ALINE TRAMONTINI ZANLUCHI QUEIROZ

Estudo comparativo entre os parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos e de hemogasometria de bezerros clonados por scnt e de bezerros gerados por inseminação artificial

São Paulo

2016

ALINE TRAMONTINI ZANLUCHI QUEIROZ

Estudo comparativo entre os parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos e de hemogasometria de bezerros clonados por SCNT e de bezerros gerados por inseminação artificial

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 a obtenção do Título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Luciano Andrade Silva

São Paulo

2016

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.3282
FMVZ

Queiroz, Aline Tramontini Zanluchi
Estudo comparativo entre os parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos e de hemogasometria de bezerros clonados por SCNT e de bezerros gerados por inseminação artificial / Aline Tramontini Zanluchi Queiroz. -- 2016.
104 f. il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2016.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Andrade Silva.

1. Clonagem por SCNT. 2. Neonatos. 3. Alterações clínicas. 4. Patologia clínica. 5. Bovinos. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS PARÂMETROS CLÍNICOS, HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E DE HEMOGASOMETRIA DE BEZERROS CLONADOS POR SCNT E DE BEZERROS GERADOS POR INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL", protocolado sob o CEUA nº 8778081215, sob a responsabilidade de **Luciano Andrade Silva** *e equipe; Aline Tramontini Zanluchi Queiroz* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) em reunião de 01/02/2016.

We certify that the proposal "COMPARATIVE STUDY OF CLINICAL, HEMATOLOGIC AND BIOCHEMICAL PROFILES OF SCNT CLONED CATTLE WITH ARTIFICIAL INSEMINATION PRODUCED CATTLE", utilizing 20 Bovines (20 males), protocol number CEUA 8778081215, under the responsibility of **Luciano Andrade Silva** *and team; Aline Tramontini Zanluchi Queiroz* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of São Paulo (CEUA/FMZV) in the meeting of 02/01/2016.

Vigência da Proposta: de 02/2011 a 02/2016 Área: Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres

Procedência:	Não aplicável biotério						
Espécie:	Bovinos	sexo:	Machos	idade:	1 dia	N:	20
Linhagem:	Girolanda			Peso:	40kg		

Resumo: A clonagem animal por transferência nuclear de célula somática (SCNT) é uma técnica de reprodução assistida que consiste em transferir o núcleo de uma célula de interesse a um oócito previamente enucleado. Sua utilização, apesar do potencial para beneficiar a pesquisa e a agropecuária, ainda apresenta eficiência baixa. Cerca de 1 por cento dos oócitos reconstruídos resultam em neonatos hígidos. Perdas embrionárias ocorrem principalmente no início da gestação, mas podem ocorrer em outras fases da gestação, e no período perinatal. Essas perdas têm sido associadas a uma interação materno-fetal anormal devido a malformações diversas na placenta, entre elas, uma vascularização deficiente do órgão. Após o nascimento as taxas de mortalidade circulam entre 12,5 e 42 por cento. As principais alterações nos neonatos são descritas como a síndrome do bezerro grande, com fetos exageradamente grandes, desenvolvimento anormal de placenta e crescimento não sincronizado de órgãos. Também são relatadas malformações musculoesqueléticas, aumento do diâmetro do cordão umbilical, dificuldades respiratórias e anormalidades metabólicas. Acredita-se que o mecanismo desta síndrome esteja relacionado com a reprogramação nuclear. Alinhando a gravidade dessas alterações e o custo elevado da técnica, torna-se necessário entender os mecanismos dessas alterações e desenvolver estratégias para prevenção e terapias para minimizar perdas. A avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos é uma ferramenta para auxílio no diagnóstico e no acompanhamento terapêutico. O objetivo deste estudo é avaliar os parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos e de hemogasometria de bezerros clonados por SCNT, assim como comparar os mesmos resultados obtidos em bezerros gerados a partir de inseminação artificial em um programa comercial de produção de clones bovinos por SCNT.

São Paulo, 01 de fevereiro de 2016

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

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: QUEIROZ, Aline Tramontini Zanluchi

Titulo: Estudo comparativo entre os parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos e de hemogasometria de bezerros clonados por SCNT e de bezerros gerados por inseminação artificial

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 titulo 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

À Profª Drª Maria Angélica Miglino e ao Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior pela oportunidade.

À minha Família por absolutamente tudo. Sem vocês nada seria possível, nada faria sentido.

Ao Sr. Marco Antônio Laffranchi (*in Memorian*) e sua Família por permitirem que o projeto acontecesse, por acreditarem e por oferecerem a oportunidade de aprender e trabalhar.

Ao Prof. Dr. Luciano Andrade Silva pelo apoio, pela orientação, pela confiança.

Aos Professores da FZEA: Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Junior por compartilhar seu conhecimento e Prof. Dr. Ricardo Strefezzi pelos conselhos durante a elaboração do trabalho.

Aos colegas de UNOPAR Luiz Fernando Coelho da Cunha Filho, Raquel Cristina Gonçalves, Maria Augusta Berlingieri, Mariana Ferreira de Almeida, Ériko da Silva Santos, Renato Zanin, Paulo Adona e Paulo Monzani pela convivência durante o trabalho e durante as viagens a São Paulo.

À Profª Drª Neide Mariko Tanaka pelo auxílio durante a documentação do projeto.

Aos meus alunos Patrícia Cruz, Gabriel Lopes, Tobias Sovernigo, Dalton Bronkvorst.

À Iza, Ana Paula, Bárbara, Estela pela análise dos dados e pelo apoio em Pirassununga.

Ao Serviço de Atendimento ao Usuário da Biblioteca Virginie Buff D'Apice, especialmente à Elza Faquim, pela revisão das normas e produção da ficha catalográfica.

À Comissão de Ética para o Uso de Animais da FMVZ, especialmente à Profª Drª Denise Tabacchi Fantoni, à Lia e Rosemeire pela ajuda na documentação e no trâmite do projeto.

RESUMO

QUEIROZ, A. T. Z. **Estudo comparativo entre os parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos e de hemogasometria de bezerros clonados por SCNT e de bezerros gerados por inseminação artificial.** [Comparative study of clinical, hematologic and biochemical profiles of SCNT cloned cattle with artificial insemination produced cattle]. 2016. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A clonagem animal por transferência nuclear de células somáticas (SCNT) é uma técnica de reprodução assistida que consiste em transferir o núcleo de uma célula de interesse a um oócito previamente enucleado. Sua utilização ainda apresenta eficiência baixa, com perdas embrionárias principalmente no início da gestação, ou em outras fases da gestação e no período perinatal devido à interação materno-fetal anormal com malformações diversas na placenta. Após o nascimento, a mortalidade está entre 12,5 e 42% devido às anormalidades neonatais já descritas como a síndrome do “large offspring”, com fetos exageradamente grandes, desenvolvimento anormal da placenta e crescimento não sincronizado de órgãos. Também são relatadas malformações musculoesqueléticas, aumento do diâmetro do cordão umbilical, dificuldades respiratórias e anormalidades metabólicas. Acredita-se que o mecanismo desta síndrome esteja relacionado com a reprogramação nuclear. Alinhando a gravidade das alterações e o custo elevado da técnica, torna-se necessário entender os mecanismos dessas alterações e desenvolver estratégias para prevenção e terapias para minimizar perdas. A avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos pode auxiliar no diagnóstico e acompanhamento terapêutico do neonato. O objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos e de hemogasometria de bezerros clonados por SCNT, comparando os resultados com aqueles de bezerros gerados a partir de inseminação artificial. Dos bezerros clonados deste estudo, quatro vieram a óbito no período pós-natal. Alterações comuns nestes bezerros e que não ocorreram com os demais foram: pesos extremos ao nascimento, muito altos ou muito baixos; avaliação baixa no APGAR, principalmente após 5 minutos do nascimento; presença de líquido amniótico com viscosidade elevada; pH sanguíneo baixo imediatamente após o nascimento e elevação da creatinina sérica. As alterações nestes parâmetros em bezerros neonatos clonados podem indicar um risco de complicação no quadro geral dos clones, forçando medidas intensivas no tratamento para preservar a vida

dos mesmos. Outras alterações frequentes nos clones, mas que não estavam necessariamente relacionadas a um quadro de risco foram: aumento do diâmetro dos vasos umbilicais; pH elevado ao nascimento e que evoluiu para acidose respiratória, acidose metabólica ou acidose mista respiratória e metabólica; elevação do volume celular médio; leucocitose por neutrofilia que foi observado em todos os clones devido à administração de corticoides ao nascimento; elevação gradual da contagem de plaquetas; diminuição da concentração de creatinina sérica e da atividade de AST. A gamaglutamiltransferase apresentou uma elevação mais discreta nos clones, podendo indicar uma falha na transferência de imunidade passiva. A concentração de lactado apresentou-se elevada em todos os clones em algum momento do período perinatal, indicando o quadro de acidose metabólica.

Palavras-chave: Clonagem por SCNT. Neonatos. Alterações clínicas. Patologia clínica. Bovinos.

ABSTRACT

QUEIROZ, A. T. Z. **Comparative study of clinical, hematologic and biochemical profiles of SCNT cloned cattle with artificial insemination produced cattle.** [Estudo comparativo entre os parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos e de hemogasometria de bezerros clonados por SCNT e de bezerros gerados por inseminação artificial]. 2016. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Animal cloning by somatic cell nuclear transfer (SCNT) is an assisted reproductive technique in which the nucleus of a donor cell is transferred to a previously enucleated oocyte. Despite its potential benefits to research and agriculture, only 1% of the reconstructed oocytes develop into live healthy neonates. Embryo losses may occur early in pregnancy or in other stages of gestation, and during the perinatal period. These losses have been associated to abnormalities in maternal-fetal interaction, probably due to a deficient placental vascularization. Mortality rates after birth range between 12,5 to 42%, and the main abnormalities are related to the large offspring syndrome, with overly large cattle, abnormal placental development, and desynchronized organ development. Other problems reported include muscle-skeletal disorders, enlarged umbilical cord, respiratory distress and metabolic disorders. The mechanism of this syndrome is probably related to nuclear reprogramming. Considering the severity of these abnormalities and the high costs of the technique, it is necessary to understand the mechanisms that lead to the pathology and develop strategies for preventing and treating the affected animals, minimizing financial losses. The evaluation of hematological and biochemical parameters is a very important tool for diagnosis and therapeutics. The aim of this study was to evaluate clinical, hematological and biochemical profiles, including blood gas analysis in calves originated by SCNT embryos, as well as comparing the same results from artificial insemination (AI) bred calves (control group). Amongst the cloned calves in this study, four died in the post-natal period. The most common abnormalities seen in these calves and that did not affect the others were: extreme birth weights (low or high), low APGAR score, especially when evaluated 5 minutes after birth, viscous amniotic fluid, low blood pH measured immediately after birth and high serum levels of creatinine. These abnormalities may present a risk of general health impairment in cloned calves, imposing better intensive care treatment in order to minimize death losses. Other frequent abnormalities in clones, but not necessarily

related to risk of neonatal death immediately after birth are: enlarged umbilical vessels, high blood pH at birth that progresses to respiratory acidosis, metabolic acidosis or mixed respiratory metabolic acidosis, high mean cell volume, leukocytosis with neutrophilia due to glucocorticoids therapy after birth was observed in all of our clones, gradual increase in platelet count, low creatinine levels and low aspartate aminotransferase levels. There was a slight increase in gamma glutamyltransferase in clones compared to controls, which represent a poor passive immunity transfer. Lactate levels were high in all of the cloned animals at some point of the perinatal period, showing that they suffer from some degree of metabolic acidosis.

Keywords: Cloning by SCNT. Neonate calf. Clinical abnormalities. Clinical pathology. Bovine.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 10

2 REVISÃO DE LITERATURA..... 12

2.1 CLONAGEM POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS (SCNT) 12

2.2 ANORMALIDADES PLACENTÁRIAS OBSERVADAS NA SCNT..... 13

2.3 ENFERMIDADES EM BEZERROS CLONADOS POR SCNT..... 16

3 OBJETIVOS..... 20

4 HIPÓTESE 21

5 MATERIAL E MÉTODO..... 22

5.1 LOCAL..... 22

5.2 ANIMAIS UTILIZADOS E GRUPOS EXPERIMENTAIS 22

5.3 PRODUÇÃO DE EMBRIÕES POR SCNT 23

5.4 INDUÇÃO DO PARTO, CESARIANAS E CUIDADOS NEONATAIS 25

5.5 MÉTODOS DE COLETA DE SANGUE 28

5.6 ANÁLISES CLÍNICAS 29

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA 29

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO 30

6.1 ANÁLISE DOS PARÂMETROS CLÍNICOS, HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E HEMOGASOMÉTRICOS DO GRUPO CONTROLE 31

6.2 ANÁLISE TEMPORAL DA EVOLUÇÃO DOS BEZERROS CLONADOS (GRUPO CLONES) 35

6.2.1. **Clone 21 ..... 35**

6.2.2. **Clone 22 ..... 41**

6.2.3. **Clone 23 ..... 45**

6.2.4. **Clone 24 ..... 47**

6.2.5. **Clone 25 ..... 51**

6.2.6. **Clone 26 ..... 55**

6.2.7. **Clone 27 ..... 61**

6.2.8. **Clone 28 ..... 65**

6.2.9. **Clone 29 ..... 69**

6.2.10. **Clone 211 ..... 75**

6.2.11. **Clone 212** **79**
6.2.12. **Clone 123** **83**
6.3. DISCUSSÃO SISTEMÁTICA DOS PRINCIPAIS ACHADOS NOS PARÂMETROS CLÍNICOS, HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E DE HEMOGASOMETRIA EM BEZERROS CLONADOS POR SCNT 84
7. CONCLUSÕES **95**
REFERÊNCIAS **97**

1. INTRODUÇÃO

A clonagem animal por transferência nuclear de célula somática (SCNT) é uma biotécnica que consiste em transferir o núcleo de uma célula de interesse a um oócito previamente enucleado (CAMPBELL et al., 1996). A utilização desta biotecnologia pode beneficiar a pesquisa e a agricultura. É defendida sob o propósito da produção de indivíduos com perfil de alta produção ou qualquer outra característica que se queira manter no rebanho, para a conservação de espécies em extinção, para gerar indivíduos que produzam determinadas substâncias de interesse farmacológico ou para xenotransplantes (CAMPBELL et al., 1996; EDWARDS et al., 2003; BUHLER, 2004).

Mesmo após todos os avanços recentes neste campo, a clonagem por SCNT ainda não apresenta uma eficiência adequada a ponto de permitir sua expansão comercial em larga escala. Cerca de 1% dos oócitos reconstruídos resultam em produtos viáveis e saudáveis. Existe uma incidência alta de perdas embrionárias, a maioria no início da gestação, podendo ocorrer, também, em outras fases da gestação, assim como no período perinatal (HILL et al., 2000; FARIN et al., 2006; SMITH et al., 2012). Em vacas e ovelhas, essas perdas têm sido associadas a uma interação materno-fetal anormal devido a malformações diversas na placenta, entre elas, uma vascularização deficiente deste órgão (HILL et al., 2000; DE SOUZA et AL, 2001; FARIN et al., 2006; SMITH et al., 2012).

Ainda nos casos de gestações a termo, também existem relatos de problemas com os neonatos. Nesta fase, as taxas de mortalidade circulam em torno de 12,5 a 42% (HILL et al., 1999; PANARACE, 2007). As alterações observadas nos neonatos foram caracterizadas como pertencentes à síndrome do bezerro grande. Relatada na fase final da gestação é uma causa importante de morte de bezerros clonados. As mortes fetais tardias presentes nesta síndrome estão relacionadas com a presença de fetos exageradamente grandes, desenvolvimento anormal de placenta e crescimento não sincronizado de órgãos (FARIN e FARIN, 1995; WILSON et al., 1995; YOUNG et al., 1998). Por haver uma maior incidência em bovinos clonados por SCNT do que por transferência nuclear de células embrionárias, acredita-se que o mecanismo desta síndrome esteja relacionado com

a reprogramação nuclear (HEYMAN et al., 2002). Também são descritas outras doenças tais como malformações musculoesqueléticas (GARRY et al., 1996), dificuldades respiratórias (PANARACE et al., 2007; BRISVILLE et al., 2011) e anormalidades metabólicas (BATCHELDER et al, 2007a).

Em clones observa-se um período gestacional mais longo e os bezerros neonatos podem exibir a síndrome da dificuldade respiratória e outras alterações que prejudicam sua sobrevivência (KRUIP e DEN DAAS, 1997; HILL et al., 1999). Entre as causas de morte de bezerros clonados, citam-se a insuficiência cardíaca esquerda e a dificuldade respiratória. Podem ser observados sinais como hiperventilação, dilatação ventricular esquerda, taquicardia, ausência do reflexo de sucção e vasos umbilicais aumentados (HILL et al., 1999; CHAVATTE-PALMER et al., 2002). Há relatos de infecções, como ruminites e abomasites, coccidiose, infecção após trauma, aplasia tímica, insuficiência renal e hipertermia paradoxal (RENARD et al., 1999; WELLS et al., 1999; LEWIS et al., 2000; CHAVATTE-PALMER et al., 2002).

Em virtude de todas essas alterações graves que ocorrem em animais clonados e, considerando os altos investimentos para a realização da técnica, há uma necessidade de estudos controlados para entender os mecanismos dessas alterações e desenvolver estratégias para prevenção e terapias para minimizar perdas por morte neonatal. A avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos nestes casos funciona como uma ferramenta para auxílio no diagnóstico das alterações presentes em cada animal, assim como para monitoramento da terapêutica instituída (FELDMAN et al., 2000). O objetivo deste trabalho foi avaliar e descrever as principais alterações nos parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos e hemogasometria de bezerros clonados por SCNT. Utilizamos como referência, bezerros controles hígidos, nascidos e tratados nas mesmas condições dos clones. O segundo objetivo deste trabalho foi determinar, a partir dos casos dos clones que vieram a óbito, quais foram as principais suspeitas da causa da morte e as alterações dos parâmetros laboratoriais que coincidiram nos momentos próximos ao óbito. Dessa forma, a presença destas alterações pode chamar a atenção para a gravidade do quadro geral de animais mais debilitados, para que os cuidados se intensifiquem e as perdas sejam evitadas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. CLONAGEM POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS

O primeiro relato do nascimento de um animal por meio de uma técnica de clonagem ocorreu em 1997, quando Wilmut et al. (1997) anunciaram o nascimento de uma ovelha. Dolly, como foi chamada, foi clonada a partir de uma célula da glândula mamária de uma ovelha adulta.

O processo de clonagem por transferência nuclear de célula somática consiste em unir o núcleo da célula doadora e um oócito nucleado por meio de um estímulo elétrico. Tanto células embrionárias quanto células adultas não têm a capacidade de ativar oócitos, portanto estas células precisam ser ativadas de forma artificial. O estímulo elétrico tem sido o mais utilizado, mas o estímulo químico ou a combinação de ambos também podem ser utilizados (WAKAYAMA et al., 1998; LOI et al., 1998; CIBELLI et al., 1998; WELLS et al., 1999).

O principal objetivo, assim como o maior desafio do processo de clonagem é obter animais hígidos e férteis. Desta forma, a eficiência da técnica é calculada como a relação entre fetos desenvolvidos a partir do blastocisto e transferidos para as receptoras, ou pela proporção entre animais nascidos vivos e todos os oócitos transferidos (YANAGIMACHI, 2002; OBACK, 2009).

Embora tenha sido postulado que a habilidade da célula doadora em ser reprogramada fosse inversamente proporcional ao seu estado de diferenciação, experimentos têm mostrado que a eficiência da clonagem tem pouca relação com a idade da célula. A eficiência do processo de clonagem depende da capacidade da célula receptora enucleada em completar todas as reações de reprogramação e da célula doadora de ser reprogramada (YANAGIMACHI, 2002; OBACK, 2009). A taxa de sucesso da clonagem é em torno de 3% independentemente do tipo de célula utilizado como doadora ou do estágio de desenvolvimento desta célula – embrionária ou senil (YANAGIMACHI, 2002). Por outro lado, células receptoras podem ter uma maior habilidade de reprogramar seu genoma. Em bovinos, o uso de zigotos ao invés de oócitos elevou a eficiência da clonagem (OBACK, 2009).

2.2. ANORMALIDADES PLACENTÁRIAS EM GESTAÇÕES DE CLONES POR SCNT

A placentação em ruminantes apresenta algumas particularidades em relação a outras espécies. Classificada como cotiledonária sinepiteliocorial, apresenta inúmeros placentomas constituídos por carúncula (parte materna) e cotilédone (parte fetal), ao invés de uma única área grande de contato materno-fetal (ARNOLD et al., 2008; PETER, 2013). Os placentomas fornecem o aumento da superfície necessária para as trocas de substâncias entre mãe e feto. Um grande número de células binucleadas oriundas do trofoblasto deixa de seguir a citocinese após a divisão celular. Então elas invadem e fundem-se com células epiteliais carunculares para formar um pequeno sincício e secretar proteínas da gestação. As células do trofoectoderma estão relacionadas com as modificações do epitélio uterino, desde a implantação até o termo. As células uninucleadas produzem interferon-tau que mantém o embrião no início da gestação, e tem função no reconhecimento materno. As células binucleadas produzem lactogênio placentário, estrógeno, progesterona e prostaglandinas. O estrógeno parece ter um efeito positivo no processo de maturação da placenta, auxiliando no controle do crescimento, diferenciação e função caruncular (PETER, 2013).

O desenvolvimento placentário, seu crescimento, vascularização e diferenciação ocorrem em grande velocidade no início da gestação. Fatores como nutrição, stress (principalmente hipotermia) e infecções afetam o desenvolvimento da placenta. A restrição ou o excesso de nutrientes podem suprimir a proliferação celular e a vascularização placentárias (PETER, 2013). A expressão de fatores angiogênicos e seus receptores também são afetados pela má nutrição. Para que o desenvolvimento fetal seja adequado, é fundamental que haja um desenvolvimento placentário correspondente, desde a implantação até seu crescimento e vascularização. Qualquer problema neste processo pode comprometer o crescimento fetal (PETER, 2013). Placentas de animais originados a partir de técnicas reprodutivas não assistidas costumam ser normais funcional e estruturalmente. Embriões originados a partir de técnicas assistidas tais como fertilização *in vitro* e transferência nuclear de células somáticas, costumam

apresentar problemas de placentação que, aparentemente, estão relacionados com a reprogramação genética (CHAVATTE-PALMER et al., 2012; PETER, 2013). Acredita-se que o desenvolvimento deficiente da placenta possa ser um fator importante para o desenvolvimento dos distúrbios observados nos neonatos oriundos da clonagem por SCNT.

A transferência nuclear de células somáticas é uma técnica reprodutiva que, embora tenha sido aprimorada significativamente nos últimos anos, apresenta baixa eficiência. Cerca de 50 a 100% dos embriões clonados por SCNT morrem entre 30 e 60 dias de gestação, antes ou logo depois da implantação, levando à absorção pelo útero ou eliminação do embrião. Há evidências de hipoplasia e redução do desenvolvimento cotiledonário e consequente desenvolvimento de uma placenta afuncional. Dentre as anomalias placentárias observadas, podem-se citar placentomegalia, vascularização deficiente do saco alantoide, números e tamanhos alterados dos placentomas (YOUNG et al., 1998; HILL et al., 2000; EDWARDS et al., 2003; SMITH et al., 2012). O desenvolvimento do alantoide e de sua vascularização é essencial para a formação e função da placenta (HILL et al., 2000).

Alguns bezerros nascidos por meio dessa técnica também apresentam anomalias descritas na síndrome do bezerro grande, primeiramente descrita por Cibelli et al. (1998). Essa síndrome parece ser causada mais pela manipulação dos oócitos *in vitro* do que pelo processo de clonagem (YOUNG et al., 1998). Outras pesquisas descrevem o desenvolvimento de fetos clonados e suas placentas com uma ampla gama de problemas sutis ou graves de desenvolvimento (WILSON et al., 1995; KRUIP & DEN HAAS, 1997; FARIN et al., 2001). Portanto, mesmo animais clonados com peso considerado normal, podem exibir diversas modalidades de anomalias. O termo “síndrome do bezerro anormal”, sugerido por Farin et al. (2006) seria a nomenclatura mais adequada para o quadro.

As principais alterações macro e microscópicas de placentas de animais clonados por SCNT e alguns mecanismos moleculares já foram descritos. Aparentemente, pouco pode ser feito de forma a evitar que essas alterações ocorram. As pesquisas têm direcionado seus focos em descobrir as raízes do desenvolvimento da placenta em bovinos clonados (ARNOLD et al., 2008).

Durante o início do desenvolvimento placentário, embriões derivados da clonagem pr SCNT podem apresentar tanto uma deficiência na formação dos cotilédones, quanto um crescimento e vascularização exacerbados. Muitas interações entre carúncula e cotilédone não formam placentomas, o que resulta num número reduzido destas estruturas. Essa redução de até 80% no número de placentomas pode acarretar em perda gestacional por volta do dia 90 de gestação (LEE et al., 2004). A observação da forma e arranjo dos placentomas sugere que os cotilédones tenham sido formados a partir da junção de vários outros cotilédones pequenos. Histologicamente, a morfologia dos placentomas de bezerros clonados por SCNT é similar ao de bezerros normais, embora haja indícios de um desenvolvimento anormal. Também foi notada a presença de cotilédones muito pequenos, com menos de 1cm de diâmetro, nas membranas fetais. Histologicamente, embora pequenos, esses cotilédones são funcionais (MIGLINO et al., 2007; CHAVATTE-PALMER et al., 2012).

A partir do dia 90 de gestação, as perdas esporádicas giram em torno de 25 a 75%. Independente do número de placentomas, o peso da placenta tende a aumentar. Entre os dias 150 e 200 pode se estabelecer o hidroalantoide, que corresponde a 50% das causas de morte neste período, e edema das membranas fetais (CHAVATTE-PALMER, 2002; LEE et al., 2004; CHAVATTE-PALMER, 2004).

O diâmetro do cordão umbilical em bezerros clonados por SCNT é maior do que em animais gerados por inseminação artificial. Histologicamente há ausência das dobras no lúmen arterial e venoso, com edema nas paredes vasculares externas e engrossamento da camada muscular dos vasos. Isso implica em hemorragia umbilical ao nascimento e predisposição a infecções, embora não esteja diretamente relacionado às perdas durante a gestação (MIGLINO et al., 2007; BATCHELDER et al., 2007a; SMITH et al., 2012).

As anormalidades placentárias têm sido também associadas a outras lesões fetais como ascite, aumento do coração, esteatose hepática, e lesões renais como hidronefrose, que podem afetar a viabilidade fetal, seu desenvolvimento e sobrevivência após o nascimento (MIGLINO et al., 2007). Os mecanismos destas alterações ainda não foram completamente elucidados, porém foi proposto que seja

devido à expressão alterada de genes impressos importantes na regulação do crescimento e desenvolvimento fetal (BERTOLINI et al., 2002; FARIN et al., 2004).

2.3. ENFERMIDADES EM BEZERROS CLONADOS POR SCNT

Embora seja possível a obtenção de animais hígidos e férteis originados pela clonagem por SCNT, ainda existe uma alta incidência de perdas embrionárias no início da gestação e nos períodos final da gestação e perinatal (WILMUT et al., 1997; CIBELLI et al., 1998; KATO et al., 1998). Em bovinos e ovinos, as perdas iniciais da gestação estão associadas à má formação placentária, principalmente no que se refere à sua vascularização (HILL et al., 2000; DE SOUSA et al., 2001). A gestação em clones costuma ser mais longa e os animais recém-nascidos podem apresentar dificuldade respiratória e vários tipos de anomalias que prejudicam sua sobrevivência (WILSON et al., 1995; KRUIP & DEN HAAS, 1997; HILL et al., 1999).

