando-se o V_{exp} pela frequência respiratória (FR) expresso em litros por minuto (L/min).

3.2.4 Capnografia

Com base nos princípios da lei de Beer-Lambert, na qual foi estabelecido que a concentração de um soluto dissolvido num solvente pode ser determinada pelo seu grau de absorção luminosa, a capnografia é capaz de analisar a quantidade de dióxido de carbono no ar expirado (CO_{2exp}) e inspirado (CO_{2insp}). O CO_2 respirado absorve uma fração de luz infravermelha emitida pelo aparelho,

perfazendo, dessa maneira, a mensuração da quantidade de CO₂ tanto no ar expirado quanto inspirado. Para essa análise foi usada uma máscara completamente vedada, assim como a da espirometria, de maneira que o sensor de capnografia (GE Capnostat® CO₂ Sensor - GE Medical Systems Information Technologies, Inc., Freiburg, Germany) do monitor multiparamétrico acoplava-se pela saída de ar da máscara, por onde eram feitas as mensurações.

3.2.5 Análise estatística

Os dados obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados utilizando o programa estatístico Statistical Analysis System (SAS, 2011), com prévia verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE). As variáveis que não atenderam às premissas estatísticas foram submetidas à transformação logarítmica [$\text{Log}(X+1)$] ou o inverso ($1/X$) ou potência lizados ao quadrado (X^2). Os dados originais ou transformados, quando este procedimento foi necessário, foram submetidos à Análise de Variância. À análise estatística foi adicionada o fator medidas repetidas no tempo, referentes aos diversos momentos de amostragem. As probabilidades de interações com o tempo foram determinadas pelo teste de Greenhouse-Geisse, utilizando-se o comando REPEATED gerado pelo procedimento MIXED (PROC MIXED do SAS). As análises por tempo somente serão realizadas quando as interações entre tempo e tratamentos forem significativas. Análises de correlação de Pearson foram feitas entre as diferentes amostras de sangue para as variáveis de hemogasometria, assim como para CO_{2exp} e a pCO₂ das diferentes amostras de sangue, usando-se o procedimento CORR. Em todas as análises estatísticas, o nível de significância considerado foi 5%.

3.3 RESULTADOS

São apresentados resultados dos exames de cateterização invasiva com cateter de termodiluição de Swan-Ganz, hemogasometria, espirometria e capnografia de bezerras da raça Nelore, criados em sistema de pastejo rotacionado, juntamente com suas mães, do nascimento aos 30 dias de vida, demonstrando as alterações hemodinâmicas e função pulmonar.

3.3.1 Avaliação das pressões invasivas de átrio e ventrículo direito, artéria pulmonar e artéria pulmonar ocluída de bezerros da raça Nelore.

Foram avaliados bezerros da raça Nelore no 1° dia (com 6 horas de vida), 2° dias (entre 44 e 48 horas de vida), 7°, 14° e 30° dia de vida. Os animais foram retirados dos piquetes, onde ficavam com suas respectivas mães, pelo tempo suficiente para realização do procedimento, e em seguida eram devolvidos, para que continuassem junto com as mães sem que essas rejeitassem seus bezerros. Os valores das pressões invasivas de átrio direito (PAP), ventrículo direito (PVD), artéria pulmonar (PAP) e artéria pulmonar ocluída (PAPo), que representa os valores de pressão do átrio esquerdo, nos diferentes momentos de vida dos bezerros são apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Valores (média $\pm$ desvio padrão) das pressões invasivas de artéria pulmonar (PAP; mmHg), artéria pulmonar ocluída (representativa do átrio esquerdo - PAPo; mmHg), átrio direito (PAD; mmHg) e ventrículo direito (PVD; mmHg) de bezerros da raça Nelore concebidos por inseminação artificial, nascidos por eutocia e mantidos a pasto junto das mães em diferentes tempos de vida: 1° dia (6 horas de vida), 2° dia (entre 44 e 48 horas de vida), 7°, 14° e 30° dias de vida

	PAP	PAPo	PAD	PVD
1° dia	47,20 $\pm$ 15,93 ^a	8,77 $\pm$ 1,91	6,97 $\pm$ 1,87 ^a	31,63 $\pm$ 6,94 ^a
2° dia	28,53 $\pm$ 4,05 ^b	8,00 $\pm$ 3,03	4,97 $\pm$ 2,68 ^b	24,70 $\pm$ 9,67 ^b
7° dia	26,40 $\pm$ 5,27 ^b	7,37 $\pm$ 2,92	5,93 $\pm$ 3,06 ^a	22,17 $\pm$ 12,36 ^{bc}
14° dia	21,30 $\pm$ 4,49 ^c	7,40 $\pm$ 4,07	5,27 $\pm$ 3,31 ^a	21,17 $\pm$ 8,00 ^{bc}
30° dia	19,33 $\pm$ 2,70 ^c	9,78 $\pm$ 5,51	4,19 $\pm$ 2,42 ^b	17,89 $\pm$ 4,31 ^c

Nota: Letras minúsculas em uma mesma coluna identifica diferenças significativas no tempo ($p < 0,05$).

Na figura 4 é mostrada a variação individual dos valores de PAP nos diferentes momentos de mensuração. A partir do 7° dia, nenhum animal teve valor de PAP superior a 35 mmHg (Considerado hipertensão) e apenas 3 animais apresentaram PAP superior à 30 mmHg. As variáveis PAP, PAD, PVD (Tabela 1) e PNI (Tabela 2) tiveram diferença significativa com o passar do tempo, onde a PAP, PAD e PVD tiveram seus valores reduzidos, ao passo que a PAPo (representando a pressão do ventrículo esquerdo) não sofreu alteração significativa. A PNI, por outro lado, teve aumento de seus valores.

Figura 4 – Variação dos valores de PAP

Fonte: (FANTINATO NETO, 2015).

Legenda: Média e valores individuais de PAP de bezerros da raça Nelore, concebidos por IA e nascidos por eutocia no 1º dia (6 horas de vida), 2º dia (entre 44 e 48 horas de vida), 7º, 14º e 30º dias de vida.

Nota: Letras minúsculas identificam médias diferentes no tempo ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Valores (média $\pm$ desvio padrão) da pressão arterial sistêmica média não invasiva (PNI; mmHg) de bezerros da raça Nelore concebidos por inseminação artificial, nascidos por eutocia e mantidos a pasto junto das mães em diferentes tempos de vida: 1º dia (6 horas de vida), 2º dia (entre 44 e 48 horas de vida), 7º, 14º e 30º dias de vida

	PNI
1º dia	82,17 $\pm$ 15,69 ^a
2º dia	92,66 $\pm$ 16,15 ^{ab}
7º dia	101,75 $\pm$ 16,23 ^{bc}
14º dia	98,43 $\pm$ 18,25 ^{bc}
30º dia	106,96 $\pm$ 23,96 ^c

Nota: Letras minúsculas em uma mesma coluna identifica diferenças significativas no tempo ($p < 0,05$).

3.3.2 Hemogasometria

Nos momentos do procedimento de cauterização invasiva, foram colhidos sangue arterial (Tabela 3), colhido da artéria auricular caudal, sangue venoso central (Tabela 3), colhido da veia cava cranial, e sangue venoso misto (Tabela 3), colhido da artéria pulmonar, por ocasião da passagem do cateter de Swan-Ganz. Os dados de hemogasometria utilizados foram pH, $p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$, BE, HCO_3^- , $t\text{CO}_2$ e sO_2 , que são as variáveis relevantes para avaliação do período de transição da vida intra- para a vida extrauterina.

Tabela 3 – Média $\pm$ desvio padrão de pH, pressão parcial de dióxido de carbono ($p\text{CO}_2$; mmHg), pressão parcial de oxigênio ($p\text{O}_2$; mmHg), total de dióxido de carbono ($t\text{CO}_2$; mEq/L), saturação de oxigênio ($s\text{O}_2$; %), excesso de base (BE) e íons de bicarbonato (HCO_3^-) do sangue arterial (colhido da artéria auricular caudal), de bezerras da raça Nelore concebidos por IA e nascidos por eutocia, no momento de aferição das pressões invasivas: 1° dia (6 horas de vida), 2° dia (entre 44 e 48 horas de vida), 7°, 14° e 30° dias de vida)

	Variável	1° dia	2° dia	7° dia	14° dia	30° dia
pH	Arterial	7,428±0,046	7,464±0,037	7,448±0,025	7,448±0,031	7,436±0,048
	Venoso Central	7,398±0,023	7,424±0,029	7,424±0,023	7,418±0,025	7,390±0,049
	Venoso Misto	7,407±0,032	7,431±0,028	7,417±0,030	7,412±0,016	7,394±0,046
pCO ₂ (mmHg)	Arterial	38,65±3,91	40,03±3,65	41,77±3,65	41,88±3,85	41,51±3,55
	Venoso Central	43,36±1,91	45,26±2,64	45,09±3,47	46,19±2,68	46,22±5,51
	Venoso Misto	43,27±2,04 ^c	44,61±3,08 ^{bc}	44,76±3,00 ^b	47,98±2,41 ^a	46,99±4,52 ^{ab}
pO ₂ (mmHg)	Arterial	72,70±12,39 ^a	58,20±13,79 ^b	55,00±13,02 ^b	59,40±15,39 ^b	64,30±8,74 ^{ab}
	Venoso Central	33,38±4,98 ^{bc}	30,70±2,21 ^c	37,00±9,57 ^b	37,80±7,70 ^{ab}	41,11±4,23 ^a
	Venoso Misto	39,50±14,55	31,90±6,82	34,80±9,72	32,80±3,01	34,33±3,94
tCO ₂ (mEq/L)	Arterial	26,80±3,39 ^b	30,10±3,41 ^a	30,30±2,11 ^a	30,40±2,27 ^a	29,10±1,73 ^a
	Venoso Central	28,00±1,77 ^c	30,90±0,71 ^a	30,80±2,04 ^{ab}	31,30±2,58 ^a	29,11±1,69 ^{bc}
	Venoso Misto	28,60±2,37 ^c	32,00±1,00 ^{ab}	30,10±2,51 ^{bc}	32,10±2,18 ^a	30,22±1,79 ^{abc}
sO ₂ (%)	Arterial	94,30±2,36	89,30±6,09	86,10±10,89	87,30±9,01	92,10±3,35
	Venoso Central	62,50±7,95 ^{bc}	59,40±5,93 ^c	69,11±12,15 ^{ab}	70,10±9,45 ^{ab}	74,78±5,89 ^a
	Venoso Misto	69,50±12,19	60,40±13,55	64,00±13,53	62,40±5,64	64,56±7,60
BE (mEq/L)	Arterial	1,30±3,86 ^c	5,30±3,83 ^a	4,90±2,08 ^{ab}	4,90±2,33 ^{ab}	3,60±2,12 ^b
	Venoso Central	1,88±2,10 ^c	5,30±2,75 ^a	5,00±2,40 ^{ab}	5,20±2,74 ^a	2,78±1,79 ^{bc}
	Venoso Misto	2,50±2,80 ^b	6,33±1,00 ^a	4,30±2,87 ^{ab}	6,10±2,51 ^a	3,78±2,11 ^b
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	Arterial	25,65±3,38 ^c	29,00±3,29 ^a	28,88±1,93 ^{ab}	28,96±2,21 ^{ab}	27,89±1,60 ^b
	Venoso Central	26,46±1,69 ^c	30,44±0,72 ^a	29,47±2,17 ^{ab}	29,87±2,40 ^a	27,83±1,54 ^{bc}
	Venoso Misto	27,32±2,34 ^b	30,56±0,89 ^a	28,88±2,46 ^{ab}	30,61±2,08 ^a	28,66±1,56 ^b

Nota: Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha representa diferença significativa entre tempos ($p < 0,05$).

Uma vez que o sangue venoso é retirado com maior facilidade do animal em situações de campo, tentou-se estabelecer correlação entre as variáveis pH, $p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$, $t\text{CO}_2$, $s\text{O}_2$, Be e HCO_3^- dos diferentes tipos de amostras nos diferentes momentos. As correlações das variáveis supracitadas entre o sangue arterial e o sangue venoso central são apresentados na tabela 4; entre o sangue arterial e o

sangue venoso misto na tabela 5; e entre o sangue venoso central e venoso misto na tabela 6. Ressalta-se que as mais significativas correlações foram encontradas aos 30 dias de vida.

Tabela 4 – Coeficiente de correlação (r^2) entre as amostras sangue arterial (colhido da artéria auricular caudal) e sangue venoso central (colhido da veia cava cranial) das variáveis pH, pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2 ; mmHg), pressão parcial de oxigênio (pO_2 ; mmHg), total de dióxido de carbono (tCO_2 ; mEq/L), saturação de oxigênio (sO_2 ; %), excesso de base (BE) e íons de bicarbonato (HCO_3^-) de bezerros da raça Nelore concebidos por IA e nascidos por eutocia, no momento de aferição das pressões invasivas – 1° dia (6 horas de vida), 2° dia (entre 44 e 48 horas de vida), 7°, 14° e 30° dias de vida

Sangue arterial × Sangue venoso central					
	1° dia	2° dia	7° dia	14° dia	30° dia
pH	0,4743	0,5151	0,3657	0,1648	0,9231*
pCO_2	0,2717	0,2932	0,5004	0,2991	0,9031*
pO_2	-0,3473	0,2424	-0,3103	-0,5235	0,9266*
tCO_2	0,8434*	0,1857	0,8653*	0,7726*	0,8349*
sO_2	-0,1526	0,1377	-0,1300	-0,7278*	0,8888*
BE	0,4903	0,1383	0,9338*	0,9600*	0,8028*
HCO_3^-	0,8152	0,1427	0,9295*	0,8305*	0,8466*

Nota: * $p < 0,05$

Tabela 5 – Coeficiente de correlação (r^2) entre as amostras sangue arterial (colhido da artéria auricular caudal) e sangue venoso misto (colhido da artéria pulmonar) das variáveis pH, pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2 ; mmHg), pressão parcial de oxigênio (pO_2 ; mmHg), total de dióxido de carbono (tCO_2 ; mEq/L), saturação de oxigênio (sO_2 ; %), excesso de base (BE) e íons de bicarbonato (HCO_3^-) de bezerros da raça Nelore, concebidos por IA e nascidos por eutocia, no momento de aferição das pressões invasivas – 1° dia (6 horas de vida), 2° dia (entre 44 e 48 horas de vida), 7°, 14° e 30° dias de vida

Sangue arterial × Sangue venoso misto					
	1° dia	2° dia	7° dia	14° dia	30° dia
pH	0,3865	0,5616	-0,1993	0,0426	0,9691*
pCO_2	-0,1310	0,2778	0,1151	-0,2991	0,9481*
pO_2	-0,6952*	-0,3623	-0,5928	0,2321	0,5150*
tCO_2	0,9161*	0,4924	0,7683*	0,8875*	0,8361*
sO_2	0,0251	-0,2950	-0,6500*	-0,1097	0,9382*
BE	0,9232*	0,8125*	0,7133*	0,9687*	0,8532*
HCO_3^-	0,9552*	0,4393	0,8224*	0,9191*	0,8613*

Nota: * $p > 0,05$

Tabela 6 – Coeficiente de correlação (r^2) de Pearson entre as amostras sangue venoso central (colhido da veia cava cranial) e sangue venoso misto (colhido da artéria pulmonar) das variáveis pH, pressão parcial de dióxido de carbono ($p\text{CO}_2$; mmHg), pressão parcial de oxigênio ($p\text{O}_2$; mmHg), total de dióxido de carbono ($t\text{CO}_2$; mEq/L), saturação de oxigênio ($s\text{O}_2$; %), excesso de base (BE) e íons de bicarbonato (HCO_3^-) de bezerros da raça Nelore, concebidos por IA e nascidos por eutocia, no momento de aferição das pressões invasivas – 1° dia (6 horas de vida), 2° dia (entre 44 e 48 horas de vida), 7°, 14° e 30° dias de vida

Sangue venoso central × Sangue venoso misto					
	1° dia	2° dia	7° dia	14° dia	30° dia
pH	0,6595*	0,9005*	0,4727	0,6338*	0,9102*
$p\text{CO}_2$	0,3744	0,8289*	0,6296	0,4943	0,9349*
$p\text{O}_2$	0,5653	0,7261*	0,0741	0,3431	0,9591*
$t\text{CO}_2$	0,9410*	-0,1767	0,8042*	0,9000*	0,8591*
$s\text{O}_2$	-0,0507	0,8123*	0,2344	0,5747	0,9048*
BE	0,8884*	0,0790	0,8054*	0,9158*	0,8146*
HCO_3^-	0,9181*	0,1098	0,8578*	0,9229*	0,8769*

Nota: * $p > 0,05$

Tabela 7 – Valores (média $\pm$ desvio padrão) de frequência respiratória (FR), expressa em movimento por minuto (mpm), e de frequência cardíaca (FC), expressa em batimentos por minuto (bpm) de bezerros da raça Nelore concebidos por IA e nascidos por eutocia, no momento de aferição das pressões invasivas: 1° dia (6 horas de vida), 2° dia (entre 44 e 48 horas de vida), 7°, 14° e 30° dias de vida

	FR (mpm)	FC (bpm)
1° dia	32,33 $\pm$ 6,16	117,50 $\pm$ 16,03
2° dia	35,04 $\pm$ 12,39	109,00 $\pm$ 17,98
7° dia	37,19 $\pm$ 17,02	124,00 $\pm$ 21,82
14° dia	30,96 $\pm$ 15,55	107,33 $\pm$ 19,49
30° dia	34,33 $\pm$ 10,31	107,56 $\pm$ 23,28

3.3.3 Espirometria e capnografia

Os dados referentes à espirometria são apresentados nas figuras 5, 6 e 7; e de capnografia na figura 8, e mostram a evolução dos valores de PEF, V_{exp} , V_{min} e $\text{CO}_{2\text{exp}}$ crescentes (Tabela 8) conforme o crescimento do animal. A frequência respiratória não sofreu influência do tempo média de $34,0 \pm 12,4$ mpm. O $\text{CO}_{2\text{insp}}$ se apresentou como 0mmHg para todos animais em todos tempos.

