CAIO RODRIGUES DOS SANTOS

Patologia de neonatos bovinos clonados

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Paulo César Maiorka

São Paulo

2008

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

8/
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
23/7/08

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2018
FMVZ

Santos, Caio Rodrigues dos
Patologia de neonatos bovinos clonados / Caio Rodrigues dos
Santos. – São Paulo : C. R. Santos, 2008.
101 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo.
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de
Patologia, 2008.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e
Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Maiorka.

1. Patologia. 2. Neonatologia. 3. Bovinos. 4. Clonagem.
5. Biometria. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Patologia de fetos neonatos bovinos clonados", protocolado sob o nº1393/2008, utilizando 12 (doze) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo César Maiorka, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Pathology of cloned bovines", protocol number 1393/2008, utilizing 12 (twelve) bovines, under the responsibility Prof. Dr. Paulo César Maiorka, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum" meeting).

São Paulo, 27 de maio de 2008

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SANTOS, Caio Rodrigues

Título: Patologia de neonatos bovinos clonados

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr(a). _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof.(a) Dr(a). _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof.(a) Dr(a). _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Aos moradores da Rua Fernando Caldas, 128,
pela paciência, pelo carinho e
pela a alegria de ter uma família.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo César Maiorka, presente desde 2000, nesta minha caminhada científica, sempre confiando e me apoiando.

Ao Prof. Dr. Antônio Fernandes Filho, pela amizade e pelas suas sábias palavras, sempre me encorajando a enfrentar mais este degrau em minha vida profissional.

Ao Dr. Romeu Macruz, por me ensinar o que é ter caráter de verdade.

A Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli, pela disponibilização dos laboratórios e materiais utilizados.

A todos os funcionários do departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em especial: Buga, Claudio Arroyo, Raimundo, Edson e Suli, pela amizade sincera de vocês.

A todos os colegas do departamento, em especial: Daniel (Damby), Heidge Fukumasu, Marina, Carol, Lulis, Fernando, Fabrizio Grandi e Eliza Rossi (VCM).

Aos meus amigos (em ordem alfabética), Célia Regina, Claudião, Cleber, Ismaerino Júnior, Pâmella, Rafael e Rodolfo Jasão.

Ao povo do Estado de São Paulo, pela sagrada ajuda financeira, a qual é gerenciada e administrada de forma muito competente, pela FAPESP, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, Bolsa (Processo nº 06/52480-2) e suporte financeiro (Processo nº 05/60606-3).

RESUMO

SANTOS, C. R. **Patologia de neonatos bovinos clonados. [Pathology of cloned bovine neonates]**. 2008. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2008.

Clonagem ou técnica de transferência nuclear (TN) permite a geração de um organismo geneticamente idêntico a outro. Inúmeras aplicações da TN têm sido descritas para uso em pecuária e em medicina humana. O sucesso na clonagem de ovinos, bovinos, suínos e caprinos confirma a utilidade da TN para o propósito de expansão clonal de animais de valor zootécnico. Diversos trabalhos mostram que há uma perda de embriões e neonatos de animais clonados, sendo que má formações de órgãos e alterações de tamanho e peso destes animais são freqüentemente descritas. Mediante o exposto este trabalho visa esclarecer do ponto de vista morfológico as principais alterações apresentadas por animais que vieram a óbito, usando como método de estudo a biometria de órgãos e a avaliação dos que apresentam algum tipo de alteração. Este estudo foi conduzido na fazenda Tambaú, no período compreendido entre 2004 e 2008, foram necropsiados 13 animais clonados pela TN, pertencentes à espécie bovina, das raças Nelore e Simental, com idade variando de 1 a 19 dias, de ambos os sexos. Foram registrados o peso do animal, dos órgãos, bem como avaliação morfológica, histológica e imunoistoquímica destes. As alterações do tamanho e da morfologia de órgãos são os problemas mais freqüentemente encontrados, se alocando dentro da “síndrome do bezerro anormal” onde estão envolvidos alterações morfológicas, como o gigantismo, presente em 92,3 % dos animais necropsiados neste estudo. Houve uma importância muito grande em descrever estas anormalidades, através de estudos morfológicos e imunoistoquímicos, para uma melhor caracterização e entendimento dos problemas envolvendo a clonagem animal e também contribuir no desenvolvimento da neonatologia bovina.

Palavras-chave: Patologia. Bovinos. Clonagem. Biometria.

ABSTRACT

SANTOS, C. R. **Pathology of cloned bovine neonates. [Patologia de neonatos bovinos clonados]**. 2008. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2008.

Cloning or Nuclear Transfer (NT) allows generation of identical organisms. Innumerous applications of NT in veterinary and human medicine have been described. The success of cloning bovine, ovine, caprine and swine confirms the utility of NT in clonal expansion of valuable animals with high zootechnical performance. Many articles show that there is an important embryonal and neonatal loss of cloned animals, in which malformations of organs and alteration of size and weight are the most frequent problems described. This work aims to clarify, through morphological evaluation, the main alterations found in neonatally dead cloned bovines, using biometric rates of organs and evaluation of those that present any alteration. This work was conducted at the Tambaú Farm, São Paulo State, Brazil, from 2004 to 2008, and 13 bovine cloned by NT, male and female, belonging to Nelore and Simental breeds, aging from 01 to 19 days of life. The weight of animals and organs were registered and also morphological, histopathological and immunohistochemical analyses were performed during this work. The alterations of size and morphology of the animals and organs were the most frequent problems found in our study, referred to as “abnormal offspring syndrome” that describes morphological alterations such as gigantism, present in 92,3% of necropsied animals of this study. It is very important to identify and describe these abnormalities, by morphological, immunohistochemical approach aiming a better characterization of the problems related to cloning procedure, and also to contribute to the development of neonatal medicine bovines.