A síndrome do bezerro grande ou “large offspring syndrome” é uma causa importante de morte no período perinatal de bezerros originados de embriões manipulados em cultivos, como na fertilização *in vitro* e na clonagem por SCNT (YOUNG et al., 1998; CIBELLLI et al., 1998; FARIN et al., 2006; SMITH et al., 2012). Essa síndrome é caracterizada por bezerros de tamanho exagerado, desenvolvimento anormal da placenta (hidroalantoide, placentomas edemaciados e em menor quantidade) e crescimento irregular dos órgãos incluindo coração, cérebro, medula espinhal, músculos esqueléticos (FARIN & FARIN, 1995; WALKER et al., 1996; KRUIP & DEN HAAS, 1997; HILL et al., 1999). Há uma maior incidência desta síndrome em bezerros clonados a partir de células somáticas, quando comparado àqueles originados de células embrionárias, mesmo quanto os embriões são cultivados nas mesmas condições. Isso indica que há um efeito da reprogramação nuclear sobre esta síndrome (CHAVATTE-PALMER et al., 2004).

Uma pesquisa comparando bezerros gerados por SCNT e bezerros oriundos de inseminação artificial observou ascite abdominal e edema em fetos clonados abortados. Nestes animais, as placentas apresentavam cotilédones

grandes e edematosos, em quantidade reduzida. Um dos rins de um feto (n=12) era exageradamente grande e, num natimorto, os dois rins estavam autolisados. Apenas um animal apresentava fígado gorduroso e vários fetos apresentavam quantidade maior de gordura abdominal (CHAVATTE-PALMER et al., 2002). O peso corpóreo dos bezerros clonados era maior do que nos bezerros do grupo controle (oriundos de inseminação artificial e fertilização *in vitro*). A temperatura retal em clones também foi mais elevada do que nos bezerros controle. Picos de 41ºC na temperatura retal em clones foram observados sem qualquer sinal clínico ou relação com temperatura ambiente. Os parâmetros hematológicos neste trabalho foram avaliados em 21 clones e oito controles. Hematócrito, contagem de hemácias, concentração de hemoglobina, contagem total e diferencial de leucócitos, bioquímica clínica (ureia, creatinina, AST e ALT) estavam dentro dos valores considerados normais, exceto por um animal que, devido à aplasia linfoide (RENARD et al., 1999), apresentou valores baixos na contagem total de leucócitos e na contagem de hemácias. Entretanto, o volume celular médio (VCM) foi significativamente maior em clones. Esses valores tendem a decrescer no decorrer da gestação, porém as idades gestacionais eram as mesmas para clones e controle. A relação neutrófilo:linfócito, que reflete a maturação da adrenal, estava significativamente elevada em clones. A concentração basal de cortisol estava diminuída em clones, assim como nos bezerros controle, todos nascidos de cesariana. Aparentemente, esta diminuição está mais relacionada com a cesariana do que com a clonagem em si.

Outro trabalho estudou as características clínicas e patológicas de 13 bezerros da raça Holandesa clonados por transferência nuclear. Dos 13 bezerros, dois morreram após o nascimento, cinco morreram no útero e seis sobreviveram. Apenas dois bezerros nasceram de parto natural e seis nasceram por cesariana, pesando entre 44 a 58,6Kg. Dos oito bezerros, os dois que apresentaram hidroalantoide, espessamento dos vasos umbilicais, edema do alantoide, hidroâmnio, edema do âmnio, morreram quatro dias e seis semanas após o nascimento. As anormalidades das placentas observadas em alguns bezerros coincidiram com as anormalidades cardiopulmonares, inclusive a hipertensão pulmonar congênita grave. Após a morte do primeiro bezerro apresentando sinais de imaturidade pulmonar, o grupo resolveu tratar todos os outros bezerros com

oxigênio, além dos outros tratamentos específicos para as enfermidades apresentadas. Outras alterações apresentadas por este bezerro foram degeneração hepática, dilatação do ventrículo direito. O segundo bezerro morreu devido à pneumonia. Natimortos e fetos abortados apresentaram sinais de doença cardiovascular (congestão hepática passiva crônica, aumento do ventrículo direito) e anormalidades placentárias. Dos cinco fetos, dois apresentavam edema de placenta e veias umbilicais com o dobro do diâmetro esperado para a idade dos fetos (HILL et al., 1999).

Onze bezerros nelores clonados e necropsiados no Laboratório de Patologia Animal da Universidade de São Paulo – USP apresentaram outras alterações tais como aumento das dimensões das articulações metacarpofalangeanas e metatarsofalangeanas, efusão abundante de fibrina na cavidade torácica, conteúdo pulmonar corado com mecônio proveniente de aspiração, enfisema pulmonar difuso, atelectasia pulmonar difusa, edema pulmonar, hemorragia e congestão pulmonar. Coração e grandes vasos também apresentaram malformações: cistos hemáticos, persistência do forame oval, persistência do ducto arterial, dilatação do ventrículo direito, justaposição de músculos papilares, hipertrofia excêntrica do miocárdio ventricular e sufusões. No sistema digestório havia sufusões e víbices distribuídos pelas mucosas ruminal e abomasal, congestão hepática, coloração amarelada do parênquima e bordos irregulares. Havia poucas lesões renais sendo estas caracterizadas por cálices dilatados. A hipoplasia de timo foi observada em 84,6% dos animais necropsiados (SANTOS et al., 2010).

Tem sido descrito que bezerros clonados apresentam parâmetros hematológicos, bioquímicos, gases sanguíneos e eletrólitos semelhantes aos bezerros controle no período pós-parto imediato. A diferença mais notável foi a redução da contagem de hemácias e leucócitos totais até uma hora após o nascimento. No perfil eletrolítico, houve elevação das concentrações de sódio e cloreto e redução das concentrações de potássio e bicarbonato quando comparados aos controles. No perfil bioquímico, observou-se hipoglicemia e hiperfrutosemia nos bezerros clonados. Embriões clonados por SCNT cujas placentas apresentavam placentomas grandes e em pequena quantidade apresentavam concentrações reduzidas de glicose nos líquidos fetais. Dessa forma, os fetos podiam apresentar privação de nutrientes. Considerando que a placenta é a fonte de frutose para o

recém-nascido, a elevação de sua produção pela placenta pode ser um fator importante na etiologia das alterações cardíacas e umbilicais. Segundo os autores, essas diferenças são resultado da maior dificuldade dos clones em se adaptar à vida extrauterina. Também é necessário determinar qual a relação destas alterações com a morfologia anormal da placenta nesses animais (BATCHELDER et al., 2007a; BATCHELDER et al., 2007b).

As perdas observadas na técnica de clonagem por SCNT ainda são um fator limitante e representam uma parcela importante dos investimentos econômicos e uma preocupação justificável com questões relacionadas ao bem estar animal. Ainda há questões relacionadas aos mecanismos e causas de alterações que precisam ser elucidadas e inteiramente compreendidas para que se elaborem alternativas preventivas e terapêuticas para reduzir estas perdas.

3. OBJETIVOS

1) Descrever os parâmetros clínicos e laboratoriais de bezerros neonatos clonados por SCNT, relatando as principais alterações presentes.
2) Estabelecer um grupo de bezerros controle sujeitos ao mesmo tratamento dos clones para eliminar a possível interferência do tratamento.
3) Comparar as alterações laboratoriais com o quadro clínico dos bezerros clonados por SCNT utilizando, como referência, os valores obtidos com os bezerros gerados por inseminação artificial ou monta natural.
4) Determinar, por meio de comparação entre os bezerros clonados que sobreviveram ao período perinatal e os que não sobreviveram a este período, quais as alterações que revelam sinais de deterioração do estado de saúde geral dos clones e que coincidem com a morte do bezerro.

4. HIPÓTESE

A análise das alterações de alguns parâmetros hematológicos, bioquímicos e de hemogasometria podem predizer a evolução do quadro clínico de bezerros neonatos clonados por SCNT, indicando a sobrevivência ou não do bezerro.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. LOCAL

O experimento foi realizado nas instalações da Fazenda Experimental da Universidade Norte do Paraná – UNOPAR, no município de Tamarana, Paraná, localizado a uma altitude de 753m, tendo como coordenadas geográficas, 23º43’24’’ de latitude Sul e 51º05’50’’ de longitude Oeste, no período de junho de 2010 a novembro de 2011.

5.2. ANIMAIS UTILIZADOS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

As receptoras dos clones e dos controles eram vacas da raça Girolanda, criadas a pasto, com suplementação de mistura mineral (Sal Mineral Fosbovi Reprodução ®Tortuga), vacinadas contra brucelose aos oito meses, febre aftosa, clostridioses, IBR, BVD e leptospirose, segundo protocolo pré-estabelecido pela fazenda experimental. Foram vermifugadas com ivermectina de longa ação no período da campanha de vacinação contra febre aftosa, em maio e novembro.

A monta natural foi feita em três dos controles. Para os demais controles e clones, foi realizado o seguinte protocolo de sincronização: no dia zero (D0) foram colocados implantes intravaginais de progesterona e administrados 2mL de benzoato de estradiol. No dia 8 (D8) os implantes foram retirados e foram administrados 2mL de prostaglandina, 1mL de cipionato de estradiol e 1,5mL de gonadotrofina coriônica equina. No dia 10 (D10) foram realizadas as inseminações artificiais em tempo fixo (IATF) nas vacas sincronizadas para a obtenção dos controles (quatro animais). No dia 17 (D17) foram feitas as transferências de embriões em tempo fixo nas receptoras dos clones.

Para estudar as diferenças entre os parâmetros hematológicos, bioquímicos e de hemogasometria de bezerros clonados por SCNT e de bezerros

gerados por inseminação artificial ou monta natural, dois grupos foram formados: (1) Grupo Controle formado por sete bezerros neonatos machos da raça Girolanda gerados por inseminação artificial ou monta natural; (2) Grupo Clone formado por bezerros neonatos machos (nove animais oriundos da clonagem de um touro) e bezerros neonatos fêmeas (três animais oriundos da clonagem de uma vaca), todos da raça Girolanda, gerados a partir de embriões clonados pela técnica de SCNT.

5.3. PRODUÇÃO DE EMBRIÕES CLONADOS POR SCNT

Colheita de oócitos. Os ovários de fêmeas bovinas foram coletados num abatedouro na cidade de Londrina, PR, logo após o abate e transportados em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) com 50 mg/ml de gentamicina (Sigma, G1397) a 30° C. Foram lavados em NaCl 0,9% e aspirados com auxílio de uma agulha (1,20 X 40 mm). O líquido folicular com os oócitos foi depositado em tubos cônicos de 50 mL e mantido em repouso para decantação por 5 minutos. O pellet foi adicionado a 5 ml de meio H199 [Meio 199 com 25 mM de hepes (Sigma, M7528) acrescido de 50 mg/ml de gentamicina e 5% de soro fetal bovino]. *Cultivo de maturação in vitro*. Após a classificação, os oócitos foram transferidos para o meio de maturação Meio 199 (Sigma, M4530) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 5,0 µg/mL de LH (hormônio luteinizante), 0,5 µg/mL de FSH (hormônio folículo estimulante), 0,2 mM de piruvato e 50 mg/mL de gentamicina. Os oócitos foram cultivados *in vitro* durante 18 horas, em gotas de 100 µl de meio de maturação sob óleo mineral, a 38,5º C e atmosfera de 5% de CO_2. Cada gota continha aproximadamente 20 oócitos (ADONA et al., 2011). *Cultivo das células doadoras de núcleo*. Uma amostra de tecido (pele) com aproximadamente 3 mm^2 foi coletada dos animais que seriam clonados. A amostra foi transportada a 4ºC em PBS com 50 µg/mL de gentamicina. A amostra foi dividida em pequenos fragmentos que foram depositados no fundo de placas de *Petri* (35 mm) com 500 µL de meio de cultivo celular (DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino, 0,4 µM de piruvato, 50 µg/mL de glutamina e 50 µg/mL de gentamicina). Após a agregação das células (fibroblastos) no fundo da placa, as amostras de tecidos foram removidas e o meio substituído por DMEM suplementado

com 10% de soro fetal bovino até atingirem a confluência (ADONA et al., 2011). *Congelação das células*. Após as células atingirem a confluência elas foram desagregadas das placas com tripsina 0,25% em DMEM. A inativação da tripsina foi com DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 0,4 µM de piruvato, 50 µg/mL de glutamina e 50 µg/mL de gentamicina durante a centrifugação da amostra a 200 ‘g’ por 10 minutos. Cinco dias antes dos procedimentos de transferência de núcleo, um criotubo foi descongelado a 37ºC e adicionado em um tubo com 10 ml de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 0,4 µM de piruvato, 50 µg/mL de glutamina e 50 µg/mL de gentamicina e centrifugado a 200 ‘g’ por 10 minutos. No precipitado de células foi adicionado 1 mL do meio DMEM suplementado e utilizado para transferência de núcleo (ADONA et al., 2011).

Transferência de núcleos. Após 18 horas de maturação *in vitro* os oócitos foram transferidos para o meio B199 com 0,2% de hialuronidase e submetidos à agitação mecânica com auxílio de micropipetador para remoção das células do cumulos. Os oócitos com o 1°corpúsculo polar foram incubados em estufa de CO_2 por 15 minutos em meio SOF (synthetic oviductal fluid) suplementado com 7,5 µg/mL de citocalasina B e com 5 µg/mL de Hoescht 33342. Com o auxílio de micropipetas montadas em um micromanipulador, os oócitos foram enucleados (após 20 horas do início da maturação) um a um pela aspiração do 1° corpúsculo polar e da placa metafásica com aproximadamente 10% do citoplasma adjacente. Os fibroblastos presentes na gota de micromanipulação foram aspirados um a um para o interior da micropipeta de injeção e inseridos (um fibroblasto por oócito) no espaço perivitelínico do oócito. Para reconstrução, foram mantidos durante 3 minutos em solução de manitol (0,3 M), transferidos para a câmara de fusão com manitol, posicionados entre dois eletrodos paralelos de platina (200 µm de distância) e submetidos a uma descarga elétrica de 1KV/cm de corrente contínua durante 5 segundos, seguida de duas descargas elétricas de 1,75KV/cm por 65 µs para promover a fusão das membranas do oócito e do fibroblasto. Os oócitos foram incubados em meio SOF e avaliados quanto à fusão uma hora após o início da fusão os que fundiram foram submetidos à ativação partenogenética após 26 horas do início da maturação. No 2º dia de cultivo foi avaliada a taxa de clivagem e no 7º foi avaliada a produção de embriões (ADONA, 2011).

Transferência de embriões e acompanhamento das gestações. No sétimo dia de cultivo *in vitro*, os embriões que atingiram o estádio de blastocisto foram transferidos para receptoras previamente sincronizadas para o estabelecimento de gestações. As receptoras foram submetidas ao exame ultrassonográfico transretal no 30º e no 60º dia de gestação (Aloka SSD- 500V). As fêmeas com diagnóstico de prenhez positivo após o 60º dia foram separadas das demais para o acompanhamento do desenvolvimento da gestação.

5.4. INDUÇÃO DO PARTO, CESARIANAS E CUIDADOS NEONATAIS

Indução do parto e cesarianas. As receptoras foram observadas diariamente para a detecção do início do trabalho de parto. A indução do parto foi realizada por volta de 280 dias de gestação, tempo médio para a raça (BALL e PETERS, 2006), em todos os bezerros do Grupo Clone e do Grupo Controle. O protocolo para a indução do parto está citado na Tabela 1. Todos os bezerros nasceram por meio de secção cesariana paralombar esquerda após o protocolo de indução do parto (NEWMAN, 2008).

Cuidados neonatais. Durante a cesariana, os conceptos foram mantidos em nível abaixo da linha de incisão durante 30 a 40 segundos, tempo de realização da coleta de sangue do cordão umbilical e remoção de conteúdo nasal e oral por meio de mangueira de silicone acoplada a um sugador cirúrgico. Subsequentemente foi realizada a obliteração temporária dos vasos umbilicais com “clamp” umbilical estéril. Após o nascimento, uma equipe promovia os cuidados com as receptoras, enquanto os bezerros recebiam atendimento neonatal emergencial em mesa apropriada. Inicialmente os bezerros receberam banho com água fria, seguido de banho de água morna e secagem vigorosa, massageando principalmente a região torácica. Também era feita a lavagem com detergente e água morna para remover traços de mecônio na pele.

É importante ressaltar que todo o protocolo de tratamento realizado nos bezerros clonados foi repetido nos controles, de forma que se pudesse comparar os clones com animais na mesma situação, sob as mesmas interferências

de estresse pela manipulação e sob os mesmos efeitos das medicações administradas.

Tabela 1 – Medicamentos utilizados na indução do parto de receptoras da raça Girolando, na Fazenda Experimental UNOPAR, no período de setembro/2010 a setembro/2011 – São Paulo, 2016.

Medicamento	Dose e via de administração	Momento da administração
Acetonido de triancinolona (20mg/mL)	8mg via intramuscular	72 horas antes da data prevista para o parto
Dexametasona (2mg/mL)	25mg via intramuscular	48 horas antes da data prevista para o parto
Cloridrato de isoxsuprine (5mg/mL)	50mg via intravenosa	No início da intervenção cirúrgica

Fonte: (BIRGEL JUNIOR et al., 2011)

A presença de tingimento por mecônio, peso ao nascer, avaliação de APGAR (BIRGEL JUNIOR et al., 2011), presença do reflexo de sucção, intervalo de tempo entre o nascimento e a tentativa de permanecer em estação foram registrados em quase todos os nascimentos. No exame físico foi realizada a avaliação das funções vitais: frequência cardíaca, frequência respiratória, auscultação pulmonar e cardíaca, aferição da temperatura retal, avaliação da coloração das mucosas.

Após a estabilização do animal, foram feitas avaliações mais específicas do sistema circulatório e respiratório por meios semiológicos como inspeção, palpação, e auscultação conforme proposto por Dirksen et al. (1993). Em seguida foi realizada a inspeção e avaliação do umbigo. Colostro obtido a partir do banco de colostro da propriedade foi fornecido logo após o nascimento por mamadeira, se houvesse reflexo de sucção. Se o bezerro não apresentasse o reflexo, o colostro era administrado por sonda nasoesofágica. Após esse período, leite era dado na mamadeira em quantidade e horários determinados para cada bezerro.

Todos os bezerros, clones ou controles, receberam um protocolo de tratamento pré-estabelecido que consistia em oxigenioterapia (5 a 10L/min), massagem cardíaca, fluidos intravenosos e medicamentos para a função cardíaca que eram administrados após o parto de forma contínua, ou caso houvesse necessidade, conforme observado na Tabela 2 (BIRGEL JUNIOR et al., 2011). Este

tratamento foi mantido até a estabilização dos bezerros indicada por meio de exames físicos e exames laboratoriais complementares.

Tabela 2 – Medicamentos fornecidos aos bezerros do Grupo Clone e Grupo Controle imediatamente após o nascimento.

Medicamento	Dose	Via	Frequência
Medicamentos fornecidos a todos os bezerros recém-nascidos			
Surfactante pulmonar suíno (Butantã, USP)	30 a 60mg/Kg	Intratraqueal	5 administrações nas primeiras 2 horas de vida
Dexametasona (2mg/mL)	0,1mg/Kg	Intravenosa	6 em 6 horas
Citrato de sildenafila (5mg)	0,6mg/Kg	Via oral	6 em 6 horas
Bromexina (3mg/mL)	0,15 mg a 0,30 mg de bromexina/Kg d	Intravenosa	A cada 24 horas
Aminofilina (24mg/mL)	5,5mg/Kg	Intravenosa lenta	A cada 24 horas
Complexo vitamínico A, D, E injetável	0,1mL/Kg 27.000U vit. A/Kg 5.000U vit. D/Kg 5,5U vit. E/Kg	Intramuscular	A cada 24 horas
ESSE	1mL	Via oral	A cada 12 horas
Hemolitan	10mL	Via oral	A cada 24 horas
Ceftiofur (0,05mg/mL)	1mg/Kg	Via intramuscular	1 vez ao dia – 3 dias
Oxigênio	5 a 10L/min	Intranasal	Infusão contínua
Medicamentos e suplementos fornecidos segundo a necessidade do bezerro			
Sulfato de atropina 1%	1,2mg/Kg	Intravenosa	De acordo com a necessidade
Cloridrato de doxapram (0,02mg/mL)	1mL	Intravenosa	De acordo com a necessidade

O surfactante pulmonar não foi administrado a todos os bezerros. Esse medicamento tinha a função de diminuir a tensão superficial alveolar e manter a expansão alveolar. Era administrado mesmo antes de se diagnosticar alterações pulmonares. A oxigenioterapia foi fornecida para todos os bezerros, tanto do Grupo Controle quanto do Grupo Clones visando minimizar os efeitos de uma possível

hipertensão pulmonar congênita e com o objetivo de iniciar o fechamento do ducto arterioso e evitar vasoconstrição dos vasos pulmonares causada pela hipóxia (HILL et al., 1999). Optou-se pela oxigenioterapia por um período prolongado (acima de sete dias, dependendo das condições de cada bezerro), visto que alguns estudos suspeitaram que períodos mais curtos (3 dias) seriam insuficientes para a correção dos parâmetros hematológicos e gasométricos (BRISVILLE et al., 2011). Todas as amostras de sangue foram coletadas com os clones e controles sob oxigenioterapia.

5.5. MÉTODOS DE COLETA DE SANGUE

Amostras de sangue venoso foram coletadas de todos os animais (dos grupos clones e controles) por punção da veia jugular externa e armazenadas em três frascos estéreis: um com o anticoagulante EDTA de potássio (BD Preanalytical Systems, Brasil) utilizado para a confecção do hemograma, um com fluoreto de sódio (BD Preanalytical Systems, Brasil) para a determinação de glicose e outro sem aditivo (BD Preanalytical Systems, Brasil) para as análises bioquímicas. Amostras de sangue venoso e arterial direcionadas para a hemogasometria foram coletadas com seringa estéril contendo heparina lítica (BD Preanalytical Systems, Brasil). As análises foram realizadas imediatamente no Laboratório de Patologia Clínica da UNOPAR. As amostras de sangue venoso para a hemogasometria foram coletadas a partir da punção da veia jugular, enquanto as amostras de sangue arterial foram coletadas a partir da punção da artéria femoral. As amostras foram coletadas nos seguintes tempos: 30 minutos ($H_{0,5}$), uma hora (H_1), 12 horas (H_{12}), 24 horas (H_{24}), 36 horas (H_{36}), 48 horas (H_{48}), 72 horas (H_{72}), 96 horas (H_{96}) e 120 horas (H_{120}) após o nascimento. Os exames físicos foram realizados de acordo com Dirksen (1993) nos mesmos tempos de coleta das amostras de sangue. Embora amostras tivessem sido coletadas nos tempos acima, as interpretações ficaram restritas aos tempos entre 0 e uma hora (H1), 12 horas (H12), 24 horas (H24) e 48 horas (H48) por serem os momentos em que se obteve um número mais consistente de coletas e, consequentemente, de parâmetros avaliados.

5.6. ANÁLISES CLÍNICAS

Os hemogramas completos foram realizados em analisador automático (PocH-100i Vet, Roche, Alemanha). Proteína plasmática total foi mensurada em refratômetro portátil de bancada (Instrutherm, Brasil). A contagem diferencial de leucócitos e a observação da morfologia celular foram realizadas em microscopia óptica (E-100, Nikon, Japão) a partir de lâminas coradas com Panótico Rápido (LB, Brasil). As análises bioquímicas foram realizadas em equipamento automatizado (Reflotron, Roche, Alemanha) e foram avaliados: ureia, creatinina, gamaglutamiltransferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST), bilirrubina total, glicose, ácido lático, fosfatase alcalina (FA). A determinação do lactato sanguíneo foi feita por fotometria de reflexão (Accutrend® - Roche, Alemanha). A hemogasometria foi realizada no aparelho Cobas b121 (Roche, Alemanha) que mensurou os pH, pressão parcial de oxigênio (pO_2), pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2), sódio (Na^+), potássio (K^+), cloretos (Cl^-), cálcio (Ca^{2+}), bicarbonato (HCO_3^-), excesso de base (BE), saturação de oxigênio (SO_2) e intervalo aniônico (AG). Todos os resultados serão comparados com os animais do grupo controle e com os relatórios médicos, evocando os exames físicos realizados na rotina hospitalar dos animais.

5.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados de forma descritiva por animal devido aos tratamentos serem realizados individualmente não observando os mesmos momentos cronológicos, mas os momentos relacionados às necessidades clínicas. Os resultados dos exames dos bezerros clonados foram comparados utilizando, como valor de referência, as médias aritméticas dos resultados do Grupo Controle em relação a cada tempo de coleta. Estes dados foram analisados por ANOVA para efeito de tempo e pelo teste T-student para comparações entre médias. Resultados do Grupo Controle são apresentados como média ± desvio padrão. Probabilidade de $P \leq 0,05$ indica diferença significativa.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Relatórios médicos e laudos de exames laboratoriais foram analisados, sendo sete bezerros da raça Girolanda oriundos de inseminação artificial e monta natural (Grupo Controle) e 12 bezerros clonados por SCNT (Grupo Clones) foram analisados, todos nascidos vivos. Dentre os bezerros clonados, quatro vieram a óbito nos períodos de uma hora, três horas, 36 horas, 72 horas após o nascimento. Dados de duas necropsias foram descritos e duas necropsias não foram realizadas.

Considerando que os animais clonados possuíam enfermidades diversas, optou-se por discutir as alterações apresentadas por cada clone, desde o nascimento até o momento do óbito, caso este fosse o desfecho. Dessa forma, foi possível identificar as alterações mais marcantes que, provavelmente, se relacionam com a enfermidade que determinou a morte do animal. Portanto, serão mostrados, a princípio os dados de cada bezerro clonado neonato, detalhando sua história clínica para, em seguida, comparar esses dados com os dos animais controle. Para fins de identificação dos animais, os animais serão nominados conforme a tabela 3.

Tabela 3 – Denominação dos bezerros do Grupo Controle e Grupo Clone.

Grupo Controle (grupo 1) (n=7)	Grupo Clone (grupo 2) (n=12)	
11	21	211
12	22	212
13	23	213
14	24	
15	25	
16	26	
17	27	
	28	
	29	

6.1. ANÁLISE DOS PARÂMETROS CLÍNICOS, HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E HEMOGASOMÉTRICOS DO GRUPO CONTROLE

Os resultados das análises hematológicas, bioquímicas e hemogasométricas dos bezerros do Grupo Controle se encontram descritos abaixo. Os bezerros do Grupo Controle nasceram na mesma época e foram manipulados e tratados da mesma forma que os do Grupo Clone. Todas as amostras de material biológico, assim como no Grupo Clone, foram coletadas com os animais em oxigenioterapia. Assim, foram avaliados animais nas mesmas condições para que se pudessem excluir as interferências do tratamento. A análise do hemograma (tabela 4) revela que não houve variações significativas na contagem de hemácias e na concentração de hemoglobina nas idades avaliadas. Alguns autores relataram diminuição da concentração de hemoglobina e hematócrito a partir do nascimento (FAGLIARI et al., 1998). Nossos valores de volume celular médio (VCM) estão menores do que o da literatura utilizada como referência (FAGLIARI et al., 1998).