Não foram encontradas correlações significantes entre a $p\text{CO}_2$ das diferentes amostras de sangue (sangue arterial, venoso central e venoso misto) e a $p\text{CO}_{2\text{exp}}$. Na tabela 9 são apresentados os coeficientes de correlação.

Tabela 8 – Valores (média $\pm$ desvio padrão) de pico do fluxo expiratório (PEF), volume expirado (Vexp), volume minuto (Vmin) e dióxido de carbono expirado (CO₂exp) de bezerros da raça Nelore, concebidos por IA e nascidos por eutocia, no 1º dia (6 horas de vida), 2º dia (entre 44 e 48 horas de vida), 7º, 14º e 30º dias de vida

	PEF (L/s)	Vexp (L)	Vmin (L/min)	CO ₂ exp (mmHg)
1º dia	0,81 $\pm$ 0,26 ^c	0,42 $\pm$ 0,15 ^b	14,14 $\pm$ 5,84 ^b	32,30 $\pm$ 4,48 ^b
2º dia	1,03 $\pm$ 0,42 ^{bc}	0,52 $\pm$ 0,15 ^b	17,16 $\pm$ 6,83 ^{ab}	33,42 $\pm$ 6,59 ^b
7º dia	1,13 $\pm$ 0,37 ^{bc}	0,53 $\pm$ 0,12 ^b	19,45 $\pm$ 9,75 ^a	37,81 $\pm$ 4,18 ^a
14º dia	1,21 $\pm$ 0,46 ^b	0,57 $\pm$ 0,16 ^{ab}	17,98 $\pm$ 10,18 ^a	37,15 $\pm$ 5,04 ^a
30º dia	1,42 $\pm$ 0,64 ^a	0,68 $\pm$ 0,09 ^a	23,10 $\pm$ 6,75 ^a	37,81 $\pm$ 5,02 ^a

Nota: Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma coluna representa diferença significativa no tempo (p<0,05).

Figura 5 – Gráfico da evolução dos valores de pico do fluxo expiratório (PEF)

Fonte: (FANTINATO NETO, 2015).

Legenda: Pico do fluxo expiratório, expresso em litros por segundo (L/s), de bezerros da raça Nelore, concebidos por inseminação artificial, e nascido por eutocia, em diferentes momentos de vida: 1º dia (com 6 horas de vida), 2º dia (entre 44 e 48 horas de vida), 7º, 14º e 30º dias de vida.

Nota: Letras minúsculas diferentes sobrescritas representa diferença significativa nos diferentes momentos (p<0,05).

Figura 6 – Gráfico da evolução dos valores do volume expirado (Vexp)

Fonte: (FANTINATO NETO, 2015).

Legenda: Volume expirado (Vexp), expresso em litros (L), de bezerros da raça Nelore, concebidos por inseminação artificial, e nascido por eutocia, em diferentes momentos de vida: 1º dia (com 6 horas de vida), 2º dia (entre 44 e 48 horas de vida), 7º, 14º e 30º dias de vida.

Nota: Letras minúsculas diferentes sobrescritas representa diferença significativa nos diferentes momentos ($p < 0,05$).

Figura 7 – Gráfico da evolução dos valores de volume minuto (V_{min})

Fonte: (FANTINATO NETO, 2015)

Legenda: Volume minuto (V_{min}), expressos em litros por minuto (L/min), de bezerros da raça Nelore, concebidos por inseminação artificial, e nascido por eutocia, em diferentes momentos de vida: 1º dia (com 6 horas de vida), 2º dia (entre 44 e 48 horas de vida), 7º, 14º e 30º dias de vida.

Nota: Letras minúsculas diferentes sobrescritas representa diferença significativa entre os diferentes momentos ($p < 0,05$).

Figura 8 – Gráfico da evolução dos valores de dióxido de carbono expirado (CO₂exp)

Fonte: (FANTINATO NETO, 2015)

Legenda: Dióxido de carbono expirado (CO₂exp), expressos em milímetros de mercúrio (mmHg), de bezeros da raça Nelore, concebidos por inseminação artificial, e nascido por eutocia, em diferentes momentos de vida: 1º dia (com 6 horas de vida), 2º dia (entre 44 e 48 horas de vida), 7º, 14º e 30º dias de vida.

Nota: Letras minúsculas diferentes sobrescritas representa diferença significativa entre os diferentes momentos ($p < 0,05$).

Tabela 9 – Coeficientes de correlação (r^2) entre o dióxido de carbono expirado a cada respiração (CO₂exp) e a pressão parcial de dióxido de carbono das diferentes amostras de sangue colhido (sangue arterial, sangue venoso central e sangue venoso misto)

	Sangue arterial	Sangue venoso central	Sangue venoso misto
6 horas	-0,2616	0,6007	0,4393
48 horas	-0,1989	0,5347	0,4784
7 dias	0,6447	0,0003	0,1012
14 dias	-0,2086	0,0447	0,4909
30 dias	0,4679	0,6374	0,6832

Nota: Não foram encontradas correlações significativas.

3.4 DISCUSSÃO

Nas primeiras horas de vida existe hipertensão fisiológica da artéria pulmonar decorrente ao processo de adaptação a vida extrauterina. Entre 6 horas e 48 horas de vida houve uma diminuição da PAP da ordem de 42,5 %. Entre 48 horas de vida e 30 dias de vida houve uma diminuição da PAP da ordem de 27,3 %. Considerando-se que o limite de PAP igual a 35 mmHg a partir do qual considera-se, em humanos, que existe hipertensão da artéria pulmonar, verificou-se que com 6 horas de vida que 88,8 % (8/9) animais estavam com valores acima deste limite e com 48 horas de vida somente 11,1 %

(1/9) dos bezerros apresentavam valores de PAP maiores do que 35 mmHg. A partir de 7 dias de vida nenhum animal apresentava valores maiores do que este limite.

Os resultados encontrados na presente pesquisa, com bezerros zebuínos da raça Nelore, mostram a grande influência da idade nos valores de PAP, sendo que há divergências na literatura de quando deveria ocorrer a estabilização da PAP. Em pesquisa realizada por Amory et al. (1993) utilizando 41 bezerros da raça Holandesa, sem sedação ou anestesia, foi verificado entre uma semana de vida e um ano de idade não havia modificações da PAP, sendo que os valores médios obtidos em bezerros mantidos em estação sem qualquer medicação variavam entre 20,5 e 23,3 mmHg. Em estudo com 10 bezerros da raça holandesa, Yasuoka (2012) relatou que os valores de PAP obtidos de bezerros em decúbito lateral sem qualquer medicação e com 1, 7, 15 e 30 dias de vida eram, respectivamente, iguais a $39,9 \pm 13,5$ mmHg, $27,8 \pm 9,98$ mmHg, $28,0 \pm 9,5$ mmHg e $25,2 \pm 13,2$ mmHg, sendo que a partir de 7 dias de vida eles passavam a ficar estáveis. Takaseya et al. (2012) encontraram valores de PAP de $24,0 \pm 4,3$ mmHg em bezerros da raça Jersey não anestesiados. Por outro lado, Meyer et al. (2010) trabalhando com 28 bezerros da raça Holandesa com idade variando entre 25 e 53 dias encontraram em animais mantidos em decúbito dorsal valores de PAP variando entre $19,0 \pm 0,8$ e $20,0 \pm 1,6$ mmHg para os diferentes grupos de seu estudo antes do tratamento.

Os resultados obtidos por nós para o grupo de bezerros com 14 e 30 dias de vida são similares aqueles encontrados na literatura em experimento feito por Sustronck et al. (1997), que utilizou 5 bezerros holandeses, com idade variando entre 64 e 71 dias de vida, submetidos a anestesia geral intravenosa com EGG, xilazina e quetamina (PAP igual a $21,6 \pm 3,5$ mmHg) ou similares aqueles obtidos em pesquisa feita por Takaseya et al. (2012) que utilizou 11 bezerros Jersey, com peso variando entre 60 e 107 Kg, submetidos a anestesia geral inalatória induzida com quetamina e mantida com isoflurano (PAP igual a $19,9 \pm 3,8$ mmHg). Araújo et al. (2014), em trabalho com 8 bezerros da raça holandesa com idade média de 10 meses, submetidos a anestesia geral inalatória induzida com xilazina, quetamina e midazolam e mantida com isoflurano relataram valores de PAP abaixo dos encontrados nessa pesquisa (PAP variando entre $13,0 \pm 1,0$ e $14,0 \pm 3,0$ mmHg).

A descrição dos resultados anteriores mostram variações na PAP que podem ser creditadas a idade, ao modo de contenção, ao procedimento anestésico que o animal foi submetido e, principalmente, a fatores raciais. Os animais utilizados em nossa pesquisa foram mantidos em decúbito lateral, não receberam qualquer medicação e permaneceram tranquilos e com os olhos vendados durante o procedimento, sem que fossem notadas alterações em seus parâmetros cardiopulmonres (p.e. frequências cardíacas e respiratórias). Desta forma, não houve a necessidade de que sedação ou anestesia fosse utilizada durante os exames.

Amory et al. (1991) relataram hipertensão transitória associada ao aumento da frequência cardíaca e respiratória, e justificaram como sendo uma reação, de sensores mecânicos locais, à ponta do cateter. Na presente, em nenhum dos animais ou momentos procedimentais foi identificado esse comportamento de aumento transitório, e inesperado, da PAP, associado ou não à taquicardia e/ou taquipneia.

Assim como a PAP, a PVD diminuiu significativa e progressivamente da primeira aferição (com 6 horas de vida) até os 30 dias de vida. Durante o processo de adaptação à vida extrauterina existe o fechamento do ducto arterioso, relaxamento da artéria pulmonar, aumento do fluxo sanguíneo para os pulmões e diminuição da resistência pulmonar vascular (RPV), sendo a diminuição da PAP e da PVS reflexo dessas modificações. Ao mesmo tempo que há diminuição nos valores de PAP e PVD, há aumento na resistência vascular sistêmica (RVS) observado pelo aumento significativo da PNI conforme os bezerros ficavam mais velhos. É importante ressaltar que não houve hipertensão da artéria pulmonar persistente ou retorno a circulação fetal nos animais avaliados, porém durante o processo adaptativo observou-se que entre o 2º e o 15º dias de vida há diminuição da pO_2 do sangue arterial.

Pogliani (2010), em estudo com animais da raça Nelore concebidos por inseminação artificial (IA) ou monta natural (MN), utilizando-se da ultrassonografia “doppler”, relatou presença de fluxo turbulento através da comunicação interatrial (forame oval) até 7 dias de vida, sendo que a maioria dos animais apresentou o desaparecimento do fluxo turbulento, ou fechamento do forame oval, até os 4 dias de vida. Apesar de não ter sido encontrada diferença significativa entre a PAPo (que representa a pressão do átrio esquerdo) e a PAD, a análise individual dos resultados por nós obtidos sugerem que, em parte dos bezerros poderia ocorrer um “shunt” interatrial no sentido do coração direito para esquerdo, pois no 1º dia de vida (6 horas) 11,1% (1/9) dos animais tinham uma PAD maior que a PAPo, sendo que no 2º, 7º e 15º dias de vida, houve aumento, respectivamente para 22,2% (2/9); 33,3% (3/9) e 33,3% (3/9) do percentual de bezerros nos quais a PAD era maior que a PAPo. Ao avaliar-se a hemogasometria de sangue obtido da veia cava cranial (sangue venoso central) e de sangue obtido na artéria pulmonar (sangue venoso misto) observa-se que no 1º dia de vida a PO_2 de sangue venoso misto era maior do que o valor do sangue venoso central. Esse fato poderia indicar a presença de shunt cardíaco no sentido esquerdo para direito.

De 25% a 30% da população humana adulta tem forame oval patente (HOMMA; SACCO, 2005; SHARMA; FORD; CALVERT, 2014), sendo que em 50% das crianças há o fechamento do forame oval até os cinco anos de vida, sendo que o fechamento funcional acontece nas primeiras respirações (SHARMA; FORD; CALVERT, 2014). Durante o processo adaptativo observado nos primeiros dias e semanas de vida em bezerros da raça Nelore, a ocorrência de fluxo sanguíneo no

sentido esquerdo para direito ou mesmo do direito para esquerdo no forame oval deveria ser considerado fisiológico, e mesmo que o forame oval não esteja completamente fechado, até o 7° ou 14° dia e que haja mistura de sangue venoso e arterial, não ocorreram alterações na oxigenação dos animais que pudessem determinar implicações para a vida do animal.

No que se diz respeito a avaliação da espirometria, no 1° dia de vida, os bezerros do presente experimento apresentaram valores próximos apresentados pela literatura internacional, para bezerros taurinos (VARGA et al., 1999, 2001). Bleul e Bylang (2012), porém, em estudo com bezerros *Bos taurus* de 3 a 15 horas de vida, relataram valores de $0,21 \pm 0,07L$ e $0,25 \pm 0,10L$ para V_{exp} , inferiores aos apresentados nessa pesquisa para animais com até 6 horas de vida ($0,42 \pm 0,15L$). Os valores de V_{min} aqui reportados são muito próximos dos valores reportados por Bleul e Bylang (2012) que encontraram valores de $13,83 \pm 5,00L/min$ para bezerros da taurinos de 3 a 15 horas de vida. Em outro estudo com bezerros da raça Holandesa, foram encontrados valores de V_{min} de $15,8 \pm 5,7L/min$ e $15,4 \pm 2,2L/min$ quando os animais estavam com 30 minutos e 6 horas de vida respectivamente (VARGA et al., 2001). Os mesmo autores, relatam valores de $14,3 \pm 5,9L/min$ e $19,2 \pm 5,3L/min$ para bezerros com 30 minutos e 6 horas de vida respectivamente, mas que nasceram em estado considerado de acidose ($pH < 7,2$). No estudo conduzido por Varga et al. (2001), utilizando bezerros da raça Holandesa nascidos por eutocia, em acidose ($pH < 7,2$) ou considerados com pH normal ($pH \geq 7,2$), não foram encontradas diferenças de V_{min} entre os grupos nem dos 30 minutos às 24 horas de vida. Na presente pesquisa é relatado aumento significativo de V_{min} do 1° dia em relação aos 7°, 14° e 30° dias de vida. Uma vez que a FR se manteve constante durante o período experimental, o aumento de V_{min} indica aumento da capacidade respiratória dos bezerros conforme seu crescimento, nos momentos avaliados. Foi utilizado um espirômetro portátil, com a intenção de poder aplicar a metodologia a campo. Contudo, o aparelho usado apresentou limitações na mensuração do volume inspirado, uma vez que a mensuração somente é realizada quando a duração da inspiração é superior a 2 segundos. Dessa maneira foi possível mensurar o volume inspirado apenas de alguns animais e a partir dos 14 dias de vida. De maneira geral, a técnica foi realizada de maneira satisfatória, visto que os valores encontrados se encontravam de acordo com a literatura internacional pesquisada. A espirometria pode ser aplicada a campo, usando-se o aparelho portátil, sendo que, de acordo com suas limitações, animais com uma amplitude respiratória maior têm uma avaliação mais completa da função respiratória.