Keyword: Pathology. Bovines. Cloned. Biometric.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Organograma ilustrando as etapas do processo de clonagem.	18
Figura 2-	Alterações macroscópicas encontradas ao exame externo.	42
Figura 3-	Coleções líquidas evidenciadas.	43
Figura 4-	Alterações no sistema respiratório.	44
Figura 5-	Alterações cardíacas evidenciadas.	45
Figura 6-	Alterações esplênicas e intestinais.	46
Figura 7-	Alterações hepáticas, vesícula biliar e abomasais.	47
Figura 8-	Alterações renais evidenciadas.	48
Figura 9-	Alterações no sistema nervoso central.	49
Figura 10-	Alterações em medula óssea.	50
Figura 11-	Fotomicrografia de coração.	65
Figura 12	Fotomicrografia de pulmão.	66
Figura 13-	Fotomicrografia de fígado.	67
Figura 14-	Fotomicrografia de baço.	68
Figura 15-	Fotomicrografia de linfonodo.	69
Figura 16-	Fotomicrografia de timo.	70
Figura 17-	Reação imunoistoquímica cd3 em baço	71
Figura 18-	Reação imunoistoquímica cd3 em baço	72
Figura 19-	Reação imunoistoquímica cd3 em baço	73
Figura 20-	Reação imunoistoquímica cd3 em baço	74
Figura 21-	Reação imunoistoquímica cd3 em baço	75
Figura 22-	Reação imunoistoquímica cd3 em baço	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Lista dos animais utilizados neste estudo.	38
-----------	--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Idades dos animais necropsiados.	51
Gráfico 2-	Variação dos pesos aferidos nos animais em óbito.	52
Gráfico 3-	Variação dos pesos aferidos nos órgãos.	53
Gráfico 4-	Variação dos pesos relativos dos órgãos.	53
Gráfico 5-	Pesos relativos dos órgãos em relação ao peso do clone um.	54
Gráfico 6-	Pesos relativos dos órgãos em relação ao peso do clone dois.	54
Gráfico 7-	Pesos relativos dos órgãos em relação ao peso do clone três.	55
Gráfico 8-	Pesos relativos dos órgãos em relação ao peso do clone quatro.	55
Gráfico 9-	Pesos relativos dos órgãos em relação ao peso do clone cinco.	56
Gráfico 10-	Pesos relativos dos órgãos em relação ao peso do clone seis.	56
Gráfico 11-	Pesos relativos dos órgãos em relação ao peso do clone sete.	57
Gráfico 12-	Pesos relativos dos órgãos em relação ao peso do clone oito.	57
Gráfico 13-	Pesos relativos dos órgãos em relação ao peso do clone nove.	58
Gráfico 14-	Pesos relativos dos órgãos em relação ao peso do clone dez.	58
Gráfico 15-	Pesos relativos dos órgãos em relação ao peso do clone onze.	59
Gráfico 16-	Pesos relativos dos órgãos em relação ao peso do clone doze.	59
Gráfico 17-	Pesos relativos dos órgãos em relação ao peso do clone treze.	60
Gráfico 18-	Principais alterações patológicas encontradas.	61
Gráfico 19-	Principais pneumopatias encontradas.	61
Gráfico 20-	Principais cardiopatias encontradas.	62
Gráfico 21-	Principais nefropatias encontradas.	62
Gráfico 22-	Principais hepatopatias encontradas.	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMP-4	Bone Morphogenetic Protein 4
DAB	Diaminobenzidina
FDA	US Food and Drug Administration
FGF10	Fibroblast Growth Factor 10
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	Gramas
HSP-70	Heat Shock Proteins
H&E	Hematoxilina e Eosina
Kg	Kilos
ml	mililitros
mM	milimoles
PCAF	P300 / CFBP Associated Factor
SNA	Síndrome do Neonato Anormal
TN	Transferência Nuclear
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Xist	X chromosome inactivation

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Definição	18
2.2 Mecanismos de Clonagem	19
2.3 Histórico	21
2.4 Contribuições das Técnicas de Clonagem	22
2.5 Aspectos Anatomopatológicos	23
3 OBJETIVOS	28
4 JUSTIFICATIVAS	30
5 MATERIAL E MÉTODOS	32
5.1 Animais e Exame Necroscópico	32
5.2 Histopatologia	32
5.3 Imunoistoquímica	33
<i>5.3.1 Padronização da técnica de reação Imunoistoquímica</i>	33
5.4 Biometria	35
5.5 Análises Estatísticas	35
6 RESULTADOS	38
6.1 Macroscopia	38
6.2 Idade	51
6.3 Biometria	52
6.4 Alterações Patológicas	60
6.5 Histopatologia	63
6.6 Imunoistoquímica	71
7 DISCUSSÃO	78
7.1 Tamanho dos Animais	78

7.2 Biometria	79
7.3 Malformações de Órgãos	82
7.4 Alterações Cardíacas	82
7.5 Alterações Pulmonares	83
7.6 Relação Pneumopatia X Cardiopatia	85
7.7 Aspectos Anatomopatológicos	86
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
9 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	93
ANEXOS	100

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A clonagem ou técnica de transferência nuclear é uma biotécnica que permite a geração de um organismo geneticamente idêntico a outro. Para tanto, é utilizado o núcleo de uma célula somática ou embrionária de interesse, o qual é transferido posteriormente para um oócito previamente enucleado (CAMPBELL et al.; 1996).