Tabela 4 – Médias e desvios padrões dos parâmetros hematológicos do Grupo Controle (n=7).

Variável	Momento ($\bar{X}$ ± sd)			
	H1	H12	H24	H48
Hemácias (x10^6/mm^3)	8,1±0,7	7,7±1,2	7,6±0,9	7,5±1,2
Hematócrito (%)	34,6±4,5	33,3±5,8	32,1±4,5	30,7±5,5
Hemoglobina (g/dL)	10,6±1,5	10,2±1,9	10,1±1,4	9,8±1 ,8
VCM (fL)	43,4±2,8	41,8±5,5	41,7±4,3	40,2±4,9
CHCM (%)	30,4±1,1	30,7±1,3	32,8±4,1	31,8±1,1
Plaquetas (x10^3/mm^3)	620,5±38,2	595,2±59,1	538,3±118,3	553,4±136,4
Leucócitos (/mm^3)	8708±3072	9.400±3241	10043±4.955	9000±4750
Bastonetes (/mm^3)	0,0	156,9±225	143,6±299	58,4±130
Segmentados (/mm^3)	6374±2031	6572±3502	8391±5105	7470±4504
Linfócitos (/mm^3)	2165±1121	1892±1025	1084±537	917±541
Eosinófilos (/mm^3)	0,0	0,0	43±80	27±59
Monócitos (/mm^3)	246±279	123±146	15±37	41±60
Basófilos (/mm^3)	0,0	0,0	0,0	0,0
PPT (g/dL)	4,7±0,2	4,8±0,7	5,5±1,1	5,8±0,9

Médias para todos os parâmetros não diferiram estatisticamente (P>0,05)

As contagens de leucócitos (tabela 4) apresentaram um aumento leve e gradual até as 24 horas de vida, voltando a diminuir ao segundo dia de vida. Tais valores estão um pouco abaixo da média citada por Fagliari et al. (1998). Na contagem diferencial os valores da contagem de neutrófilos segmentados foram maiores do que a de linfócitos em todos os tempos analisados e também foi maior do que a referência citada (FAGLIARI et al., 1998). No entanto, os bezerros do grupo controle passaram pelo mesmo tratamento fornecido aos clones, o que incluía a administração de glicocorticoides que podem interferir nestes valores.

Ao analisar os parâmetros bioquímicos de bezerros neonatos (tabela 5), nota-se que há diferenças significativas de acordo com a idade. A concentração de ureia não variou com o tempo, mas a de creatinina apresentou-se elevada ao nascimento, resultado semelhante ao de Fagliari et al. (1998). A atividade da aspartato aminotransferase se elevou com a idade provavelmente devido à maior atividade muscular (KANEKO, 1997). A atividade da fosfatase alcalina, ao contrário do observado por Fagliari et al.(1998) se elevou, discretamente, do nascimento até as 12 horas de vida, porém sem significância estatística. A atividade da gama glutamiltransferase (GGT) estava baixa ao nascimento, elevando-se acentuadamente 12 horas depois e diminuindo até as 24 horas de vida. Estes resultados são semelhantes aos de Fagliari et al. (1998) e também estão de acordo com Costa et al. (2008) que culpam este aumento à absorção de GGT presente nas células da glândula mamária e, consequentemente, no colostro. Aproximadamente 24 horas após a ingestão do colostro, a atividade da GGT se eleva 10 a 50 vezes comparada com bezerros que não ingeriram o colostro. Sua elevação sérica em neonatos bovinos está mais relacionada com a absorção adequada de colostro do que com uma doença hepática (RUSSEL e ROUSSEL, 2007; COSTA et al., 2008). As médias das concentrações de bilirrubina se elevaram no avançar da idade. Isso pode ter ocorrido devido à hemólise ou à administração de fluidos e medicamentos. Fagliari et al. (1998) relataram redução da glicemia, possivelmente devido ao gasto de energia que, nos primeiros dias de vida podem superar a reserva orgânica. Tal fato não foi observado em nosso estudo. Ressaltamos, porém, que as coletas eram realizadas sem a observação do período adequado de jejum.

Tabela 5 – Médias e desvios padrões dos parâmetros bioquímicos do Grupo Controle (n=7).

Variável	Momento ($\bar{X}$ ± sd)			
	H1	H12	H24	H48
Uréia (mg/dL)	41,5±5,5	26,7±7,2	29,7±13,8	51,4±25,6
Creatinina (mg/dL)	3,9±1,8[a]	1,7±0,3[b]	1,3±0,2[b]	1,0±0,1[b]
AST (UI/L)	18,8±8,9[b]	86,6±44,7[a]	99,9±24,9[a]	122,7±69,1[a]
FA (UI/L)	426,7±99,0	681,7±433,6	500,3±238,2	582,3± 443,7
GGT (UI/L)	6,1±1,2[c]	1896,7±436,5[a]	1665±459,6[a]	577,0±602,3[b]
Bilirrubina (mg/dL)	0,5±0,1	0,8±0,2	1,3±0,2	0,9±0, 3
Glicose (mg/dL)	83,0±33,1	101,0±39,9	96,5±30,1	109, 4±25,9

Efeito principal de tempo: Creatinina: P<0,0001. AST: P<0,008. GGT: P<0,0001.
Letras diferentes nas mesmas linhas indicam diferenças entre as médias (P<0,05)

Não foi realizada a determinação da concentração de lactato sérico no Grupo Controle. Para a interpretação deste parâmetro entre os animais clonados foi utilizado como valor de referência a avaliação de Kaneko (1997) conforme consta na tabela 6.

Tabela 6 – Intervalo de referência dos parâmetros bioquímicos não mensurados no Grupo Controle.

Variável	Valor	Fonte
Lactato (mmol/L)	0,56-2,22	KANEKO (1997)

Para descartar possíveis interferências dos tratamentos sobre os parâmetros sanguíneos, todos os bezerros do Grupo Controle receberam o mesmo tratamento que os clones. Por esse motivo, foram utilizadas as médias do Grupo Controle como referência. Os valores dos parâmetros hemogasométricos para sangue venoso e sangue arterial encontram-se nas tabelas 7 e 8, respectivamente. Há poucas variações entre os tempos de coleta no que se refere ao pH e às concentrações de eletrólitos no sangue venoso. As pressões parciais de oxigênio e de dióxido de carbono, no entanto, apresentaram variações entre os tempos. Houve variação dos valores de pH no sangue arterial entre os tempos de coleta. Como o mesmo não aconteceu com o sangue venoso, conclui-se que não se pode utilizar valores de referência de sangue venoso para a interpretação de gasometria de sangue arterial. Os valores dos eletrólitos foram muito semelhantes entre os tempos

de coleta tanto para sangue venoso quanto para arterial. Shirani et al. (2011) já haviam demonstrado a utilidade do sangue venoso na avaliação dos parâmetros hemogasométricos. Havia discordância apenas na pressão parcial de oxigênio e na saturação de oxigênio. Nosso estudo também observou discordância nos valores de pH entre os resultados obtidos para sangue venoso e para sangue arterial.

Tabela 7 – Médias e desvios padrões de hemogasometria venosa do Grupo Controle (n=7).

Variável	Momento ($\bar{X}$ ± sd)			
	H1	H12	H24	H48
Ph	7,35±0,02	7,40±0,01	7,44±0,03	7,4±0,02
PO2 (mmHg)	22,9±4,2[b]	28,8±3,4[b]	44,4±8,9[a]	29,8±1,9[b]
PCO2 (mmHg)	60,0±3,6[a]	47,3±4,8[b]	47,3±3,5[b]	53,4±7,5[ab]
SO2 (%)	36,4±10,4[c]	54,7±8,3[b]	80,7±10,6[a]	57,6±5,5[b]
Na (mmol/L)	139,5±1,3	141,5±3,5	139,1±0,6	139,7±3,0
K (mmol/L)	3,7±0,7	4,2±0,3	4,2±0,4	4,5±0,4
iCa (mmol/L)	1,2±0,2	1,2±0,2	1,3±0,1	1,3±0,03
Cl (mmol/L)	97,7±2,5	100,6±2,1	98,4±0,6	99,9±3,2
cHCO3 (mmol/L)	32,3±0,6	28,8±2,7	31,1±1,1	32,1±2,9
BE (mmol/L)	5,3±0,4	3,4±2,3	6,0±1,2	6,2±2,1
AG (mmol/)	13,3±0,8	16,3±3,7	13,8±0,7	12,1±2,3

Efeito principal de tempo: PO_2: P<0,0001. PCO_2: P<0,001. SO_2:P<0,0001
Letras diferentes nas mesmas linhas indicam diferenças entre as médias (P<0,05)

Tabela 8 – Médias e desvios padrões de hemogasometria arterial do Grupo Controle (n=7).

Variável	Momento ($\bar{X}$ ± sd)			
	H1	H12	H24	H48
pH	7,34±0,04	7,43±0,04	7,57±0,03	7,54 ± 0,07
PO2 (mmHg)	44,3±20,9	66,1±22,6	106,7±84,9	69,9±21,2
PCO2 (mmHg)	56,4±4,6[a]	42,4±2,5[b]	44,1±2,6[b]	35,8±11,3[b]
SO2 (%)	75,8±10,6	89,0±2,9	92,5±3,3	87,4±0,0
Na (mmol/L)	138,6±2,4	140,9±1,4	137,8±1,0	134,5±2,4
K (mmol/L)	3,8±0,2	4,2±0,5	4,1±0,3	4,3±0,4
iCa (mmol/L)	1,3±0,1	1,2±0,1	1,3±0,1	1,2±0,02
Cl (mmol/L)	97,8±2,6	100,9±2,1	98,2±1,3	99,0±2,4
cHCO3 (mmol/L)	29,8±3,2	27,9±2,4	31,1±0,7	28,9±5,3
BE (mmol/L)	3,1±3,3[b]	3,3±2,7[b]	6,6±1,1[a]	6,6±2,6[a]
AG (mmol/)	14,8±2,6	16,3±1,2	12,7±1,6	13,1±0,6

Efeito principal de tempo: PCO_2: P<0,0001. BE: P<0,033
Letras diferentes nas mesmas linhas indicam diferenças entre as médias (P<0,05)

Os parâmetros clínicos avaliados no Grupo Clone estão citados na tabela 9. Foram avaliados a temperatura (ºC), a frequência cardíaca (bpm) a frequência respiratória (mpm) e o peso ao nascer.

Tabela 9 – Médias e desvios padrões dos parâmetros clínicos dos bezerros controle (n=7)

Variável	Momento ($\bar{X}$ ± sd)			
	H1	H12	H24	H48
Temperatura (ºC)	38,4±0,8	38,7±0,4	38,6±0,2	38,5±0,2
Frequência cardíaca (bpm)	146±23,8	136±22,2	130,1±19,5	151,4±17,8
Frequência respiratória (mpm)	65,1±12,4	68,1±23,1	74,7±34,8	63±24,1
Peso ao nascer (Kg)	27,2±0,9	-	-	-

Médias para todos os parâmetros não diferiram estatisticamente (P>0,05)

6.2. ANÁLISE TEMPORAL DA EVOLUÇÃO DOS BEZERROS CLONADOS (GRUPO CLONES)

6.2.1. Clone 21

O primeiro bezerro clonado nascido neste estudo era, assim como todos os outros bezerros, da raça Girolanda. O nascimento ocorreu no dia 15/10/2010 às 09h10min. A receptora deste animal apresentava, no momento do parto, relaxamento parcial do ligamento sacro isquiático (indicando fase inicial do trabalho de parto), edema de vulva discreto e ausência de preparo da glândula mamária. O parto foi induzido com a administração de corticoides conforme mostrado na tabela 1. A cesariana foi realizada 32 horas após a administração de dexametasona. As principais características clínicas deste bezerro observadas ao seu nascimento encontram-se no quadro 1.

O bezerro nasceu com peso superior à média do grupo controle. O fato de ter eliminado mecônio imediatamente após o parto pode indicar que havia sofrimento fetal no momento do parto. Neste bezerro também foi observado aumento do diâmetro dos vasos umbilicais, persistência do úraco e hiperextensão das articulações do boleto tanto dos membros anteriores quanto posteriores.

Quadro 1 – Principais características clínicas do clone 21 ao nascer

Parâmetro	**Avaliação**
Peso ao nascer	52Kg
APGAR imediatamente após o parto	8
APGAR aos 5 minutos de vida	8
Tingido por mecônio	Sim
Tempo até a liberação do mecônio	Imediatamente após o parto
Tentativa de permanecer em estação	3 horas
Aparecimento do reflexo de sucção	1,5 hora após o parto
Temperatura ao nascer	39ºC
Frequência cardíaca	132 bpm
Frequência respiratória	32 mpm
Coloração de mucosas	Róseas
Funções vitais	Ausência de edema e desidratação, ausência de sinais de insuficiência cardíaca. Não apresenta sopro. Reforço de 1ª bulha, mas há propagação do ruído cardíaco em campos pulmonares
Avaliação pulmonar	Respiração costoabdominal, de amplitude normal, ausência de insuficiência respiratória, fluxo nasal catarral misturado ao mecônio. Na auscultação pulmonar, presença de respiração rude e estertor úmido crepitante
Avaliação do umbigo	Comprimento do cordão: 8cm Espessura: 3 dedos Estruturas visíveis: 2 artérias Pulso arterial: positivo, intenso Ausência de hematoma no entorno da artéria umbilical Persistência do úraco
Outras observações	Hiperextensão das articulações do boleto (anterior e posterior)

Após os primeiros cuidados com o bezerro neonato, tais como banho com água quente e secagem com secador e toalhas, cateterização de um acesso venoso e administração de medicamentos e inserção do cateter nasal para oxigenioterapia (tabela 2), foram realizadas as coletas de sangue para os exames laboratoriais: hemograma (tabela 10), bioquímica sérica (tabela 11), hemogasometria

venosa (tabela 12), hemogasometria arterial (tabela 13) e parâmetros vitais (tabela 14).

Aproximadamente sete horas após o nascimento foram realizadas as avaliações semiológicas dos sistemas cardíaco e respiratório, assim como da cicatriz umbilical. Pela avaliação semiológica, pode-se observar que não havia alterações no sistema cardiorrespiratório. O exame do cordão umbilical revelou aumento de sua espessura e persistência do úraco.

Tabela 10 – Parâmetros hematológicos do bezerro clonado 21 nos tempos determinados para a coleta (H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120).

Parâmetro	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{60}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Hemácias ($x10^6/mm^3$)	6,8	…	5,8	…	6,2	6,2	6,1	…	7,7
Hematócrito (%)	37,9	…	29,8	…	30,9	30,5	29,9	...	33,4
Hemoglobina (g/dL)	11,2	…	9,5	…	10,2	10,1	10	…	11,0
VCM (fL)	52,4	…	51,4	…	50,2	48,9	48,8	…	47,2
CHCM (%)	31,6	…	31,9	…	33,0	33,1	33,4	…	32,9
Plaquetas ($x10^3/mm^3$)	399	…	394	…	581	663	847	…	1791
Leucócitos ($/mm^3$)	11800	…	20500	…	18400	23100	29200	…	10600
Bastonetes ($/mm^3$)	0	…	2050	…	0	0	0	…	0
Segmentados ($/mm^3$)	7670	…	16810	…	17480	22060	27127	…	8268
Linfócitos ($/mm^3$)	3776	…	1230	…	920	1040	2073	…	2332
Eosinófilos ($/mm^3$)	0	…	205	…	0	0	0	…	0
Monócitos ($/mm^3$)	354	…	205	…	0	0	0	…	0
Basófilos ($/mm^3$)	0	…	0	…	0	0	0	…	0
Relação N:L	2,0	…	13,7	…	19,0	21,2	26,1	…	3,5
PPT (g/dL)	5,8	…	6,0	…	6,4	6,4	6,4	…	6,0

Embora não tenha nascido anêmico, o hematócrito, assim como outros parâmetros eritrocitários, diminuiu discretamente com a idade (tabela 10). A influência da idade sobre o eritrograma de bezerros neonatos foi demonstrado anteriormente por Birgel Junior et al. (2001a). O bezerro nasceu com os parâmetros eritrocitários normais, porém com o VCM elevado, que só retornou aos valores normais após o quinto dia, contrariando Brun-Hansen et al. (2006), que observaram redução no VCM de bovinos, embora não especificassem a presença de neonatos

no estudo. As plaquetas, baixas ao nascimento, se elevaram aos níveis normais após 48 horas. Quando comparado ao Grupo Controle, notou-se que o bezerro nasceu com leucocitose por neutrofilia, que persistiu nos primeiros dias, retornando ao normal após aproximadamente 5 dias. A concentração de proteínas plasmáticas totais (PPT) estava elevada no início, mas retornou aos valores normais após 48 horas. Aparentemente, 48 horas é o período crítico para a estabilização dos animais (BLEUL, 2009).

Tabela 11 – Parâmetros bioquímicos do bezerro clonado 21 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120).

Parâmetro	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Ureia (mg/dL)	53	…	21,3	…	29,2	…	…	22,3
Creatinina (mg/dL)	1,4	…	0,7	…	0,7	…	…	1,0
AST (UI/L)	5,9	…	87,5	…	54,9	…	…	55,3
FA (UI/L)	463	…	759	…	387	…	…	236
Bilirrubina (mg/dL)	…	…	2,7	…	…	…	…	2,7
GGT (UI/L)	…	…	…	…	…	…	…	…
Glicose (mg/dL)	45,4	…	148	…	230	…	68	101
Lactato (mmol/L)	7,7	…	5,9	…	4,1	…	4,6	4,3

Ao nascer, o animal apresentava elevação de ureia sérica e elevação de lactato. Embora a dinâmica da produção e concentração sérica do lactato ainda necessite ser estudado em neonatos (BRISVILLE et al., 2011), observa-se que, juntamente com a redução da PO_2, estas alterações acabaram conduzindo o animal a um quadro de acidose 24 horas após o parto. O bezerro se manteve acidótico no período estudado e a concentração de lactato acompanhou este quadro. Segundo Russel e Roussel (2007), a elevação do lactato pode estar relacionada à diminuição da perfusão tecidual e à consequente elevação do metabolismo anaeróbico. A AST se apresentava baixa ao nascimento, mas seus valores se elevaram no avançar da idade. A FA se elevou em 24 horas, mas este resultado é esperado em animais jovens devido à isoforma óssea da enzima que é liberada na circulação nesses animais (KANEKO, 1997). Concordando com os resultados de Garry et al. (1996), o bezerro apresentou hipoglicemia no momento do

parto, e elevação no decorrer do tempo. Esta elevação pode estar relacionada com o fato de não ter sido respeitado o jejum para a coleta de sangue. Dessa forma, a interpretação deste parâmetro acaba ficando prejudicada nos demais momentos. A creatinina sérica estava normal logo após o parto, mas apresentou queda nos momentos seguintes. A bilirrubina também estava alta quando comparada com os controles. Isso pode indicar uma deficiência das funções hepáticas no bezerro clonado.

Tabela 12 – Parâmetros hemogasométricos do sangue venoso do bezerro clonado 21 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120)

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
pH	7,21	7,27	7,39	7,39	…	7,38	…	7,36	7,37
PO2 (mmHg)	32,5	24,9	22,5	28,5	…	29,2	…	30,6	29,3
PCO2 (mmHg)	64,9	52,9	50,2	49	…	50,4	…	52,7	52,3
SO2 (%)	47,2	35,6	38	53,5	…	54,5	…	56,1	54
Na (mmol/L)	134,8	133,8	141,2	139,3	…	137,5	…	126,8	127,6
K (mmol/L)	4,5	4,7	4,3	3,6	…	3,9	…	4,2	4,3
iCa (mmol/L)	1,3	1,2	1,2	1,2	…	1,3	…	1,2	1,2
Cl (mmol/L)	95,3	94,4	98,3	97,2	…	96,0	…	89,5	90,8
cHCO3 (mmol/L)	25,3	26,8	29,8	29,1	…	29,3	…	29,4	29,8
BE (mmol/L)	-3,3	-0,7	4,1	3,5	…	3,4	…	3,0	3,6

Tabela 13 – Parâmetros hemogasométricos do sangue arterial do bezerro clonado 21 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120)

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
pH	…	7,46	7,43	7,44	7,44	7,41	7,45	7,44	7,44
PO2 (mmHg)	…	40,4	34,6	56,1	51,5	45,8	63	80,9	77,7
PCO2 (mmHg)	…	39,9	43,7	39,8	41,6	39	40,5	41,9	43,4
SO2 (%)	…	79,5	69,4	90,1	88	81,8	93,1	96,5	96
Na (mmol/L)	…	139,5	140,4	137,6	136,8	137,4	137,4	125,4	127,3
K (mmol/L)	…	5,1	4,3	3,6	3,9	3,7	3,9	4,3	4,3
iCa (mmol/L)	…	1,2	1,1	1,2	1,3	1,3	1,23	1,1	1,1
Cl (mmol/L)	…	99,2	99,5	98	96,8	97,8	96,8	90,4	91,7
cHCO3 (mmol/L)	…	27,8	28,5	26,2	27,8	24	27,6	28,1	28,8
BE (mmol/L)	…	3,7	3,8	1,9	3,4	-0,6	3,4	3,6	4,2
AG (mmol/L)	…	17,6	16,7	17,1	16,1	19,4	16,9	11,2	11,1

Tabela 14 – Sinais vitais do bezerro clonado 21 nos tempos de coleta preconizados.

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Temperatura retal (ºC)	39,0	37,6	39,0	38,3	39,5	39,0	39,1	39,1	38,8
Frequência cardíaca (bpm)	132	128	130	140	160	168	180	120	136
Frequência respiratória (mpm)	32	60	42	36	52	40	36	32	32

As tabelas 12 e 13 apresentam os valores da hemogasometria venosa e arterial, respectivamente, do clone 21. A partir delas podemos avaliar o equilíbrio ácido-básico e eletrolítico do bezerro. Bleul (2009) afirma que a maioria dos bezerros nasce com leve acidose metabólica e respiratória que se normaliza em pouco tempo. Entretanto, este bezerro apresentou alcalose mista respiratória e metabólica, hipercalemia e hipocalcemia no momento do nascimento. Em 12 horas, o pH estava normal, porém a pressão e a saturação de oxigênio estavam baixas, mesmo com a oxigenioterapia. Em 24 horas, no entanto, apresentou uma acidose metabólica acompanhada por hipocalemia que persistiu até 48 horas.

A hipercalemia observada logo após o nascimento foi revertida para hipocalemia 24 horas após o nascimento. A hipocalcemia presente no nascimento foi revertida para hipercalcemia nas 48 horas de vida. Esses resultados concordam com Russel e Roussel (2007), que afirmaram que, bovinos com acidose tendem a apresentar concentrações elevadas de cálcio. Nessa situação, o cálcio ionizado se desliga da albumina, resultando numa elevação de sua concentração.

Quanto ao exame clínico (tabela 14), a alteração mais marcante foi a diminuição da frequência respiratória. Este bezerro nasceu com alterações muito semelhantes a outros bezerros clonados de outros estudos (WILSON et al., 1995; GARRY et al., 1996; WELLS et al., 1998; HILL et al., 1999; BATCHELDER et al., 2007a; MEIRELLES et al., 2010; BRISVILLE et al., 2011), mas, embora alguns parâmetros tenham alcançado valores normais, seu quadro se complicou no avanço dos dias devido ao aumento do diâmetro dos vasos umbilicais.

6.2.2. Clone 22

O bezerro clonado 22 nasceu no dia 15/09/2010 às 14h28min. Era da mesma linhagem celular do clone 21. Nasceu indução do parto, por cesariana. A receptora deste bezerro apresentava, no momento do parto, início de relaxamento do ligamento sacro isquiático, ausência de alterações na vulva ou nas glândulas mamárias antes da administração de 25mg dexametasona. Depois deste procedimento, houve relaxamento intenso do ligamento e edema de vulva e o animal entrou em trabalho de parto, sendo a cesariana realizada com o animal apresentando dilatação cervical completa. A cesariana foi realizada 40 horas após a indução com dexametasona. Todos os procedimentos foram semelhantes aos realizados com o clone 21.

As principais características clínicas deste bezerro observadas ao seu nascimento encontram-se no quadro 2. Este bezerro nasceu com peso acima dos valores do Grupo Controle e com alterações importantes nos vasos umbilicais que precisaram ser obliteradas individualmente para que não houvesse hemorragia. A avaliação semiológica do sistema cardiorrespiratório não revelou alterações significativas, exceto algumas características comuns em bezerros neonatos. A avaliação do coto umbilical revelou alterações importantes na espessura da estrutura, que evidenciou a necessidade de bloquear cada vaso isoladamente para que não houvesse hemorragia, nem servisse como porta de entrada para microrganismos patogênicos. Apresentava, também, hiperextensão das articulações do boleto.

Quadro 2 – Principais características clínicas do clone 22 ao nascer

(continua)

Parâmetro	**Avaliação**
Peso ao nascer	61Kg
APGAR imediatamente após o parto	6
APGAR aos 5 minutos de vida	8
Tingido por mecônio	Não
Tempo até a liberação do mecônio	6 minutos após o nascimento
Tentativa de permanecer em estação	2 horas após o nascimento

(conclusão)

Parâmetro	Avaliação
Aparecimento do reflexo de sucção	4 horas e 13 minutos após o nascimento
Temperatura ao nascer	39,3ºC
Frequência cardíaca	144 batimentos por minuto
Frequência respiratória	80 movimentos por minuto
Coloração de mucosas	Normocoradas
Funções vitais	Ausência de edema e desidratação. Sem sinais de insuficiência cardíaca. Na auscultação cardíaca, foi observado reforço de 1ª bulha
Avaliação pulmonar	Dispneia mista, ausência de insuficiência respiratória e fluxo nasal. Na auscultação pulmonar notou-se a presença de estertor seco sibilante e estertor úmido crepitante
Avaliação do umbigo	Comprimento do cordão: 5cm Espessura: 3 dedos Estruturas visíveis: 2 artérias e 2 veias Pulso arterial: negativo Alterações graves no umbigo, cada vaso foi obliterado isoladamente para evitar hemorragia Ausência de persistência do úraco
Outras observações	Hiperextensão das articulações do boleto (anterior e posterior)

Os parâmetros eritrocitários (tabela 15) não apresentaram alterações ao nascimento e ao longo do período estudado. Havia baixa contagem de plaquetas ao nascimento, que se elevou após 48 horas. Apresentou leucocitose por neutrofilia a partir das 12 horas de vida, que somente se normalizou a partir de 96 horas. A leucocitose por neutrofilia observada nos animais deste estudo pode estar relacionada à liberação de glicocorticoides endógenos no momento do parto e à administração de glicocorticoides, que provocam, inicialmente, uma elevação dos neutrófilos (KRAMER, 2000; BENESI et al., 2012). Além disso, havia a preocupação com o umbigo com espessura aumentada que demora a involuir e serve como porta de entrada para organismos patogênicos. A concentração de proteínas plasmáticas totais (PPT) estava alta ao nascimento, mas voltou aos valores normais após 24 horas.

Tabela 15 – Parâmetros hematológicos do bezerro clonado 22 nos tempos preconizados para coleta (H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120).