Em animais hígidos adultos foram encontradas correlações entre diferentes tipo de amostra. Sucupira (2003), em estudo com novilhos mestiços, reportou altas correlações entre sangue venoso e sangue arterial para pH ($r^2=0,88$), tCO_2 ($r^2=0,94$), HCO_3^- ($r^2=0,94$), e pCO_2 ($r^2=0,56$), não sendo mostradas correlações em BE ou pO_2 . Nos animais do presente estudo, as correlações existiram

principalmente aos 30 dias de vida, momento no qual os animais atingiram definitivamente sua homeostase. Assim, existiram correlações em todos parâmetros avaliados (pH, pCO₂, pO₂, tCO₂, sO₂, BE e HCO₃⁻) tanto entre o sangue arterial e venoso central, como entre o sangue arterial e o venoso misto, e entre o sangue venoso central e venoso misto. Aparentemente, animais da raça Nelore têm seu processo adaptativo para vida extrauterina mais prolongado em comparação com animais taurinos; a PAP dos animais estudados baixou significativamente até o 14º dia de vida e, em uma análise dos valores de pO₂ apresentados, demonstram que esses animais ainda irão progredir em seu processo adaptativo.

3.5 CONCLUSÕES

Os valores encontrados na presente pesquisa servem de base de referência para bezerros saudáveis, da raça Nelore, de até 30 dias de idade, concebidos por inseminação artificial e nascidos por eutocia. Em futuras pesquisas ou avaliações feitas em bezerros recém nascidos, e advindos das biotécnicas da reprodução ou de gestações complicadas (como de bezerros muito grandes ou vacas não prontas para parição) onde seja necessária realização de cesariana, os valores apresentados nessa pesquisa poderão servir para direcionar o tratamento ou o estabelecimento de um protocolo de assistência ao neonato, assim como a formular um prognóstico.

Capítulo 4

4 VALORES DE REFERÊNCIA DA HEMOGASOMETRIA ARTERIAL DE BEZERROS DA RAÇA NELORE DURANTE O PERÍODO NEONATAL

Esse experimento objetivou-se padronizar a hemogasometria de bezerros da raça Nelore nascidos em sistema extensivo no sudeste brasileiro. Foram acompanhados partos espontâneos de vacas da raça Nelore prenhez por inseminação artificial de animais também da raça Nelore. O experimento teve a menor interferência humana possível, sendo que os bezerros utilizados ficavam a pasto com suas mães.

4.1 RESUMO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos tem grande importância no cenário mundial e nacional, sendo o Brasil o país que mais faz embriões de fertilização *in vitro* do mundo, principalmente em animais da raça Nelore. Com o aumento de animais advindos das técnicas de PIV, também aumentaram os problemas de partos, sobrevivência e sobrevida dos recém nascidos. Dez bezerros da raça Nelore, concebidos por inseminação artificial (IA), tiveram seus nascimentos acompanhados, porém sem assistência ao parto. Os partos foram observados a distância, para não ter interferência humana alguma. Foram colhidos sangue arterial quando os bezerros tinham 5 minutos (0 horas), 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas, 7, 14 e 30 dias. Nas primeiras doze horas de vida, ocorre um processo adaptativo ao novo ambiente, extra uterino, onde há diminuição dos valores de pCO_2 e tCO_2 , com aumento gradativo do pH. Não houve diferenças significativas na pO_2 ou sO_2 . A padronização da hemogasometria de bezerros da raça Nelore concebidos por IA nascidos por parto espontâneo, pode fomentar as pesquisas com animais advindos de técnicas de PIV, assim como aumentar a sobrevida e sobrevivência além de diminuir a mortalidades desses animais.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Dez vacas gestantes da raça Nelore com idades entre 30 e 36 meses foram utilizadas nesse experimento. Para acompanhamento dos partos, o piquete maternidade foi escolhido devido sua proximidade do curral. Os animais entraram nesse piquete no terço final da gestação para acostumarem-se com a movimentação de pessoal e ao tipo de pastagem. O sistema era de pastejo rotacionado, com sal e água a vontade em uma área comum (“lanchonete”) aos diferentes piquetes. Durante o dia, os funcionários passavam perto do piquete maternidade ou davam uma atenção maior do curral de manejo a cada hora, para não perderem o momento do parto. Durante a noite, eram feitos revezamentos de observação do curral, de maneira que existia uma iluminação no piquete maternidade que não atrapalhava o descanso dos animais e permitia a observação a distância. A grande maioria dos partos ocorreram logo pela manhã, o que facilitou o trabalho, sendo que nenhum parto aconteceu entre 00h00 e 05h00.

4.2.1 Hemogasometria

Foram colhidos sangue arterial da artéria auricular caudal nos tempos 5 minutos (0 horas), 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas, 7, 14 e 30 dias. Foi usado o aparelho de hemogasometria portátil i-STAT® ONE (Abbott Point of Care Inc., Princeton, NJ, USA) com cartucho próprio para esse fim CG7+ (Abbott Point of Care Inc., Princeton, NJ, USA). O sangue arterial foi colhido da artéria auricular caudal, usando-se escalpe número 27 (BD Asepto® - Becton Dickinson Ind. Cir. Ltda., Juiz de Fora, MG, Brazil) e seringa própria para colheita de sangue para hemogasometria (Blood Gas Monovette® - Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany). O cartucho utilizado para colheita realizava análises de pH, pressões parciais de oxigênio (pO_2 ; mmHg) e dióxido de carbono (pCO_2 ; mmHg), excesso de base (BE; mEq/L), total de dióxido de carbono (tCO_2 ; mEq/L), saturação de oxigênio (sO_2 ; %), hematócrito (Hct; %), hemoglobina calculada a partir do hematócrito (Hb; g/dL) e íons de bicarbonato (HCO_3^- ; mmol/L).

4.2.2 Análise estatística

Os dados obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados utilizando o programa estatístico Statistical Analysis System (SAS, 2011), com prévia verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE). As variáveis que não atenderam às premissas estatísticas foram submetidas à transformação logarítmica [$\text{Log}(X+1)$]. Os dados originais ou transformados, quando este procedimento foi necessário, foram submetidos à Análise de Variância. À análise estatística foi adicionada o fator medidas repetidas no tempo, referentes aos diversos momentos de amostragem. As probabilidades de interações com o tempo foram determinadas pelo teste de Greenhouse-Geisse, utilizando-se o comando REPEATED gerado pelo procedimento MIXED (PROC MIXED do SAS). As análises por tempo somente serão realizadas quando as interações entre tempo e tratamentos forem significativas. Análises de correlação de Pearson foram feitas entre as diferentes amostras de sangue para as variáveis de hemogasometria, assim como para CO_2exp e a pCO_2 das diferentes amostras de sangue, usando-se o procedimento CORR. Em todas as análises estatísticas, o nível de significância considerado foi 5%.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos mamíferos, o nascimento é marcado por grandes mudanças fisiológicas do recém nascido e a respiração voluntária parece ser a mais importante já nos primeiros segundos de vida. Com a respiração própria, ocorrem grandes alterações da oxigenação dos tecidos do recém nascido e também do seu equilíbrio ácido-base, que terá de se manter por mecanismos próprios. Acompanhando as mudanças relativas a respiração, a passagem para vida extra uterina é também marcada por alterações morfológicas, assim há o fechamento do ducto arterioso para que um maior volume de sangue flua para os pulmões afim de ser ocorrerem as trocas gasosas; não há mais o refluxo do átrio direito para o esquerdo pelo forame oval, também afim de privilegiar a oxigenação sanguínea; o ducto venoso se fecha dando origem ao ligamento venoso; o fluxo das artérias e veia umbilicais são reduzidos a zero, de maneira que estas estruturas perdem sua função e reduzem a ligamento medial da bexiga e ligamento redondo do fígado, respectivamente. Assim, o entendimento e a interpretação da hemogasometria neonatal apresenta importantes informações relativas a adaptação neonatal.

Em neonatologia humana, a colheita de sangue arterial para avaliação da hemogasometria é rotineira pois fornece informações sobre o estado metabólico e respiratório do indivíduo (BROWN; EILERMAN, 2006; EDWARDS; KOTTECHA; KOTTECHA, 2013). Ou seja, a hemogasometria não só é necessária para confirmar o diagnóstico de problemas respiratórios (p.e. síndrome do desconforto respiratório – RDS), mas para direcionar um tratamento adequado para cada problema e também poder se fazer prognóstico. Em medicina veterinária, a hemogasometria ainda é pouco utilizada, apesar de sua importância clínica, especialmente em grandes animais, onde há a necessidade de utilizar aparelhos portáteis. Esse estudo objetivou padronizar a hemogasometria de bezerros da raça Nelore nascidos por eutocia, em condições de campo, ou seja, em pastejo com as mães, para se ter um melhor entendimento das alterações pós natais nos gases sanguíneos e, consequentemente, na função pulmonar.

Na análise da hemogasometria, a primeira variável que chama atenção e deve ser vista é o pH (BROWN; EILERMAN, 2006; NOBLE, 2009). Todos fluidos do corpo assim como a função normal de enzimas e a manutenção da estrutura proteica e a distribuição de íons dependem e requerem um pH estável (SMITH; TAYLOR, 2005, 2008). Em humanos (tanto adultos como crianças) o pH normal encontra-se na faixa entre 7,35 e 7,45 (BROWN; EILERMAN, 2006; BAYLIS; TILL, 2009; NOBLE, 2009), em bovinos recém nascidos, o pH venoso considerado normal para bezerros da raça nelore, concebidos por fertilização *in vitro* (FIV), nascidos por parto normal é de $7,12 \pm 0,12$ (FEITOSA et al., 2012), porém, em estudos com animais taurinos, os valores de pH encontrados foram de $7,21 \pm 0,04$ com cinco minutos de vida (VARGA et al., 1998) e de $7,24 \pm 0,09$ imediatamente após o nascimento (BLEUL et al., 2007). No sangue arterial foram encontrados valores de pH de $7,26 \pm 0,03$ para animais com menos de 2 minutos de vida (VARGA et al., 1999) e $7,30 \pm 0,06$ imediatamente após o nascimento (BLEUL et al., 2007). Os mesmos autores, ainda, consideraram que bezerros nascidos com pH venoso menor que 7,2 como em estado de acidose (VARGA et al., 2001; BLEUL et al., 2007). Considerando-se que o pH venoso é mais baixo que o pH arterial, na presente pesquisa, os animais estavam com pH do sangue arterial de $7,352 \pm 0,040$ e em 3 horas elevou-se para $7,402 \pm 0,039$, ou seja, os bezerros da raça nelore, concebidos por IA e nascidos por eutocia, sem qualquer tipo de medicação para maturação pulmonar ou indução do parto nasceram com pH considerado normal para a espécie. No seu estudo com bezerros FIV, Feitosa et al. (2012) encontraram valores de pH venoso de $7,29 \pm 0,11$, quando os animais nascidos por parto normal estavam com 24 horas de vida, enquanto em estudos com bezerros *Bos taurus* considerados em acidose (pH arterial menor que 7,2), já com 6 horas de vida os animais já haviam estabilizado o pH, $7,103 \pm 0,10$ para $7,352 \pm 0,04$ (VARGA et al., 2001), e com 4 horas de vida de $7,13 \pm 0,10$ para $7,36 \pm 0,01$ (BLEUL et al., 2007), valores considerados dentro da normalidade para a espécie.

A sO_2 e pO_2 do sangue arterial são os indicadores da oxigenação e seus resultados estão mostrados na tabela 10. Em humanos, usando-se da oximetria de pulso, com menos de dois minutos de vida a sO_2 está entre 50% e 60% e com 6 minutos atinge entre 80% e 90% (MEIER-STAUSS et al., 1990). Entretanto, em estudo com bezerros *Bos taurus* recém nascidos, Bleul et al. (2007) encontrou valores menores no momento do nascimento ($64,16 \pm 20,82\%$) e, 30 minutos após, valores ($82,08 \pm 9,98\%$) muito próximos aos desta pesquisa, onde o sangue arterial foi colhido com 5 minutos de vida. A análise da sO_2 mostra que, em animais saudáveis, há um rápido aumento dos seus valores em alguns minutos, o que pode explicar os valores encontrados na primeira amostragem, da presente pesquisa, serem muito parecidos com os valores encontrados quando os animais já estavam com mais de 7 dias de vida. Nos demais tempos os valores de sO_2 corroboram com os valores reportados por Bleul et al. (2007). Ainda sim, em bezerros taurinos, recém nascidos, com RDS os valores de sO_2 nos primeiros 60 minutos de vida variam entre 27% e 78%, com média de 53% (BLEUL; BIRCHER; KÄHN, 2008). A pO_2 encontrada na presente pesquisa (Tabela 10) para bezerros da raça Nelore, recém nascidos por eutocia, apresenta valores em concordância aos valores apresentados na literatura para bezerros recém nascidos de raças europeias, apresentando, inclusive a mesma variação no momento de 12 horas de vida, quando há pequeno aumento (não significativo) e depois volta a baixar. A explicação para tal fato pode ser que há aumento compensatório devido ao novo estado, extra uterino, e quando a circulação se estabelece os valores voltam a baixar. Em bovinos taurinos adultos a pO_2 fica por volta dos 90mmHg (SUCUPIRA; ORTOLANI, 2003), em humanos recém nascidos os valores de referência estão entre 45mmHg e 60mmHg (GOEL; CALVERT, 2012).

No BE, a variação ficou dentro dos limites de normalidade para bovinos taurinos recém nascidos (BLEUL et al., 2007) e adultos (SUCUPIRA; ORTOLANI, 2003), sendo que para recém nascidos humanos a amplitude desta variável é um pouco menor – de -3mmol/L a 3mmol/L (GOEL; CALVERT, 2012). Os valores de HCO_3^- (Figura 9) tiveram uma variação, não significativa, inversamente proporcional aos valores de pH no tempo, como esperado, ou seja, o organismo utilizou do bicarbonato disponível para ajustar o pH sanguíneo. O tCO_2 é o total de dióxido de carbono no plasma, tanto na forma de HCO_3^- (sendo essa 95% do tCO_2) como de CO_2 dissolvido. Apesar de não ter grande importância clínica, houve variação no tempo ($p < 0,05$) dos valores de tCO_2 (Figura 9), acompanhando a curva de HCO_3^- , como esperado. A pCO_2 é um dos fatores mais importantes a serem analisados, pois o pulmão é o primeiro órgão a se envolver em uma possível compensação (NOBLE, 2009) tanto no caso de uma acidose como em uma alcalose. Além disso, em humanos adultos, valores de pCO_2 maiores que 45mmHg são indicativos de falhas na ventilação ou acidose respiratória, e valores abaixo de 35mmHg estão relacionados a hiperventilação alveolar ou alcalose respiratória (BROWN; EILERMAN, 2006).

Tabela 10 – Valores (média $\pm$ desvio padrão) de pH, pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2 ; mmHg), pressão parcial de oxigênio (pO_2 ; mmHg), saturação de oxigênio (sO_2 ; %) e excesso de base (BE; mEq/L) do sangue arterial de bezerros da raça Nelore, concebidos por inseminação artificial, e nascido por eutocia, em diferentes momentos de vida 5 minutos (0 horas), 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas, 7, 14 e 30 dias de vida

	pO_2 (mmHg)	sO_2 (%)	BE (mEq/L)
0 horas	63,60 $\pm$ 21,55	82,60 $\pm$ 11,64	3,40 $\pm$ 2,32
3 horas	77,99 $\pm$ 19,42	91,30 $\pm$ 7,93	2,80 $\pm$ 2,25
6 horas	83,22 $\pm$ 21,94	94,20 $\pm$ 2,49	2,40 $\pm$ 3,03
12 horas	83,38 $\pm$ 27,88	94,38 $\pm$ 2,77	2,88 $\pm$ 2,80
24 horas	75,56 $\pm$ 19,33	91,67 $\pm$ 7,23	3,44 $\pm$ 2,46
48 horas	65,50 $\pm$ 15,49	89,30 $\pm$ 6,09	5,30 $\pm$ 3,83
72 horas	64,99 $\pm$ 12,21	88,70 $\pm$ 6,70	4,30 $\pm$ 3,53
7 dias	67,10 $\pm$ 8,41	90,70 $\pm$ 5,68	4,90 $\pm$ 2,08
14 dias	69,70 $\pm$ 12,81	90,50 $\pm$ 5,97	4,80 $\pm$ 2,30
30 dias	73,40 $\pm$ 9,72	92,10 $\pm$ 3,35	3,60 $\pm$ 2,12

Figura 9 – Gráficos da evolução dos valores de pH, íons de bicarbonato (HCO_3^-), pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2) e total de dióxido de carbono no plasma (tCO_2)

Fonte: (FANTINATO NETO, 2015).