Inúmeras aplicações da técnica de transferência nuclear são hipotetizadas na pecuária e na medicina humana. O sucesso na clonagem em animais confirma a utilidade da TN para o propósito de expansão clonal de animais de produção. Há também um crescente interesse na reprodução de indivíduos com perfil de excelência e alta produtividade, ou com características que se queira manter ou imprimir em um rebanho (EDWARDS et al.; 2003) e também em espécies com risco de extinção (LANZA et al.; 2000). Outra aplicação seria a produção de animais geneticamente modificados, os quais podem ser utilizados como biorreatores ou doadores de órgãos para xenotransplantação (BUHLER, 2004, EDWARDS et al.; 2003). Sob o ponto de vista zootécnico, a clonagem é uma prática de interesse já que permite a geração de indivíduos com perfil de excelência e de alta produtividade.

Dolly, o primeiro mamífero clonado através da técnica de TN, um ovino, que teve seu nascimento anunciado em 1997, a célula utilizada era proveniente da glândula mamária de um animal adulto de seis anos (WILMUT et al.; 1997). Após o nascimento de Dolly, vários outros mamíferos de espécies diferentes foram clonados pelo mesmo procedimento de transferência nuclear tais como bovinos, caprinos, murinos, suínos, felinos, eqüídeos e caninos. Apesar das tentativas, a maioria dos animais vieram a óbito antes de completar seis meses de idade (CHAVATTE – PALMER et al.; 2004). A maioria das alterações encontradas nos animais clonados foram tidas como incidentes isolados, e foram alocados dentro da “síndrome do bezerro anormal”, que ocorre em associação com a manipulação do embrião, e é caracterizada por um tamanho aumentado do animal ao nascimento, além de outras anormalidades morfológicas (FARIN et al.; 2006).

As anormalidades fenotípicas encontradas nos clones, e que raramente acometem animais gerados por processo natural de reprodução, revelam que há a necessidade de uma investigação anatomo-patológica minuciosa dos clones. A proporção elevada de clones que vem a óbito “*in utero*” após a transferência nuclear, e a alta porcentagem de má formação em animais neonatos, sugere que o procedimento de transferência nuclear pode estar relacionado

ao desenvolvimento destas anomalias. Logo, estes achados demonstram o valor de estudos anatomo-patológicos detalhados de embriões, fetos, neonatos e animais adultos clonados.

Com base nos fatos expostos, a realização deste trabalho visa descrever as alterações detectadas em bovinos clonados com vistas a contribuir com estudos na área de clonagem, biologia do desenvolvimento e de neonatologia bovina, através de investigações morfológicas de órgãos e tecidos alterados.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Definição

Clone é um indivíduo derivado de outro, que possui o mesmo patrimônio genético do indivíduo original, e que foi produzido por reprodução assexuada. A palavra clone tem sua origem etimológica da palavra grega “*klon*”, que significa broto de um vegetal, pois os vegetais se propagam naturalmente por mecanismos de clonagem (ZATZ, 2004). Portanto, clonagem é uma forma de propagação de um indivíduo a partir de um núcleo celular de um organismo adulto ou de um embrião desta espécie, a qual será submetida a várias etapas, as quais são ilustradas na figura 1.

Adaptado a partir de: Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives. *Theriogenology*, 68s, p. 215s, 2007.

Figura 1- Organograma ilustrando as etapas do processo de clonagem

2.2 Mecanismos de Clonagem

A clonagem pode ter duas finalidades, a clonagem reprodutiva e a clonagem terapêutica. A clonagem reprodutiva visa reproduzir um animal geneticamente idêntico ao animal doador do patrimônio genético, após ser inserido o núcleo de uma célula do doador em um óvulo enucleado, o qual é posteriormente implantando no útero de uma fêmea, a qual servirá de “*receptora*” ou “*barriga de aluguel*”, gestando um novo indivíduo. Sob o ponto de vista zootécnico esta é uma prática de interesse na reprodução de indivíduos com perfil de excelência e de alta produtividade, ou com características que se queira manter ou imprimir em um rebanho (EDWARDS et al.; 2003). A clonagem reprodutiva também pode vir a ser útil na reprodução de espécies em risco de extinção (LANZA et al.; 2000). Ou ainda, na produção de animais geneticamente modificados, os quais podem ser utilizados como biorreatores ou doadores de órgãos para xenotransplantação (LANZA et al.; 2002; EDWARDS et al.; 2003; BUHLER, 2004).

A clonagem terapêutica visa à geração de tecidos ou órgãos, com vistas a possibilidades de utilização destes em bioengenharia tecidual ou na medicina regenerativa. Esta técnica visa à geração de células tronco embrionárias pluripotentes, as quais serão manipuladas ao ponto de diferenciação nos mais diversos tecidos e órgãos que poderão servir no tratamento de diversos tipos de doenças que afligem tanto os seres humanos quanto os animais (ZATZ, 2004).

A clonagem pode ser realizada a partir de diversos tipos de células, células embrionárias ou células somáticas (CAMPBELL et al.; 1996). Após a fecundação, ou seja, a união de um óvulo e um espermatozóide ocorre à formação de uma célula $2n$, a qual irá se dividir em duas células, estas por sua vez em quatro, em oito e assim por diante. Até esta fase cada uma destas células é capaz de desenvolver um ser completo e por isto são chamadas de células tronco totipotentes. Na fase de 8 a 16 células, as células do embrião se diferenciam em dois grupos: um grupo de células externas que vão originar a placenta e anexos embrionários, e uma massa de células internas que vão originar o embrião propriamente dito. Quando alcançar o número de 100 células, este conjunto de células do embrião é denominado de blastocisto e é nesta fase que ocorre a implantação do embrião na cavidade uterina. As células da massa interna do blastocisto irão originar as centenas de tecidos que compõe o organismo, tais células são chamadas de células-tronco embrionárias pluripotentes (ZATZ, 2004).