Parâmetro	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{60}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Hemácias ($x10^6/mm^3$)	8,1	7,7	7,6	…	7,7	…	8,1	8,6	8,1
Hematócrito (%)	37,9	35,8	35,0	…	34,2	…	35,8	38,6	35,9
Hemoglobina (g/dL)	11,8	11,5	11,3	…	11,4	…	11,7	12,5	11,8
VCM (fL)	47,1	46,5	46,1	…	44,6	…	44,4	44,6	44,3
CHCM (%)	31,1	32,1	32,3	…	33,3	…	32,7	32,4	32,9
Plaquetas ($x10^3/mm^3$)	405	458	460	…	570	…	855	1142	1267
Leucócitos ($/mm^3$)	11200	14000	20700	…	16100	…	19800	12500	12500
Bastonetes ($/mm^3$)	0	560	1449	…	322	…	0	0	0
Segmentados ($/mm^3$)	7616	12320	17181	…	14329	…	18810	11000	10375
Linfócitos ($/mm^3$)	3584	980	1863	…	1288	…	990	1625	2125
Eosinófilos ($/mm^3$)	0	0	0	…	0	…	0	0	0
Monócitos ($/mm^3$)	0	140	207	…	161	…	0	0	0
Basófilos ($/mm^3$)	0	0	0	…	0	…	0	0	0
PPT (g/dL)	5,2	5,8	6,0	…	6,2	…	6,4	6,8	6,4

Os exames bioquímicos (tabela 16) não revelaram alterações renais ou hepáticas. A Bilirrubina estava elevada, assim como a glicose e o lactato. A glicemia é um parâmetro difícil de ser avaliado nas condições deste estudo, visto que não se preparavam os animais com jejum. Valores altos na glicemia destes animais não devem ser vistos com desconfiança.

Tabela 16 – Parâmetros bioquímicos do bezerro clonado 22 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120).

Parâmetro	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Ureia (mg/dL)	40,4	22,5	…	…	24,9	…	29,8	19
Creatinina (mg/dL)	1,2	0,7	0,7	…	0,6	…	0,8	0,7
AST (UI/L)	7,19	48,9	65,0	…	57,7	…	48,8	60,8
FA (UI/L)	179	535	619	…	449	…	175	60,8
Bilirrubina (mg/dL)	…	…	1,97	…	…	…	1,47	1,53
GGT (UI/l)	…	…	…	…	552	…	228	198
Glicose (mg/dL)	53,3	187	133	…	178	…	131	99,8
Lactato (mmol/L)	10,3	7,4	3,4	…	3,4	…	1,8	3,6

Os resultados das hemogasometrias venosa e arterial estão dispostos nas tabelas 17 e 18, respectivamente e os parâmetros vitais estão na tabela 19.

Tabela 17 – Parâmetros hemogasométricos do sangue venoso do bezerro clonado 22 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120)

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
pH	7,28	7,19	7,38	7,39	7,41	7,35	7,41	…	…
PO2 (mmHg)	9,4	25,6	26,5	25,4	34,5	41,4	33,6	…	…
PCO2 (mmHg)	55,9	71,2	52,0	47,8	48,6	54,0	51,6	…	…
SO2 (%)	7,2	31,9	48,1	45,4	67,2	74,3	66,7	…	…
Na (mmol/L)	135,7	135,5	141,7	141,3	142,1	139,2	140,0	…	…
K (mmol/L)	4,4	3,8	4,1	3,8	3,3	3,7	3,67	…	…
iCa (mmol/L)	1,2	1,2	1,2	1,3	1,2	1,2	1,2	…	…
Cl (mmol/L)	93,9	94,5	99,5	100,6	100,2	97,7	98,6	…	…
cHCO3 (mmol/L)	25,7	27,0	30,4	28,3	29,7	29,3	32,3	…	…
BE (mmol/L)	-2	-2,4	4,3	2,7	4,2	2,5	6,2	…	…

Tabela 18 – Parâmetros hemogasométricos do sangue arterial do bezerro clonado 22 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120)

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
pH	7,46	7,20	7,45	7,42	7,44	7,39	7,48	…	7,52
PO2 (mmHg)	37,7	56,4	41,3	42,9	38,7	50,9	56,2	…	41
PCO2 (mmHg)	31,2	66,8	44	41,1	42,7	47,4	42,2	…	35,1
SO2 (%)	75,5	80,6	80,3	79,6	75,8	85,9	91,6	…	83
Na (mmol/L)	133,7	135,5	142,2	141,1	142,1	138,5	139,5	…	139,5
K (mmol/L)	3,9	3,7	4,1	3,9	3,6	3,7	3,6	…	3,6
iCa (mmol/L)	1,2	1,2	1,2	1,3	1,3	1,3	1,3	…	1,3
Cl (mmol/L)	93,2	95,2	100,3	101,2	99,7	98,3	98,8	…	98,8
cHCO3 (mmol/L)	22	25,7	30,1	25,8	28,1	28,6	30,7	…	30,8
BE (mmol/L)	-0,9	-3,5	5,5	1,2	3,5	3,0	6,5	…	6,5
AG (mmol/L)	22,5	18,4	15,8	18,5	17,9	15,3	13,7	…	13,7

Na hemogasometria arterial foi observada acidose mista respiratória e metabólica uma hora após o nascimento. Foi revertida 12 horas depois, provavelmente como consequência da terapia instaurada, mas retornou 12 horas

depois, acompanhada de hipernatremia e hipercloremia. A acidose persistiu até 48 horas de vida. A acidose respiratória é relatada em bezerros sadios não clonados imediatamente após o parto, mas que é revertida nos dois primeiros dias (BENESI, 1993; LISBOA et al., 2002). Neste animal ela foi revertida no quarto dia. Os níveis séricos de lactato também se mantiveram alto durante o período estudado e somente se normalizou no quinto dia após o nascimento. Os níveis altos de lactato poderiam estar relacionados com o metabolismo anaeróbico provocado pela hipóxia e isso deve ter causado a acidose metabólica (RUSSEL e ROUSSEL, 2007).

Os sinais vitais do bezerro clonado 22 se encontram em valores muito próximos às médias dos controles, sem alterações.

Tabela 19 – Sinais vitais do bezerro clonado 22 associados com a pressão de oxigênio e dióxido de carbono nos tempos de coleta preconizados.

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Temperatura retal (ºC)	39,0	38,3	39,1	39,1	39,4	39,5	39,1	39	39,2
Frequência cardíaca (bpm)	144	96	144	164	164	152	140	140	132
Frequência respiratória (mpm)	80	64	56	48	40	68	48	40	36

6.2.3. Clone 23

O bezerro clonado 23 nasceu no dia 15/09/2010 às 17h00min. Todos os procedimentos desde o tratamento da receptora para a indução do parto, a cesariana e os cuidados neonatais foram iguais aos dos bezerros clonados 21 e 23. No entanto, o bezerro morreu três horas após o nascimento. A tentativa de estabilizar o quadro clínico foi priorizada e amostras de material biológico deixaram de ser coletadas. Por este motivo, não há dados fornecidos pelo hemograma, bioquímica sérica ou hemogasometria. Foram realizadas apenas uma hemogasometria venosa e a necropsia. Os resultados da hemogasometria venosa podem ser observados na tabela 20.

Tabela 20 – Parâmetros hemogasométricos do sangue venoso do bezerro clonado 23 observados duas horas após o nascimento

Parâmetro	H_2
pH	6,65
PO2 (mmHg)	47,4
PCO2 (mmHg)	130,9
SO2 (%)	29,7
Na (mmol/L)	142,2
K (mmol/L)	5,4
iCa (mmol/L)	1,5
Cl (mmol/L)	103,3
cHCO3 (mmol/L)	14,3
BE (mmol/L)	-23,3

Em virtude dos procedimentos para a estabilização do bezerro, não foi possível coletar amostras de materiais biológicos para outras análises. Na hemogasometria venosa pode-se notar acidose mista respiratória e metabólica e hipercalemia, hipercalcemia e hipercloremia. A elevação intensa da pressão de dióxido de carbono revela a dificuldade para realizar trocas gasosas manter o equilíbrio eletrolítico.

Durante a necropsia foi observado hidropericárdio discreto, coração levemente dilatado, pesando aproximadamente 400g. Apresentava defeito de septo interatrial. As dimensões do coração do bezerro foram: perímetro da aorta 5,5cm; parede livre do ventrículo esquerdo 2cm; parede livre do ventrículo direito 1,3cm; septo interventricular 1,8cm. De acordo com Batchelder et al. (2006), os valores de referência desses parâmetros para bezerros neonatos são de 0,93 a 1,65cm para a parede livre do ventrículo esquerdo e 1,12 a 1,28cm para parede livre do ventrículo direito. Estes achados podem indicar hipertrofia congênita concêntrica do miocárdio, que pode conduzir à hipertensão da artéria pulmonar. Após o nascimento, esse quadro pode ser agravado pela insuficiência respiratória e pela falta do efeito do surfactante pulmonar (BLEUL, 2009; POGLIANI, 2010; BIRGEL JUNIOR et al., 2011ab).

No exame dos pulmões observou-se que os mesmos pareciam não ter inflado, estavam colabados e hipocrepitantes. Havia mecônio nos brônquios e na

traqueia, demonstrando ter havido sofrimento fetal. O baço estava aparentemente normal. Os rins tinham aspecto normal, mas coloração esverdeada.

A associação da hemogasometria com os achados de necropsia revela dificuldade de estabelecer trocas gasosas provocada, provavelmente pela hipertrofia congênita concêntrica do coração, aspiração de líquidos fetais (BLEUL, 2009).

6.2.4. Clone 24

O bezerro clonado 24 nasceu no dia 16/09/20110 às 07h27min. Era da mesma linhagem celular dos clones 21, 22 e 23. Nasceu por meio de cesariana realizada 42 horas após indução do parto com a administração de dexametasona conforme citado na tabela 1. A receptora apresentava, no momento da cesariana, um dedo de dilatação e ausência de preparo da glândula mamária. Após o nascimento do bezerro, todos os procedimentos foram realizados de forma semelhante aos realizados com os demais clones. As principais características clínicas deste bezerro observadas ao seu nascimento encontram-se no quadro 3.

Após os primeiros cuidados foram realizadas as coletas de sangue para os exames laboratoriais cujos resultados estão citados nas tabelas 21 (hemograma), 22 (bioquímica sérica) e 23 (hemogasometria).

Este bezerro apresentava-se normal ao nascer, exceto pelo tingimento leve por mecônio, presença de líquido na traqueia e mecônio nas narinas, além de ruídos pulmonares indicando presença de líquido na traqueia. A ausência de sinais de distúrbios cardíacos e respiratórios levou a equipe a suspender a medicação (dexametasona, aminofilina e citrato de sildenafila) 48 horas depois do nascimento. Apresentava involução normal do cordão umbilical, sem persistência do úraco. Apresentou hematúria logo após o nascimento, mas que reverteu em menos de 24 horas. A avaliação das atividades séricas das enzimas creatinoquinase (CK) e aspartato aminotransferase (AST) descartaram a possibilidade de ter sido causada por hemólise ou lesão muscular. Possivelmente foi devido a um hematoma na região do úraco.

Quadro 3 – Principais características clínicas do bezerro clonado 24 ao nascer

Parâmetro	**Avaliação**
Peso ao nascer	42Kg
APGAR imediatamente após o parto	8
APGAR aos 5 minutos de vida	8
Tingido por mecônio	Levemente tingido por mecônio
Tempo até a liberação do mecônio	5 horas após o nascimento
Tentativa de permanecer em estação	1 hora após o nascimento
Aparecimento do reflexo de sucção	1 hora após o nascimento
Temperatura ao nascer	39,2
Frequência cardíaca	132 bpm
Frequência respiratória	48 mpm
Coloração de mucosas	Rosa pálido
Funções vitais	Mucosa rósea pálida, ausência de desidratação e edema. Parâmetros cardiocirculatórios normais na auscultação e palpação
Avaliação pulmonar	Não havia alterações marcantes. Na palpação do tórax, notou-se estertor vibrante sonoro de origem traqueal. Na auscultação dos pulmões notou-se estertor seco roncoso, estertor úmido crepitante e estertor úmido bolhoso. Observou-se ausência de estridores, fluxo nasal ou tosse Havia grande quantidade de líquido, na traqueia e mecônio dentro das narinas. Não foi usado surfactante
Avaliação do umbigo	Comprimento do cordão: 4cm Espessura: 1 dedo Estruturas visíveis: nenhuma Pulso arterial: negativo Ausência de edema no entorno da artéria umbilical, não há persistência do úraco Involução normal do cordão
Outras observações	Hematúria logo após o nascimento devido a hematoma na região do úraco. Descartou-se a possibilidade de hemólise ou lesão muscular

Os resultados do hemograma (tabela 21) revelam que o eritrograma deste bezerro mostrou poucas alterações, seguindo o padrão dos outros bezerros.

Apresentou apenas VCM ao nascimento. Também havia trombocitopenia discreta ao nascimento, mas que se normalizou após 48 horas. O leucograma revelou leucocitose por neutrofilia desde o nascimento, que retornou aos valores de referência após 120 horas (5 dias).

Tabela 21 – Parâmetros hematológicos do bezerro clonado 24 nos tempos preconizados para coleta (H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120).

Parâmetro	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{60}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Hemácias ($x10^6/mm^3$)	7,3	6,4	6,3	6,1	6,6	...	...	6,6	6,5
Hematócrito (%)	36,2	30,6	30,1	28,1	29,2	…	…	29,1	28,2
Hemoglobina (g/dL)	11,0	9,8	9,5	9,1	9,9	…	…	9,7	9,6
VCM (fL)	49,7	47,6	47,5	46,2	44,2	…	…	44,4	43,7
CHCM (%)	30,4	32,0	31,6	32,4	33,9	…	…	33,3	34,0
Plaquetas ($x10^3/mm^3$)	405	409	437	478	745	…	…	919	1574
Leucócitos ($/mm^3$)	13600	24500	24700	23000	21100	…	…	18800	8000
Bastonetes ($/mm^3$)	0	735	1729	460	0	…	…	0	0
Segmentados ($/mm^3$)	8704	21315	19760	20930	13926	…	…	17296	5840
Linfócitos ($/mm^3$)	4488	1960	2717	1380	844	…	…	1504	2160
Eosinófilos ($/mm^3$)	0	0	0	0	0	…	…	0	0
Monócitos ($/mm^3$)	408	490	494	230	0	…	…	0	0
Basófilos ($/mm^3$)	0	0	0	0	0	…	…	0	0
PPT (g/dL)	5,0	6,0	…	6,2	6,0	…	…	6,8	5,6

Tabela 22 – Parâmetros bioquímicos do bezerro clonado 24 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120).

Parâmetro	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Ureia (mg/dL)	37,7	24,5	21,7	…	22,9	…	19,0	19,0
Creatinina (mg/dL)	1,65	1,10	0,92	…	0,95	…	0,72	1,00
AST (UI/L)	8,9	70,5	81,2	…	44,6	…	48,3	50,0
FA (UI/L)	742	1430	1190	…	210	…	285	177
CK (UI/L)	…	570	636	…	…	…	…	…
Bilirrubina (mg/dL)	…	…	0,90	…	0,66	…	0,98	0,4
GGT (UI/l)	…	…	…	…	109	…	…	113
Glicose (mg/dL)	73	137	202	…	121	…	139	78
Lactato (mmol/L)	8,3	7,2	3,2	…	1,9	…	…	2,7

Os exames bioquímicos estão apresentados na tabela 22. A hiperglicemia observada neste bezerro de 12 horas de vida deve ser observada com cautela visto que as coletas de sangue não eram realizadas em jejum. A elevação da atividade sérica da FA pode estar relacionada com o fato de ser um animal jovem, em fase de crescimento quando se eleva a isoenzima do tecido ósseo (KANEKO, 1997). Por volta de 48 horas de vida, esses parâmetros já haviam voltado aos valores normais e o bezerro já se apresentava como um bezerro normal de acordo com os parâmetros clínicos (tabela 25) e laboratoriais.

Nas tabelas 23 e 24 estão contidos os dados referentes às hemogasometrias venosa e arterial, respectivamente. A análise da hemogasometria arterial (tabela 23) revelou que o bezerro nasceu com alcalose mista respiratória e metabólica. Uma hora após o nascimento, apresentava um quadro normal no que se refere aos gases sanguíneos, embora houvesse redução na concentração de cloretos e elevação do intervalo aniônico (AG), o que pode estar relacionado a um possível quadro de acidose, que foi corrigido a seguir pela terapia. Com 24 horas de vida, a gasometria mantinha-se nos valores de referência, exceto pela hipernatremia e uma redução discreta no bicarbonato, que determinou uma elevação do intervalo aniônico. Com 48 horas de vida, a única alteração da hemogasometria era, ainda, a hipernatremia.

Tabela 23 – Parâmetros hemogasométricos do sangue venoso do bezerro clonado 24 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120)

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
pH	7,36	7,33	7,39	7,43	…	7,40	…	…	7,39
PO2 (mmHg)	15,1	20,9	26,9	28,0	…	25,7	…	…	49,6
PCO2 (mmHg)	84,1	60,4	50,2	48,1	…	56,5	…	…	59,0
SO2 (%)	12,1	30,0	49,6	56,3	…	47,9	…	…	85,0
Na (mmol/L)	137,2	137,2	141,8	139,9	…	138,2	…	…	134,3
K (mmol/L)	5,3	4,5	4,1	3,7	…	3,3	…	…	4,3
iCa (mmol/L)	1,4	1,3	1,3	1,2	…	1,3	…	…	1,3
Cl (mmol/L)	95,1	93,8	99,3	97,5	…	96,0	…	…	94,0
cHCO3 (mmol/L)	29,2	30,9	29,8	31,6	…	34,1	…	…	34,6
BE (mmol/L)	-1,2	3,7	4,2	6,5	…	7,8	…	…	8,0

Tabela 24 – Parâmetros hemogasométricos do sangue arterial do bezerro clonado 24 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120)

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
pH	7,46	7,33	7,45	7,49	7,48	7,50	7,48	…	7,46
PO2 (mmHg)	24,2	59,4	62,8	53,5	81,9	55,7	69,3	…	126,8
PCO2 (mmHg)	42,9	53,7	42,8	39,8	43,4	41,3	43,7	…	45,6
SO2 (%)	47,8	88,1	93	90,8	97	92	95,5	…	99,1
Na (mmol/L)	133,6	137	140,6	139,1	140,7	137,4	137,5	…	132,4
K (mmol/L)	4,3	3,8	4,1	3,8	3,4	3,4	3,7	…	4,2
iCa (mmol/L)	1,3	1,3	1,3	1,2	1,27	1,3	1,3	…	1,2
Cl (mmol/L)	92,5	93,2	100,7	98,3	98	96,5	96,7	…	94,4
cHCO3 (mmol/L)	29,7	27,4	28,8	29,9	31,5	31,7	31,2	…	31,7
BE (mmol/L)	5,2	0,7	4,3	6,2	7,3	7,8	7,4	…	7,0
AG (mmol/L)	15,8	20,3	15,2	14,7	14,6	12,6	13,3	…	10,5

Os sinais vitais deste bezerro (tabela 25) se apresentam dentro dos parâmetros normais quando comparados às médias do Grupo Controle.

Tabela 25 – Sinais vitais do bezerro clonado 24 nos tempos de coleta preconizados.

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Temperatura retal (ºC)	37,8	38,3	39,1	39,1	39,4	38,8	38,9	38,8	38,8
Frequência cardíaca (bpm)	128	120	152	140	144	164	158	158	152
Frequência respiratória (mpm)	80	52	42	40	52	47	45	40	40

6.2.5. Clone 25

O bezerro clonado 25 nasceu no dia 16/09/2010 às 11h00min. Era da mesma linhagem celular dos clones 21, 22, 23 e 24. A cesariana ocorreu 42 horas após a indução do parto com a administração de dexametasona, A receptora tinha um dedo de dilatação no momento da cesariana. Não foi utilizado isoxsuprine. Todos os procedimentos de cuidados neonatais foram semelhantes aos dos outros bezerros. O bezerro apresentou hipotermia 30 minutos após o nascimento, mas a temperatura voltou aos valores normais após 30 minutos. As principais

características clínicas deste bezerro observadas ao seu nascimento encontram-se no quadro 4.

Quadro 4 – Principais características clínicas do bezerro clonado 25 ao nascer

Parâmetro	**Avaliação**
Peso ao nascer	35,5Kg
APGAR imediatamente após o parto	6
APGAR aos 5 minutos de vida	8
Tingido por mecônio	Não
Tempo até a liberação do mecônio	Um minuto após o nascimento
Tentativa de permanecer em estação	Desde o nascimento
Aparecimento do reflexo de sucção	40 minutos após o nascimento
Temperatura ao nascer	39,2ºC
Frequência cardíaca	130bpm
Frequência respiratória	...
Coloração de mucosas	Normocoradas
Funções vitais	Ausência de edema ou desidratação. Sem alterações cardiocirculatórias
Avaliação pulmonar	Não foi utilizado surfactante Respiração costo-abdominal, de amplitude e frequência normais. Apresentava estridor nasal e fluxo nasal catarral com coloração amarelada de mecônio. Na auscultação pulmonar, presença de estertor seco roncoso, estertor seco sibilante, estertor úmido crepitante e estertor úmido bolhoso, característicos de bezerros neonatos com sistema cárdio-respiratório sem muitas alterações.
Avaliação do umbigo	Comprimento do cordão: 3 a 4cm Espessura: 2 dedos Estruturas visíveis: 1 artéria umbilical (diâmetro menor do que um lápis) Pulso arterial: presente, de intensidade moderada. Desapareceu em 48 horas Não havia persistência do úraco

Aproximadamente 48 horas após o nascimento, a medicação para as alterações cárdio-respiratórias (dexametasona, aminofilina e citrato de sildenafila) foi suspensa. Não houve alterações eritrocitárias neste bezerro durante o período estudado. Ao nascimento havia trombocitopenia, hipoproteinemia e leucocitose por neutrofilia discretas. A leucocitose, no entanto, se tornou mais evidente e somente voltou aos valores de referência ao 5º dia de vida (tabela 26).

Tabela 26 – Parâmetros hematológicos do bezerro clonado 25 nos tempos preconizados para coleta (H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120).

Parâmetro	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{60}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Hemácias ($x10^6/mm^3$)	7,3	7,1	6,7	…	6,7	...	...	6,9	6,9
Hematócrito (%)	32,8	30,6	28,5	…	27	…	…	28,1	27,8
Hemoglobina (g/dL)	10,1	9,7	9,4	…	9,2	…	…	9,4	9,5
VCM (fL)	44,8	43,2	42,3	…	40,4	…	…	40,8	40,0
CHCM (%)	30,8	31,7	33,0	…	34,1	…	…	33,5	34,2
Plaquetas ($x10^3/mm^3$)	473	488	456	…	548	…	…	797	1442
Leucócitos ($/mm^3$)	13400	21600	24100	…	17400	…	…	16000	7100
Bastonetes ($/mm^3$)	0	216	0	…	0	…	…	0	0
Segmentados ($/mm^3$)	8442	17712	20967	…	16530	…	…	14560	5254
Linfócitos ($/mm^3$)	4288	3240	1928	…	870	…	…	1440	1846
Eosinófilos ($/mm^3$)	0	0	0	…	0	…	…	0	0
Monócitos ($/mm^3$)	670	432	241	…	0	…	…	0	0
Basófilos ($/mm^3$)	0	0	0	…	0	…	…	0	0
PPT (g/dL)	5,0	…	5,2	…	5,4	…	…	6,2	5,2

Tabela 27 – Parâmetros bioquímicos do bezerro clonado 25 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120).

Parâmetro	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Ureia (mg/dL)	26,5	21,9	…	…	…	…	19	21,9
Creatinina (mg/dL)	1,3	1,03	…	…	…	…	1,2	0,8
AST (UI/L)	64,6	85,3	…	…	…	…	47,9	59,7
FA (UI/L)	1690	2000	…	…	…	…	240	462
Bilirrubina (mg/dL)	…	…	…	…	…	…	0,7	0,8
GGT (UI/l)	…	574	…	…	…	…	77,3	156
Glicose (mg/dL)	110	117	177	…	…	…	94	84
Lactato (mmol/L)	4,7	3,3	2,7	…	…	3,0	1,7	1,8

Houve diminuição das concentrações de ureia, creatinina e AST quando comparadas ao Grupo Controle. Comparadas com dados de Benesi et al. (2003), nota-se redução da GGT, elevação da bilirrubina a partir do quarto dia, elevação da AST. A elevação da AST pode estar relacionada à maior atividade muscular em neonatos e a GGT reduzida gerou suspeitas a respeito da absorção inadequada de anticorpos colostrais e, consequentemente, falha na transferência da imunidade passiva (COSTA et al., 2008). Apresentou hiperglicemia uma hora depois do nascimento. A concentração de lactato, discretamente elevada nos primeiros três dias de vida, alcançou níveis normais após quarto dia de vida. A elevação da atividade da FA sem elevação concomitante da AST e da bilirrubina não indica alteração hepática, mas sim, sinais de crescimento.

A análise dos achados na hemogasometria venosa (tabela 28) revelou acidose, enquanto a arterial (tabela 29) revelou que, com uma hora de vida, o bezerro apresentou alcalose respiratória, pois houve elevação da pressão parcial de oxigênio provavelmente devido à oxigenioterapia. Mesmo sem a utilização de surfactante e cloridrato de isoxsuprine, que inibe as contrações uterinas e melhora as condições de oxigenação para o feto (BIRGEL et al., 2011b; MEIRELLES et al., 2010), o animal conseguiu manter as trocas gasosas nesse período. Com 12 horas de vida, hemogasometria apresentava hiponatremia como única alteração. Com 24 horas de vida, o bezerro apresentou uma acidose respiratória discreta. Com 48 horas, a única alteração presente na hemogasometria arterial era a hipocalemia.

Tabela 28 – Parâmetros hemogasométricos do sangue venoso do bezerro clonado 25 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120)

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
pH	7,09	7,29	7,36	7,39	…	…	…	7,41	7,42
PO2 (mmHg)	13,0	21,8	28,9	31,1	…	…	…	35,3	34,8
PCO2 (mmHg)	78,9	61,8	57,3	51,8	…	…	…	52,6	52,8
SO2 (%)	8,3	29,7	52,3	60,3	…	…	…	69,3	69,8
Na (mmol/L)	137,2	137,1	141,2	138,3	…	…	…	134,7	133,7
K (mmol/L)	5,2	4,0	4,6	4,0	…	…	…	4,0	4,1
iCa (mmol/L)	1,5	1,3	1,3	1,3	…	…	…	1,2	1,1
Cl (mmol/L)	98,0	97,5	100,0	97,3	…	…	…	94,9	94,1
cHCO3 (mmol/L)	23,4	29,2	31,7	31,2	…	…	…	32,4	33,8
BE (mmol/L)	-8,2	1,5	4,6	5,4	…	…	…	6,6	7,7

Tabela 29 – Parâmetros hemogasométricos do sangue arterial do bezerro clonado 25 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120)

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
pH	7,32	7,45	7,45	7,44	7,47	7,50	7,41	…	7,48
PO2 (mmHg)	54	107,7	71,2	93,4	107,7	89,3	39,8	…	66,4
PCO2 (mmHg)	54,3	42,6	40,5	46,9	45,9	43,9	54,8	…	42,7
SO2 (%)	84,8	98,4	95	97,6	98,6	97,9	76,5	…	94,7
Na (mmol/L)	137,7	140,8	138,9	139,1	137,7	137,3	137,7	…	134
K (mmol/L)	4,09	4,5	4,3	4,2	3,9	3,8	3,9	…	4,2
iCa (mmol/L)	1,3	1,3	1,3	1,2	1,2	1,2	1,2	…	1,2
Cl (mmol/L)	97,8	101,2	99,9	98,4	98,3	97,1	96,7	…	96,8
cHCO3 (mmol/L)	27,4	28,6	27,3	30,8	32,6	33,5	34	…	31,1
BE (mmol/L)	0,6	4,1	3,1	5,8	8	9,4	7,5	…	6,8
AG (mmol/L)	16,5	15,5	16	14,1	10,8	10,5	11	…	11,3

Os parâmetros vitais apontam para hipotermia e taquipneia ao nascimento, mas estes sinais voltaram aos valores normais após 12 horas de vida. Isso demonstra certa dificuldade de adaptação à vida extrauterina.