Legenda: pH, pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2 ; mmHg), íons de bicarbonato (HCO_3^- ; mmol/L), e total de dióxido de carbono (tCO_2 ; mEq/L) do sangue arterial de bezerros da raça Nelore, concebidos por inseminação artificial, e nascido por eutocia, em diferentes momentos de vida: antes com 5 minutos de vida (0 horas), 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas, 7, 14 e 30 dias de vida.

Nota: Letras minúsculas sobrescritas diferentes representa diferença significativa ($p < 0,05$).

4.4 CONCLUSÃO

A hemogasometria é uma ferramenta prática e precisa para avaliação da capacidade de trocas pulmonares e oxigenação tecidual que deve ser usada para avaliar a condição do neonatal logo após o nascimento, para assim poder estabelecer tratamento adequado para cada caso. Os bezerros estudados, da raça Nelore, concebidos por inseminação artificial, nascidos por parto espontâneo, e sem aplicação de qualquer ou semelhante que causasse maturação pulmonar ou indução do parto, têm parâmetros hemogasométricos do sangue arterial tidos como normais para a espécie bovina, mesmo com 5 minutos de vida apenas.

Capítulo 5

5 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO SILDENAFIL SOBRE OS VALORES DE PRESSÃO DE ARTÉRIA PULMONAR EM BEZERROS DA RAÇA NELORE PREMATUROS

Nesse experimento foram simulados nascimentos de bezerros prematuros, sendo realizadas cesarianas antes de serem observados sinais evidentes de parição de bezerros da raça Nelore concebidos por inseminação artificial, sem que fosse usado medicamento para indução do parto ou maturação pulmonar. Segundo a Associação Brasileira de Criadores de Zebu (ABCZ), são considerados animais zebuínos, para fins de registro, os animais nascidos de gestação com duração entre 275 e 315 dias. Veiga, Paiva e Chieffi (1946) relataram média de duração de gestação de $291 \pm 0,5$ dias, sendo considerado pelos autores como normal variações de 5 a 10 dias, ainda sim os autores relatam apenas 2 nascimentos, de 254 estudados, com período gestacional inferior a 280 dias, e 18 superior a 300 dias. Em estudo mais recente e com maior número de observações (7585 animais da raça Nelore), Rocha et al. (2005) encontraram média de duração de gestação de $294,55 \pm 8,47$ e $293,34 \pm 8,40$ dias para produtos machos e fêmeas respectivamente, com amplitude de 40 dias na duração das gestações.

5.1 RESUMO

Foram realizadas 9 cesarianas em animais da raça Nelore, prenhes de inseminação artificial também de animais da raça Nelore. Não foi utilizada qualquer tipo de medicação que causasse indução do parto ou maturação fetal (p.e. corticoides). Foi realizada a monitorização hemodinâmica dos animais com consequente colheita de sangue venoso central e venoso misto no 1º dia de vida (com até 6 horas após o nascimento), 2º dia (entre 44 e 48 horas de vida), 7º, 14º e 30º dias de vida, além do sangue arterial. Foi realizado também, nos mesmos momentos, a capnografia e a espirometria. Os 9 bezerros receberam 25mg de sildenafil via oral depois da primeira aferição de pressão da artéria pulmonar (PAP), e eram verificados os efeitos do sildenafil sobre a PAP a cada 15 minutos por 1 hora e depois com 2 horas após o fornecimento do medicamento. O efeito do sildenafil sobre a PAP parece depender primeiramente do valor inicial desta, podendo ter efeito desejado quando a PAP apresenta-se alta; ter efeito contrário transitório em PAP relativamente baixa; e não apresentar efeitos significativos também com valores de PAP relativamente baixos; sem apresentar efeitos sobre a oxigenação do indivíduo.

Dessa forma, quando não existe a possibilidade de se aferir a PAP e suspeita-se de hipertensão, o sildenafil é pode ser usado sem maiores consequências para a saúde do paciente.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada a mensuração de PAP em 9 bezerros prematuros da raça Nelore obtidos por cesariana. Os animais eram tratado com 25mg de sildenafil oral (Citrato de Sildenafil - Medley Indústria Farmacêutica Ltda., Campinas, SP, Brasil; sildenafil), e verificada sua ação sobre a PAP. Todos animais receberam a mesma assistência neonatal, que consistiu em secagem dos bezerros recém nascidos, com papel absorvente e toalhas de pano, estimulando a respiração dele através de fricção no tórax e coluna, manutenção da temperatura, através de lâmpada própria e secadores de cabelo (de uso humano), e fornecimento de colostro por mamadeira nas primeiras horas de vida. Assim que o animal ingeria o colostro, este era submetido ao processo de cateterização invasiva. Por ocasião do procedimento eram feitas colheitas de sangue arterial (colhido da artéria auricular caudal), sangue venoso central (colhido da veia cava cranial), e sangue venoso misto (colhido da artéria pulmonar). A metodologia para colheita de material biológico e as diversas aferições feitas durante esse experimento são os mesmos utilizados no capítulo anterior, de forma que nesse capítulo, a metodologia está resumida, para maiores detalhes consultar Capítulo 3.

5.2.1 Animais

Os animais tinham até 48 horas de vida no momento do procedimento. Depois de verificado o valor da basal da PAP, foi aplicado 25mg de sildenafil por via oral e acompanhado os efeitos sobre os valores de PAP. Foram verificadas três diferentes respostas após aplicação do medicamento, e os animais foram subdivido três grupos de 3 animais: A) Grupo com PAP elevada (acima de 35mmHg) e que teve redução dos valores após aplicação; B) Grupo com PAP considerada normal para bovinos (menor que 35mmHg) e que apresentaram alterações nos valores de PAP após aplicação; e C) Grupo com PAP considerada normal para bovinos (menor que 35mmHg) e que tiveram elevação dos valores após aplicação do sildenafil. Os três grupos tiveram a PAP monitorada a cada 15 minutos após aplicação do sildenafil por 60 minutos e uma ultima aferição com 120 minutos. Quando verificada

alteração dos valores de PAP, amostras de sangue foram colhidas. No grupo B, onde não foi observada alteração da PAP, as amostras de sangue foram colhidas no momento da última aferição, aos 120 minutos após aplicação do sildenafil.

5.2.2 Aferição das pressões invasivas

A pressão da artéria pulmonar foi aferida com uso de cateter de termodiluição de Swan-Ganz tamanho 7F (Edwards LifeSciences LLC – Irvine, CA, EUA), tamanho usado para adultos humanos, conectado a um monitor multiparamétrico (GE - DASH 3000, GE Medical Systems Information Technologies, Inc., Freiburg, Germany). O procedimento de aferição de pressão invasiva foi realizado nos animais no 1º dia (com até 6 horas de vida), 2º dias (entre 44 e 48 horas de vida), 7º, 14º e 30º dias de vida. Durante o procedimento de aferição da pressão arterial pulmonar os bezerros foram colocados em decúbito lateral esquerdo e devidamente contidos, de modo a não causar desconforto para os animais. Foi realizada tricotomia no pescoço na região da veia jugular externa direita, sendo realizada anestesia local infiltrativa com 1,5mL de lidocaína 2% sem vaso constritor, por via subcutânea no local onde o cateter seria inserido.

Assim, o cateter de termodiluição de Swan-Ganz foi inserido, observando-se a quantidade do cateter que entrava no bezerro através das marcas que o mesmo possui em sua superfície a cada 10cm, e pela observação das ondas mostradas no monitor multiparamétrico. Com o cateter inserido no bezerro, eram aferidas e anotadas a pressão da artéria pulmonar (PAP). No caso dos animais tratados com citrato de sildenafil, com o cateter ainda no inserido no bezerro, eram administrados 25mg do medicamento por via oral, e novamente aferidas as PAP, a cada 15 minutos, até serem completados 60 minutos e com 120 minutos após administração. Esse procedimento só foi possível e facilitado porque antes do procedimento era fornecido leite para que os animais ficassem tranquilos durante o exame.

5.2.3 Hemogasometria

Foi usado o aparelho de hemogasometria portátil i-STAT® ONE (Abbott Point of Care Inc., Princeton, NJ, USA) com o cartucho próprio para esse fim CG7+ (Abbott Point of Care Inc., Princeton, NJ, USA). O sangue arterial foi colhido da artéria auricular caudal, usando-se escalpe número 27 (BD

Asepto® - Becton Dickinson Ind. Cir. Ltda., Juiz de Fora, MG, Brazil) e seringa própria para colheita de sangue para hemogasometria (Blood Gas Monovette® - Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany). O cartucho utilizado para colheita realizava as pressões parciais de oxigênio (pO_2) e dióxido de carbono (pCO_2), saturação de oxigênio, pH, excesso de base (BE), íons de HCO_3^- e total de dióxido de carbono (tCO_2) a 37°C, hemoglobina e hematócrito, além dos íons de sódio, potássio e cálcio.

5.2.4 Análise estatística

Os dados obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados utilizando o programa estatístico Statistical Analysis System (SAS, 2011), com prévia verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE). As variáveis que não atenderam às premissas estatísticas foram submetidas à transformação logarítmica [$\text{Log}(X+1)$]. Os dados originais ou transformados, quando este procedimento foi necessário, foram submetidos à Análise de Variância. À análise estatística foi adicionada o fator medidas repetidas no tempo, referentes aos diversos momentos de amostragem. As probabilidades de interações com o tempo foram determinadas pelo teste de Greenhouse-Geisse, utilizando-se o comando REPEATED gerado pelo procedimento MIXED (PROC MIXED do SAS). As análises por tempo somente serão realizadas quando as interações entre tempo e tratamentos forem significativas. Em todas as análises estatísticas, o nível de significância considerado foi 5%.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sildenafil é relatado como sendo efetivo vasodilatador seletivo para artéria pulmonar, onde provoca mudanças na resistência vascular pulmonar (SHEKERDEMIAN; RAVN; PENNY, 2002). Dos 9 animais tratados, três animais com PAP elevada (valores maiores do que 40 mmHg) responderam ao tratamento com 25 mg de sildenafil de forma esperada, isto é, houve queda da pressão da artéria pulmonar (Figura 10). O grupo em que houve redução significativa da PAP mostra que o sildenafil teve efeito desejado diretamente sobre a artéria pulmonar, concordando com os dados relatados na literatura (LINDMAN et al., 2012).

Figura 10 – Pressão invasiva da artéria pulmonar (PAP)

Fonte: (FANTINATO NETO, 2015).

Legenda: Valores de pressão invasiva da artéria pulmonar (PAP) de três bezerros prematuros da raça Nelore nascidos por cesariana, apresentando PAP elevada antes da aplicação do citrato de sildenafil, com resposta esperada a medicação, onde ocorre grande queda dos valores de PAP, chegando próximo dos valores considerados normais.

Apesar da literatura consultada serem relatados nenhum ou poucos efeitos colaterais, Weimann et al. (2000) usou o sildenafil para reduzir hipertensão da pulmonar induzida (pela aplicação intravenosa de U46619) em cordeiros, e alertou que os inibidores das PDE-5 podem causar acentuada hipotensão sistêmica se associados a aumento na produção de GMPc. Em estudos com humanos, tratados apenas com uma dose de sildenafil foi relatado em um paciente modificação do padrão respiratório e dois pacientes presença de rinorreia (LINDMAN et al., 2012). Em humanos tratados por longo período com sildenafil (12 semanas), Galiè et al. (2005) relatam apenas que os efeitos colaterais não causaram mudanças clinicamente significativas e não alterou as variáveis laboratoriais.

Dos 6 animais que receberam 25 mg de sildenafil e que apresentavam valores de PAP menores do que 35 verificou-se que em três deles houve apenas uma pequena redução da PAP (Figura 11), e em três dos bezerros responderam ao sildenafil de forma inesperada, apresentando como efeito colateral o aumento passageiro nos valores de PAP, uma vez que antes de 60 minutos após aplicação do medicamento havia o retorno aos valores iniciais (Figura 12). Esse aumento transitório da PAP após a aplicação do sildenafil não interferiu em outros parâmetros fisiológicos, pois não houve alterações na pO_2 , sO_2 ou pCO_2 (Figura 13) e nenhum outro efeito colateral foi observado.

Figura 11 – Pressão invasiva da artéria pulmonar (PAP)

Fonte: (FANTINATO NETO, 2015).

Legenda: Valores de pressão invasiva da artéria pulmonar (PAP) de três bezerras prematuros da raça Nelore nascidos por cesariana, apresentando PAP considerada normal antes da aplicação do citrato de sildenafil, com resposta esperada a medicação, com leve queda nos valores de PAP mas mantendo um valor sempre considerado normal.

Figura 12 – Pressão invasiva da artéria pulmonar (PAP)

Fonte: (FANTINATO NETO, 2015).

Legenda: Valores de pressão invasiva da artéria pulmonar (PAP) de três bezerras prematuros da raça Nelore nascidos por cesariana, apresentando PAP considerada normal antes da aplicação do citrato de sildenafil, com resposta adversa a medicação, com considerável elevação nos valores de PAP, retornando ao valor perto do inicial, considerado normal, em até 60 minutos após a aplicação da medicação.

Figura 13 – Pressão parcial de oxigênio, saturação de oxigênio e pressão parcial de dióxido de carbono, antes e após a aplicação de 25mg sildenafil oral

Fonte: (FANTINATO NETO, 2015).

Legenda: Pressão parcial de oxigênio (pO₂), saturação de oxigênio (sO₂) e pressão parcial de dióxido de carbono (pCO₂), antes e após a aplicação de 25mg sildenafil oral, nos subgrupos A) Grupo com PAP elevada (acima de 40mmHg) e que teve redução dos valores após aplicação; B) Grupo com PAP considerada normal para bovinos (menor que 35mmHg) e que apresentaram alterações nos valores de PAP após aplicação; e C) Grupo com PAP considerada normal para bovinos (menor que 35mmHg) e que tiveram elevação dos valores após aplicação do sildenafil.

Da mesma forma como aconteceu no grupo A, que apresentavam PAP elevada que teve redução após aplicação oral do sildenafil, e apesar de terem sido observadas diferentes reações dos valores de PAP após aplicação do medicamento, não foram verificadas diferenças nos valores de pO₂, sO₂ ou pCO₂ do sangue arterial dos animais estudados (Figura 13), ou seja, as trocas de gases não foram afetadas ou alteradas após a sua administração.

Em estudo com pacientes humanos adultos, com hipertensão da artéria pulmonar, Michelakis et al. (2002) relatam aumento numérico não significativo da sO₂ após aplicação do sildenafil. Já em estudo com crianças recém nascidas, com persistência de hipertensão pulmonar, Baquero et al. (2006) mostraram aumento significativo da sO₂ 12 horas após a primeira aplicação de sildenafil, em esquema de aplicação a cada 6 horas. Os mesmo autores afirmam que o sildenafil por via oral ainda melhorou o índice de oxigenação dos animais a partir, também de 12 horas após a primeira aplicação do sildenafil, quando comparado com a linha base, de entrada do paciente no experimento. Quando comparou-se a eficácia do sildenafil em comparação com o grupo tratado com placebo, foi possível verificar diferenças a partir de 24 horas após a aplicação (BAQUERO et al., 2006). Em um estudos com humanos adultos, usando diferentes doses de sildenafil (20mg, 40mg, ou 80mg), a cada 48 horas por 12 semanas, foi reportado que o sildenafil aumentou significativamente, a partir da quarta semana de tratamento, a distância percorrida em 6 minutos, independentemente da dose do medicamento, enquanto no grupo que recebeu placebo não houve alterações para essa medida (GALIÈ et al., 2005). Em outro estudo, ainda com humanos adultos tratados com sildenafil 3 vezes ao dia, foi demonstrado que o medicamento melhorou a tolerância ao exercício comparado ao grupo placebo e ao início do tratamento (SASTRY et al., 2004).