As células somáticas são células que já sofreram diferenciação. Uma vez diferenciadas as células somáticas perdem a capacidade de originar qualquer tecido ou órgão. No entanto, o grande avanço da clonagem da Dolly foi demonstrar que mesmo a partir de uma célula já diferenciada é possível induzir a embriogênese e formação de um novo indivíduo que compartilha o mesmo patrimônio genético do doador do material genético: Clonagem.

Células embrionárias são passíveis de serem obtidas e cultivadas em laboratório, além de oferecerem também uma alternativa para introdução de “adições” ou “knock in”, ou “deleções seletivas” ou “knock out” de genes no genoma de animais de produção, os quais poderão produzir uma série de proteínas terapêuticas, servindo como “biorreatores” (DINNYES et al.; 2002; EDWARDS et al.; 2003). Da mesma forma, tais manipulações podem ser utilizadas para produzir animais que tenham compatibilidade imunológica com seres humanos, ou outros animais, e servirem como doadores de órgãos, ou xenotransplantação (LANZA et al.; 2002; BUHLER, 2004).

Em geral o primeiro passo para o processo de clonagem envolvendo células somáticas, constitui na obtenção de células de um animal adulto que irá ser clonado, foi descrito que as células do cumulus, fibroblastos, células granulosa do ovário, células mamárias, células musculares, células do oviduto e células uterinas, são as mais comuns para ser utilizadas no processo de clonagem (EDWARDS et al.; 2003). Para a clonagem com células embrionárias o primeiro passo é a obtenção das células, a partir de um embrião, posteriormente o procedimento é usado tanto para células embrionárias, quanto para células somáticas, como veremos a seguir.

O segundo passo é remover o núcleo do oócito primário materno (LIU et al.; 2006), para posterior inclusão do núcleo proveniente da célula somática ou embrionária, isto é feito através de micropipetas, aproximadamente, 18 horas após o oócito sofrer uma maturação prévia e confirmação que todo o material genético foi retirado do citoplasma (DINNYES et al.; 2002; LAI et al.; 2002; EDWARDS et al.; 2003).

O terceiro passo é inserir o núcleo da célula somática ou embrionária no citoplasma de um óvulo enucleado, construindo o equivalente a um óvulo fecundado. Inicialmente o núcleo é mecanicamente inserido no espaço perivitelineo através de micropipetas, após isso é feita uma indução elétrica através de dois eletrodos para que ocorra a fusão do núcleo com o óvulo enucleado, em alguns casos a indução elétrica utilizada para a fusão do núcleo ao óvulo é suficiente para começar o desenvolvimento do zigoto, também são usados em combinações químicas (EDWARDS et al.; 2003; BUHLER, 2004).

O quarto passo no caso de uma clonagem reprodutiva é transferir o zigoto fecundado e inseri-lo no útero de uma fêmea, se este zigoto se desenvolver teremos um novo ser idêntico ao animal de que foi retirada a célula doadora do material genético (ZATZ, 2004). No caso da clonagem terapêutica, ao invés de inserir o óvulo fecundado no útero, as células tronco embrionárias pluripotentes, obtidas serão utilizadas para originar novas células. Estas serão colhidas, manipuladas e cultivadas em laboratório para atingirem a diferenciação desejada e produção de tecidos ou órgãos (EDWARDS et al.; 2003;BUHLER , 2004).

2.3 Histórico

Em cinco de julho de 1996, nasceu o primeiro mamífero clonado, nascimento que só foi divulgado em fevereiro de 1997. A espécie clonada foi um ovino, a famosa ovelha Dolly, a qual foi reproduzida através de uma clonagem reprodutiva, a partir de células somáticas oriundas de uma ovelha adulta de seis anos de idade, nesta ocasião foram utilizadas células da glândula mamária (ZATZ, 2004).

Dolly sobreviveu até os seis anos e meio de idade, quando foi submetida a eutanásia, pois Dolly era vítima de uma doença pulmonar grave. Segundo seus criadores, tal doença supostamente de etiologia infecciosa, além da pneumopatia, Dolly apresentava uma artrite, a qual foi atribuída ao fato de Dolly ficar muito tempo apoiada com os membros pélvicos para “brincar” com os visitantes (SILVA, 2004). A eficiência de células somáticas diferenciadas na clonagem ainda é pequena, somente 1 a 5% chegam ao êxito (BATCHELDER et al.; 2005).

Após o nascimento de Dolly, vários outros mamíferos foram clonados, pelo mesmo procedimento de transferência nuclear. Bovinos (CIBELLI et al.; 1998), caprinos (BAGUISI et al.; 1999), camundongos (WAKAYAMA et al.; 1998), suínos (BETTHAUSER et al.; 2000), gatos (SHIN et al.; 2002), eqüídeos (WOODS et al.; 2003) e cães (LEE et al.; 2005) são exemplos de mamíferos clonados pelo método de transferencia nuclear, mas poucos sobreviviam, a maioria vian a óbito antes dos 6 meses de idade (CHAVATTE-PALMER et al.; 2004).

O sucesso deste procedimento varia de espécie para espécie, sendo que os bovinos mostraram uma melhor performance, perante as outras espécies também clonadas (DINNYES et al.; 2002).

A clonagem não é um processo fácil, Dolly nasceu após 267 tentativas de clonagem reprodutiva, sendo que 90% das células da “mãe de Dolly” que foram inseridas em óvulo enucleados, não chegaram nem ao estágio de blastocisto (ZATZ, 2004). As clonagens posteriores envolvendo outras espécies de mamíferos, também tiveram uma eficiência muito baixa e uma grande proporção de abortos e de embriões malformados (CIBELLI et al.; 2002).