Tabela 30 – Sinais vitais do bezerro clonado 25 nos tempos de coleta preconizados.

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Temperatura retal (ºC)	36,8	37,8	39,1	38,4	39,3	38,1	39,0		
Frequência cardíaca (bpm)	130	133	174	156	160	164	160		
Frequência respiratória (mpm)	81	62	64	44	40	47	45		

6.2.6. Clone 26

O bezerro 26 do Grupo Clones nasceu no dia 16/09/2010 às 15h14min. Era da mesma linhagem celular dos clones 21, 22, 23, 24 e 25. Todos os procedimentos de indução do parto e cesariana, assim como todos os cuidados neonatais foram semelhantes aos dos clones citados anteriormente. No entanto o bezerro 26 apresentou inúmeras complicações que culminaram com sua morte 36 horas após o nascimento. Todos os dados referentes aos exames clínicos e

laboratoriais deste bezerro estão contidos no quadro 5 e nas tabelas 31, 32, 33, 34 e 35.

Quadro 5 – Principais características clínicas do bezerro clonado 26 ao nascer

Parâmetro	**Avaliação**
Peso ao nascer	52,5Kg
APGAR imediatamente após o parto	...
APGAR aos 5 minutos de vida	...
Tingido por mecônio	...
Tempo até a liberação do mecônio	...
Tentativa de permanecer em estação	...
Aparecimento do reflexo de sucção	Não apresentou (colostro foi administrado por sonda nasoesofágica)
Temperatura ao nascer	40,5ºC
Frequência cardíaca	200
Frequência respiratória	40mpm (2 horas após o nascimento)
Coloração de mucosas	Rosa pálida
Funções vitais	Hipertermia e bradicardia. Após a administração de atropina e adrenalina, a FC se elevou para 200bpm
Avaliação pulmonar	Dispneia expiratória, respiração costo-abdominal, frequência normal, sem sinais de insuficiência respiratória. Pausa breve entre inspiração e expiração, tornando a expiração profunda
Avaliação do umbigo	Hematoma da artéria umbilical de aproximadamente 3cm de diâmetro
Outras observações	Grande quantidade de líquido amniótico de viscosidade elevada

Devido às complicações cardiorrespiratórias apresentadas ao nascimento, não foi possível coletar todos os dados (gráfico 5). A prioridade foi dada para a estabilização do quadro clínico. Logo ao nascer apresentou hipertermia (40,5ºC), e bradicardia. Foi administrado sulfato de atropina e adrenalina. A temperatura logo voltou aos valores de referência e a frequência cardíaca se elevou (200bpm). A concentração de lactato sérico estava elevada (8,0mmol/L). Foi feita a

correção da acidose com solução de bicarbonato de sódio 8,4% em solução de NaCl 0,9%. Duas horas após o nascimento, a concentração do lactato sérico ainda estava muito elevada (12,9mmol/L) e, mesmo com o tratamento, nas 24 horas que se seguiram, ainda não havia baixado. Uma hora após o nascimento, havia dilatação abdominal, com timbre metálico na percussão, possivelmente devido a uma disfunção vagal. O bezerro recebia colostro via sonda nasoesofágica, o que pode ter causado o timpanismo.

O exame físico realizado 20 horas após o parto revelou enoftalmia e desidratação de 5%. Não havia sinais de insuficiência cardíaca, porém apresentava taquicardia, ruído adventício sistólico e diastólico com ponto máximo de auscultação na valva semilunar aórtica. Após o uso de citrato de sildenafila, o sopro cardíaco regrediu, mas voltou após 40 minutos com intensidade leve, voltando a ser auscultado no foco aórtico (1ª e 2ª bulha). Com 30 horas de vida, o bezerro apresentou dispneia expiratória, respiração rude e estertor úmido crepitante, com propagação de batimentos cardíacos no 12º espaço intercostal. O quadro respiratório não evoluiu de forma positiva e o bezerro continuou apresentando respiração intensa e rude. Com, aproximadamente, 37 horas de vida, teve uma parada cardiorrespiratória e veio a óbito.

Tabela 31 – Parâmetros hematológicos do bezerro clonado 26 nos tempos preconizados para coleta (H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120).

Parâmetro	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}
Hemácias ($x10^6/mm^3$)	8,7	…	8,7	8,3
Hematócrito (%)	40,4	…	39,8	37,7
Hemoglobina (g/dL)	11,4	…	12,2	11,7
VCM (fL)	46,3	…	45,9	45,2
CHCM (%)	30,7	…	30,7	31,0
Plaquetas ($x10^3/mm^3$)	445	…	413	508
Leucócitos ($/mm^3$)	12300	…	17500	18900
Bastonetes ($/mm^3$)	0	…	350	1323
Segmentados ($/mm^3$)	7872	…	13125	14742
Linfócitos ($/mm^3$)	3567	…	3850	2646
Eosinófilos ($/mm^3$)	0	…	0	0
Monócitos ($/mm^3$)	0	…	0	0
Basófilos ($/mm^3$)	0	…	0	0
PPT (g/dL)	5,0	…	…	5,0

O hemograma (Tabela 31) mostrou algumas alterações importantes, tais como a elevação discreta do hematócrito, da contagem de hemácias, da concentração de hemoglobina e da concentração das plasmáticas totais, causados pelo quadro de desidratação, também detectado no exame físico. A contagem de plaquetas manteve-se como nos outros animais: baixa no início, mas elevando-se no avanço da idade. No leucograma, observou-se leucocitose por neutrofilia que se agravou no decorrer do tempo e persistiu durante as 37 horas de vida do animal.

A análise dos parâmetros bioquímicos (tabela 32) deste bezerro mostrou elevação da concentração sérica de ureia 12 horas após o nascimento e a concentração sérica de creatinina, ao contrário dos demais clones, estava mais elevada quando comparada à média do Grupo Controle na última análise realizada antes do óbito. Este achado pode indicar que as alterações cardiorrespiratórias tenham afetado a função renal (BLEUL, 2009).

Tabela 32 – Parâmetros bioquímicos do bezerro clonado 26 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120).

Parâmetro	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}
Ureia (mg/dL)	46	56,5	31,6	41,8
Creatinina (mg/dL)	2,1	1,7	1,1	1,7
AST (UI/L)	10,2	9,9	101	109
FA (UI/L)	1130	273	380	424
Bilirrubina (mg/dL)	0,4	…	…	…
GGT (UI/l)	…	…	…	…
Glicose (mg/dL)	74,4	89,0	131,0	101,0
Lactato (mmol/L)	8,0	12,9	9,4	…

O bezerro clonado 26 apresentou níveis elevados de lactato no sangue desde os primeiros momentos (30 minutos) após o parto. A hemogasometria arterial (tabela 34) confirma a acidose metabólica e respiratória. A hiperlactemia pode ser responsável pela acidose mista com origem respiratória e metabólica apresentada na primeira hora de vida. Esse desequilíbrio começa na fase expulsiva do parto e se acentua no decorrer do evento. A hipoxemia experimentada no momento do parto devido à redução das trocas materno-fetais induz a produção de ácido lático no metabolismo celular, resultando num agravamento do quadro (BENESI et al., 1993; LISBOA et al., 2002; BLEUL, 2009;). Essa condição se reverte

com o início da atividade respiratória, por volta do segundo dia de vida em bezerros sadios (BENESI et al., 2012), embora a recuperação completa e definitiva do quadro possa ocorrer até o quinto dia de idade (LECHOWSKI, 1997; LISBOA et al., 2002). Durante as 36 horas de vida desse bezerro, não houve regressão do quadro de acidose. Os dados da necropsia e o quadro de insuficiência respiratória apresentado pelo animal sustentam a causa da morte como sendo devido à não expansão pulmonar no período de adaptação à vida extrauterina. Ainda foram observadas, na hemogasometria arterial, hipernatremia e hipercloremia que persistiram até o momento do óbito do animal.

Tabela 33 – Parâmetros hemogasométricos do sangue venoso do bezerro clonado 26 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120)

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}
pH	7,11	6,94	7,29	7,33
PO2 (mmHg)	18,0	55,3	27,1	24,5
PCO2 (mmHg)	71,0	120,8	49,5	47,5
SO2 (%)	14,5	62	40,9	37,7
Na (mmol/L)	135,4	136,3	143,9	142,6
K (mmol/L)	4,8	3,2	4,4	3,8
iCa (mmol/L)	1,3	1,3	1,3	1,3
Cl (mmol/L)	94,5	99,8	101,7	100,8
cHCO3 (mmol/L)	22,3	25,3	23,1	24,4
BE (mmol/L)	-8,2	-9,2	-3,8	-1,9

Tabela 34 – Parâmetros hemogasométricos do sangue arterial do bezerro clonado 26 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120)

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}
pH	7,45	7,19	7,35	7,35	7,32
PO2 (mmHg)	40,8	66,4	45,3	37,5	43,1
PCO2 (mmHg)	32,1	66,6	44,3	43,0	50,0
SO2 (%)	78,7	86,6	78,3	67,1	73,9
Na (mmol/L)	133	140,8	141,6	142,6	143,2
K (mmol/L)	4,1	3,6	4,1	4,5	4,2
iCa (mmol/L)	1,2	1,2	1,2	1,3	1,3
Cl (mmol/L)	92,5	98,0	98,9	101,7	101,7
cHCO3 (mmol/L)	21,9	25	24	23	25,1
BE (mmol/L)	-1,3	-3,9	-1,7	-2,6	-1,4
AG (mmol/L)	22,5	21,4	22,9	22,4	20,6

Tabela 35 – Sinais vitais do bezerro clonado 26 nos tempos de coleta preconizados.

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}*	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Temperatura retal (ºC)	38,3	37,8	38,8	38,9	39,3	...	...	...	...
Frequência cardíaca (bpm)	180	174	144	164	126	...	...	...	...
Frequência respiratória (mpm)	...	24	56	60	76	...	...	...	...

* parâmetros aferidos com 33 horas de vida

Os sinais vitais do animal (tabela 35) apontam para um quadro de dificuldade de adaptação à vida extrauterina, com taquicardia nos primeiros minutos de vida e bradipneia na primeira hora após o nascimento. O óbito ocorreu no dia 18/09/2010 às 04h30min, quando o bezerro tinha, aproximadamente 37 horas de vida. Na necropsia, foram observadas mucosas cianóticas e acúmulo de líquido na cavidade abdominal e no tecido subcutâneo, provavelmente oriundo da fluidoterapia. Havia hematoma perivascular na região da cicatriz umbilical, envolvendo ambas as artérias e bexiga devido à não obliteração das artérias umbilicais, que retraíram no momento do parto. As artérias umbilicais tinham aspecto normal, assim como a veia umbilical. O úraco ainda estava aberto, mas tinha aspecto normal. A artéria aorta e a artéria pulmonar apresentavam aumento de volume, a base do coração estava dilatada e havia hematomas valvulares no lado direito e esquerdo. A circunferência da aorta media 5,5cm, a espessura do ventrículo direito era de 1,5cm e a do ventrículo esquerdo era de 2,5cm. O septo tinha 1,7cm de espessura. Havia pequenos focos de hemorragia subepicárdica. O lobo cranial do pulmão esquerdo estava crepitante e com grande área de enfisema, mas o lobo caudal apresentou consistência firme devido à atelectasia. A traqueia tinha um diâmetro maior no terço superior, diminuía no terço médio e voltava a aumentar levemente no terço final. Não havia conteúdo na traqueia, nem edema pulmonar. A insuficiência respiratória ocorreu devido à falha na expansão pulmonar e enfisema. No baço eram visíveis pequenas formações na cápsula esplênica. Os rins tinham aspecto normal. Não havia alterações macroscópicas no fígado, embora fossem notados esteatose leve, bordos arredondados de um lado e finos do outro. O abomaso estava repleto de leite coagulado e apresentava distensão moderada. Não havia alterações macroscópicas no cérebro, cerebelo, pâncreas, adrenais, intestinos, testículos e bexiga.

6.2.7. Clone 27

O bezerro 27 nasceu no dia 16/09/2010 às 18h25min. Também originado de um embrião clonado por SCNT da mesma linhagem celular dos bezerros 21, 22, 23, 24, 25 e 26. Assim como nos outros bezerros, foi realizada a indução do parto conforme a tabela 1. A cesariana ocorreu 26 horas após a administração de dexametasona, A receptora tinha menos de um dedo de dilatação no momento da cesariana e ainda não estava em trabalho de parto e também apresentava hidroalantoide.

Todos os procedimentos de cuidados neonatais foram semelhantes aos dos outros bezerros, mas não foi administrado o surfactante. O bezerro nasceu com peso adequado, embora ainda fosse mais pesado que a média do Grupo Controle. Apresentou avaliação de APGAR ruim 5 minutos após o nascimento (quadro 6). O fato de estar ligeiramente tingido por mecônio pode indicar que houve sofrimento fetal. Havia grande quantidade de líquido amniótico com viscosidade muito alta. Durante o estímulo com o jato de água, o bezerro eliminou uma quantidade grande de líquido amniótico pela boca. Tinha reflexos e frequência cardíaca normais (135bpm) imediatamente após o nascimento. No entanto, durante os procedimentos de coleta de material biológico para exames, o bezerro teve bradicardia e parada cardíaca. A bradicardia foi corrigida com a administração de 20mg de sulfato de atropina intravenoso e a parada cardíaca foi revertida com massagem cardíaca. O fato de a bradicardia ter sido revertida por meio da administração de atropina pode indicar que o quadro tenha sido decorrente da vagotonia. A quantidade de oxigênio administrada foi elevada de 5L/min para 10L/min nas primeiras horas de vida. Houve rompimento do cordão umbilical, o que provocou a retração dos vasos umbilicais para a cavidade abdominal, impedindo que fosse feita a obliteração de maneira adequada. As características clínicas do bezerro ao nascimento podem ser observadas no quadro 6.

Quadro 6 – Principais características clínicas do bezerro clonado 27 ao nascer

Parâmetros	**Avaliação**
Peso ao nascer	41Kg
APGAR imediatamente após o parto	6
APGAR aos 5 minutos de vida	3 a 4
Tingido por mecônio	Ligeiramente tingido por mecônio
Tempo até a liberação do mecônio	...
Tentativa de permanecer em estação	No primeiro dia de vida
Aparecimento do reflexo de sucção	11 horas após o nascimento
Temperatura ao nascer	40,3ºC
Frequência cardíaca	135bpm, arritmia, depois evoluiu para bradicardia
Frequência respiratória	...
Coloração de mucosas	Cianóticas ao nascimento
Funções vitais	Mucosas cianóticas ao nascimento, ficaram normocoradas em 48 horas. Edema na extremidade do membro anterior. Sem sinais de desidratação ou insuficiência cardíaca. Na auscultação cardíaca havia reforço da 1ª bulha
Avaliação pulmonar	Respiração costoabdominal de amplitude normal, ausência de tose, estridor, fluxo nasal ou muco na boca e sem alterações na palpação do tórax. Na auscultação dos pulmões, observou-se respiração rude
Avaliação do umbigo	Comprimento do cordão: 0cm Espessura: 2 dedos Estruturas visíveis: nenhuma Pulso arterial: negativo Houve rompimento do cordão umbilical, as artérias retraíram para a cavidade abdominal. Percebia-se pulso das duas estruturas e hemorragia umbilical (hematoma umbilical de 3 a 5cm de diâmetro) Ausência de persistência do úraco
Outras observações	Apresentou hipoglicemia, mas não apresentou hipotermia, embora tivesse tido uma queda de 2ºC de temperatura em 30 minutos Precisou receber o colostro por sonda nasoesofágica.

Não houve alterações eritrocitárias neste bezerro, exceto uma elevação discreta do hematócrito no 4º dia de vida (tabela 36). As plaquetas seguiram o padrão normal dos outros bezerros, ou seja, estava baixa ao nascimento e teve sua contagem elevada no avançar da idade. No leucograma observou-se leucocitose por neutrofilia durante todo o período observado.

Tabela 36 – Parâmetros hematológicos do bezerro clonado 27 nos tempos preconizados para coleta (H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120).

Parâmetro	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{60}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Hemácias ($x10^6/mm^3$)	7,5	6,1	6,5	…	6,3	…	…	6,4	6,7
Hematócrito (%)	34,4	27,5	28,7	…	26,7	…	…	26,6	28,1
Hemoglobina (g/dL)	10,5	8,8	9,0	…	9,0	…	…	8,9	9,6
VCM (fL)	45,9	45,1	44,0	…	42,2	…	…	41,8	42,0
CHCM (%)	30,5	32,0	31,4	…	33,7	…	…	33,5	34,2
Plaquetas ($x10^3/mm^3$)	504	454	432	…	548	…	…	730	1615
Leucócitos ($/mm^3$)	14900	13400	11400	…	14200	…	…	16500	19300
Bastonetes ($/mm^3$)	0	268	0	…	0	…	…	0	0
Segmentados ($/mm^3$)	10579	10988	10488	…	13348	…	…	15180	16598
Linfócitos ($/mm^3$)	4023	1742	912	…	852	…	…	1320	2702
Eosinófilos ($/mm^3$)	0	134	0	…	0	…	…	0	0
Monócitos ($/mm^3$)	298	268	0	…	0	…	…	0	0
Basófilos ($/mm^3$)	0	0	0	…	0	…	…	0	0
PPT (g/dL)	4,4	4,8	6,0	…	5,6	…	…	6,6	4,8

Tabela 37 – Parâmetros bioquímicos do bezerro clonado 27nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120).

Parâmetro	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Ureia (mg/dL)	58,4	59,3	31,8	…	21,5	...	19	22,4
Creatinina (mg/dL)	0,95	1,04	0,72	…	0,40	…	0,40	0,4
AST (UI/L)	14,3	10,4	64,5	…	139,0	…	68,3	77,2
FA (UI/L)	241	264	183	…	241	…	19	193
Bilirrubina (mg/dL)	0,50	0,52	1,67	…	…	…	3,84	3,96
GGT (UI/l)	…	…	36,3	…	208,0	…	131	141
Glicose (mg/dL)	73,8	69,5	96,3	…	108	…	127	99,2
Lactato (mmol/L)	11,2	6,2	12,3	…	4,5	…	4,3	…

A elevação da ureia nas primeiras 12 horas de vida foi a alteração mais marcante na série bioquímica deste bezerro (tabela 37). A concentração de ureia depende da nutrição e está relacionada com alterações renais e desidratação. A ingestão de colostro não afeta a concentração de ureia e, ao nascimento, ela se apresenta diminuída, elevando-se apenas aos 60 dias de idade (KLINKON & JEZEK, 2012).

De acordo com a análise da hemogasometria tanto venosa (tabela 38) quanto arterial (tabela 39), o bezerro apresentou acidose metabólica e elevação da concentração do lactato sérico durante todos os tempos de coleta, exceto no último tempo, com 48 horas de vida, quando houve recuperação da acidose e retorno do ácido lático aos valores normais. Neste momento, houve hipocalemia e hipercalcemia. É comum bezerros nascerem acidóticos, mas esse quadro se reverte com a respiração e a filtração renal. A hipercapnia é frequente nos bezerros recém-nascidos e costuma haver retorno aos valores normais após o segundo dia de vida (LISBOA et al., 2002). De acordo com a interpretação dos dados da hemogasometria arterial, este bezerro já mostrava sinais de adaptação adequada à vida extrauterina 48 horas após o nascimento.

Os sinais vitais do bezerro clonado 27 (tabela 40) não mostra as alterações que ocorreram durante a manipulação do bezerro porque foram aferida após a estabilização do quadro clínico.

Tabela 38 – Parâmetros hemogasométricos do sangue venoso do bezerro clonado 27 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120)

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
pH	7,19	7,19	7,32	7,44	…	…	…	…	7,32
PO2 (mmHg)	22,3	29,7	27,7	28,0	…	…	…	…	23,2
PCO2 (mmHg)	55,0	60,5	45,0	41,3	…	…	…	…	57,8
SO2 (%)	24,4	39,5	44,9	56,0	…	…	…	…	34,7
Na (mmol/L)	136,7	138,6	141,8	136,3	…	…	…	…	130,3
K (mmol/L)	5,4	4,1	4,1	3,6	…	…	…	…	4,0
iCa (mmol/L)	1,4	1,3	1,3	1,3	…	…	…	…	1,2
Cl (mmol/L)	98,1	98,4	100,6	96,4	…	…	…	…	92,9
cHCO3 (mmol/L)	20,7	22,7	22,6	27,6	…	…	…	…	29,0
BE (mmol/L)	-7,6	-6,5	-3,3	3,2	…	…	…	…	1,9

Tabela 39 – Parâmetros hemogasométricos do sangue arterial do bezerro clonado 27 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120)

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
pH	7,41	7,36	7,33	7,37	7,45	7,47	…	7,23	7,50
PO2 (mmHg)	19,3	22,6	38,1	60,9	45,1	53,4	…	50,3	60,2
PCO2 (mmHg)	34	36,9	49,4	39,7	35,2	36,7	…	65,4	35,3
SO2 (%)	29,4	34,6	67,3	89,8	83,4	89,6	…	76,9	93,3
Na (mmol/L)	130,8	132,7	140,6	140,6	137,7	135,6	…	134,9	131,6
K (mmol/L)	5,9	5,6	4,2	4,6	3,8	3,0	…	3,5	3,9
iCa (mmol/L)	1,2	1,3	1,2	1,3	1,3	1,3	…	1,2	1,2
Cl (mmol/L)	98,6	95,2	99,3	100,7	99,3	96,7	…	94,6	95,2
cHCO3 (mmol/L)	21	20,2	25,3	22,3	24,1	25,8	…	26,9	29,2
BE (mmol/L)	-3	-4,7	-1,1	-2,8	0,4	2,3	…	-1,9	5,2
AG (mmol/L)	17,1	22,8	20,2	21,8	18,1	16,1	…	16,9	11,6

Tabela 40 – Sinais vitais do bezerro clonado 27 nos tempos de coleta preconizados.

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Temperatura retal (ºC)	38,6	38,5	39,0	40,5	39,4	39,3	39,6	39,2	39,5
Frequência cardíaca (bpm)	156	154	148	144	174	168	160	140	136
Frequência respiratória (mpm)	52	60	40	52	50	32	44	30	32

6.2.8. Clone 28

O bezerro 28 nasceu no dia 17/09/2010 às 10h52min. Era da mesma linhagem celular dos clones citados anteriormente. A indução do parto foi realizada da mesma forma como nos outros bezerros. A cesariana ocorreu 37 horas após a indução com dexametasona, A cérvix tinha 1,5 a 2,0 dedos de dilatação e havia sinais de relaxamento do ligamento sacro-isquiático e edema de vulva. As glândulas mamárias não estavam desenvolvidas e a receptora apresentou cetonúria (+++) e elevação do beta-hidroxibutirato. Apesar disso, o bezerro nasceu em ótimas condições. Os cuidados neonatais foram semelhantes ao dos outros animais. Não foi utilizado surfactante, mas foram administrados 50mg de cloridrato de isoxsuprine na receptora no momento da cesariana. As principais características clínicas deste

bezerro observadas ao nascimento encontram-se no quadro 7 e os resultados dos principais parâmetros sanguíneos estão nas tabelas 41, 42, 43, 44 e 45.

Quadro 7 – Principais características clínicas do bezerro clonado 28 ao nascer

Parâmetro	**Avaliação**
Peso ao nascer	40,8Kg
APGAR imediatamente após o parto	8
APGAR aos 5 minutos de vida	8
Tingido por mecônio	Levemente tingido por mecônio
Tempo até a liberação do mecônio	Três minutos após o nascimento
Tentativa de permanecer em estação	...
Aparecimento do reflexo de sucção	30 minutos após o nascimento
Temperatura ao nascer	39,8ºC
Frequência cardíaca	136 bpm
Frequência respiratória	96 mpm
Coloração de mucosas	Normocoradas
Resposta aos estímulos	
Avaliação do aparelho circulatório	Ausência de edema ou sinais de desidratação e de insuficiência cardíaca. Apresenta auscultação normal.
Avaliação pulmonar	Não foi utilizado surfactante Respiração costo-abdominal, amplitude normal Apresentava fluxo nasal catarral levemente amarelado. Na palpação do tórax havia presença de estertor vibrante sonoro Na auscultação pulmonar notou-se respiração rude, presença de estertor seco roncoso, estertor seco sibilante, estertor úmido crepitante e estertor úmido bolhoso
Avaliação do umbigo	Comprimento do cordão: 15cm Espessura: 2 dedos Estruturas visíveis: 1 artéria umbilical Presença de exsudato seroso Pulso arterial: negativo Não havia persistência do úraco

Não havia alterações clínicas no momento do nascimento (quadro 7). O bezerro nasceu aparentemente normal de acordo com as avaliações de seu quadro clinicamente.

Tabela 41 – Parâmetros hematológicos do bezerro clonado 28 nos tempos preconizados para coleta (H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120).

Parâmetro	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{60}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Hemácias ($x10^6/mm^3$)	7,98	...	7,26	...	7,93	...	7,76	7,53	7,46
Hematócrito (%)	39,1	…	33,5	…	36,6	…	35,2	33,7	33,1
Hemoglobina (g/dL)	11,9	…	11,2	…	12,0	…	11,7	11,4	11,4
VCM (fL)	49,0	…	46,1	…	46,2	…	45,4	44,8	44,4
CHCM (%)	30,4	…	33,4	…	32,8	…	33,2	33,8	34,4
Plaquetas ($x10^3/mm^3$)	383	…	418	…	418	…	688	872	1156
Leucócitos ($/mm^3$)	13700	…	19000	…	19700	…	18600	8100	6200
Bastonetes ($/mm^3$)	0	…	0	…	0	…	0	0	0
Segmentados ($/mm^3$)	8220	…	17860	…	18518	…	16926	6318	4154
Linfócitos ($/mm^3$)	4932	…	1140	…	1182	…	1674	1782	2046
Eosinófilos ($/mm^3$)	0	…	0	…	0	…	0	0	0
Monócitos ($/mm^3$)	548	…	0	…	0	…	0	0	0
Basófilos ($/mm^3$)	0	…	0	…	0	…	0	0	0
PPT (g/dL)	4,8	…	5,0	…	6,8	…	5,6	4,9	4,6

As características do hemograma do bezerro 28 foram muito parecidas com as dos demais bezerros clonados (tabela 41). Não havia alterações nos parâmetros eritrocitários, exceto uma elevação discreta no VCM nos primeiros dois dias de vida, indicando que a maturação das hemácias não é completa nesta fase da vida dos bezerros clonados (CHAVATTE-PALMER et al., 2002). As plaquetas tinham contagem baixa nos primeiros dias, atingindo o valor de referência no 3º dia. No leucograma se observou, em todos os tempos estudados, leucocitose por neutrofilia.