5.4 CONCLUSÃO

No grupo em que havia hipertensão da artéria pulmonar (valores maiores do que 40 mmHg) houve redução significativa da PAP mostrando que, em bezerros neonatos, o sildenafil teve efeito desejado diretamente sobre a artéria pulmonar. Nos grupos onde a PAP eram menores do que 35 mmHg foram observadas duas reações diferentes. Um grupo não apresentou qualquer tipo de alteração nos valores e um grupo teve aumento transitório.

O uso do sildenafil não interfere, a curto prazo, nos valores de pO_2 , sO_2 ou pCO_2 do sangue arterial de bezerros neonatos.

O sildenafil oral pode ser aplicado em bezerros com suspeita de hipertensão da artéria pulmonar, em situações onde não é possível fazer o diagnóstico do problema, sem causar maiores complicações ou efeitos adversos. De maneira que seu uso preventivo pode aumentar a sobrevivência ou melhorar a qualidade de vida de animais prematuros.

Capítulo 6

6 DIFERENÇAS HEMODINÂMICAS (UTILIZANDO O CATETER DE SWAN-GANZ), NA FUNÇÃO PUMONAR E NAS TROCAS GASOSAS ENTRE BEZERROS A TERMO NASCIDOS POR PARTO ESPONTÂNEO E PREMATUROS NASCIDOS POR CESARINA

Nesse estudo foram comparadas pressões invasivas de artéria pulmonar, artéria pulmonar ocluída, átrio direito e ventrículo direito, pressão sistêmica arterial não invasiva, hemogasometrias e espirometria de bezerros recém nascidos da raça Nelore, concebidos por inseminação artificial, a termo, nascidos por parto espontâneo, e prematuros, nascidos por cesariana, sem que fosse usado medicamento para indução do parto ou maturação pulmonar, até os 30 dias de vida.

6.1 RESUMO

Foram avaliadas as pressões invasivas e hemogasometrias de bezerros da raça Nelore nascidos por cesariana ou eutocia no 1° dia (com até 6 horas de vida), 2° dia (entre 44 e 48 horas de vida), 7°, 14° e 30° dias de vida. Sangue arterial para hemogasometria era colhido quando os animais apresentavam 1 minuto de vida (animais nascidos por cesariana) ou 5 minutos de vida (animais nascidos por eutocia), 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas, 7, 14 e 30 dias de vida. Não houve diferença nas pressões invasivas de artéria pulmonar, artéria pulmonar ocluída, átrio direito e ventrículo direito entre os grupos, mas foram significativamente diferentes no tempo. O pH dos animais a termo foram superiores ao pH dos animais prematuros até as 3 horas de vida. A pressão parcial de oxigênio (pO_2) e a saturação por oxigênio (sO_2) foram estatisticamente diferentes no primeiro momento de coleta e com 6 horas de vida. Os animais a termo, nascidos por parto espontâneo, têm valores de hemogasometria mais próximos dos valores normais para a espécie, enquanto os bezerros prematuros, nascidos por cesariana, têm valores mais deslocados em relação a normalidade.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas 7 cesarianas, de bezerros da raça Nelore concebidos por inseminação artificial (IA), sem que fosse utilizado medicamento para indução do parto ou maturação pulmonar. Depois de retirados, os bezerros recebiam um tratamento inicial de secagem e aquecimento com toalhas de papel e pano, secadores e lâmpada própria pra esse fim. Nove partos normais e espontâneos de bezerros da raça Nelore concebidos por IA, sem que fosse utilizado medicamento para indução do parto ou maturação pulmonar, foram acompanhados a distância e sem interferência humana. Depois de receber os primeiros estímulos maternos, os bezerros eram avaliados no próprio local do nascimento.

6.2.1 Delineamento experimental

Os animais prematuros, nascidos por cesariana, receberam assistência neonatal, que consistiu em secagem dos bezerros recém nascidos, com papel absorvente e toalhas de pano, estimulando a respiração dele através de fricção no tórax e coluna, manutenção da temperatura, através de lâmpada própria e secadores de cabelo (de uso humano), e fornecimento de colostro por mamadeira nas primeiras horas de vida. Assim que o animal ingeria o colostro era submetido ao processo de cateterização invasiva. Sangue arterial para exames de hemogasometria foram colhidos quando o animal tinha menos de 1 minuto de vida (0 hora), 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas, 7, 14 e 30 dias de vida. Assim que o animal ingeria o colostro, este era submetido ao primeiro procedimento (1º dia) de aferição das pressões invasivas, que se repetia no 2º dia (entre 44 e 48 horas de vida), 7º, 14º e 30º dias de vida. Por ocasião do procedimento eram feitas colheitas de sangue arterial (colhido da artéria auricular caudal), sangue venoso central (colhido da veia cava cranial), e sangue venoso misto (colhido da artéria pulmonar). A metodologia para colheita de material biológico e as diversas aferições feitas durante esse experimento são os mesmos utilizados no capítulo anterior, de forma que nesse capítulo, a metodologia está resumida, para maiores detalhes consultar Capítulo 3.

Nove vacas gestantes da raça Nelore com idades entre 30 e 36 meses foram utilizadas nesse experimento. Para acompanhamento dos partos, o piquete maternidade foi escolhido devido sua proximidade do curral. Os animais entraram nesse piquete no terço final da gestação para acostumarem-se com a movimentação de pessoal e ao tipo de pastagem. O sistema era de pastejo

rotacionado, com sal e água a vontade em uma área comum (“lanchonete”) aos diferentes piquetes. Durante o dia, os funcionários passavam perto do piquete maternidade ou davam uma atenção maior do curral de manejo a cada hora, para não perderem o momento do parto. Durante a noite, eram feitos revezamentos de observação do curral, de maneira que existia uma iluminação no piquete maternidade que não atrapalhava o descanso dos animais e permitia a observação a distância. A grande maioria dos partos ocorreram logo pela manhã, o que facilitou o trabalho, sendo que nenhum parto aconteceu entre 00h00 e 05h00 e todos os partos foram espontâneos, sem a necessidade de indução. Depois do nascimento, a mãe limpava e estimulava o bezerro, que quando começava a querer se levantar era abordado e realizava-se a primeira colheita de sangue arterial desse animal, com aproximadamente 5 minutos de vida (0 hora). Assim como nos animais nascidos por cesariana, eram colhidos sangue arterial para hemogasometria com aproximadamente 5 minutos de vida (0 hora), 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas, 7, 14 e 30 dias de vida. Para o procedimento de avaliação das pressões invasivas, os animais eram retirados do pasto, onde ficavam com os outros animais do lote e suas respectivas mães, por um período máximo de 2 horas, somente o suficiente para realização do procedimento, que foi realizado no 1º dia (com 6 horas de vida), 2º dia (entre 44 e 48 horas de vida), 7º, 14º e 30º dias de vida.

6.2.2 Avaliação hemodinâmica

As pressões invasivas de artéria pulmonar (PAP), artéria pulmonar ocluída (PAPo), átrio direito (PAD) e ventrículo direito (PVD) foram aferidas com uso de cateter de termodiluição de Swan-Ganz tamanho 7F (Edwards LifeSciences LLC – Irvine, CA, EUA), tamanho usado para adultos humanos, conectado a um monitor multiparamétrico (GE - DASH 3000, GE Medical Systems Information Technologies, Inc., Freiburg, Germany). O procedimento de aferição de pressão invasiva foi realizado nos animais com até 6 horas de vida, 48 horas e 7, 14 e 30 dias de vida. Durante o procedimento de aferição da pressão arterial pulmonar os bezerros foram colocados em decúbito lateral esquerdo e devidamente contidos, de modo a não causar desconforto para os animais. Foi realizada tricotomia no pescoço na região da veia jugular externa direita, sendo realizada anestesia local infiltrativa com 1,5mL de lidocaína 2% sem vaso constritor, por via subcutânea no local onde o cateter seria inserido.

Assim, o cateter de termodiluição de Swan-Ganz foi inserido, observando-se a quantidade do cateter que entrava no bezerro através das marcas que o mesmo possui em sua superfície a cada 10cm, e pela observação das ondas mostradas no monitor multiparamétrico. Com o cateter inserido no

bezerro, foram aferidas pressões artéria pulmonar (PAP) e artéria pulmonar ocluída (PAPo; que representa a pressão do átrio esquerdo).

6.2.3 Análise da hemogasometria

Foi usado o aparelho de hemogasometria portátil i-STAT® ONE (Abbott Point of Care Inc., Princeton, NJ, USA) com cartucho próprio para esse fim CG7+ (Abbott Point of Care Inc., Princeton, NJ, USA). O sangue arterial foi colhido da artéria auricular caudal, usando-se escalpe número 27 (BD Asept® - Becton Dickinson Ind. Cir. Ltda., Juiz de Fora, MG, Brazil) e seringa própria para colheita de sangue para hemogasometria (Blood Gas Monovette® - Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany). O cartucho utilizado para colheita realizava análises de pH, pressões parciais de oxigênio (pO_2 ; mmHg) e dióxido de carbono (pCO_2 ; mmHg), excesso de base (BE; mEq/L), total de dióxido de carbono (tCO_2 ; mEq/L), saturação de oxigênio (sO_2 ; %), hematócrito (Hct; %), hemoglobina calculada a partir do hematócrito (Hb; g/dL) e íons de bicarbonato (HCO_3^- ; mmol/L). Para entendimento da adaptação da função respiratória foram considerados os resultados de pH, pO_2 , pCO_2 , BE, HCO_3^- e BE.

4.2.2 Análise estatística

Os dados obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados utilizando o programa estatístico Statistical Analysis System (SAS, 2011), com prévia verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE). As variáveis que não atenderam às premissas estatísticas foram submetidas à transformação logarítmica [$\log(X+1)$]. Os dados originais ou transformados, quando este procedimento foi necessário, foram submetidos à Análise de Variância. À análise estatística foi adicionada o fator medidas repetidas no tempo, referentes aos diversos momentos de amostragem. As probabilidades de interações com o tempo foram determinadas pelo teste de Greenhouse-Geisse, utilizando-se o comando REPEATED gerado pelo procedimento MIXED (PROC MIXED do SAS). As análises por tempo somente serão realizadas quando as interações entre tempo e tratamentos forem significativas. Análises de correlação de Pearson foram feitas entre as diferentes amostras de sangue para as variáveis de hemogasometria, assim como para CO_{2exp} e a

pCO₂ das diferentes amostras de sangue, usando-se o procedimento CORR. Em todas as análises estatísticas, o nível de significância considerado foi 5%.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A comparação dos resultados obtidos na PAP, PAPo, PAD e PVD entre bezerros prematuros, nascidos por cesariana, e bezerros a termo, nascidos por parto espontâneo, não evidenciaram diferenças estatísticas significantes (Tabela 11). Considerando-se que o limite de PAP igual a 35 mmHg a partir do qual considera-se, em humanos, que existe hipertensão da artéria pulmonar, verificou-se que com 6 horas de vida, no grupo dos bezerros prematuros, 100% dos animais (4/4) apresentaram hipertensão da artéria pulmonar ao nascimento, e no grupo de animais a termo, 88,8 (8/9) apresentaram o problema. Com 6 horas de vida, os valores individuais da PAP em bezerros a termo variaram entre 31 e 88 mmHg enquanto nos bezerros prematuros variaram entre 53 e 60 mmHg (Figura 14).

Na literatura pesquisada, não são encontrados dados referentes às diferenças de PAP para bezerros da raça Nelore a termo, nascidos por parto espontâneo a pasto e /ou bezerros prematuros nascidos por cesariana. Apesar de não serem demonstradas diferenças entre os valores da PAP, o grupo de bezerros prematuros demorou 14 dias para que a sua PAP estivesse estabilizada, enquanto nos bezerros a termo isso ocorreu mais precocemente com 7 dias de vida, apresentando semelhança aos resultados apresentados por Yasuoka (2012), que monitorou a PAP de bezerros da raça holandesa com 1, 7 15 e 30 dias de idade e Amory et al. (1993), em estudo com 41 bezerros da raça Holandesa nascidos por parto eutócico, no qual a monitoração da PAP realizada em bezerros entre 7 e até 1 ano de vida não apresentava variações nos seus valores. Observou-se que com o evoluir da idade havia uma diminuição da PVD nos dois grupos (Figura 16).

Figura 14 – Pressão invasiva da artéria pulmonar (PAP) e ventrículo direito (PVD)

Fonte: (FANTINATO NETO, 2015).

Legenda: Valores de pressão invasiva da artéria pulmonar (PAP) e ventrículo direito de bezerros da raça Nelore a termo, nascidos por parto espontâneo, e prematuros, nascidos por cesariana.

Nota: Letras minúsculas indicam diferenças estatística no tempo para o grupo a termo ($p < 0,05$). Letras maiúsculas indicam diferenças estatística no tempo para o grupo prematuro ($p < 0,05$).

Figura 15 – Pressão invasiva da artéria pulmonar (PAP) e ventrículo direito (PVD)

Fonte: (FANTINATO NETO, 2015).

Legenda: Valores individuais de pressão invasiva da artéria pulmonar (PAP) de bezerros da raça Nelore a termo, nascidos por parto espontâneo, e prematuros, nascidos por cesariana no 1º dia de vida (com até 6 horas após o nascimento).

Tabela 11 – Valores (média $\pm$ desvio padrão) das pressões invasivas de artéria pulmonar (PAP), artéria pulmonar ocluída (PAPo), átrio direito (PAD) e ventrículo direito (PVD) de bezerros da raça Nelore concebidos por IA e nascidos por eutocia ou cesariana, no 1º dia (com até 6 horas de vida), 2º dia (entre 44 e 48 horas de vida), 7º, 14º e 30º dias de vida

		PAP (mmHg)	PAPo (mmHg)	PAD (mmHg)	PVD (mmHg)
1º dia	A termo (Parto espontâneo)	47,2 $\pm$ 15,9 ^a	8,8 $\pm$ 1,9	7,0 $\pm$ 1,9	31,6 $\pm$ 6,9 ^a
	Prematuro (cesariana)	56,4 $\pm$ 4,3 ^a	5,5 $\pm$ 2,7	3,6 $\pm$ 3,2	28,5 $\pm$ 2,4 ^a
2º dia	A termo (Parto espontâneo)	28,5 $\pm$ 4,1 ^b	8,0 $\pm$ 3,0	5,0 $\pm$ 2,7	24,7 $\pm$ 9,7 ^{ab}
	Prematuro (cesariana)	34,2 $\pm$ 5,0 ^b	7,9 $\pm$ 3,5	7,6 $\pm$ 2,4	27,0 $\pm$ 12,5 ^{ab}
7º dia	A termo (Parto espontâneo)	26,4 $\pm$ 5,3 ^{bc}	7,4 $\pm$ 2,9	5,9 $\pm$ 3,1	22,2 $\pm$ 12,4 ^b
	Prematuro (cesariana)	25,2 $\pm$ 4,3 ^{bc}	7,3 $\pm$ 1,6	7,0 $\pm$ 2,3	18,7 $\pm$ 2,7 ^{ab}
14º dia	A termo (Parto espontâneo)	21,3 $\pm$ 4,5 ^c	7,4 $\pm$ 4,1	5,3 $\pm$ 3,3	21,2 $\pm$ 8,0 ^b
	Prematuro (cesariana)	20,4 $\pm$ 2,7 ^{cd}	7,3 $\pm$ 2,1	5,6 $\pm$ 1,9	18,8 $\pm$ 3,2 ^{ab}
30º dia	A termo (Parto espontâneo)	19,3 $\pm$ 2,7 ^c	9,8 $\pm$ 5,5	4,2 $\pm$ 2,4	17,9 $\pm$ 4,3 ^b
	Prematuro (cesariana)	18,9 $\pm$ 1,4 ^d	11,8 $\pm$ 0,7	9,0 $\pm$ 1,7	15,8 $\pm$ 1,8 ^b

Nota: Letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indica diferença estatística no tempo dentro de um mesmo grupo – a termo (parto espontâneo) ou prematuro (cesariana) – ($p < 0,05$).