2.4 Contribuições das Técnicas de Clonagem

Apesar de completar mais de uma década após o nascimento do primeiro mamífero clonado, a taxa de sucesso no desenvolvimento completo e sem perdas de um animal ainda é muito baixa (CAMPBELL et al.; 2007). Muitos estudos ainda estão em desenvolvimento para minimizar estas perdas, entre eles uma particular mudança na metodologia de maturação do oócitos para um melhor desenvolvimento e uma sobrevivência maior para o animal clonado (CAMPBELL et al.; 2007).

Inúmeros trabalhos estão sendo publicados tratando do método de transferência nuclear e sua maturação, publicações recentes afirmam que estas etapas do processo de clonagem sejam responsáveis pelos insucessos na produção de animais clonados (CAMPBELL, et al.; 2007), portanto, os pontos no processo de clonagem que são alvos de investigação são a maturação dos oócitos quanto ao seu método *in vivo* ou em *in vitro*, o estágio da maturação dos oócitos utilizados para o processo de enucleação, o método de enucleação utilizado (químico, físico sendo este por laser, centrifugação ou aspiração), o método da transferência do material genético (núcleo) para o oócito enucleado e o método utilizado na ativação e fusão do núcleo ao oócito (CAMPBELL, et al.; 2007).

Ao mesmo tempo em que técnicas empregadas na geração de animais por transferência nuclear, outro aspecto da clonagem animal é resultado de inúmeras publicações, trata-se da utilização de animais clonados na produção de alimentos de origem animal tal como na produção de animais clonados para produção de carnes na alimentação de seres humanos (RUDENKO, et al.; 2007). Este tema é muito polêmico, já que o FDA, entidade americana que certifica fármacos e alimentos de origem animal no país, ainda não tem uma posição no que diz respeito à utilização de matéria prima a partir de animais clonados para a produção de alimentos de origem animal. Até o presente momento, não há publicações

científicas abordando o tema, sobre os riscos que o consumo de alimentos oriundos de animais clonados pode oferecer a saúde humana, por falta de bases científicas para tomar qualquer tipo de decisão, o FDA esta aguardando futuras publicações científicas, para poder tomar alguma decisão.

2.5 Aspectos Anatomopatológicos

Entre os diferentes defeitos, observados nos animais que nasceram vivos, após inúmeras tentativas de clonagem, usando células somáticas, podemos destacar:

- **Placentas anormais:** Uma das causas apontadas por perdas de fetos clonados em fase de gestação é devido a deficiências placentária, aproximadamente 82% de bovinos clonados não sobrevivem entre o 30º e 90º dia de gestação (DINNYES et al.; 2002; SILVA 2004). Esta alteração placentária é devido ao desenvolvimento de um corioalantóide deficiente, se comparado ao de uma gestação normal. Os fatores que promovem o crescimento placentário e vascular e as interações materno-fetais como as conexões placentárias também estão envolvidas na formação de alterações placentárias (HILL et al.; 1999; TANAKA et al.; 2001). A deficiência do desenvolvimento vascular em bovinos pode ser evidenciada por estruturas cotiledonares reduzidas ou ausentes. Placentações deficientes foram relatadas em camundongos (DINNYES et al.; 2002), as anormalidades mais comumente encontradas foram uma irrigação sangüínea deficiente, aumento da ocorrência de hidroalantóide e redução do numero e aumento de tamanho dos placentomas (HILL et al.; 1999; TANAKA et al.; 2001; FARIN et al.; 2006).
- **Gigantismo:** O cultivo de embrião e transferência nuclear são procedimentos que podem resultar em uma cria com o tamanho acima do normal, essas alterações são chamadas de “Síndrome do neonato gigante” ou “Síndrome do bezerro gigante” as quais são uns dos problemas mais freqüentes observados em fetos de animais clonados, (YOUNG et al.; 1998; CHAVATTE-PALMER et al.; 2004; HEYMAN et al.; 2004; FARIN et al.; 2006). Fetos de animais clonados geralmente nascem cerca de 20% maiores do que fetos de animais provenientes de transferência de embrião (HEYMAN et al.; 2004).

A heterogeneidade observada na “Síndrome do neonato gigante”, faz com que haja uma dificuldade extrema para estudar um baixo número de casos, por isso foi proposto um novo

termo para o estudo destas anormalidades “Síndrome do neonato anormal” (FARIN et al.; 2006), a qual foi dividida em quatro tipos, de acordo com seu grau de anormalidades.

- Tipo 1 – Há o desenvolvimento anormal e morte precoce do embrião com aproximadamente 42 dias de gestação.
- Tipo 2 – Há o desenvolvimento anormal de membranas placentárias e morte do feto entre o 42º e o 280º dia de gestação.
- Tipo 3 – A gestação vem a termo, mas com severas anormalidades e com nenhuma resposta compensatória do feto. Após o nascimento o feto apresenta severos comprometimentos como: alterações clínicas, hematológicas, parâmetros bioquímicos, com o feto vindo a óbito no período perinatal.
- Tipo 4 - A gestação vem a termo, mas com moderadas anormalidades e já apresentando respostas compensatórias do feto, como a adaptação fisiológica. Após o nascimento o feto apresenta comprometimentos como: alterações clínicas, hematológicas, parâmetros bioquímicos, ao contrário do tipo 3 onde o feto vem a óbito no período perinatal, o feto sobrevive (FARIN et al.; 2006).