Na análise dos parâmetros bioquímicos (tabela 42), notou-se redução da concentração sérica de ureia e creatinina e da atividade de aspartato aminotransferase. Houve elevação da concentração de bilirrubina, indicando uma possível hemólise ou obstrução intra ou extra hepática (RUSSEL e ROUSSEL,

2007). A hiperglicemia deve ser analisada com cautela pois não foi respeitado o período de jejum antes da coleta. Este bezerro foi o único que não apresentou concentrações elevadas de lactato sérico desde o momento do nascimento até o final do período estudado.

Tabela 42 – Parâmetros bioquímicos do bezerro clonado 28 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120).

Parâmetro	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Ureia (mg/dL)	…	23,5	20,6	…	19	19	19	…
Creatinina (mg/dL)	…	0,77	0,61	…	0,73	0,88	1,16	…
AST (UI/L)	…	52,4	32,3	…	35,2	44,7	49,4	…
FA (UI/L)	…	491	351	…	277	261	193	…
Bilirrubina (mg/dL)	…	2,65	2,29	…	1,01	1,25	0,79	…
GGT (UI/l)	…	101,0	72,3	…	51,4	36,5	32,8	…
Glicose (mg/dL)	…	165	187	…	111	92,4	90,7	…
Lactato (mmol/L)	3,4	1,5	4,3	3,1	2,6	…	3,3	3,3

A hemogasometria arterial imediatamente após o nascimento revelou uma alcalose mista metabólica e respiratória (tabela 44). Aproximadamente uma hora depois ocorreu uma inversão no quadro e o bezerro apresentou acidose respiratória. Não havia acidose metabólica associada porque os níveis de lactato estavam normais. A recuperação ocorreu logo no primeiro dia de vida, quando todos os parâmetros já estavam normais. Esta recuperação rápida é relatada em bezerros hígidos por Benesi et al. (1992).

Tabela 43 – Parâmetros hemogasométricos do sangue venoso do bezerro clonado 28 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120)

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
pH	7,35	7,39	…	7,42	…	…	…	7,41	7,41
PO2 (mmHg)	14,2	30,9	…	45,6	…	…	…	29,8	38,1
PCO2 (mmHg)	55,5	56,5	…	54,0	…	…	…	55,6	53,0
SO2 (%)	16,1	59,5	…	83,3	…	…	…	58,8	73,9
Na (mmol/L)	134,4	137,6	…	138,2	…	…	…	133,3	132,2
K (mmol/L)	4,6	4,5	…	3,6	…	…	…	4,0	4,2
iCa (mmol/L)	1,3	1,3	…	1,1	…	…	…	1,3	1,2
Cl (mmol/L)	94,0	96,7	…	96,5	…	…	…	93,0	92,5
cHCO3 (mmol/L)	30,2	33,4	…	34,2	…	…	…	34,4	32,7
BE (mmol/L)	3,5	6,8	…	8,3	…	…	…	8,1	6,6

Os achados da hemogasometria venosa podem ser observados na tabela 43, com resultados muito semelhantes aos da hemogasometria arterial.

Tabela 44 – Parâmetros hemogasométricos do sangue arterial do bezerro clonado 28 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120)

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
pH	7,46	7,45	7,38	7,49	…	…	…	7,48	7,46
PO2 (mmHg)	35,7	64,2	30,8	62,1	…	…	…	118,9	110,6
PCO2 (mmHg)	38,6	46,7	55,5	42,6	…	…	…	44,6	46,0
SO2 (%)	73,0	93,5	58,6	93,9	…	…	…	99,0	98,7
Na (mmol/L)	132,5	136,1	142	136,6	…	…	…	133	131,8
K (mmol/L)	4,2	4,1	3,9	3,6	…	…	…	4,0	4,1
iCa (mmol/L)	1,3	1,3	1,3	1,1	…	…	…	1,2	1,12
Cl (mmol/L)	93	98,9	100,6	98,2	…	…	…	93,7	92,8
cHCO3 (mmol/L)	26,9	31,5	32,4	32,0	…	…	…	32,2	32,1
BE (mmol/L)	3,1	6,5	5,7	7,9	…	…	…	7,7	7,3
AG (mmol/)	16,7	9,7	13	10	…	…	…	11,1	10,9

Os sinais vitais do bezerro clonado 28 estão contidos na tabela 45. Eles revelam taquicardia até as 12 horas de vida. A frequência respiratória e a temperatura estavam normais.

Tabela 45 – Sinais vitais do bezerro clonado 28 nos tempos de coleta preconizados.

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Temperatura retal (ºC)	39,8	38,6	38,9	...	38,3	38,6	39,1	38,6	38,9
Frequência cardíaca (bpm)	180	180	162	...	132	148	166	120	126
Frequência respiratória (mpm)	72	72	40	...	28	38	32	30	24

6.2.9. Clone 29

O bezerro 29 nasceu no dia 17/09/2010 às 13h02min. Era da mesma linhagem celular dos bezerros clonados citados anteriormente. A indução do parto foi realizada da mesma forma como nos outros bezerros. A cesariana ocorreu 43 horas

após a indução com dexametasona, A cérvix tinha um dedo de dilatação e havia relaxamento do ligamento sacro-isquiático, mas não havia alterações no úbere. Os cuidados neonatais foram semelhantes ao dos outros animais. Não foi utilizado surfactante, mas foram administradas 50mg de cloridrato de isoxsuprine na receptora no momento do parto. O líquido amniótico tinha aspecto viscoso e o bezerro estava levemente tingido por mecônio. O bezerro nasceu pequeno e viável, mas estava com hipoglicemia e hiperlactemia ao nascimento. Teve parada cardíaca que foi revertida com atropina (2mL intravenosa). Teve retorno dos batimentos cardíacos, mas a apneia permanecia e as mucosas ficaram cianóticas. Foi administrado 1mL de cloridrato de doxapram intravenoso. Uma sonda nasotraqueal foi utilizada para a retirada de secreções das vias aéreas anteriores, pois, aparentemente, ocorrera aspiração do líquido abomasal. Logo em seguida o bezerro vocalizou. Como os exames laboratoriais indicaram acidose metabólica, foram administrados 70mL de solução de bicarbonato de sódio (8,4%) em solução fisiológica. Para que houvesse ingestão adequada de colostro, foi preciso inserir uma sonda nasoesofágica, pois houve demora em apresentar o reflexo de sucção. A primeira mamada (250mL de colostro) ocorreu somente 8 horas após o nascimento, após a estabilização do quadro clínico. Aproximadamente 24 horas após o nascimento, o bezerro apresentou timpanismo.

A hemogasometria realizada às 12 horas de vida revelou início de alcalose metabólica compensada possivelmente decorrente do uso de glicocorticoide ou da administração do bicarbonato de sódio. No terceiro dia após o nascimento, o bezerro começou a apresentar timpanismo novamente, que foi tratado com N-butilbrometo de hioscina (0,7mg/Kg) e escopolamina e dipirona (83mg/Kg). O animal veio a óbito no terceiro dia de vida. As principais características clínicas deste bezerro observadas ao seu nascimento encontram-se no quadro 8 e os resultados dos principais parâmetros sanguíneos estão nas tabelas 46, 47, 48, 49 e 50. Como os dados da necropsia não foram recuperados, não foi possível discutir as alterações de necropsia em conjunto com os outros parâmetros laboratoriais.

Quadro 8 – Principais características clínicas do clone 29 ao nascer

Parâmetro	**Avaliação**
Peso ao nascer	31,8Kg
APGAR imediatamente após o parto	7 a 8 (reflexo ocular e interdigital presentes)
APGAR aos 5 minutos de vida	4 (logo após o parto teve parada cardíaca)
Tingido por mecônio	Levemente tingido por mecônio
Tempo até a liberação do mecônio	...
Tentativa de permanecer em estação	7 horas após o nascimento
Aparecimento do reflexo de sucção	1ª mamada com 6 horas de vida
Temperatura ao nascer	39,9ºC
Frequência cardíaca	...
Frequência respiratória	...
Coloração de mucosas	Róseas (logo após o parto)
Resposta aos estímulos	Reflexos ocular e interdigital presentes ao nascimento. Após parada cardíaca e ficou cianótico e sem reflexos.
Avaliação do aparelho circulatório	Ausência de edema ou sinais de desidratação. Não havia sinais de sopro na auscultação logo após o nascimento. A ultrassonografia do coração não revelou malformação. Sinais de sopro 20 horas após o nascimento. Ruído adventício sistólico e diastólico com ponto máximo de auscultação na valva semi-lunar aórtica e reforço da 1ª bulha.
Avaliação pulmonar	Respiração costo-abdominal com amplitude normal. Ausência de fluxo nasal e tosse. A auscultação da traqueia e pulmões revelou respiração rude, ruidosa com crepitação e estertores. O ruído respiratório podia ser palpado e auscultado na traqueia.
Avaliação do umbigo	Comprimento do cordão: 5cm Espessura: 2 dedos Estruturas visíveis: uma artéria Presença de exsudato seroso Pulso arterial: negativo Ausência de edema no entorno da artéria umbilical, pouca alteração das estruturas umbilicais espessura normal
Outras observações	Líquido amniótico viscoso

Tabela 46 – Parâmetros hematológicos do bezerro clonado 29 nos tempos preconizados para coleta (H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120).

Parâmetro	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{60}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Hemácias ($x10^6/mm^3$)	8,9	…	7,9	…	…	10,6	9,07	…	…
Hematócrito (%)	35,7	…	32,9	…	…	43,4	37,1	…	…
Hemoglobina (g/dL)	10,8	…	10,3	…	…	13,6	11,7	…	…
VCM (fL)	44,2	…	41,6	…	…	41,1	40,9	…	…
CHCM (%)	30,3	…	31,3	…	…	31,3	31,5	…	…
Plaquetas ($x10^3/mm^3$)	567	…	646	…	…	346	717	…	…
Leucócitos ($/mm^3$)	15800	…	21300	…	…	3300	11400	…	…
Bastonetes ($/mm^3$)	0	…	0	…	…	0	0	…	…
Segmentados ($/mm^3$)	9638	…	20235	…	…	2211	10488	…	…
Linfócitos ($/mm^3$)	6162	…	1065	…	…	1089	912	…	…
Eosinófilos ($/mm^3$)	0	…	0	…	…	0	0	…	…
Monócitos ($/mm^3$)	0	…	0	…	…	0	0	…	…
Basófilos ($/mm^3$)	0	…	0	…	…	0	0	…	…
PPT (g/dL)	5,0	…	5,8	…	…	5,0	5,4	…	…

Não houve alterações eritrocitárias ou leucocitárias no bezerro 29 até as 60 horas de vida, quando houve elevação dos parâmetros eritrocitários com policitemia, porém sem hiperproteinemia (tabela 46). O leucograma apresentou o mesmo comportamento dos outros clones, com leucocitose por neutrofilia. Houve uma queda acentuada da contagem total de leucócitos com 60 horas de vida, apontando uma leucopenia, mas sem neutropenia. As plaquetas, ao contrário dos outros bezerros estiveram sempre dentro do valor de referência, com exceção para o exame realizado com 60 horas de vida, quando houve redução na contagem.

Havia indícios de alteração no perfil renal com a elevação da concentração de creatinina sérica. A elevação da concentração de bilirrubina sérica indicou uma alteração na função hepática nas 48 horas após o nascimento (tabela 47). Tais alterações podem ocorrer devido à hipóxia provocada pelo quadro respiratório que afeta a perfusão e a função destes órgãos (BLEUL, 2009).

Tabela 47 – Parâmetros bioquímicos do bezerro clonado 29 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120).

Parâmetro	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Ureia (mg/dL)	41,6	24,5	34,5	…	75,5	…	…	…
Creatinina (mg/dL)	1,8	1,0	0,9	…	2,4	…	…	…
AST (UI/L)	9,3	95,2	67,1	…	128	…	…	…
FA (UI/L)	975	655	357	…	461	…	…	…
Bilirrubina (mg/dL)	…	2,0	…	…	2,37	…	…	…
GGT (UI/l)	6,2	51,9	…	…	84,1	…	…	…
Glicose (mg/dL)	53	157	136	…	134	…	…	…
Lactato (mmol/L)	10,0	4,2	1,1	…	5,4	…	…	…

A análise da hemogasometria venosa (tabela 48) mostra um quadro de acidose mista respiratória e metabólica. No entanto, a hemogasometria arterial mostra uma alcalose respiratória discreta no mesmo momento em que a hemogasometria venosa mostrava acidose (tabela 48). Há uma divergência nos dois exames. O bezerro clonado 29 nasceu com alcalose respiratória. Porém, houve reversão do quadro uma hora depois, quando todos os parâmetros estavam dentro dos valores de referência. Houve um início de alcalose mista respiratória e metabólica. No primeiro dia de vida, o bezerro não se apresentava com acidose de acordo com a hemogasometria arterial, embora fosse notada uma elevação da pressão de dióxido de carbono, hipocalemia e hipcloremia. Pouco tempo antes do óbito, o bezerro apresentou hipercalemia, que pode acontecer secundariamente à acidose metabólica devido à perda de bicarbonato quando o potássio se move do líquido intracelular para o líquido extracelular (RUSSEL E ROUSSEL, 2007). Em bezerros neonatos deve ser feita uma investigação sobre a possibilidade de uma fluidoterapia oral realizada incorretamente. Também foi observada a hipocalcemia. Esta alteração pode estar relacionada à perda da função da tireoide ou septicemia (KANEKO, 1997). Esta alteração fica inconclusiva uma vez que não foi realizado nenhum tipo de teste para avaliar as funções endócrinas, ou testes para detectar possíveis infecções bacterianas.

Tabela 48 – Parâmetros hemogasométricos do sangue venoso do bezerro clonado 29 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120)

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}
pH	7,11	7,07	…	7,39	...	…	7,23
PO2 (mmHg)	17,9	31,9	…	22,2	…	…	20,1
PCO2 (mmHg)	79,9	80,6	…	57,2	…	…	62,7
SO2 (%)	14,5	35,5	…	38,5	…	…	22,5
Na (mmol/L)	137,1	136,3	…	137,8	…	…	132,8
K (mmol/L)	4,9	4,2	…	4,3	…	…	7,67
iCa (mmol/L)	1,4	1,4	…	1,2	…	…	1,0
Cl (mmol/L)	96	96,2	…	94,5	…	…	90,7
cHCO3 (mmol/L)	25,1	22,9	…	34,4	…	…	25,8
BE (mmol/L)	-5,5	-8,2	…	8,1	…	…	-3,1

Tabela 49 – Parâmetros hemogasométricos do sangue arterial do bezerro clonado 29 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120)

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}
pH	7,48	7,31	7,41	7,41
PO2 (mmHg)	31,9	54,9	58,6	84,8
PCO2 (mmHg)	38,4	58,8	51,3	50,9
SO2 (%)	67,4	84,9	90,9	96,6
Na (mmol/L)	133,7	137,5	141,4	137,4
K (mmol/L)	4,2	3,9	4,3	3,4
iCa (mmol/L)	1,3	1,3	1,3	1,3
Cl (mmol/L)	93,0	95,5	98,2	94,1
cHCO3 (mmol/L)	27,8	28,7	32	31,6
BE (mmol/L)	4,1	1,5	6,3	5,6
AG (mmol/L)	17,1	17,3	15,4	15

Poucos dados relativos aos sinais vitais haviam sido coletados e armazenados, observou-se taquicardia com 24 horas de vida (tabela 50).

Tabela 50 – Sinais vitais do bezerro clonado 29 nos tempos de coleta preconizados.

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Temperatura retal (ºC)	39,9	37,4	...	38,7	38,9	39,0	...	...	...
Frequência cardíaca (bpm)	...	...	...	196	...	...	...	...	...
Frequência respiratória (mpm)	...	...	...	32	...	...	...	...	...

6.2.10. Clone 211

A bezerra 211 nasceu no dia 18/09/2011 à 20h35min. Pertencia a outra linhagem de células cuja doadora era uma vaca da raça Girolanda. A indução do parto foi realizada da mesma forma como nos outros bezerros deste estudo. A cesariana ocorreu 24 horas após a indução com dexametasona. Havia sinais de parto iminente, com relaxamento do ligamento sacro-isquiático, leve edema na vulva, mas pouco desenvolvimento da glândula mamária. A bezerra nasceu com índice APGAR 8, sem acidose respiratória ou metabólica. Porém seu quadro clínico piorou nos 20 minutos seguintes ao seu nascimento. Após a administração do surfactante (53mg/Kg divido em 6 aplicações), a bezerra começou a apresentar hipóxia, cianose e diminuição da amplitude dos movimentos respiratórios. Teve parada cardíaca, imediatamente revertida com a administração de sulfato de atropina. Também foi realizada insuflação artificial dos pulmões. O animal permaneceu nesse estado por aproximadamente 30 segundos. Os cuidados neonatais foram semelhantes ao dos outros animais, exceto pela administração do citrato de sildenafila. Neste caso o animal recebeu 75mg do medicamento nas duas primeiras horas de vida, divididas em três administrações cujas doses são apresentadas na tabela 51. Outra particularidade no tratamento deste animal foi que o volume de oxigênio foi ajustado, imediatamente após o parto, para 10L/min, para estimular o fechamento do ducto arterioso. O restante da medicação seguiu o protocolo que já havia sido realizado nos animais citados anteriormente. As principais características clínicas deste bezerro observadas ao seu nascimento encontram-se no quadro 9 e os resultados dos principais parâmetros sanguíneos estão nas tabelas 52, 53, 54, 55 e 56.

Tabela 51 – Modificação no protocolo de administração do citrato de sildenafila por via oral para a bezerra clonada 211.

	Tempo após o nascimento (minutos)	Quantidade (mg)	Dose (mg/Kg)
1ª administração	1	25	0,56
2ª administração	55	25	0,56
3ª administração	124	25	0,56

Quadro 9 – Principais características clínicas da bezerra clonada 211 ao nascimento

Peso ao nascer	45,0Kg
APGAR imediatamente após o parto	8
APGAR aos 5 minutos de vida	4 a 6 (respiração irregular e fraca, mucosas cianóticas)
Tingido por mecônio	Não
Tempo até a liberação do mecônio	10 horas e 44 minutos após o nascimento
Tentativa de permanecer em estação	1 horas e 10 minutos após o nascimento
Aparecimento do reflexo de sucção	1 horas e 10 minutos após o nascimento
Temperatura ao nascer	39,8ºC
Frequência cardíaca	160bpm
Frequência respiratória	50
Coloração de mucosas	Cianóticas ao nascimento
Avaliação do aparelho circulatório	Desdobramento de bulha, taquicardia Estertor úmido Estertor sibilante Estertor roncoso Observou-se a presença de sopro da 1ª e 2ª bulhas por volta das 4 horas de vida, indicando a persistência do ducto arterioso
Avaliação pulmonar	A princípio havia sinais de adaptação neonatal ao meio externo, mas no decorrer do tempo, houve falha na expansão da caixa torácica e bradipneia (frequência de 20 a 24 mpm) Após a administração de cloridrato de doxapram (1mg/Kg intravenoso) houve aumento da frequência respiratória, a respiração tornou-se mais profunda, costoabdominal. Animal apresentou dispneia expiratória após o seu uso, mas houve melhoras nos parâmetros gasométricos (pH, PO_2, PCO_2) cerca de 10 horas depois do nascimento
Avaliação do umbigo	Comprimento do cordão: 4 a 6cm Espessura: 4 dedos Estruturas visíveis: Ausência de exsudato Pulso arterial: negativo Pela palpação, não foi identificado edema no entorno da artéria umbilical

Tabela 52 – Parâmetros hematológicos da bezerra clonada 211 nos tempos preconizados para coleta (H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120).

Parâmetro	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{60}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Hemácias ($x10^6/mm^3$)	7,9	8,2	7,2	…	7,5	7,2	7,1	7,1	6,7
Hematócrito (%)	36,3	36,8	31,1	…	31,2	28,9	28,4	28,6	27,1
Hemoglobina (g/dL)	10,4	10,8	9,3	…	9,7	9,4	9,3	9,3	8,9
VCM (fL)	45,7	44,7	43,3	…	41,7	40,4	40,1	40,3	40,4
CHCM (%)	28,7	29,3	29,9	…	31,1	32,5	32,7	32,5	32,8
Plaquetas ($x10^3/mm^3$)	569	327	499	…	494	557	715	1180	1749
Leucócitos ($/mm^3$)	23000	29000	24900	…	20900	14600	14400	15400	31400
Bastonetes ($/mm^3$)	0	3	0	…	0	0	0	0	0
Segmentados ($/mm^3$)	17020	24360	24153	…	20064	12994	12384	12936	27946
Linfócitos ($/mm^3$)	5520	3190	747	…	836	1606	2016	2464	2826
Eosinófilos ($/mm^3$)	0	0	0	…	0	0	0	0	0
Monócitos ($/mm^3$)	460	580	0	…	0	0	0	0	628
Basófilos ($/mm^3$)	0	0	0	…	0	0	0	0	0
PPT (g/dL)	5,2	5,2	…	…	6,8	6,6	…	…	6,1

A bezerra clonada 211 não apresentou alterações eritrocitárias, porém teve leucocitose por neutrofilia que persistiu durante quase todo o tempo do estudo (tabela 52). Houve uma redução por volta do terceiro dia, provavelmente devido à administração de antibacterianos e anti-inflamatórios. Mas no 5º dia a contagem de leucócitos voltou a aumentar. As plaquetas estavam baixas ao nascimento, e atingiram valores normais no terceiro dia.

Tabela 53 – Parâmetros bioquímicos da bezerra clonada 211 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120).

Parâmetro	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Ureia (mg/dL)	52,3	40,1	33,9	…	27,8	…	…	…
Creatinina (mg/dL)	1,4	1,2	1,0	…	0,8	1,7	…	…
AST (UI/L)	10,1	21,7	58,8	…	148,0	51,3	…	…
FA (UI/L)	…	…	…	…	…	…	…	…
Bilirrubina (mg/dL)	0,5	0,5	1,0	…	1,7	0,7	…	…
GGT (UI/l)	4,9	6,7	15,6	…	374,0	78,5	…	…
Glicose (mg/dL)	73	129	57	…	127	131	124	146
Lactato (mmol/L)	10,9	8,4	10,7	…	4,2	5,8	3,9	2,1

A ureia se apresentou elevada no primeiro momento após o nascimento, mas logo retornou aos valores normais (tabela 53). A concentração sérica de creatinina e a atividade sérica de AST estavam baixas. A GGT se apresentou diminuída a partir das 12 horas de vida. Embora não haja suspeita de alteração hepática, a preocupação paira sobre a falha na transmissão da imunidade passiva (COSTA et al., 2008). Os níveis de lactato só baixaram após o quinto dia. Não ocorreu hiperglicemia como nos outros clones, assemelhando-se aos resultados de GARRY et al.(1996), CHAVATTE-PALMER et al.(2002) e BATCHELDER et al. (2007b).

Tabela 54 – Parâmetros hemogasométricos do sangue venoso da bezerra clonada 211 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120)

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Ph	6,98	7,02	7,27	7,27	7,44	7,40	7,48	7,37	7,42
PO2 (mmHg)	30,8	50,0	23,5	30,2	41,6	29,7	33,5	30,5	23,9
PCO2 (mmHg)	113,3	128,3	60,5	61,3	42,6	43,8	42,3	44,1	49,4
SO2 (%)	28,2	62,4	31,9	47,9	79,9	56,9	71	55,3	44,6
Na (mmol/L)	138,8	137,7	142,8	139,5	135,6	141,3	141,8	146,7	135,9
K (mmol/L)	3,7	4,2	4,9	4,3	3,9	4,9	4,2	4,4	3,2
iCa (mmol/L)	1,5	1,4	1,3	1,4	1,2	1,2	1,4	1,3	1,5
Cl (mmol/L)	97,8	95,9	100,6	99,3	100,4	101,1	100,2	107,5	93,9
cHCO3 (mmol/L)	25,9	32,0	27,0	27,7	28,5	26,8	30,7	24,6	31,6
BE (mmol/L)	-7,5	-1,7	-0,8	0	4,0	1,8	6,6	-0,8	6,3

Tabela 55 – Parâmetros hemogasométricos do sangue arterial da bezerra clonada 211 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120)

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
pH	7,015	7,197	7,347	7,364	…	7,441	7,500	7,455	7,442
PO2 (mmHg)	32,0	87,6	88,8	82,5	…	49,9	43,7	33,9	31,0
PCO2 (mmHg)	106,8	77,6	43,8	51,8	…	36,7	39,3	46,7	45,9
SO2 (%)	32,5	93,8	96,1	95,7	…	86,6	84,9	70,2	63,3
Na (mmol/L)	138,2	138,5	142,1	140,2	…	139,8	137,9	140,2	134,5
K (mmol/L)	3,67	3,84	4,65	4,47	…	4,36	3,96	3,5	3,29
iCa (mmol/L)	1,334	1,273	1,267	1,291	…	1,279	1,415	1,311	1,420
Cl (mmol/L)	99,3	97,6	101,8	98,4	…	99,3	100,5	95,6	93,2
cHCO3 (mmol/L)	26,7	29,4	23,4	28,8	…	24,4	30,0	32,2	30,6
BE (mmol/L)	-6,1	-0,1	-2,2	2,7	…	0,5	6,3	7,3	5,7
AG (mmol/)	15,9	15,4	21,5	17,5	…	20,5	11,4	16,0	14,0

Tabela 56 – Sinais vitais do bezerro clonado 211 nos tempos de coleta preconizados.

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Temperatura retal (ºC)	39,8	37,7	38,3	38,7	38,7	39,1	39,3	39,5	38,8
Frequência cardíaca (bpm)	160	160	112	150	162	139	156	156	144
Frequência respiratória (mpm)	50	28	44	44	60	64	45	36	52

A bezerra clonada 211 apresentou acidose desde o momento do nascimento, tanto na avaliação da hemogasometria venosa (tabela 54) quanto na hemogasometria arterial (tabela 55). O quadro somente se reverteu no quarto dia. A princípio a acidose foi classificada como respiratória (H1). Doze horas depois este quadro evoluiu para acidose metabólica com redução do íon bicarbonato e elevação de lactato. Às 24 horas de vida, ela apresentou acidose mista respiratória e metabólica. Aos dois dias, contrariando Benesi (1992), ainda não havia a regressão das alterações gasométricas. Essa regressão ocorreu somente no quinto dia. Os parâmetros vitais da bezerra se apresentaram normais na maior parte do tempo.

6.2.11. Clone 212

A bezerra clonada 212 nasceu no dia 19/09/2011 às 12h51min. Era da mesma linhagem celular da bezerra 211. A receptora apresentava poucos sinais de aproximação do momento do parto: relaxamento discreto do ligamento sacro-isquiático, edema de mama ausente, cérvix completamente aberta indicando fase de dilatação do parto. Após o nascimento, não foi realizado o pêndulo. Nasceu com índice APGAR adequado, mas logo após o parto começou a apresentar depressão respiratória, bradicardia e arritmia. Foi feita a administração de sulfato de atropina intravenosa e cloridrato de doxapram nas doses apresentadas na tabela 2, além de respiração artificial para insuflar os pulmões. Após estes procedimentos, o animal voltou a apresentar movimentos respiratórios normais. Este fato pode ter colaborado com a elevação da pressão parcial de dióxido de carbono (PCO_2). Foi realizada a

medicação habitual, inclusive a administração de surfactante (cinco administrações de 400mg, somando 2000mg na primeira hora de vida).