Considerando-se os bezerros a termo observou-se que ao nascimento 40% dos bezerros (4/10) tinham pH que variava entre 7,2 e 7,35 enquanto em 60 dos bezerros (6/10) o valor do pH era maior do que 7,35. Nos bezerros prematuros 25% dos animais (1/4) tinha pH menor do que 7,2 e 75% dos bezerros (3/4) tinham pH que variava entre 7,2 e 7,35. Considerando que para bezerros neonatos taurinos os limites de normalidade do pH é igual a 7,2 (SZENCI; TAVERNE; TAKÁCS, 1989; VARGA et al., 2001), os resultados evidenciam que o padrão hemogasométrico de bezerros prematuros da raça nelore tem padrão similar aos dos bezerros holandeses a termo, ou seja, ocorrência de acidose fisiológica no momento do nascimento que é compensada nas primeiras horas de vida. Apesar de que a acidose respiratória ser considerada relativamente normal em bezerros taurinos nascidos por eutocia (VARGA et al., 1998) esse fato não é o predominante em bezerros nelores a termo. Essas diferenças indicam que o processo de maturação pulmonar e/ou de adaptação a vida extrauterina são diferentes nos taurinos e zebuínos.

Figura 16 - pH, íons de bicarbonato (HCO_3^-) e pressão parcial de oxigênio (pCO_2) do sangue arterial

Fonte: (FANTINATO NETO, 2015).

Legenda: Evolução do pH, íons de bicarbonato (HCO_3^-) e pressão parcial de oxigênio (pCO_2) do sangue arterial de bezerros da raça Nelore concebidos por IA a termo, nascidos por parto espontâneo, e prematuros nascidos por cesariana.

Nota: * diferença significativa entre grupos ($p < 0,05$)

A pO_2 e sO_2 variaram de forma semelhante, sendo que o grupo prematuro apresentou valores considerados ideais apenas a partir do 7º dia de vida (Figura 17). Amostras colhidas imediatamente após o nascimento e com 3 horas de vida mostram a existência de diferenças estatisticamente significantes. Bastante significativo é o fato da pO_2 imediatamente após o nascimento dos bezerros prematuros ser extremamente baixa (variando entre 19 e 29 mmHg). Esses bezerros prematuros sobreviviam e apresentaram, com 3 horas de vida, valores de pO_2 que variavam entre 34 e 53 mmHg. Nenhum desses bezerros teve seu parto induzido com qualquer tipo de medicamento e nenhum desses bezerros desenvolveu asfixia neonatal tardia. Esses fatos indicam que os mecanismos de adaptação neonatal em bezerros zebuínos e taurinos são diferentes.

Bleul et al.(2007) sugere que bezerros nascidos em acidose podem ter um maior estímulo respiratório por quimiorreceptores levando a maior captação de oxigênio. Na presente pesquisa, esse fato não ocorreu, onde os bezerros com pH mais baixo demoraram mais tempo para chegar em valores satisfatórios de pO_2 e sO_2 . Apesar de ocorrerem grandes mudanças nas variáveis de hemogasometria 24 horas iniciais de vida neonatal (VARGA et al., 2001), as principais mudanças nessas variáveis acontecem nas primeira 6 horas de vida, que parecem ser as mais críticas para bezerros que precisam de auxílio ao parto. Mesmo assim, mudanças nos valores de hemogasometria dignas de atenção acontecem até os 7 dias de vida, de maneira que o devido monitoramento da saúde do bezerro, principalmente no que diz respeito a oxigenação e equilíbrio ácido-base, é de grande importância para identificar precocemente possíveis problemas e poder estabelecer um tratamento precoce.

Figura 17 – Pressão parcial de oxigênio (pO_2) e saturação de oxigênio (sO_2) do sangue arterial

Fonte: (FANTINATO NETO, 2015).

Legenda: Evolução da pressão parcial de oxigênio (pO_2) e saturação de oxigênio (sO_2) do sangue arterial de animais da raça Nelore concebidos por IA a termo, nascidos por parto espontâneo, e prematuros, nascidos por cesariana.

Nota: * diferença significativa entre grupos ($p < 0,05$)

Os dados referentes a comparação das espirometria são apresentados na figura 18. Na análise da PEF e Vexp não foram verificadas diferenças entre os grupos de animais, e os valores são próximos dos valores apresentados por Varga et al. (1999, 2001) em trabalho com bezerros taurinos recém nascidos. Bleul e Bylang (2012) reportaram valores menores para Vexp de $0,21 \pm 0,07L$ e $0,025 \pm 0,10L$ para animais taurinos entre 3 e 15 horas de vida, de maneira que a PEF teve valores também próximos aos reportados na presente pesquisa. O aumento no Vmin no tempo apresentado pelo grupo de animais a termo, nascidos por parto espontâneo, indica aumento da capacidade respiratória dos bezerros conforme seu crescimento, uma vez que a frequência respiratória se manteve sem alterações significativas, nos momentos da avaliação. No entanto o grupo de animais prematuros, nascidos por cesariana, não apresentou diferenças no decorrer do tempo e foi significativamente diferente do grupo de animais a termo, justamente devido às alterações na frequência respiratória (Figura 19).

Figura 18 – Pico do fluxo expiratório (PEF), volume expirado (Vexp) e volume minuto (Vmin)

Fonte: (FANTINATO NETO, 2015).

Legenda: Evolução dos valores de pico do fluxo expiratório (PEF), volume expirado (Vexp) e volume minuto (Vmin) de animais da raça Nelore concebidos por IA a termo, nascidos por parto espontâneo, e prematuros, nascidos por cesariana.

Nota: * diferença significativa entre grupos ($p < 0,05$).

Figura 19 – Comparação entre as frequências respiratórias

Fonte: (FANTINATO NETO, 2015).

Legenda: Evolução dos frequência respiratória (FR) de animais da raça Nelore concebidos por IA a termo, nascidos por parto espontâneo, e prematuros, nascidos por cesariana.

Nota: * diferença significativa entre grupos ($p < 0,05$)

6.4 CONCLUSÃO

Os animais prematuros estudados, nascidos por cesariana, sem indução do parto com qualquer medicação mostraram-se viáveis e sobreviveram sem qualquer tipo de tratamento. Nesses bezerros observou-se padrão hemogasométrico similar aquele observado em bezerros de raças taurinas, no qual ocorre acidose respiratória nas primeiras horas de vida.

Apesar da pO_2 imediatamente após o nascimento dos bezerros prematuros ser extremamente baixa (variando entre 19 e 29 mmHg), esta condição é compatível com a vida, pois esses bezerros prematuros sobreviveram sem que nenhum medicamento fosse utilizado nas primeiras horas de vida. Nenhum desses bezerros desenvolveu acidose neonatal tardia. Esses fatos permitem supor que os mecanismos compensatórios e processo adaptativo à vida extrauterina em bezerros zebuínos e taurinos são diferentes.

Capítulo 7

7 ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO DE CUIDADOS NEONATAL PARA BEZERROS ADVINDOS DE GESTAÇÕES COMPLICADAS COM RISCO DE MORTE NEONATAL PREMATURA

Foram realizadas 3 cesarianas em animais oriundos da técnica de inseminação artificial (AI) e 16 em animais concebidos por transferência nuclear por de células somática (TNSC e clonagem), a termo, com 290 dias de gestação. Dos animais clonados, 5 receberam surfactante e sildenafil, 4 receberam somente surfactante e 7 receberam só sildenafil, todos juntamente com oxigenoterapia. Os animais IA receberam o oxigenoterapia, surfactante e sildenafil e foram comparados com os animais clonados do mesmo tratamento.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 Estabelecimento de protocolo de cuidados ao neonato

Para viabilização do protocolo de cuidados ao neonato foram feitas avaliações clínicas, de hemogasometria arterial e bioquímica dos animais nos diferentes protocolos experimentais: 1. somente sildenafil; 2. somente surfactante; e 3. sildenafil e surfactante associados. Para avaliação da efetividade dos protocolos testados foram levadas em consideração a pressão parcial de oxigênio (pO_2) e dióxido de carbono (pCO_2), a saturação de oxigênio (sO_2), pH sanguíneo, excesso de base (BE) e íons de bicarbonato (HCO_3^-). Para estabelecimento do protocolo foi utilizada oxigenoterapia – estabelecida com cateter intranasal, 5L/min –, inibidores das fosfodiesterases (PDE; p.e.: citrato de sildenafil) e surfactante intratraqueal. Os animais clonados receberam oxigenoterapia, aminofilina, inibidores das PDEs e, de acordo com a necessidade, expectorante mucolítico (cloridrato de bromexina). O sildenafil era aplicado na forma de comprimido triturado juntamente com água, por via oral, na dose de 25mg a cada 8 horas, por 48 horas completando 6 aplicações totais. O surfactante era aquecido à temperatura corpórea, aplicado por via intratraqueal (Figura 20) na dose de 400mg, com seringa de 20mL e agulha 40x1,2mm (BD®), a cada 15 a 30 minutos até completar a dose de 2g nas primeiras 2 horas de vida.

Figura 20 – Aplicação do surfactante

Fonte: (FANTINATO NETO, 2015)

Legenda: Aplicação de surfactante intratraqueal de 400mg de surfactante em bezerro clonado recém-nascido, utilizando seringa de 20mL e agulha 40x1,2mm.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1 Estabelecimento de protocolo de cuidados ao neonato bovino

No grupo de animais AI, foram feitas avaliações hemogasométricas de 3 animais tratados com surfactante e sildenafil. Os valores de pressão parcial de oxigênio (pO_2), pressão parcial de gás carbônico (pCO_2), pH, íons de bicarbonato (HCO_3^-) e excesso de base (BE) nos diferentes tempos de vida é mostrado na tabela 12. O conhecimento desses valores serve como padrão quando comparados com animais clonados que recebem o mesmo tipo de tratamento.

Tabela 12 – Valores de pressão parcial de oxigênio (pO₂), pressão parcial de gás carbônico (pCO₂), pH, íons de bicarbonato (CHCO₃⁻) e excesso de base (BE) de bezerros saudáveis nascidos por cesariana e tratados com surfactante e sildenafil.

Animal	Variável	Horas após o nascimento						
		até 3	6	12	24	36	60	84
Bezerro 1	pO ₂	103,6	109,1	107,1	132,2	60,3	53,7	62,1
	pCO ₂	38,8	34,3	33,0	41,9	39,9	34,7	54,3
	pH	7,461	7,469	7,424	7,485	7,519	7,504	7,207
	CHCO ₃ ⁻	27,0	24,4	21,1	30,9	31,8	26,7	21,1
	BE	3,1	1,0	-2,8	6,7	8,3	3,9	-6,5
Bezerro 2	pO ₂	23,4	34,6	66,4	62,7	49,2	NA	69,7
	pCO ₂	35,8	49,6	44,7	45,8	40,4	NA	46,4
	pH	7,504	7,405	7,433	7,448	7,524	NA	7,472
	CHCO ₃ ⁻	27,6	30,4	29,2	31,0	32,6	NA	33,2
	BE	4,4	4,9	4,4	6,2	9,0	NA	8,5
Bezerro 3	pO ₂	41,3	53,7	NA	52,1	57,1	71,0	62,3
	pCO ₂	42,6	46,4	NA	47,1	48,7	48,4	47,0
	pH	7,440	7,413	NA	7,420	7,436	7,430	7,446
	CHCO ₃ ⁻	28,2	29,0	NA	29,9	32,1	31,4	31,7
	BE	3,7	3,8	NA	4,7	6,6	5,9	6,5

Avaliando-se os valores de pH arterial dos bezerros recém nascidos pode-se dizer que nenhum animal apresentou acidose metabólica. BLEUL et al. (2007) relataram valores de $7,38 \pm 0,03$, $7,43 \pm 0,03$ e $7,48 \pm 0,04$ para pH do sangue arterial de bezerros taurinos, nascidos por parto normal, nas 4, 12 e 24 horas de vida. Os valores encontrados na presente pesquisa estiveram mais altos em média, mostrando que, mesmo nascidos por cesariana, os bezerros não encontravam-se em acidose metabólica, o que pode ser ação secundária do protocolo de cuidados neonatal utilizados nesses animais para melhorar a função pulmonar desses animais. Em bezerros cruzados com média de 8 semanas de vida, o pH do sangue arterial normal deve estar por volta de $7,475 \pm 0,004$ (GUNES; ATALAN, 2006), de maneira que, ao nascimento, considerado crítico do equilíbrio ácido-base, os bezerros do presente trabalho não apresentaram quadro de acidose. SZENCI; TAVERNE; TAKÁCS (1989) relataram que de 126 bezerros taurinos nascidos por cesariana, 63,5% não nasceram com quadro de acidose, sendo o pH do sangue venoso desses bezerros considerados como normais, os valores acima de 7,2. Nesse mesmo estudos os autores relataram que 23,8% dos bezerros nascidos por cesariana apresentaram acidose leve ou moderada, com pH venoso entre 7,2 e 7,0, e 12,7% dos bezerros recém nascidos apresentaram acidose severa, quando o pH do sangue venoso estava abaixo de 7,0. No presente estudo, os Bezerros 1, 2 e 3 apresentaram pH de sangue venoso de 7,355, 7,408 e 7,456. Não foram achadas correlações entre os valores de sangue venoso e sangue arterial, como foi

relatado por SUCUPIRA; ORTOLANI (2003) que encontraram alta correlação entre o pH arterial e venoso em novilhos tratados com alimentação balanceada, e GUNES; ATALAN (2006) que também encontraram alta correlação para o pH venoso e arterial. Este fato pode ser explicado por tratar de animais recém nascidos, que estão se adaptando a nova condição de vida e ainda não tem seu equilíbrio ácido-base bem ajustado, além de serem poucos dados os apresentados neste trabalho.

Os valores de HCO_3^- e BE confirmam que os animais não entraram no quadro de acidose, mostrando valores normais para HCO_3^- que deve estar entre $27,4 \pm 2,32 \text{ mmol/L}$ e $26,96 \pm 2,94 \text{ mmol/L}$ e $28,31 \pm 3,26 \text{ mmol/L}$ nas 4, 12 e 24 horas de vida (BLEUL et al., 2007). Em bovinos mais erados foram encontrados valores de $22,9 \pm 3,8 \text{ mmol/L}$ e $28,45 \pm 1,30 \text{ mmol/L}$ para HCO_3^- do sangue arterial (SUCUPIRA; ORTOLANI, 2003; GUNES; ATALAN, 2006), valores que também ficaram muito próximos dos encontrados no presente trabalho. Os valores de BE tiveram uma variação grande nesse trabalho discordando com os valores relatados por BLEUL et al. (2007), que aparentemente encontram-se em valores mais fisiológicos. Os valores de pO_2 e pCO_2 foram os que apresentaram maior variabilidade, principalmente ao nascimento, sendo que às 36 horas de vida os animais pareceram estar estável, de modo que as variações posterior a esse tempo de vida são consideradas normais do ciclo circadiano, uma vez que havia variação do horário de nascimento e, conseqüentemente, dos horários de colheita do sangue. Em animais prematuros, não há o fechamento em tempo adequado do ducto arterioso, uma vez que na vida intrauterina, os pulmões do feto não realizam as trocas gasosas de forma apropriada. Em humanos, o fechamento do ducto arterioso ocorre até 96 horas de vida (BÖKENKAMP et al., 2010). Assim, BLEUL et al. (2007) relataram que bezerros com 30 minutos, 4, 12 e 24 horas de vida apresentavam valores de pCO_2 de $52,58 \pm 5,00 \text{ mmHg}$, $48,70 \pm 3,73 \text{ mmHg}$, $43,71 \pm 4,75 \text{ mmHg}$ e $44,22 \pm 4,32 \text{ mmHg}$, e de pO_2 de $58,08 \pm 13,12 \text{ mmHg}$, $67,66 \pm 6,10 \text{ mmHg}$, $71,89 \pm 8,32 \text{ mmHg}$ e $66,77 \pm 14,21 \text{ mmHg}$, respectivamente, mostrando também, dessa maneira, variações maiores que encontradas em outros parâmetros hemogasométricos. Isto posto, pode-se notar que nos três animais houve redução nos valores de pCO_2 concordando com os achados de BLEUL et al. (2007) e GUNES; ATALAN (2006). O valores de pO_2 dos bezerros 2 e 3 também variaram de acordo com a normalidade, sofrendo aumento normal e gradativo. O bezerro 1 apresentou pO_2 elevada, como de um animal com sua função respiratória já devidamente estabelecida e estabilizada (SUCUPIRA; ORTOLANI, 2003). Ao nascimento, os mamíferos podem apresentar valores diminuídos valores de pO_2 , primeiramente devido a oxigenação intrauterina, onde o sangue que chega ao feto tem valores menores de pO_2 quando comparados com os valores de sangue arterial da vaca (BLEUL, 2009). Tão logo o animal tem os devidos estímulos para começar a respirar e, dessa maneira, captar oxigênio por seu próprio pulmão, os valores da pO_2 têm um aumento gradual conforme ocorre a estabilização da função respiratória.