O gigantismo de fetos é maléfico a genitora, pois além de causar um parto distócico (YOUNG et al.; 1998), eles são muito pesados. Este tipo de anomalia tem uma taxa de 30% de mortalidade antes do desmame do animal. Tais alterações podem também estar presentes em FIV (HORTA, 1999).

- **Cardiopatias:** Exames de ecocardiografia foram realizados, imediatamente após o nascimento de clones, os exames revelaram uma dilatação do ventrículo direito e uma hipertrofia severa do ventrículo esquerdo (RENARD et al.; 1999).
- **Pneumopatias:** Muitos animais clonados que apresentaram problemas cardíacos após o nascimento, são submetidos a uma terapia intensa e monitoramento, pois a maioria apresenta complicações pulmonares, como deficiência de surfactante, hipertensão pulmonar, pulmões imaturos hipoxia, dispnéia e o desenvolvimento de pneumonias (HILL et al.; 1999; EDWARDS et al.; 2003; LI et al.; 2005)
- **Hepatopatias:** Esteatose foi observada em alguns clones, sendo sugestivo de perturbações na regulação do metabolismo ácido-básico (CHAVATTE-PALMER et al.; 2004). O excesso de amônia circulante também foi relatado como uma possível causa de lesões hepáticas.

- **Doenças do sistema hemolinfóide:** Relatos envolvendo animais clonados, que apresentaram uma hipoplasia linfóide, após exame histológico, nos quais foi evidenciado hipoplasia tímica, hipoplasia esplênica e hipoplasia de linfonodos. Nos linfonodos há uma redução do número de folículos primários e uma redução do tamanho da porção cortical, o que caracteriza a hipoplasia (RENARD et al.; 1999).

Essas enfermidades contribuem para um alto índice de abortos e morte no período pós-natal de fetos clonados (FARIN et al.; 2006). A expressão aberrante de genes VEGF, BMP-4, PCAF, HSP-70 em órgãos de bovinos clonados que vieram ao óbito logo no início do período pós-natal (dois dias) foi descrita recentemente (LI et al.; 2005). Dados clínicos e anatomopatológicos referentes aos clones ainda são poucos e pouco elucidativos, o que demonstra a necessidade de acompanhamento por clínicos e patologistas para realmente elucidar os fenômenos relativos aos problemas decorrentes da clonagem (RHIND et al.; 2003).

Estudos sobre animais clonados que vieram a óbito logo após o nascimento descrevem quadros de insuficiência cardíaca e respiratória, lesões renais, hidroalantóide proveniente de insuficiência renal, nascimentos de animais fracos, em péssimo estado geral, baixa resistência ao esforço (andar/deambular) que vem ao óbito mesmo quando assistidos por médicos veterinários. O exame sistemático de caracterização destas alterações irá fornecer dados importantes sobre a biologia do desenvolvimento nas espécies domésticas.

Os animais clonados que se desenvolveram até a idade adulta, são descritos muitos episódios clínicos e doenças, dentre estas estão quatro animais com alterações do desenvolvimento do timo, com organização anormal do tecido além de hipoplasia tímica. Sendo que em um dos casos foi descrito como hipoplasia linfóide (RENARD et al.; 1999). Alguns vieram a óbito subitamente, estes quadros de morte súbita ainda não estão bem elucidados, sem lesões específicas na necropsia, sendo mais marcante a presença de esteatose, mas as descrições patológicas são escassas e ainda pouco elucidativas (CHAVATTE-PALMER et al.; 2004). Em camundongos clonados também há descrições de perda logo após o nascimento e animais com sobrevida inferior aos controles não clonados (OGONUKI et al.; 2002). Da mesma forma estudos das placentas destes animais também mostram alterações importantes, as quais podem estar relacionadas à perdas no início da gestação bem como na sanidade da prole gerada (TANAKA et al.; 2001). Estudos revelam alterações epigenéticas em células e em clones de camundongos gerados tanto por células embrionárias como em

células somáticas (HUMPHERYS et al.; 2001). Também foram estudados os efeitos do cultivo “*in vitro*” de embriões de camundongos e estes mostraram alteração na expressão do mRNA dos genes de implantação, desenvolvimento e alterações comportamentais nos camundongos clonados (FERNANDEZ-GONZALEZ et al.; 2004). Estudos sobre a sobrevivência dos clones ainda são controversos, sendo que o estado de “aparentemente normal” dos animais, como descrito por autores (CIBELLI et al.; 2002), não são satisfatórios. Avaliação de gerações de clones mostram que estes são viáveis sob o ponto de vista reprodutivo (CIBELLI et al.; 2002). Mas também há relatos de menor eficiência imune e complicações em órgãos como coração, pulmão e fígado (HUMPHERYS et al.; 2001; TANAKA et al.; 2001; CAMPBELL et al.; 2007).

Objetivos

3 OBJETIVOS

- Colher e tabular os dados referentes à gestação dos clones.
- Realizar as necropsias dos animais que vierem a óbito.
- Colher os dados de peso e tamanho para estudos de biometria dos diferentes órgãos dos animais necropsiados.
- Tabular os dados para o estudo de biometria.
- Colher e preparar o material para estudo histopatológico.
- Avaliar as alterações histopatológicas e tabular os principais achados.
- Descrever as principais alterações macro e microscópicas nos diversos órgãos dos animais clonados.
- Selecionar material para estudos com emprego de imunoistoquímica para caracterização e quantificação de componentes celulares em animais produzidos pelo processo de clonagem.