Quadro 10 – Principais características clínicas da bezerra cloneda 212 ao nascer

Parâmetro	**Avaliação**
Peso ao nascer	43,4Kg
APGAR imediatamente após o parto	8
APGAR aos 5 minutos de vida	4 a 6 (mucosa cianótica, respiração irregular e fraca)
Tingido por mecônio	Não
Tempo até a liberação do mecônio	...
Tentativa de permanecer em estação	2 horas e 30 minutos após o nascimento
Aparecimento do reflexo de sucção	5 horas e 22 minutos após o nascimento
Temperatura ao nascer	39,0ºC
Frequência cardíaca	80
Frequência respiratória	22
Coloração de mucosas	Cianóticas
Avaliação do aparelho circulatório	Mucosas cianóticas e bradicardia no momento do parto voltaram à cor normal após restabelecimento dos movimentos respiratórios. Ausência de edema e desidratação Ausência de sinais de insuficiência cardíaca Observou-se sopro de base cardíaca na 1ª e 2ª bulha decorrente de peristência do ducto arterioso, que desapareceu com a evolução do quadro clínico
Avaliação pulmonar	Cianose foi revertida após restabelecimento dos movimentos respiratórios. Havia estertor úmido, seco, crepitações, presença de líquido Traqueia tinha diâmetro normal
Avaliação do umbigo	Comprimento do cordão: Espessura: 3 dedos Estruturas visíveis: artérias e veia, úraco Presença de exsudato: negativo Pulso arterial: ausente Ausência de hematoma no entorno da artéria Persistência do úraco

Tabela 57 – Parâmetros hematológicos da bezerra clonada 212 nos tempos preconizados para coleta (H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120).

Parâmetro	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{60}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Hemácias ($x10^6/mm^3$)	8,2	…	7,5	7,3	7,1	7,7	7,0	9,5	7,1
Hematócrito (%)	38,1	…	32,7	30,2	28,7	31,3	28,6	28,4	28,2
Hemoglobina (g/dL)	10,6	…	9,9	9,8	9,3	10,3	9,1	9,5	9,5
VCM (fL)	46,7	…	43,9	41,2	40,5	40,7	41,0	40,9	40,0
CHCM (%)	27,8	…	30,3	32,5	32,4	32,9	31,8	33,5	33,7
Plaquetas ($x10^3/mm^3$)	696	…	521	541	576	523	763	716	1009
Leucócitos ($/mm^3$)	16200	…	20000	11400	16100	16900	24600	25900	29100
Bastonetes ($/mm^3$)	0	…	0	0	0	0	0	0	0
Segmentados ($/mm^3$)	11016	…	19000	10374	14812	15041	22386	22792	26190
Linfócitos ($/mm^3$)	5184	…	1000	1026	1288	1859	2214	2590	2619
Eosinófilos ($/mm^3$)	0	…	0	0	0	0	0	0	0
Monócitos ($/mm^3$)	0	…	0	0	0	0	0	518	291
Basófilos ($/mm^3$)	0	…	0	0	0	0	0	0	0
PPT (g/dL)	…	…	6,4	6,4	…	…	7,2	7,0	6,7

Os parâmetros eritrocitários da bezerra 212 não apresentaram alterações (tabela 57). A contagem de plaquetas mostrou-se com valores sempre dentro do normal e crescente no avançar da idade. O leucograma revelou leucocitose por neutrofilia em todos os tempos de coleta, mesmo com a administração dos medicamentos.

Tabela 58 – Parâmetros bioquímicos da bezerra clonada 212 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120).

Parâmetro	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Ureia (mg/dL)	37,0	…	22,2	…	…	…	…	…
Creatinina (mg/dL)	1,5	…	1,0	0,8	…	…	…	…
AST (UI/L)	11,8	…	74,4	82,8	…	…	…	…
FA (UI/L)	…	…	…	…	…	…	…	…
Bilirrubina (mg/dL)	0,5	…	1,1	1,3	…	…	…	…
GGT (UI/l)	8,3	…	476,0	174,0	…	…	…	…
Glicose (mg/dL)	126,0	…	96,0	132,0	91,0	155,0	117,0	92,0
Lactato (mmol/L)	8,6	…	7,3	1,7	2,9	1,6	1,1	1,8

Os parâmetros bioquímicos podem ser observados na tabela 58. A GGT se elevou do momento do nascimento até 48 horas, mas não o suficiente para indicar a transmissão da imunidade passiva (COSTA et al., 2008). Como nos outros controles havia hiperglicemia e elevação do lactato, esta última alteração caracterizou o quadro de acidose metabólica.

Tabela 59 – Parâmetros hemogasométricos do sangue venoso da bezerra clonada 212 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120)

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
pH	7,35	7,02	7,47	7,44	7,44	7,47	7,43	7,39	7,38
PO2 (mmHg)	13,6	50,0	33,7	34,1	22,1	35,3	25,0	28,4	42,9
PCO2 (mmHg)	61,5	128,3	46,1	52,2	49,2	44,3	50,9	44,0	46,3
SO2 (%)	15,1	62,4	71,2	69,9	40,4	73,6	47,9	52,6	77,6
Na (mmol/L)	133,4	137,7	138,7	139,8	137,4	138,0	140,2	138,2	139,0
K (mmol/L)	5,6	4,2	4,4	4,8	4,1	4,6	3,6	3,8	4,0
iCa (mmol/L)	1,4	1,4	1,3	1,2	1,2	1,2	1,3	1,4	1,2
Cl (mmol/L)	93,3	95,9	96,9	98,2	97,7	99,3	95,7	100,9	101,5
cHCO3 (mmol/L)	33,2	32,0	32,8	34,7	32,3	31,7	32,8	26,9	26,8
BE (mmol/L)	5,5	-1,7	8,2	9,2	7,1	7,2	7,3	0,8	1,4

Tabela 60 – Parâmetros hemogasométricos do sangue arterial da bezerra clonada 212 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120)

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
pH	…	7,37	…	7,41	7,49	7,49	7,50	7,46	7,45
PO2 (mmHg)	…	55,6	…	54,9	68,7	44,2	61,6	59,3	61,9
PCO2 (mmHg)	…	62,5	…	51,7	44,3	39,5	39,3	35,1	38,1
SO2 (%)	…	88,2	…	88,9	95,3	85,0	93,9	91,8	92,7
Na (mmol/L)	…	136,6	…	138,8	137,4	138,4	143,1	137,3	134,1
K (mmol/L)	…	4,7	…	4,6	4,5	4,2	4,2	3,8	4,5
iCa (mmol/L)	…	1,4	…	1,3	1,2	1,3	1,3	1,3	1,2
Cl (mmol/L)	…	95,6	…	98,8	97,1	99,0	100,1	101,8	100,1
cHCO3 (mmol/L)	…	35,2	…	21,8	32,7	29,8	30,2	24,1	25,9
BE (mmol/L)	…	8,0	…	6,0	8,4	6,1	6,6	0,5	1,9
AG (mmol/L)	…	10,5	…	12,8	12,1	13,7	12,9	15,2	12,6

Tabela 61 – Sinais vitais do bezerro clonado 212 nos tempos de coleta preconizados.

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1	H_{12}	H_{24}	H_{36}	H_{48}	H_{72}	H_{96}	H_{120}
Temperatura retal (ºC)	38,1	37,4	38,3	38,6	39,1	38,6	39,5	39,1	38,9
Frequência cardíaca (bpm)	152	160	160	140	141	168	152	148	140
Frequência respiratória (mpm)	64	56	80	80	88	60	94	40	50

De acordo com a análise da hemogasometria venosa (tabela 59) e da hemogasometria arterial (tabela 60), notou-se que, logo após o parto, a bezerra apresentou um distúrbio misto acidose alcalose (BOOKALLIL, 2009), sem alteração no pH, mas com elevação da pressão parcial de dióxido de carbono e elevação de bicarbonato. No dia seguinte o animal apresentava acidose metabólica com hipercalemia. Aos dois dias de idade, não havia alteração do pH sanguíneo, mas havia uma redução na pressão de oxigênio. No segundo dia de vida os parâmetros já haviam atingido os níveis normais. Os sinais vitais da bezerra clonada 212 não apresentaram muitas alterações durante o tempo do estudo (tabela 61).

6.2.12. Clone 213

A bezerra clonada 213 pertencia à mesma linhagem celular dos clones 211 e 212. Esta bezerra morreu aproximadamente uma hora após o nascimento. Os dados referentes ao seu nascimento não foram armazenados e guardados. Foi possível recuperar apenas os resultados de duas análises de hemogasometria venosa (tabela 62) e duas de hemogasometria arterial (tabela 63) que foram realizadas nesse tempo. Ao nascimento, a bezerra apresentou acidose mista respiratória e metabólica. A pressão de dióxido de carbono estava significativamente elevada. Nesse momento também foi notado hipercalemia, hipercalcemia e hipocloremia, demonstrando um distúrbio eletrolítico e ácido-base grave. Na segunda avaliação da hemogasometria arterial, o painel se manteve, mas dessa vez, havia redução do íon bicarbonato, o que agravou ainda mais o quadro de acidose. O desfecho foi o óbito causado, possivelmente, pela não expansão dos pulmões, o que impediu as trocas gasosas e a manutenção da homeostase.

Tabela 62 – Parâmetros hemogasométricos do sangue venoso da bezerra clonada 213 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120)

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1
pH	7,250	6,798
PO2 (mmHg)	17,2	20,1
PCO2 (mmHg)	61,7	186,9
SO2 (%)	17,8	9,7
Na (mmol/L)	133,2	142,3
K (mmol/L)	5,69	5,35
iCa (mmol/L)	1,422	1,351
Cl (mmol/L)	93,4	99,2
cHCO3 (mmol/L)	26,5	28,3
BE (mmol/L)	-1,4	-11,0

Tabela 63 – Parâmetros hemogasométricos do sangue arterial do Bezerro clonado 213 nos tempos preconizados para coleta (H0,5; H1; H12; H24; H36; H48; H72; H96; H120)

Parâmetro	$H_{0,5}$	H_1
pH	6,888	6,808
PO2 (mmHg)	27,6	51,5
PCO2 (mmHg)	120,8	123,6
SO2 (%)	19,3	46,1
Na (mmol/L)	137,5	138,6
K (mmol/L)	4,71	4,49
iCa (mmol/L)	1,398	1,415
Cl (mmol/L)	97,5	97,1
cHCO3 (mmol/L)	22,5	19,2
BE (mmol/L)	-11,1	-15,5
AG (mmol/L)	22,2	26,8

6.3. DISCUSSÃO SISTEMÁTICA DOS PRINCIPAIS ACHADOS NOS PARÂMETROS CLÍNICOS, HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E DE HEMOGASOMETRIA EM BEZERROS CLONADOS POR SCNT

Neste estudo, 12 bezerros clonados por SCNT que nasceram vivos foram estudados no período perinatal (até 72 horas) para avaliar suas condições de

saúde. Os dados obtidos nos exames clínicos e laboratoriais fora comparados com os dados de bezerros não clonados, oriundos de inseminação artificial (n=4) e monta natural (n=3). Quatro bezerros clonados (Grupo Clone) vieram a óbito neste período. Outros cinco bezerros morreram depois do período perinatal (até 30 dias após o nascimento) por causas diversas relacionadas a complicações decorrentes de infecções como, por exemplo, onfaloflebite e pneumonia. Gary et al. (1996) relataram que bezerros clonados retornaram ao hospital veterinário após receberem alta hospitalar, diagnosticados com infecções umbilicais, diarreia, pneumonia, deformidades flexurais dos membros e septicemia. Em nosso estudo, de 12 bezerros clonados nascidos vivos, três bezerros sobreviveram após alta hospitalar (25%). Essa alta mortalidade neonatal (75%) tem sido relatada em alguns trabalhos: quatro de oito clones no trabalho de Kato et al. (1998); um de dois clones no trabalho de Wells et al. (1998). Outros trabalhos foram mais bem sucedidos: Batchelder et al. (2007a) tiveram um clone morto de oito; 21 de 31 no trabalho de Brisville et al. (2011) e Wells et al. (1999) não tiveram nenhuma mortalidade neonatal em 10 clones.

A síndrome do bezerro gigante ou macrossomia é uma alteração frequente em bovinos clonados. Houve uma variabilidade alta dos pesos dos animais do Grupo Clone (31,8 a 61,0Kg) quando comparado ao Grupo Controle (26 a 28Kg). Curiosamente, os bezerros clonados mais pesados (61Kg e 52,5Kg) e o bezerro mais leve (31,8Kg) apresentaram alterações que conduziram ao óbito no período perinatal. Provavelmente, as alterações placentárias que não permitiram o desenvolvimento adequado do feto atuaram sistemicamente sobre o organismo dos animais. Outros trabalhos obtiveram animais com pesos entre 26,4 e 67,3Kg (GARRY et al., 1996), 44,0 e 58,6 (HILL et al., 1999),16 e 62Kg (MEIRELLES et al., 2010). O peso ao nascer variou muito entre os bezerros, mesmo naqueles originados do mesmo embrião, sugerindo influências diversas no padrão de crescimento entre bezerros geneticamente idênticos. Wilson et al. (1995) perceberam alta variabilidade de peso entre bezerros clonados quando comparados aos bezerros com mesmo parentesco produzidos por inseminação artificial ou por transferência de embriões, sugerindo que esta variação estaria limitada ao desenvolvimento intrauterino. Alguns pesquisadores propõem que esta síndrome esteja relacionada com alterações no metabolismo placentário ou fetal de

carboidratos, semelhante ao observado nos quadros de diabetes gestacional em humanos (DE SOUSA et al., 2001; BIRGEL JUNIOR et al., 2011). Alterações hormonais encontradas em algumas pesquisas apontam para distúrbios na regulação da energia intrauterina que seriam responsáveis pela síndrome do bezerro gigante e por outras anormalidades observadas nos clones (GARRY et al., 1996; CHAVATTE-PALMER et al., 2004). Batchelder et al. (2007a), por outro lado, sugeriram que o peso ao nascer elevado estaria relacionado a um efeito do doador da célula, visto que observaram a elevação do peso em apenas uma raça das duas estudadas.

Todos os bezerros clonados eram diferentes nas características clínicas em comparação com bezerros não clonados. Alguns nasceram debilitados e apresentavam enfermidades diversas, principalmente de origem cardiorrespiratória. Algumas alterações nos parâmetros clínicos analisados indicam situações de risco para qualquer bezerro neonato. São eles: tingimento do pêlo por mecônio, demora em aparecer o reflexo de sucção, demora em permanecer em estação, deformidades flexurais nos membros, espessamento dos vasos do cordão umbilical, persistência do úraco (BATCHELDER et al., 2007a). Todos os clones neste estudo apresentaram pelo menos uma dessas alterações. O tingimento dos fetos por mecônio é um sinal de sofrimento fetal ou hipóxia (BLEUL, 2009). Cinco animais neste estudo apresentaram esta característica que foi avaliada com variações de intensidade entre tingido por mecônio (n=1), levemente tingido por mecônio (n=4), ausência do tingimento por mecônio (n=3) e animais que não foram avaliados quanto a esse parâmetro (n=4). O tempo entre o nascimento e a tentativa de permanecer em estação foi importante na avaliação dos clones. Os bezerros clonados que permaneceram vivos no período perinatal não apresentaram muita variação nesse parâmetro quando comparados aos controles e dados da literatura (DIESCH et al., 2004; BATCHELDER et al., 2007). No entanto, aqueles que apresentavam uma condição pior de saúde, demoraram mais para permanecer em estação. O aparecimento do reflexo de sucção também foi maior entre os bezerros mais debilitados e que vieram a óbito no período perinatal. Apenas dois bezerros apresentavam deformidades flexurais. O espessamento dos vasos umbilicais foi um achado frequente nos clones. Foi observado em cinco dos 12 clones, embora dois clones não tenham sido avaliados quanto a este parâmetro por terem vindo a óbito

nas primeiras horas de vida. Dois dos animais com esta alteração umbilical também apresentaram persistência do úraco. É possível que mais e uma doença afete os bezerros clonados e as causas exatas dos problemas respiratórios e metabólicos destes animais ainda precisa ser esclarecida.

Os valores de hematócrito, contagem de hemácias e concentração de hemoglobina dos bezerros clonados foram semelhantes aos controles em todos os tempos avaliados. Apenas um bezerro apresentou elevação do hematócrito na primeira hora de vida, o que pode ser justificado pelo quadro de desidratação apresentado (KANEKO, 1997) ou pela resposta à hipóxia gerada pelo momento do parto (KLINKON & JEZEK, 2012). Alguns estudos observaram redução significativa dos parâmetros eritrocitários de clones quando comparados a bezerros clonados, principalmente nas primeiras horas de vida (CHAVATTE-PALMER ET AL., 2004; BATCHELDER et al., 2007; BIRGEL JUNIOR et al., 2011a) Três animais de nosso estudo apresentaram elevação do volume celular médio, porém sem elevação dos demais parâmetros leucocitários. Chavatte-Palmer et al. (2002) e Batchelder et al. (2007b) também observaram uma grande variação deste parâmetro em clones, o que indica uma variabilidade grande nos tamanhos das hemácias. O bezerro que teve elevação do hematócrito apresentou um quadro de desidratação que ocasionou a elevação, mesmo que discretamente e temporariamente, da concentração de proteínas plasmáticas totais. Segundo Kaneko (1997), a desidratação é uma das causas do aumento das proteínas plasmáticas totais. A contagem das plaquetas nos bezerros do Grupo Controle não alterou durante os tempos, permanecendo constante. Em todos os clones, no entanto, as contagens de plaquetas foram discretamente baixas na primeira hora de vida, elevando gradualmente até o terceiro ou quinto dia. Ao contrário de nossos resultados, Batchelder et al. (2007b) observaram um declínio até as 36 horas de vida. Poderia se suspeitar, em nosso caso, de erro na contagem nos contadores hematológicos automáticos quando há uma variação no tamanho das hemácias ou das plaquetas. Na avaliação do leucograma, houve também resultados homogêneos, embora alterados. Todos os clones apresentaram leucocitose por neutrofilia desde o nascimento. A contagem total de leucócitos elevou-se gradualmente no decorrer dos dias, com tendência a se normalizar a partir do terceiro dia de vida. A leucocitose por neutrofilia observada em todos os animais deste estudo pode estar relacionada à liberação de glicocorticoides

endógenos no momento do parto e à administração de glicocorticoides que podem provocar uma elevação dos neutrófilos (BENESI, 1992; KRAMER, 2000; BENESI et al., 2012; ROCHA et al., 2013). Alguns estudos, porém, apontam para a presença de neutrofilia sem leucocitose em ovinos neonatos tratados com glicocorticoides (FARIA et al., 2013). Além disso, havia a preocupação com o umbigo com espessura aumentada que demora a cicatrizar e serve como porta de entrada para organismos patogênicos. Os bezerros que foram necropsiados durante o período não apresentaram sinais de infecção que justificasse esses valores. Batchelder et al. (2007) relataram valores normais para a contagem total de leucócitos, mas que caíram na primeira hora de vida, contrariando nossos resultados. As contagens de linfócitos não apresentaram grandes alterações, assim como os demais tipos de leucócitos sanguíneos. As contagens de linfócitos foram mais baixas que as contagens de neutrófilos. Essa inversão ocorre naturalmente no decorrer do primeiro ano de vida (COSTA et al., 2000; BENESI et al., 2012). A concentração de proteínas plasmáticas totais foi maior nos clones do que nos controles entre uma hora e 12 horas após o nascimento. Nenhum clone nasceu com hipoproteinemia e, em ambos os grupos houve elevação discreta no avançar da idade até, pelo menos, nas primeiras 48 horas de vida. No entanto, essa elevação não ultrapassou os limites de referência. Resultados semelhantes foram obtidos por Rocha et al. (2013). Por outro lado, Batchelder et al (2007b) mostraram uma redução deste parâmetro nas primeiras horas de vida. Apenas um animal em nosso estudo apresentava-se desidratado, o que justificaria esse aumento. Todos os bezerros clonados apresentaram leucocitose, o que também justifica a elevação das proteínas plasmáticas devido à presença do fibrinogênio e outras proteínas de inflamação aguda (KANEKO, 1997). A absorção de imunoglobulinas do colostro também pode ser um fator para a elevação destas proteínas (KANEKO, 1997; COSTA et al, 2008).

Muitas alterações foram encontradas em bezerros neonatos clonados neste estudo. Não se pode afirmar o mesmo quando se trata de exames de bioquímica sérica. A hipoglicemia reportada por alguns estudos sobre bezerros clonados (GARRY et al., 1996; BATCHELDER et al, 2007a) não foi observada no período perinatal a não ser em um bezerro, logo ao nascimento. Bezerros clonados neste estudo não apresentaram hipoglicemia, assim como em Chavatte-Palmer et al. (2002). Como a fluidoterapia e a administração de colostro se iniciavam rapidamente

após o parto e não havia controle sobre a realização das coletas em jejum, discute-se se o resultado esteja relacionado a tal tratamento. Estudos também apontam que a hipóxia induz a resistência à insulina em bezerros neonatos, o que eleva as concentrações de glicose (CHENG et al., 1997). Considerando que alguns animais apresentavam hipóxia, talvez os valores da glicemia estejam também relacionados a este fator. A concentração sérica de lactato, no entanto, mostrou-se elevada em todos os animais do Grupo Clone em algum momento do período perinatal. O valor de referência utilizado para esta avaliação foi obtida da literatura e para animais adultos (KANEKO, 1997). Infelizmente não foi dosada a concentração de lactato nos neonatos do Grupo Controle para que tivéssemos uma comparação mais adequada. Estes animais com altas concentrações de lactato sérico também apresentavam pH sanguíneo mais baixo (acidose metabólica). Resultados divergentes foram encontrados por Batchelder et al. (2007a), que reportaram diminuição dos valores de lactato.

As elevações das concentrações de ureia e creatinina séricas são indicativas de distúrbios renais ou desidratação. Sete bezerros clonados apresentaram concentrações normais de ureia, dois tiveram concentrações diminuídas, um bezerro apresentou elevação da ureia sérica e dois animais não tiveram esse parâmetro aferido por terem morrido antes que se pudesse realizar a coleta de material para análise. Batchelder et al. (2007a) não observaram diferenças entre clones e controles nas primeiras 24 horas, mas a partir de 48 horas houve elevação deste parâmetro em bezerros clonados quando comparados aos controles. As concentrações de creatinina foram baixas em oito clones e altas em dois clones, sendo que estes dois animais vieram a óbito no período perinatal. Os outros dois bezerros que também morreram neste período não tiveram este parâmetro aferido. Aparentemente, a elevação da creatinina nos clones é um sinal de que há alterações graves no metabolismo do bezerro e que tais alterações podem conduzir a um desfecho fatal. Batchelder et al. (2007a) observaram a diminuição das concentrações de creatinina.

Para avaliar a função hepática, foram avaliadas a concentração sérica de bilirrubina e as atividades séricas das enzimas fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase e gamaglutamiltransferase. As concentrações séricas de bilirrubina estavam elevadas em seis clones, normais em três clones e não foram avaliadas em

três clones. Elevações na concentração sérica de bilirrubina foram observadas em bezerros clonados em outro estudo (BATCHELDER et al., 2007a). A elevação na concentração sérica de bilirrubina pode indicar hepatopatia ou hemólise (KANEKO, 1997). No entanto, não havia outros sinais que indicassem tais enfermidades. A atividade da gamaglutamiltransferase foi muito mais elevada nos controles do que nos clones. Em todos os clones em que ela foi avaliada com exceção de um clone, a atividade estava normal. Embora esse resultado possa indicar uma ausência de doença hepática aguda (KANEKO, 1997), bezerros normais costumam apresentar elevações da atividade desta enzima quando conseguem absorver adequadamente as imunoglobulinas do colostro (COSTA et al., 2008). Batchelder et al. (2007a) não observaram diferenças entre clones e controles com relação à fosfatase alcalina e à gamaglutamiltransferase. Nossos resultados para a atividade da fosfatase alcalina são semelhantes a esse estudo. As atividades da aspartato aminotransferase se apresentaram nos valores de referência para os clones (n=8), exceto em dois clones em que estava diminuída e em dois clones ela não foi avaliada. Na análise destes resultados, pode-se deduzir que não havia alterações hepáticas nos bezerros clonados neste estudo.

Vários estudos já relataram a importância das doenças respiratórias que, além de terem uma incidência alta, são consideradas um fator limitante para a sobrevivência de bezerros clonados durante o período neonatal (GARRY et al., 1996; HILL et al., 1999; PANARACE et al., 2002; BATCHELDER, 2007; BRISVILLE et al., 2011). Estas alterações em bezerros clonados foram detectadas por meio de hemogasometria arterial (HILL et al., 1999; BRISVILLE et al., 2011) ou venosa (BRISVILLE et al., 2011). Fetos normais têm hipertensão pulmonar com vasoconstrição da artéria pulmonar até o nascimento. Com a primeira inspiração, os pulmões se enchem de ar e a resistência pulmonar ao fluxo sanguíneo diminui. O oxigênio tem efeito vasodilatador sobre as arteríolas pulmonares. A hipóxia, acidose, bacteremia, e elevação da pressão venosa pulmonar estimulam a vasoconstrição dessas arteríolas, o que predispõe os bovinos a desenvolverem hipertensão pulmonar primária (CIBELLI et al., 1998; BLEUL, 2009). A interpretação dos diversos parâmetros clínicos e laboratoriais realizada neste estudo indica que havia, em todos os 12 clones observados, alterações respiratórias importantes possivelmente causadas por algum grau de hipertensão pulmonar.

É comum bezerros normais nascerem com leve acidose metabólica e respiratória, que é normalizada após o início da atividade respiratória. Em bezerros com síndrome da dificuldade respiratória, doença descrita detalhadamente em prematuros humanos, não há essa regressão; ocorre redução do pH e do excesso de base e acúmulo de dióxido de carbono no sangue devido à dificuldade de sua eliminação pelos pulmões. Por ser um ácido fraco no sangue, o dióxido de carbono causa diminuição do pH. Em seguida, a hipóxia e a redução da perfusão dos tecidos periféricos provocam o aumento da produção de lactato a partir do metabolismo anaeróbico. Nesta fase, há acidose mista respiratória e metabólica (BLEUL, 2009). Neste estudo, esta alteração foi observada em sete bezerros clonados em algum momento no período perinatal. Contrariando alguns estudos que afirmam que neonatos, clonados ou não, nascem levemente acidóticos (BENESI et al., 1993; LISBOA, et al., 2002; BLEUL, 2009), nosso estudo observou que oito bezerros clonados nasceram com pH normal (n=4) ou com alcalose (n=4). Dos quatro bezerros que nasceram com acidose, três vieram a óbito no período perinatal, indicando que a acidose é um fator de risco em bezerros clonados. A pressão arterial de oxigênio apresentou oscilações entre os tempos para cada clone, elevando-se após um período de diminuição, indicando que os bezerros conseguiam absorver oxigênio. As pressões de dióxido de carbono também apresentaram oscilações semelhantes. Mas notou-se que, nos bezerros que vieram a óbito no período perinatal, havia uma tendência à elevação consistente da pressão de dióxido de carbono, indicando que, apesar de a oxigenioterapia fornecer oxigênio para os bezerros, havia falha na eliminação de dióxido de carbono.