Os bezerros tratados com o protocolo neonatal estabelecido apresentaram rápida evolução da função pulmonar, evidenciada principalmente pelas mudanças nos valores da pO_2 . O bezerro 1 apresentou reação acima do esperado, provavelmente por estar a termo, sendo que os efeitos dos medicamentos, nesse animal em especial, apresentaram-se exacerbados.

Figura 21 – Pressão parcial de oxigênio (pO_2), pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2), íons de bicarbonato (HCO_3^-) e excesso de base (BE) para os diferentes tratamentos testados

Fonte: (FANTINATO NETO, 2015)

Legenda: Valores de pressão parcial de oxigênio (pO_2), pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2), íons de bicarbonato (HCO_3^-) e excesso de base (BE) de animais clonados tratados com surfactante, sildenafil e surfactante mais sildenafil, nos tempos até 3 horas de vida e com 24 horas devida.

Para análise parcial dos dados hemogasometria comparada de bezerros clonados encontrados até o momento, foram utilizados apenas dois tempos – 0 e 24 horas de vida – para avaliação dos tratamentos (Figura 21); esses tempos foram escolhidos por conter maior número de dados, fazendo com que a análise tenha maior confiabilidade. Dessa forma, foram feitas comparações entre os grupos “Sildenafil”, “Surfactante”, e “Surfactante + Sildenafil” por conterem maior número de informações

relativas a hemogasometrias nos diferentes tempos. Por último foram feitas análises comparando bezerros clonados e bezerros sadios nascidos por cesariana (Figura 23). A figura 23 mostra os valores de pO_2 , pCO_2 , HCO_3^- e BE do sangue arterial de bezerros clonados com até 3 horas e 24 horas de vida. O pH está mostrado na figura 22. Tanto o pH como os íons de bicarbonato e excesso de base tiveram diferença significativa no tempo ($p < 0,05$) discordando com os achados de BLEUL et al. (2007) que também não observaram diferença significativa com o passar do tempo. Na análise comparativa dos animais tratados com sildenafil associado ao surfactante foram utilizados 4 bezerros clonados da raça e 3 animais AI, todos nascidos por cesariana. Na figura 21 são mostrados as pO_2 , pCO_2 , pH, HCO_3^- e BE de animais clonados e oriundos de inseminação artificial. As variáveis pO_2 e pCO_2 não diferiram entre grupos e tempos, sugerindo que o tratamento tem o mesmo efeito tanto para os animais TNCS e IA e, às 48 horas de vida, os animais atingem aproximadamente o mesmo valor de pressões, parecendo estabilizar. O pH diferiu entre os tratamentos (TNCS e IA), entre os tempos e houve interação entre tratamento e tempo ($p < 0,05$). No início da vida extra uterina, os animais clonados apresentaram acidose bem evidente ao passo que animais AI não tiveram esse problema, apesar de serem relatadas como normais ao nascimento, a acidose e a hipercapnia transitórias (SIRISTATIDIS et al., 2004), e com o passar do tempo os valores se aproximaram e o pH sanguíneo pareceu estabilizar. Por fim, os valores de HCO_3^- e BE diferiram entre os grupos, o que remete ao pH encontrado nessas análises. Os animais AI apresentaram sempre valores de HCO_3^- e BE mais elevados, apresentando, também, valores mais elevados de pH. Em trabalho com aplicação de surfactante associado a ventilação forçada, com 100% de oxigênio, em ovinos prematuros, NOTTER et al. (1985) relatou aumentos significativos nos valores de pO_2 e diminuição dos valores de pCO_2 , nos primeiros 30 minutos após aplicação e início da ventilação. No entanto, SILVA (2012), também em trabalho com aplicação de surfactante em ovinos prematuros, utilizando ventilação forçada manual, reportou que nos animais em que foi feita apenas a ventilação mecânica, sem o uso do surfactante, obtiveram melhora clínica significativamente maior. No presente experimento, foram notadas melhoras em todos tratamentos utilizados, de maneira que três bezerros da raça Nelore, prematuros e não tratados vieram a óbito com menos de 1 hora de vida. Na necropsia desses animais, o pulmão apresentavam-se normais e foram positivos na prova de docimasia, o ducto arterioso era evidente, e apresentava calibre igual ao da artéria pulmonar, sem serem notadas outras alterações em outros órgãos. Os animais clonados que morreram após nascimento não tinham sinal de maturação pulmonar, sendo que à necropsia, o pulmão desses animais afundava em balde com água, além de apresentarem outros distúrbio, como degeneração gordurosa hepática e degeneração renal. Tendo isso, tem-se que os tratamentos utilizados podem aumentar as chances de sobrevivência de bezerros prematuros, quando estabelecidos nos primeiros momentos de vida.

Figura 22 – pH do sangue arterial de bezerros clonados nos tratamentos estudados

Fonte: (FANTINATO NETO, 2015).

Legenda: pH de clones tratados com surfactante, sildenafil ou surfactante associado ao sildenafil com até 3 e 24 horas de vida.

Figura 23 – Pressão parcial de oxigênio (pO_2), pressão de gás carbônico (pCO_2), pH, íons de bicarbonato (HCO_3^-) e excesso de base (BE)

Fonte: (FANTINATO NETO, 2015)

Legenda: Comparação da evolução dos valores de pressão de oxigênio (pO_2), pressão de gás carbônico (pCO_2), pH, íons de bicarbonato (HCO_3^-) e excesso de base (BE) de bezerros oriundos de inseminação artificial (AI) ou transferência nuclear de células somáticas (SCNT), até 3, 24, 36 e 48 horas.

7.4 CONCLUSÃO

O uso do protocolo de cuidados ao neonato mostrou ser uma excelente ferramenta de suporte à vida neonatal, que pode ajudar bezerros prematuros na manutenção da vida, principalmente quando instituída nas primeiras horas e continuada por até 48 horas.

O uso de surfactante melhora a oxigenação dos animais sem facilitar a excreção de CO₂. O sildenafil, associado ou não com o surfactante, melhora oxigenação, apesar do número reduzido de animais testados. Sabendo da facilidade de encontrar tal medicamento e o seu baixo custo, faz com que seu uso adequado possa aumentar a capacidade de adaptação neonatal de bezerros oriundos de gestações de risco e, assim, aumentar-se as chances de sobrevivência e diminuir as taxas de mortalidade de bezerros advindos destas gestações.

Capítulo 8

8 CONCLUSÕES GERAIS

Os valores encontrados na presente pesquisa servem de base de referência para bezerros sadios, da raça Nelore, de até 30 dias de idade, concebidos por inseminação artificial e nascidos por eutocia. Em futuras pesquisas ou avaliações feitas em bezerros recém nascidos, e advindos das biotécnicas da reprodução ou de gestações complicadas (como de bezerros muito grandes ou vacas não prontas para parição) onde seja necessária realização de cesariana, os valores apresentados nessa pesquisa poderão servir para direcionar o tratamento ou o estabelecimento de um protocolo de assistência ao neonato, assim como a formular um prognóstico.

A hemogasometria é uma ferramenta prática e precisa para avaliação da capacidade de trocas pulmonares e oxigenação tecidual que deve ser usada para avaliar a condição do neonatal logo após o nascimento, para assim estabelecer tratamento adequado para cada caso. Os bezerros estudados, da raça Nelore, concebidos por inseminação artificial, nascidos por parto espontâneo, e sem aplicação de qualquer ou semelhante que causasse maturação pulmonar ou indução do parto, têm parâmetros hemogasométricos do sangue arterial tidos como normais para a espécie bovina, mesmo com 5 minutos de vida apenas.

Quando há hipertensão da artéria pulmonar (valores superiores a 40 mmHg) há redução significativa da PAP mostrando que em bezerros neonatos, o sildenafil tem efeito desejado diretamente sobre a artéria pulmonar. Quando a PAP é menor do que 35mmHg pode-se ter duas reações diferentes, um grupo que não apresenta qualquer tipo de alteração nos valores e um grupo que tem aumento transitório, sem que haja interferência, a curto prazo, nos valores de pO_2 , sO_2 ou pCO_2 do sangue arterial de bezerros neonatos.

O sildenafil oral pode ser aplicado em bezerros com suspeita de hipertensão da artéria pulmonar, em situações onde não é possível fazer o diagnóstico do problema, sem causar maiores complicações ou efeitos adversos. Seu uso preventivo pode aumentar a sobrevivência ou melhorar a qualidade de vida de animais prematuros.

Os animais prematuros estudados, nascidos por cesariana, sem indução do parto com qualquer medicação mostraram-se viáveis e sobreviveram sem qualquer tipo de tratamento. Nesses bezerros observou-se padrão hemogasométrico similar aquele observado em bezerros de raças taurinas, no qual ocorre acidose respiratória nas primeiras horas de vida.

Apesar da pO_2 imediatamente após o nascimento dos bezerros prematuros ser extremamente baixa (variando entre 19 e 29 mmHg), esta condição é compatível com a vida, pois esses bezerros

prematturos sobreviverram sem que nenhum medicamento fosse utilizado. Mecanismos compensat3rios e processo adaptativo 3 vida extrauterina em bezerros zebu3nos e taurinos s3o diferentes.

O uso do protocolo de cuidados ao neonato mostrou ser uma excelente ferramenta de suporte 3 vida neonatal, que pode ajudar bezerros prematturos na manuten33o da vida, principalmente quando instituída nas primeiras horas e continuada por at3 48 horas.

O uso de surfactante melhora a oxigena33o dos animais sem facilitar a excre33o de CO₂. O sildenafil, associado ou n3o com o surfactante, melhora oxigena33o, apesar do n3mero reduzido de animais testados. Sabendo da facilidade de encontrar tal medicamento e o seu baixo custo, faz com que seu uso adequado possa aumentar a capacidade de adapta33o neonatal de bezerros oriundos de gesta33es de risco e, assim, aumentar-se as chances de sobreviv3ncia e diminuir as taxas de mortalidade de bezerros advindos destas gesta33es.

Referências

9 REFERÊNCIAS

- ALCORN, D. G.; ADAMSON, T. M.; MALONEY, J. E.; ROBINSON, P. M. A morphologic and morphometric analysis of fetal lung development in the sheep. **The Anatomical Record**, v. 201, n. 4, p. 655–667, 1981.
- AMORY, H.; DESMECHT, D.; LINDEN, A.; MCENTEE, K.; ROLLIN, F.; GENICOT, B.; BEDUIN, J. M.; LEKEUX, P. Growth-induced haemodynamic changes in healthy Friesian calves. **Veterinary Record**, v. 132, n. 17, p. 426–434, 24 abr. 1993.
- AMORY, H.; LINDEN, A.; DESMECHT, D.; ROLLIN, F.; GENICOT, B.; LEKEUX, P. Validation of the Thermodilution Technique for the Estimation of the Cardiac Output in the Unsedated Calf. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 38, n. 1-10, p. 409–417, 12 fev. 1991.
- ARAÚJO, M. A.; DIAS, B. P.; BOVINO, F.; DESCHK, M.; ABIMUSSI, C. J.; OLIVA, V. N.; RODRIGUES, C. A.; SANTOS, P. S. Cardiovascular effects of a continuous rate infusion of lidocaine in calves anesthetized with xylazine, midazolam, ketamine and isoflurane. **Veterinary anaesthesia and analgesia**, v. 41, n. 2, p. 145–52, mar. 2014.
- ASSIS NETO, A. C.; PEREIRA, F. T. V.; SANTOS, T. C.; AMBROSIO, C. E.; LEISER, R.; MIGLINO, M. A. Morpho-physical recording of bovine conceptus (*Bos indicus*) and placenta from days 20 to 70 of pregnancy. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 45, n. 5, p. 760–72, out. 2010.
- BAQUERO, H.; SOLIZ, A.; NEIRA, F.; VENEGAS, M. E.; SOLA, A. Oral sildenafil in infants with persistent pulmonary hypertension of the newborn: a pilot randomized blinded study. **Pediatrics**, v. 117, p. 1077–1083, 2006.
- 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: hematologic and biochemical profiles. **Cloning Stem Cells**, v. 9, n. 1, p. 83–96, 2007.
- BAYLIS, C.; TILL, C. Interpretation of arterial blood gases. **Surgery (Oxford)**, v. 27, n. 11, p. 470–474, nov. 2009.
- 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. Clinical disorders observed during the first 30 days of life of cloned Zebu calf. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. Suppl. 1, p. s243 – s252, 2011.
- BLEUL, U. Respiratory distress syndrome in calves. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 25, n. 1, p. 179–93, vii, 2009.
- BLEUL, U.; BYLANG, T. Effects of doxapram, prethcamide and lobeline on spirometric, blood gas and acid–base variables in healthy new-born calves. **The Veterinary Journal**, n. 0, 2012.

BLEUL, U.; LEJEUNE, B.; SCHWANTAG, S.; KÄHN, W. Blood gas and acid-base analysis of arterial blood in 57 newborn calves. **Veterinary Record**, v. 161, n. 20, p. 688–691, 2007.

BLEUL, U. T.; BIRCHER, B. M.; KÄHN, W. K. Effect of intranasal oxygen administration on blood gas variables and outcome in neonatal calves with respiratory distress syndrome: 20 cases (2004–2006). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 233, n. 2, p. 289–293, 2008.

BOGDAN, M.; HUMBERT, M.; FRANCOUAL, J.; CLAISE, C.; DUROUX, P.; SIMONNEAU, G.; LINDENBAUM, A. Urinary cGMP concentrations in severe primary pulmonary hypertension. **Thorax**, v. 53, n. 12, p. 1059–1062, 1998.

BÖKENKAMP, R.; DERUITER, M. C.; VAN MUNSTEREN, C.; GITTENBERGER-DE GROOT, A. C. Insights into the Pathogenesis and Genetic Background of Patency of the Ductus Arteriosus. **Neonatology**, v. 98, n. 1, p. 6–17, 2010.

BONDIOLI, K. R.; WESTHUSIN, M. E.; LOONEY, C. R. Production of Identical Bovine Offspring by Nuclear Transfer. **Theriogenology**, v. 33, n. 1, p. 165–174, 1990.

BRASCH, F.; JOHNEN, G.; WINN-BRASCH, A.; GUTTENTAG, S. H.; SCHMIEDL, A.; KAPP, N.; SUZUKI, Y.; MULLER, K. M.; RICHTER, J.; HAWGOOD, S.; OCHS, M. Surfactant protein B in type II pneumocytes and intra-alveolar surfactant forms of human lungs. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 30, n. 4, p. 449–458, 2004.

BRESSAN, F. F.; DE BEM, T. H.; PERECIN, F.; LOPES, F. L.; AMBROSIO, C. E.; MEIRELLES, F. V.; MIGLINO, M. A. Unearthing the roles of imprinted genes in the placenta. **Placenta**, v. 30, n. 10, p. 823–834, 2009.

BROWN, B.; EILERMAN, B. Understanding Blood Gas Interpretation. **Newborn and Infant Nursing Reviews**, v. 6, n. 2, p. 57–62, jun. 2006.

BRUMBAUGH, G. W. Neonatal adjustments. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 19, n. 3, p. 551–556, 2003.

CARTER, A. M. Placental oxygen transfer and the oxygen supply to the fetus. **Fetal and Maternal Medicine Review**, v. 11, n. 03, p. 151–161, 1999.

CEELEN, M.; VERMEIDEN, J. P. Health of human and livestock conceived by assisted reproduction. **Twin research : the official journal of the International Society for Twin Studies**, v. 4, n. 5, p. 412–416, 2001.

CHAVATTE-PALMER, P.; GUILLOMOT, M. Comparative implantation and placentation. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 64, n. 3, p. 166–174, 2007.

CHAVATTE-PALMER, P.; REMY, D.; CORDONNIER, N.; RICHARD, C.; ISSENMAN, H.; LAIGRE, P.; HEYMAN, Y.; J.-P., M. Review: Health Status of Cloned Cattle at Different Ages. **Cloning and Stem Cells**, v. 6, n. 2, p. 94–100, 2004.

CHEN, Z.; ROBBINS, K. M.; WELLS, K. D.; RIVERA, R. M. Large offspring syndrome: a bovine model for the human loss-of-imprinting overgrowth syndrome Beckwith-Wiedemann. **Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society**, v. 8, n. June, p. 591–601, 2013.