O padrão de concentração de eletrólitos foi muito semelhante entre clones e controles. No entanto, os clones apresentaram maior variabilidade quando comparados aos controles. Quatro clones tiveram hiponatremia nas primeiras horas de vida, que foi normalizada e, em seguida elevou-se (hipernatremia). A hipernatremia pode ser uma indicação de excesso relativo de água (LISBOA et al., 2002; BATCHELDER, 2007b). Os bezerros do Grupo Clone apresentaram elevações e diminuições transitórias, dos eletrólitos no decorrer do período estudado, provavelmente relacionadas à administração de fluidos e medicação (LISBOA et al, 2002).

O tratamento das doenças respiratórias em neonatos bovinos clonados envolve a limpeza das vias aéreas, estímulo à respiração, minimizar as perdas de calor (BLEUL, 2009). A limpeza das vias aéreas foi feita com cânulas acopladas a bombas de vácuo, além da limpeza manual e suspensão dos bezerros pelos membros posteriores por alguns segundos para permitir que a gravidade promovesse a secreção de líquidos. Para estimular a respiração foi feita aspersão de água fria na cabeça e tórax dos bezerros, seguida imediatamente de banho morno e lavagem com detergente para a retirada de mecônio da pele (BLEUL, 2009). O uso de medicamentos para estimular a respiração foi feito em todos os clones e controles com hidrocloreto de doxapram e aminofilina. Surfactante também foi utilizado em alguns clones. Para minimizar as perdas de calor, as baias de internação eram climatizadas, a secagem após o nascimento era feita com secador quente e os bezerros eram mantidos, em mantas térmicas. A oxigenioterapia foi instituída em todos os animais sistematicamente. Estudos que realizaram este protocolo obtiveram incidência menor de doenças respiratórias do que aqueles que só o fizeram quando os clones apresentavam alterações na hemogasometria ou sinais de doença respiratória (HILL et al., 1999; BATCHELDER et al., 2007a; BRISVILLE et al., 2011).

A antecipação dos problemas relacionados ao aumento do diâmetro dos vasos umbilicais conduziu a terapêutica à administração de fármacos antibacterianos durante os primeiros dias de vida. Mesmo assim todos os bezerros clonados apresentaram leucocitose por neutrofilia nos primeiros dias após o parto. Os animais do grupo controle, nas mesmas condições de tratamento não apresentaram tal alteração. Embora os bezerros clonados que tenham morrido no período perinatal não tivessem apresentado sinais de infecção, a causa da morte dos bezerros que morreram após o período perinatal estava relacionada com infecções como onfaloflebite e pneumonia. A transferência de imunidade passiva não foi avaliada com maior atenção neste trabalho. No entanto, todos os bezerros clonados apresentaram elevação da proteína plasmática total entre uma hora e 48 horas após o nascimento. Esta elevação pode estar relacionada à absorção de proteínas do colostro ou a um quadro inflamatório agudo (KANEKO, 1997; COSTA et al., 2008). Como não foi realizada a determinação das imunoglobulinas ou da concentração de fibrinogênio plasmático, a diferenciação entre os dois quadros fica

prejudicada. No entanto, bezerros que demoram a ficar em estação ou para apresentar reflexo de sucção, que têm hipoxemia ou acidose pós-natal estão mais susceptíveis à baixa transferência de imunidade passiva (GARRY et al., 1996). Como estes fatores de risco estavam presentes nos bezerros do Grupo Clone, a probabilidade destes animais terem apresentado um quadro de infecção pós-natal é maior.

Poucos dados sobre achados de necropsia em bezerros clonados foram relatados. Dos quatro bezerros que morreram durante este estudo, apenas dois foram examinados na necropsia. Não foram observados sinais de infecção ou alterações renais em nenhum deles. Garry et al. (1996) relataram pneumonia e septicemia, torção intestinal, aspiração de mecônio, abscesso umbilical, poliartrite fibrinosa e insuficiência cardíaca congestiva. Wells et al. (1997) observaram edema e hidronefrose. Hill et al. (1999) também não observaram infecção ou nefropatia em seus relatos. Os bezerros nestes estudo apresentavam pulmões com atelectasia, indicando que a insuficiência respiratória ocorreu devido à falha na expansão pulmonar. Hill et al. (1999) observaram alterações semelhantes em fetos abortados, indicando que estas alterações circulatórias poderiam ter ocorrido durante a gestação.

Várias causas já foram citadas para a alta incidência de mortalidade de bezerros clonados no período perinatal. Como todos os partos foram cesarianas realizadas na idade gestacional adequada (aproximadamente 280 dias) (BALL e PETERS, 2006), excluem-se as complicações relacionadas às distocias. Garry et al. (1996) observou hipotermia em bezerros clonados. Nosso estudo assim como o de Chavatte-Palmer et al. (2002) não observou hipotermia que não fosse revertida nos bezerros clonados, embora os mesmos tenham apresentado reduções de até 2ºC entre o período imediatamente após o parto até 1 hora de vida. Apenas um bezerro teve hipoglicemia, enquanto outros estudos apontam uma incidência mais elevada desta alteração que, em associação com hipotermia, debilidade, hipoxemia e acidose metabólica, sugerem um quadro de distúrbio no metabolismo de carboidratos (GARRY et al., 1996; PANARACE et al., 2006; BATCHELDER et al., 2007a).

Neste trabalho, tentamos avaliar as alterações laboratoriais mais importantes que indicassem os momentos de maior risco para os bezerros clonados.

O relato da evolução do quadro clínico de 12 bezerros clonados da raça Girolanda no período perinatal notou que bezerros clonados são semelhantes a bezerros normais em alguns parâmetros, incluindo eritrograma, concentração de proteínas plasmáticas totais, concentração de eletrólitos sanguíneos, concentração sérica de ureia, atividade sérica de aspartato aminotransferase e concentração sérica de ureia. As diferenças mais marcantes foram a leucocitose que acompanhou todos os bezerros clonados desde o nascimento até o terceiro ou quinto dia de vida, a concentração elevada de ácido lático desde o nascimento até a estabilização do quadro, o comportamento da contagem de plaquetas que era baixo no início e se elevou gradualmente ao avançar da idade. Observamos que, dentre os bezerros que vieram a óbito no período perinatal, alguns apresentaram características semelhantes, tais como classificação de APGAR baixo 5 minutos após o nascimento, acidose metabólica ou respiratória imediatamente após o nascimento, dificuldade respiratória no momento do nascimento e elevação da concentração sérica de creatinina. Analisando essas informações, pode-se notar que bezerros clonados têm dificuldade de adaptação à vida extrauterina. Também são necessários mais estudos para explicar a origem dessas alterações e suas relações com as alterações placentárias que acometem os clones.

7. CONCLUSÕES

A análise, interpretação e a discussão dos resultados obtidos no presente estudo, que envolveu a comparação dos parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos e de hemogasometria de bezerros clonados por SCNT e de bezerros oriundos de inseminação artificial ou monta natural geraram as conclusões descritas a seguir:

1) A eficiência da técnica de clonagem por TNCS ainda é baixa, com taxa de mortalidade alta no período neonatal.
2) A avaliação do peso ao nascimento é um parâmetro importante para ser avaliado na clínica de bezerros neonatos clonados, pois bezerros com pesos extremos ao nascer (muito pesados ou muito leves) não sobreviveram no período neonatal.
3) A incidência de problemas respiratórios em bezerros clonados é elevada, sendo que as causas exatas das disfunções respiratórias ainda precisam ser esclarecidas.
4) Não há valores de referência para a concentração sérica ou plasmática de lactato em bezerros neonatos da raça Girolanda, havendo necessidade de mais estudos nesta raça.
5) O espessamento dos vasos umbilicais é uma alteração frequente em bezerros clonados e pode ser um indicativo de risco de morte no período perinatal.
6) Bezerros clonados não apresentam alterações importantes no eritrograma, mas a leucocitose por neutrofilia foi um achado frequente nestes animais e persistiu durante todo o período neonatal.
7) A hemogasometria arterial e venosa auxilia na determinação do diagnóstico das alterações respiratórias e metabólicas, no direcionamento da terapêutica e no acompanhamento de sua evolução, sendo uma ferramenta importante para a clínica de neonatos, uma vez que nem todos os bezerros neonatos clonados mostram as mesmas características dos bezerros neonatos oriundos de monta natural ou inseminação artificial.
8) Bezerros clonados apresentam dificuldade de adaptação à vida extra-uterina comprovada pela dificuldade e pela demora em reverter o quadro de acidose metabólica com que eles nascem ou que eles desenvolvem durante esse período.

9) Bezerros clonados que vieram a óbito no período perinatal imediato apresentaram características semelhantes, tais como classificação de APGAR baixa 5 minutos após o nascimento, acidose metabólica ou respiratória imediatamente após o nascimento, dificuldade respiratória no momento do nascimento e elevação da concentração sérica de creatinina. A análise destes parâmetros pode auxiliar na decisão sobre medidas terapêuticas mais específicas ou realização de outros exames para a determinação de um diagnóstico mais preciso.

10) Mais estudos a respeito de produção de bezerros clonados por SCNT devem ser realizados para investigar as causas das alterações observadas e em que elas se relacionam com as enfermidades apresentadas e com os efeitos da cultura de embriões sobre a formação da placenta e as interações materno-fetais.

REFERÊNCIAS

ADONA, P. R.; DE BEM, T. H.; MESQUITA, L. G.; ROCHETI, R. C., LEAL, C. L. Embryonic development and gene expression in oocytes cultures in vitro in supplemented pre-maturation and maturation media. **Reproduction of Domestic Animals,** n. 46, v. 1, p. 31-38, 2011.

ARNOLD, D. R.; FORTIER, A. L.; LEFEBVRE, R.; MIGLINO, M. A.; PFARRER, C.; SMITH, L. C. Placental insufficiencies in cloned animals – a workshop report. **Placenta,** v. 22, p. S108-S110, 2008.

BALL, P. J. H.; PETERS, A. R. **Reprodução em bovinos**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2006. 240 p.

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: physical and clinical characteristics. **Cloning and Stem Cells,** n. 9, v. 1, p. 63-82, 2007a.

BATCHELDER, C. A.; BERTOLINI, M.; MASON, J. B.; MOYER, A. L.; HOFFERT, K. A.; PETKOV, S. G.; FAMULA, T. R.; ANGELOS, J.; GEORGE, L. W.; ANDERSON, G. B. Perinatal physiology in cloned and normal calves: hematological and biochemical profile. **Cloning and Stem Cells,** n. 9, v. 1, p. 83-96, 2007b.

BATCHELDER, C. A.; WHITCOMB, M. B.; BERTOLINI, M.; MASON, J. B.; PETKOV. S. G.; HOFFERT, K. A.; GEORGE, L. W.; ANDERSON, G. B. Neonatal physiological status of cloned and control calves. Reproduction**. Fertility and Development,** Australian, v. 18, p. 120, 2006.

BENESI, F. J.; TEIXEIRA, C. M. C.; LEAL, M. L. R.; LISBOA, J. A. N.; MIRANDOLA, R. M. S.; SHECAIRA, C. L.; GOMES, V. Leukograms of healthy Holstein calves within the first month of life. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 32, n. 4, p. 352-356, 2012.

BENESI, F. J.; Síndrome da asfixia neonatal dos bezerros. Importância e avaliação crítica**. Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia,** v. 16, n. 1, p. 38-48, 1993.

BENESI, F. J. **Hematologia de bezerros recém-nascidos. Inluência da asixia neonatal, do tipo do parto e da ingestão de colostro sobre a crase sanguínea.** 1992. 126 f. Tese de Livre-Docência, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

BERTOLINI, M.; BEAM, S. W.; SHIM, H.; BERTOLINI, R. L.; MOYER, A. L.; FAMULA, T. R.; ANDERSON, G. B. Growth, development, and gene expression by in vivo and in vitro-produced day 7 and 16 bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development,** v. 63, p. 318-328, 2002.

BIRGEL JUNIOR, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; BENESI, F. J.; BIRGEL, E. H. Valores de referência do eritrograma de bovinos da raça Jersey criados no Estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 53, n. 2, p. 1-9, 2001a.

BIRGEL JUNIOR, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; BENESI, F. J.; BIRGEL, E. H. Valores de referência do leucograma de bovinos da raça Jersey criados no Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science,** v. 38, n. 3, p.136-141, 2001b.

BIRGEL JUNIOR, E. H.; MEIRELLES, F. V.; KOMINOU, 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, p. s243-s252, 2011a, Supplement.

BIRGEL JUNIOR, E. H.; MEIRELLES, F. V.; MAIORKA, P. C.; KUBRUSLY, F. S.; OLLHOFF, R. D. Medicina interna de bezerros clonados – Distúrbios clínicos observados nos primeiros 30 dias de vida. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP,** v. 9, n. 1, p. 24-31, 2011b.

BLEUL, U. Respiratory Distress Syndrome in Calves. **Veterinary Clinical of North America Food Animal Practice.** v. 25, p. 179-193, 2009.

BOOKALLIL, M. J. **pH of the blood: acid base balance,** 2008. Disponível em: http://www.anaes.med.usyd.edu.au/lectures/ acidbase_mjb/acidbase.html. Acesso em: 20/12/2015.

BUHLER, L. H. Xenotransplantation literature update march-april. **Xenotransplantation,** v. 11, n. 4, p. 383-386, 2004.

BRISVILLE, A. C.; FECTEAU, G.; BOYSEN, S.; DORVAL, P.; BUCZINSKI, S.; BLONDIN, P.; SMITH, L. C. Respiratory disease in neonatal cloned calves. **Journal of Veterinary Internal Medicine,** v. 25, p. 373-379, 2011.

BRUN-HANSEN, H. C.; KAMPEN, A. H.; LUND, A.; Hematologic values in calves during the first 6 months of life. **Veterinary Clinical Pathology,** v.35, n. 2, p. 182-187, 2006.

CAMPBELL, K. H.; MCWHIR, J.; RITCHIE, W.A.; WILMUT, I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. **Nature,** v. 380, n. 7, p. 64-66, 1996.

CHAVATTE-PALMER, P.; CAMOUS, S.; JAMMES, H., LE CLEAC'H, N.; GUILLOMOT M.; LEE, R. S. Placental perturbations induce the developmental abnormalities often observed in bovine somatic cell nuclear transfer. **Placenta,** v. 33, p. S99-104, 2012. Supplement.

CHAVATTE-PALMER, P.; HEYMAN, Y.; RICHARD, C.; MONGET, P.; LEBOURHIS D.; KANN, G.; CHILLIARD, Y.; VIGNON, X.; RENARD, JP. Clinical, hormonal, and

hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. **Biology of Reproduction,** v. 66, p. 1596-1603, 2002.

CHAVATTE-PALMER, P.; REMY, D.; CORDONNIER, N.; RICHARD, C.; ISSENMANN, H.; LAIGRE, P. ET AL. Health status of cloned cattle at different ages. **Cloning and Stem Cells,** v. 2, n. 6, p. 92-98, 2004.

CHENG, N.; CAI, W.; JIANG, M.; WU, S. Effect of hypoxia on blood glucose, hormones, and insulin receptor functions in newborn calves. **Pediatrics Research,** v. 41, p. 852-856, 1997.

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

COSTA, M. C.; FLAIBAN, K. K. M. C; CONEGLIAN, M. M.; FEITOSA, F. L. F.; BALARIN, M. R. S.; LISBOA, J. A. N. Transferência de imunidade passiva em bezerros das raças Nelore e Limousin e proteinograma sérico nos primeiros quatro meses de vida. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 28, n. 9, p. 410-416, 2008.

COSTA, J. N.; BENESI, F. J.; BIRGEL, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; AYRES, M. C. C.; BARROS FILHO, I. R. Fatores etários no leucograma de fêmeas zebuínas sadias da raça Nelore (*Bos indicus*). **Ciência Rural,** v. 30, n. 3, p. 399-403, 2000.

DE BEM, T. H.; CHIARATTI, M. R.; ROCHETTI, R.; BRESSAN, F. F.; SANGALLI, J. R.; MIRANDA, M. S.; PIRES, P. R.; SCHWARTZ, K. R.; SAMPAIO, R. V.; FANTINATO-NETO, P.; PIMENTEL, J. R.; PERECIN, F.; SMITH, L. C.; MEIRELLES, F. V.; ADONA, P. R.; LEAL, C. L. Viable calves produced by somatic cell nuclear transfer using meiotic-blocked oocytes. **Cell Reprogramming,** v. 13, n. 5, p. 419-429, 2011.

DE LOOS, F. A.; BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S. J.; KRUIP, T. A. Morphology of preovulatory bovine follicles as related to oocyte maturation. **Theriogenology,** v. 35, n. 3, p. 527-535, 1991.

DE SOUSA, P. A.; WALKER, S.; KING, T. J.; YOUNG, L. E.; HARKNESS, L.; RITCHIE, W. A.; TRAVERS, A.; FERRIER, P.; WILMUT, I.; Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. **Biology of Reproduction,** v. 65, p. 23-30, 2001.

DIESCH, T. J.; MELLOR, D. J.; STAFFORD, K. J.; WARD, R. N. Ther physiological and physical status of single calves at birth in a dairy herd in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**. v. 52, n. 5, p. 250-255, 2004.

DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H.D.; STÖBER, M. (Ed.). **Rosenberger**: exame clínico dos bovinos. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1993.

EDWARDS, J. L.; SCHRICK, F. N.; MCCRACKEN, M. D.; VAN AMNESTEL, S. R.; HOPKINS, F. M. Cloning adult farm animals: a review of the possibilities and

problems associated with somatic cell nuclear transfer. **American Journal of Reproductive Immunology,** v. 50, p. 113-123, 2003.

EVERTS, R. E.; CHAVATTE-PALMER, P.; RAZZAK, A.; HUE, I.; GREEN, C. A.; OLIVEIRA, R.; VIGNON, X.; RODRIGUEZ-ZAZ, S. L.; TIAN, X. C.; YANG, X.; RENARD, J. P.; LEWIN, H. A. Aberrant gene expression patterns in placentomes are associated with phenotypically normal and abnormal cattle cloned by somatic cell nuclear transfer. **Physiological Genomics,** v. 33, p. 65-77, 2008.

FAGLIARI, J. J.; SANTANA, A. E.; LUCAS, F. A.; CAMPOS FILHO, E.; CURI, P. R. Constituintes sanguíneos de bovinos recém-nascidos das raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos Taurus*) e de bubalinos (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 50, n. 3, p. 253-262, 1998.

FARIA, M. R.; ROMÃO, F. T. N. M. A.; PEREIRA, P. F. V.; ALVES, R. I. A.; FLAIBAN, K. K. M. C.; LISBOA, J. A. N. Efeito da dexametasona sobre o leucograma de ovinos sadios. **Semina**: Ciências Agrárias, v.34, n.6, p. 3739-3746, 2013. Suplemento.

FARIN, P. W.; CROSIER, A. E.; FARIN, C. E. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology,** v. 55, p. 151-170, 2001.

FARIN, P. W.; FARIN, C. E. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. **Biology of Reproduction,** v. 52, p. 676-682, 1995.

FARIN, C. E.; FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A. Development of fetuses from in vitro-produced and cloned bovine embryos. **Journal of Animal Science,** v. 82, p. E53-E62, 2004. E Supplement.

FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A.; FARIN, C. E. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro produced bovine embryos. **Theriogenology,** v. 65, n. 1, p. 178-191, 2006.

FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. (Ed.). **Schalm's Veterinary Hematology,** 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

GARRY, F. B.; ADAMS, R.; MCCANN, J. P.; ODDE, K. G. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning, **Theriogenology,** v. 45, p. 141-152, 1996.

GASPARELLI, E. R. F.; CAMARGO, D. G.; YANAKA, R.; MENDES, L. C. N.; PEIRÓ, J. R.; BOVINO, F.; PERRI, S. H. V.; FEITOSA, F. L. F. Avaliação física e dos níveis séricos de cortisol de bezerros neonatos da raça Nelore, nascidos de partos normais e auxiliados. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 29, n. 10, p. 823-828, 2009.

HEYMAN, Y.; CHAVATTE-PALMER, P.; LEBOURHIS, D.; CAMOUS, S.; VIGNON, X.; RENARD, J. P. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. **Biology of Reproduction,** v. 66, p. 6-13, 2002.

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

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

HOLM, P.; BOOTH, P. J.; SCHMIDT, M. H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology,** v. 52, p. 683-700, 1999.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals,** San Diego: Academic Press, 1997.

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

KLINKON, M.; JEZEK, J. Values of blood variables in calves. In: PEREZ-MARIN, C. C. **A Bird's-Eye view of Veterinary Medicine,** InTech, 2012, disponível em http://www.intechopen.com/books/a-bird-s-eye-view-of-veterinary-medicine/values-of-blood-variables-in-calves.

KRAMER, J. W. Normal hematology of cattle, sheep, and goats. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology,** Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 1075-1084.

KRUIP, T. A. M.; DEN DAAS, J. H. G. In vitro produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. **Theriogenology,** v. 278, p. 2130-2133, 1997.

LECHOWSKI, R. The influence of metabolic acidosis in new-born calves on biochemical profile of the liver. **Comparative Haematolgy International,** v. 7, n. 3, p. 172-176, 1997.

LEE, R. S. F.; PETERSON, A. J.; DONNISON, M. J.; RAVELICH, S.; LEDGARD, A. M.; LI, N. Cloned cattle fetuses with the same nuclear genetics are more variable than contemporary half-siblings resulting from artificial insemination and exhibit fetal and placental growth deregulation even in the first trimester. **Biology of Reproduction,** v. 70, n. 1, p. 1-11, 2004.

LEWIS, I. M.; PEURA, T. T.; OWENS, J. L.; RYAN, M. F.; DIAMENTE, M. G.; PUSHETT, D. A.; LANE, M. W.; JENKIN, G.; COLEMAN P. J.; TROUNSON, A. O.

Outcomes from novel simplified nuclear transfer techniques in cattle. **Theriogenology,** v. 53, p. 233, 2000.

LISBOA, J. A. N.; BENESI, F. J.; LEAL, M. L. R.; TEIXEIRA, C. M. C. Efeito da idade sobre o equilíbrio ácido-básico de bezerras sadias no primeiro mês de vida. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, v. 39, n. 3 p. 136-142, 2002.

LOI, P.; LEDDA, S.; FULKA, J.; CAPPARI, P.; MOORE, R. M. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. **Biology of Reproduction,** v. 58, p. 1177-1187, 1998.

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

MIGLINO, M. A.; PEREIRA, F. T. V.; VISINTIN, J. A.; GARCIA, J. M.; MEIRELLES, F. V.; RUMPF, R.; AMBROSIO, C. E.; PAPA, P. C.; SANTOS, T. C.; CARVALHO, A. F.; LEISER, R.; CARTER, A. M. Placentation in cloned cattle: Structure and micro vascular architecture. **Theriogenology,** v. 68, n. 4, p. 604-617, 2007.

NEWMAN, K. D. Bovine caesarian section in the field. **Veterinary Clinics Food Animal Practice,** v. 24, p. 273-293, 2008.

OBACK, B. Cloning from stem cells: different lineages, different species, same story. **Reproduction, Fertility and Development,** v. 21, n. 1, p. 83-94, 2009.

PANARACE, M.; AGÜERO, J. I.; GARROTE, M.; JAUREGUI, G.; SEGOVIA, A.; CANÉ, L.; GUTIÉRREZ, J.; MARFIL, M.; RIGALI, F.; PUGLIESE, M.; YOUNG, S.; LAGIOIA, J.; GARNIL, C.; FORTE PONTES, J. E.; ERENO JUNIO, J. C.; MOWER, S.; MEDINA, M. How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. **Theriogenology,** v. 67, p.142-151, 2007.

PETER, A. T. Bovine placenta: A review on morphology, components, and defects from terminology and clinical perspectives. **Theriogenology,** v. 80, p. 693-705, 2013.

RENARD, J.P.; CHASTANT, S.; CHESNÉ, P; RICHARD, C.; MARCHAL, J.; CORDONNIER, N.; CHAVATTE, P.; VIGNON, X. Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. **Lancet,** v. 353, p. 1489-1491, 1999.

ROCHA, T. G.; FRANCIOSI, C.; NOCITI, R. P.; NOGUEIRA, C. A. S.; FAGLIARI, J. J. Hemograma e proteínas do soro sanguíneo de bezerros Canchin-Nelore e da raça Holandesa nos primeiros 30 dias de vida. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 62, n. 5, p. 1250-1254, 2010.

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

RUSSEL, K. E.; ROUSSEL, A. J. Evaluation of ruminant serum chemistry profile. **Veterinary Clinics Food Animal Practice,** n. 23, p. 403-426, 2007.

SANTOS, C. R.; GRANDI, F.; MIGLINO, M. A.; MEIRELLES, F. V.; MAIORKA, P. C. Patologia de neonatos bovinos originados por meio da técnica de transferência nuclear de células somáticas – clonagem. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science,** São Paulo, v. 47, n. 6, p. 447-453, 2010.

SHIRANI, F.; SALEHI, R.; NAINI, A. E.; AZIZKHANI, R.; GHOLAMREZAEI, A. The effects of hypotension on differences between the results of simultaneous venous and arterial blood gas analysis. **Journal of Research in Medical Sciences,** v. 16, n. 2, p. 188-194.

SILVA, D. G; SILVA, P. R. L.; FAGLIARI, J. J. Hemograma e perfil bioquímico sérico, inclusive hemogasométrico, de bezerros infectados experimentalmente com *Salmonella* Dublin. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 62, n. 2, p. 251-257, 2010.

SMITH, L. C.; SUZUKI JR, J.; GOFF, A. K.; FILION, F.; THERRIEN, J.; MURPHY, B. D.; KOHAN-GHADR, H. R.; LEFEBVRE, R.; BRISVILLE, A. C.; BUCZINSKI, S.; FECTEAU, G.; PERECIN, F.; MEIRELLES, F. V. Developmental and epigenetic anomalies in cloned cattle. **Reproduction in Domestic Animals,** v. 47, p. 107-114, 2012. Supplement, 4.

VIGNON, X.; CHESNÉ, P.; LEBOURHIS, D.; FLÉCHON, J. E.; HEYMAN, Y.; RENARD, J. P. Developmental potential of bovine embryos reconstructed with enucleated matured oocytes fused with cultured somatic cells. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences,** v. 321, p. 735-745, 1998.

WALKER, S. K.; HARTWICH, K. M.; SEAMARK, R. F. The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges. **Theriogenology,** v. 45, p. 111-120, 1996.

WAKAYAMA, T.; PERRY, A. C.; ZUCCOTTI, M.; JOHNSON, K. R.; YANAGIMACHI, R. Full term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Nature,** v. 394, p. 369-374, 1998.

WELLS, D. N.; MISICA, P. M.; TERVIT, H. R.; Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulose cells. Biology **of Reproduction,** v. 60, p. 996-1005, 1999.

WELLS, D. N.; MISICA, P. M. TERVIT, H. R.; VIVANCO, W. H. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of Enderby Island cattle breed. **Reproduction and Fertility Development,** v. 10, p. 369-378, 1998.

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

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, p. 73-83, 1995.

YANAGIMACHI, R. Cloning: Experience from the mouse and other animals. **Molecular and Cellular Endocrinology,** v. 187, p. 241-248.

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