EDWARDS, M. O.; KOTTECHA, S. J.; KOTTECHA, S. Respiratory distress of the term newborn infant. **Paediatric respiratory reviews**, v. 14, n. 1, p. 29–36; quiz 36–7, mar. 2013.

FARROW, K. N.; FLIMAN, P.; STEINHORN, R. H. The diseases treated with ECMO: Focus on PPHN. **Seminars in Perinatology**, v. 29, n. 1, p. 8–14, fev. 2005.

FEITOSA, F. L. F.; PERRI, S. H. V.; BOVINO, F.; MENDES, L. C. N.; PEIRÓ, J. R.; GASPARELLI, E. R. F.; YANAKA, R.; CAMARGO, D. G. Evaluation of the Vitality of Nelore Calves Born of Normal or Dystocic Parturitions. **ARS Veterinária**, v. 28, p. 1–7, 2012.

FLINT, A. P. F.; RICKETTS, A. P.; CRAIG, V. A. The control of placental steroid synthesis at parturition in domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v. 2, n. 1–3, p. 239–251, 1979.

GALIÈ, N.; GHOFRANI, H. A.; TORBICKI, A.; BARST, R. J.; RUBIN, L. J.; BADESCH, D.; FLEMING, T.; PARPIA, T.; BURGESS, G.; ANGELO BRANZI, M.D., FRIEDRICH GRIMMINGER, M.D., MARCIN KURZYNA, M.D., AND GÉRALD SIMONNEAU, M. D. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. **The New England journal of medicine**, v. 353, n. 20, p. 2148–2157, 9 mar. 2005.

GOEL, N.; CALVERT, J. Understanding blood gases/acid–base balance. **Paediatrics and Child Health**, v. 22, n. 4, p. 142–148, abr. 2012.

GOERKE, J. Pulmonary surfactant : functions and molecular composition. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1408, p. 79–89, 1998.

GOFF, J. P.; HORST, R. L. Physiological Changes at Parturition and Their Relationship to Metabolic Disorders. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 7, p. 1260–1268, 1997.

GROSS, T. S.; WILLIAMS, W. F.; RUSSEK-COHEN, E. Cellular changes in the peripartum bovine fetal placenta related to placental separation. **Placenta**, v. 12, n. 1, p. 27–35, 1991.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E. H. **Obstetrícia veterinária**. Porto Alegre - RS: Editora Sulina, 1982. p. 323

GUILLOMOT, M.; TAGHOUTI, G.; CONSTANT, F.; DEGRELLE, S.; HUE, I.; CHAVATTE-PALMER, P.; JAMMES, H. Abnormal Expression of the Imprinted Gene Phlda2 in Cloned Bovine Placenta. **Placenta**, v. 31, n. 6, p. 482–490, 2010.

HASLER, J. F. F.; HENDERSON, W. B. B.; HURTGEN, P. J. J.; JIN, Z. Q. Q.; MCCAULEY, A. D. D.; MOWER, S. A. A.; NEELY, B.; SHUEY, L. S. S.; STOKES, J. E. E.; TRIMMER, S. A. A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 141–152, jan. 1995.

HILL, J. R. Incidence of Abnormal Offspring from Cloning and Other Assisted Reproductive Technologies. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 2, p. 131118104632004, 2014.

HOMMA, S.; SACCO, R. L. Patent foramen ovale and stroke. **Circulation**, v. 112, n. 7, p. 1063–72, 16 ago. 2005.

JACOBSEN, H.; SCHMIDT, M.; HOLM, P.; SANGILD, P. T.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Ease of calving, blood chemistry, insulin and bovine growth hormone of newborn calves derived from embryos

produced in vitro in culture systems with serum and co-culture or with PVA. **Theriogenology**, v. 54, n. 1, p. 147–158, 2000.

JENSEN, A.; ROMAN, C.; RUDOLPH, A. M. Effects of reducing uterine blood flow on fetal blood flow distribution and oxygen delivery. **Journal Developmental Physiology**, v. 15, n. 6, p. 309–323, 1991.

KATO, Y.; TANI, T.; SOTOMARU, Y.; KUROKAWA, K.; KATO, J.; DOGUCHI, H.; YASUE, H.; TSUNODA, Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2095–2098, 1998.

KRUIP, T. A. M.; DEN DAAS, J. H. G. In vitro produced and cloned embryos: Effects on pregnancy, parturition and offspring. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 43–52, 1997.

LANDIM-ALVARENGA, F. C. Parto Normal. In: PRESTES, N. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. (Eds.). **Obstetrícia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 82–96.

LINDMAN, B. R.; ZAJARIAS, A.; MADRAZO, J. A.; SHAH, J.; GAGE, B. F.; NOVAK, E.; JOHNSON, S. N.; CHAKINALA, M. M.; HOHN, T. A.; SAGHIR, M.; MANN, D. L. Effects of phosphodiesterase type 5 inhibition on systemic and pulmonary hemodynamics and ventricular function in patients with severe symptomatic aortic stenosis. **Circulation**, v. 125, n. 19, p. 2353–62, 15 maio 2012.

LU, J. Y.; DISTEFANO, J.; PHILIPS, K.; CHEN, P.; NEUMANN, A. W. Effect of the compression ratio on properties of lung surfactant (bovine lipid extract surfactant) films. **Respiration physiology**, v. 115, p. 55–71, 1999.

MARTINEAU, H. M.; DAGLEISH, M. P.; COUSENS, C.; UNDERWOOD, C.; FORBES, V.; PALMARINI, M.; GRIFFITHS, D. J. Cellular Differentiation and Proliferation in the Ovine Lung during Gestation and Early Postnatal Development. **Journal of Comparative Pathology**, n. 0, 2013.

MCGOWAN, S. E. Extracellular matrix and the regulation of lung development and repair. **The FASEB Journal**, v. 6, n. 11, p. 2895–2904, 1992.

MEE, J. F. Newborn dairy calf management. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 24, n. 1, p. 1–17, 2008.

MEIER-STAUSS, P.; BUCHER, H. U.; HÜRLIMANN, R.; KÖNIG, V.; HUCH, R. Pulse oximetry used for documenting oxygen saturation and right-to-left shunting immediately after birth. **European Journal of Pediatrics**, v. 149, p. 851–855, 1990.

MEIRELLES, F. V.; PROVIDELO, F. D.; MERIGHE, F. D.; MIRANDA, M. S.; TRALDI, A. S.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; MIGLINO, M. A.; PIMENTEL, J. R. V.; WATANABE, Y. F. Challenges for commercial cloning: planning the future. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. Suppl. 1, p. 235–242, 2006.

MESS, A. M.; FERNER, K. J. Evolution and development of gas exchange structures in Mammalia: The placenta and the lung. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 173, Suppl. n. 0, p. S74–S82, 2010.

MEYER, C. L.; BERGER, P. J.; KOEHLER, K. J. Interactions among Factors Affecting Stillbirths in Holstein Cattle in the United States. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 11, p. 2657–2663, 2000.

MEYER, H.; KÄSTNER, S. B. R.; BEYERBACH, M.; REHAGE, J. Cardiopulmonary effects of dorsal recumbency and high-volume caudal epidural anaesthesia with lidocaine or xylazine in calves. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 186, n. 3, p. 316–22, dez. 2010.

MICHELAKIS, E. Oral Sildenafil Is an Effective and Specific Pulmonary Vasodilator in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension: Comparison With Inhaled Nitric Oxide. **Circulation**, v. 105, n. 20, p. 2398–2403, 29 abr. 2002.

NAGY, D. W. Resuscitation and Critical Care of Neonatal Calves. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 25, n. 1, p. 1–11, 2009.

NOBLE, K. A. The ABCs of arterial blood gasses. **Journal of perianesthesia nursing : official journal of the American Society of PeriAnesthesia Nurses / American Society of PeriAnesthesia Nurses**, v. 24, n. 6, p. 401–5, dez. 2009.

NOTTER, R. H.; EGAN, E. A.; KWONG, M. S.; HOLM, B. A.; SHAPIRO, D. L. Lung surfactant replacement in premature lambs with extracted lipids from bovine lung lavage: effects of dose, dispersion technique, and gestational age. **Pediatric Research**, v. 19, n. 6, p. 569–577, 1985.

POGLIANI, F. C. **Parâmetros ecodopplercardiográficos em bezerros da raça Nelore originados através de transferência nuclear de células somáticas adultas – Clonagem**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2010.

POULSEN, K. P.; MCGUIRK, S. M. Respiratory Disease of the Bovine Neonate. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 25, n. 1, p. 121–137, 2009.

PROBO, M.; GIORDANO, A.; MORETTI, P.; OPSOMER, G.; FIEMS, L. O.; VERONESI, M. C. Mode of delivery is associated with different hematological profiles in the newborn calf. **Theriogenology**, v. 77, n. 5, p. 865–872, 2012.

ROCHA, J. C. M. C.; TONHATI, H.; ALENCAR, M. M.; LOBO, R. B. Componentes de variância para o período de gestação em bovinos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 6, p. 784–791, 2005.

SAS. **SAS/STAT® 9.3 User's Guide**. Cary: NCSAS Institute Inc., 2011.

SASTRY, B. K. S.; NARASIMHAN, C.; REDDY, N. K.; RAJU, B. S. Clinical efficacy of sildenafil in primary pulmonary hypertension: a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 43, n. 7, p. 1149–53, 7 abr. 2004.

SCHRÖDER, H. J. Comparative aspects of placental exchange functions. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 63, n. 1, p. 81–90, 1995.

SHARMA, A.; FORD, S.; CALVERT, J. Adaptation for life: a review of neonatal physiology. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 15, n. 3, p. 89–95, mar. 2014.

SHEKERDEMIAN, L. S.; RAVN, H. B.; PENNY, D. J. Intravenous sildenafil lowers pulmonary vascular resistance in a model of neonatal pulmonary hypertension. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 165, n. 85, p. 1098–1102, 2002.

SMITH, A.; TAYLOR, C. Analysis of blood gases and acid–base balance. **Surgery (Oxford)**, v. 23, n. 6, p. 194–198, jun. 2005.

SMITH, A.; TAYLOR, C. Analysis of blood gases and acid–base balance. **Surgery (Oxford)**, v. 26, n. 3, p. 86–90, mar. 2008.

SUCUPIRA, M. C. A.; ORTOLANI, E. L. Uso de sangue arterial e venoso no exame do equilíbrio ácido-básico de novilhos normais ou com acidose metabólica. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 863–868, 2003.

SUSTRONCK, B.; VAN LOON, G.; DEPREZ, P.; MUYLLE, E.; GASTHUYS, F.; FOUBERT, L. Effect of inhaled nitric oxide on the hypoxic pulmonary vasoconstrictor response in anesthetized calves. **Research in veterinary science**, v. 63, p. 193–197, 1997.

SZDZUY, K.; ZELLER, U.; RENFREE, M.; TZSCHENTKE, B.; JANKE, O. Postnatal lung and metabolic development in two marsupial and four eutherian species. **Journal of Anatomy**, v. 212, n. 2, p. 164–179, 2008.

SZENCI, O.; TAVERNE, M. A. M.; TAKÁCS, E. A review of 126 Caesarean sections by blood gas and the acid-base status of newborn calves. **Theriogenology**, v. 32, n. 4, p. 667–673, 1989.

TAKASEYA, T.; FUJIKI, M.; SHIOSE, A.; KIM, H.-I.; KOBAYASHI, M.; MASSIELLO, A. L.; DESSOFFY, R.; AL-RUZZEH, S.; FUKAMACHI, K. Hemodynamic differences between the awake and anesthetized conditions in normal calves. **Journal of artificial organs : the official journal of the Japanese Society for Artificial Organs**, v. 15, n. 3, p. 225–30, set. 2012.

THURLBECK, W. M. Postnatal growth and development of the lung. **The American review of respiratory disease**, v. 111, n. 6, p. 803–844, 1975.

TIVANE, C.; RODRIGUES, M. N.; FAVARON, P. O.; ASSIS NETO, A. C.; BIRGEL JÚNIOR, E. H.; MIGLINO, M. A. Mechanisms of calcium transport across the placenta: Review. **Open Journal of Animal Sciences**, v. 3, n. 1, p. 13–20, 2013.

TOQUETTI, R. DE C.; GUERRA, R. R.; AMBROSIO, C. E.; SANTOS, J. M.; FAVARON, P. O.; FRANCIOLLI, A. L. R.; ALBERTO, M. V.; MEIRELLES, F. V.; MIGLINO, M. A. Morfologia e funcionalidade do pneumócito tipo II e sua relação e variação com a idade gestacional em bovinos. **Ciência Rural**, v. 39, p. 2470–2477, 2009.

URREGO, R.; RODRIGUEZ-OSORIO, N.; NIEMANN, H. Epigenetic disorders and altered gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle. **Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society**, v. 9, n. 6, p. 803–15, jun. 2014.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M.; AERTS, B. J. G.; DEN DAAS, J. H. G. Abnormal offspring following in vitro production of bovine preimplantation embryos: A field study. **Theriogenology**, v. 49, n. 5, p. 883–894, 1998.

VARGA, J.; MESTER, L.; BÖRZSÖNYI, L.; ERDÉSZ, C.; VÁRI, A.; KÖRMÖCZI, P. S.; SZENCI, O. Adaptation of Respiration to Extrauterine-Life in Healthy Newborn Calves. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 34, n. 3-4, p. 377–379, 1999.

VARGA, J.; MESTER, L.; BÖRZSÖNYI, L.; LEKEUX, P.; SZENCI, O. Improved Pulmonary Adaptation in Newborn Calves with Postnatal Acidosis. **The Veterinary Journal**, v. 162, n. 3, p. 226–232, 2001.

VARGA, J.; SZENCI, O.; DUFRASNE, I.; BÖRZSÖNYI, L.; LEKEUX, P. Respiratory Mechanical Function Immediately Postpartum in Newborn Calves. **The Veterinary Journal**, v. 156, n. 1, p. 30–32, 1998.

VEIGA, J. S.; PAIVA, O. M.; CHIEFFI, A. Duração do período de gestação em fêmeas da raça Nelore e idade na época da primeira cria. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária de São Paulo**, v. 3, n. 3, p. 55 – 59, 1946.

VELDHUIZEN, R.; NAG, K.; ORGEIG, S.; POSSMAYER, F. The role of lipids in pulmonary surfactant. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1408, p. 90–108, 1998.

WEIBEL, E. R. Functional Morphology of the Growing Lung. **Respiration**, v. 27(suppl 1, n. Suppl. 1, p. 27–35, 1970.

WEIMANN, J.; ULLRICH, R.; HROMI, J.; FUJINO, Y.; CLARK, M. W. H.; BLOCH, K. D.; ZAPOL, W. M. Sildenafil is a pulmonary vasodilator in awake lambs with acute pulmonary hypertension. **Anesthesiology**, v. 92, n. 6, p. 1702–1712, 2000.

WILLIAMS, W. F.; MARGOLIS, M. J.; MANSPEAKER, J.; DOUGLASS, L. W.; DAVIDSON, J. P. Peripartum changes in the bovine placenta related to fetal membrane retention. **Theriogenology**, v. 28, n. 2, p. 213–223, 1987.

WILSON, J. M.; WILLIAMS, J. D.; BONDIOLI, K. R.; LOONEY, C. R.; WESTHUSIN, M. E.; MCCALLA, D. F. Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. **Animal Reproduction Science**, v. 38, n. 1-2, p. 73–83, 1995.

WRIGHT, J. R.; WAGER, R. E.; HAWGOOD, S.; DOBBS, L.; CLEMENTS, J. A. Surfactant apoprotein Mr = 26,000-36,000 enhances uptake of liposomes by type II cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 6, p. 2888–2894, 1987.

YASUOKA, M. M. **Determinação dos valores da pressão da artéria pulmonar, da oximetria, da hemogasometria e dos teores plasmáticos de lactato em bezerros nos primeiros 30 dias de vida.** São Paulo / SP: Universidade de São Paulo, 2012.

YOUNG, L. E.; SINCLAIR, K. D.; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Reviews of Reproduction**, v. 3, n. 3, p. 155–163, 1998.

ZIMMERMANN, L. J.; JANSSEN, D. J.; TIBBOEL, D.; HAMVAS, A.; CARNIELLI, V. P. Surfactant metabolism in the neonate. **Biology of the Neonate**, v. 87, n. 4, p. 296–307, 2005.