Justificativa

4 JUSTIFICATIVA

Os avanços recentes na biologia da reprodução permitiram a manipulação e modificação dos processos naturais de reprodução animal. Dentre as diversas possibilidades está a clonagem. O processo de clonagem está possibilitando avanços nunca antes imaginados na compreensão da biologia do desenvolvimento. Sob o ponto de vista zootécnico a clonagem animal pode contribuir em muito para a expansão de caracteres genéticos de interesse na produção animal. Outro ponto importante é a possibilidade da aplicação da clonagem terapêutica com vistas à produção de células tronco embrionárias. Ainda neste aspecto, a clonagem aliada às técnicas de transgenia pode fornecer animais que venham a ser utilizados como biorreatores, com intuito de produzir proteínas terapêuticas, bem como, estas manipulações podem ser empregadas com intuito de modificar respostas imunes adversas ao transplante de órgãos, ou xenotransplantação. Desta forma possibilitando a utilização de animais geneticamente manipulados e modificados com intuito de produzir tecidos e órgãos a serem utilizados pela Bioengenharia Tecidual.

Até o presente momento existem poucos estudos quanto ao estado de saúde dos animais clonados. Existem poucas publicações relatando as alterações macro e microscópica observadas nos animais clonados que não sobreviveram após o nascimento. De forma que estudos sob a caracterização clínica e patológica dos animais que vieram a óbito podem fornecer dados importantes sobre a neonatologia bovina, a biologia do desenvolvimento nesta espécie e avaliação da influência dos métodos de clonagem sobre a implantação, embriogênese e organogênese em animais produzidos através desta técnica.

Material e Métodos

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais e Exame Necroscópico

O estudo foi conduzido na fazenda Tambaú localizada no Estado de São Paulo, no período compreendido entre 2004 e 2007. Até o momento foram necropsiados treze animais clonados oriundos de células somáticas, pertencentes à espécie bovina, das raças Nelore e Simental, com idade variando de um a dezenove dias, de ambos os sexos, foram registrados o peso do animal, dos órgãos, bem como avaliação morfológica destes. As necropsias foram realizadas no Departamento de Patologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VPT – FMVZ – USP). Foi utilizado protocolo padrão de necropsia de grandes animais adotado pelo Departamento de Patologia Animal FMVZ – USP. Os dados biométricos tais como peso do animal morto, órgãos e tecidos, foram aferidos em balança e os resultados, tabulados.

5.2 Histopatologia

Estudos histopatológicos foram realizados em diversos órgãos, dando ênfase em pulmão, coração, baço, timo e linfonodos, para este estudo foi realizado o protocolo padrão de coloração H&E.

- **Fixação:** A fixação consiste por um lado em matar rapidamente as células e interromper os processos autolíticos já iniciados; por outro lado endurecer parcialmente os tecidos para poderem suportar sem deformação a acção de reagentes e manipulações técnicas a utilizar posteriormente. Foi usado como fixador, formol (10%).
- **Inclusão:** A inclusão tem por fim endurecer os tecidos para que se possam executar cortes finos. As diferentes etapas que a seguir se descrevem podem racionalizar-se assim: 1) remoção da água dos tecidos com alcoois de grau cada vez mais elevado; 2) substituição do álcool por um líquido que seja capaz de funcionar como veículo de parafina, no caso foi usado xilol; 3) parafina; 4) inclusão no cassete histológico.

- **Cortes:** Os cortes são feitos em micrótomo, a espessura padronizada foi de 5 micras, após a realização dos cortes no micrótomo, os mesmos foram fixados em lâminas histológicas para a coloração.
- **Coloração:** Para proceder à coloração torna-se necessário remover a parafina e hidratar os cortes. A sequência que se utiliza neste passo é pois inversa da inclusão: 1) Xilol para desparafinar; 2) Alcoois para remover o xilol; 3) Hidratação com água, 4) Coloração por Hematoxilina; 5) Coloração por Eosina; 6) Alcoois para desidratar; 7) Xilol para diafanizar; 8) Montagem da lâmina (laminula e resina).

5.3 Imunoistoquímica

Foram utilizadas amostras de tecidos linfóides (baço, timo e linfonodos) coletados dos animais necropsiados provenientes do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, como conduta de rotina deste departamento, após os exames necroscópicos os fragmentos teciduais coletados eram avaliados e fixados em formalina a 10% para posteriormente serem processados e incluídos em parafina.

5.3.1 Padronização da técnica de reação Imunoistoquímica

Para a padronização da técnica de imunoistoquímica, blocos de parafina contendo as amostras coletadas foram cortados em micrótomos, com espessura padronizada de 5µm e passados para lâminas de vidro previamente tratadas com Organosilano (Sigma A3648), com o objetivo de promover a adesão dos cortes às lâminas e estas postas em estufa por 24 horas em temperatura entre 55⁰ e 58⁰C para prévias desparafinização.

Depois de retiradas da estufa foram colocadas em cubas de vidro verticais contendo xilol, na qual foram feitas três passagens de trinta minutos cada, para se obter uma desparafinização completa. Em seguida foram realizadas reidratações dos cortes em soluções aquosas de álcool etílico com concentrações decrescentes, as quais passaram três vezes em

álcool absoluto com cinco minutos cada passagem, uma vez em álcool 95% por cinco minutos, uma vez em álcool 70% por cinco minutos e uma vez em água destilada também por cinco minutos.

Iniciou-se então o processo de recuperação antigênica, com o propósito de liberar os epítomos antigênicos do tecido, bloqueados com a solução fixadora. A técnica foi feita com solução de citrato 10 mM (vide anexo A). Esta solução foi colocada em cuba de vidro horizontal na qual as lâminas foram introduzidas paralelamente e incubada em forno de microondas, durante doze minutos para posterior resfriamento em temperatura ambiente.

Realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena por incubação do material em 5% de peróxido de hidrogênio a 20 volumes (20 ml) e álcool metílico (80 ml), durante trinta minutos. Posteriormente o material foi lavado em solução de tampão fosfato (PBS) (vide anexo A), 0,01 M (pH 7,0) por cinco minutos, com três repetições.

Após essa etapa, foi realizada a diluição dos anticorpos primários em tampão fosfato (PBS) 0,1M (pH 7,0), cobriram-se as lâminas com os anticorpos primários diluídos e incubaram-se em câmara úmida por 18 horas “overnight” com tempera à 4°C. No início os anticorpos primários foram diluídos conforme concentrações utilizadas em seres humanos e padronizadas posteriormente. A padronização da diluição foi otimizada em 1:200 para CD3 e 1:200 para CD79.

A segunda etapa da reação consiste na incubação com anticorpo secundário e da revelação da reação. Para a incubação do anticorpo secundário foi realizado três banhos com tampão fosfato (PBS) por cinco minutos cada, a incubação foi realizada com o anticorpo secundário biotinilado contra imunoglobulina de camundongo, coelho e cabra (Kit LSAB código K0690, Dako Corporation, Carpinteria, USA). Após a incubação foi realizada mais três lavagens com Tampão Fosfato (PBS) por cinco minutos cada para posterior incubação com a solução estreptoavidina-peroxidase (Kit LSAB código K0690, Dako Corporation, Carpinteria, USA), finalizando-se o processo com mais três lavagens com Tampão Fosfato (PBS) por cinco minutos cada.

Para a revelação da reação foi utilizado o cromógeno a base de diaminobenzina (DAB), banhando as lâminas por três segundos (Código K-3468 Dako Corporation, Carpinteria, USA), após a reação era interrompida em Tampão Fosfato (PBS), em seguida foram realizados três lavagens em Tampão Fosfato (PBS) por cinco minutos cada.

Prosseguiu-se com a contracoloração em Hematoxilina de Harrys pura por um minuto, lavagem em água corrente, desidratação, diafanização e montagem. A desidratação foi realizada em passagens por álcool etílico em concentrações crescentes, uma passagem em álcool 70%, uma passagem em álcool 95% e uma passagem em álcool absoluto (cinco minutos em cada álcool). A diafanização foi realizada em três passagens em xilol por cinco minutos cada. A montagem das lâminas foi realizada com resina sintética (ENTELLAN – MERK) e lamínulas histológicas.

5.4 Biometria

Para o estudo da biometria dos animais, foram utilizados os seguintes padrões:

- Idade do Animal: Análise da sobrevivência do animal clonado.
- Peso do Animal: Todos os animais submetidos ao exame necroscópico foram pesados em balanças apropriadas, os pesos foram anotados para posterior análise estatística.
- Peso de Órgãos: Os órgãos utilizados na padronização deste estudo foram: Fígado, Pulmões, Coração, Rins, Baço, Timo e Glândulas Tireóides, os quais foram submetidos a pesagens individuais e cálculo de seus respectivos pesos relativos em relação ao peso animal.
- Cálculo Métrico: O órgão utilizado foi a traquéia, onde foi aferido o diâmetro da luz traqueal em região de terço proximal.

5.5 Análise Estatística

Os dados finais da análise estatística correspondem aos dados biométricos obtidos dos animais necropsiados, tais como o peso dos órgãos em relação ao peso de cada animal, o chamado peso relativo, além dos órgãos foram mensurados o peso de cada animal e a idade dos animais na data dos respectivos óbitos. Os valores obtidos foram submetidos à

composição de gráficos para comparação múltipla de medidas, pesos e identificação das diferenças significantes.

Resultados

6 RESULTADOS

6.1 Macroscopia

Os animais listados no quadro 1 foram necropsiados no Departamento de Patologia Animal da FMVZ-USP, todos os animais apresentaram alguma alteração macroscópica digna de nota, as quais são descritas pormenorizadamente adiante.

Clone n°	Raça	Sexo	Data do nascimento	Data de óbito	Data da necropsia
1	Nelore	Fêmea	07/09/04	22/09/04	22/09/04
2	Nelore	Fêmea	04/10/04	09/10/04	09/10/04
3	Nelore	Macho	04/03/05	07/03/05	07/03/05
4	Nelore	Macho	12/03/05	13/03/05	14/03/05
5	Nelore	Macho	18/03/05	18/03/05	21/03/05
6	Nelore	Fêmea	03/12/05	04/12/05	05/12/05
7	Nelore	Fêmea	26/12/05	26/12/05	26/12/05
8	Nelore	Fêmea	26/12/05	06/01/06	06/01/06
9	Nelore	Fêmea	09/06/06	19/06/06	19/06/06
10	Simental	Macho	21/06/06	23/06/06	24/06/06
11	Simental	Macho	07/06/06	26/06/06	27/06/06
12	Nelore	Fêmea	28/01/07	06/02/07	07/02/07
13	Nelore	Macho	17/05/07	20/05/07	21/05/07

Quadro 1- Lista dos animais utilizados neste estudo

Ao exame externo dos animais clonados, as seguintes alterações puderam ser evidenciadas: mucosas cianóticas; presença de líquido de coloração levemente avermelhada, sendo exteriorizadas através de ambas as narinas; membros torácicos apresentando aumento de volume de grau pronunciado em articulação cárpica bilateral, com aumento de dimensões ósseas evidenciadas por exame radiográfico; presença de edema subcutâneo na referida articulação, acompanhado de consistência crepitante por ocasião da palpação e perda de arquitetura tecidual (musculatura e demais tecidos) subjacente; membros pélvicos apresentando aumento de volume de grau leve em articulação tarsica bilateral, acompanhado de hiper-extensão dos mesmos; cordão umbilical apresentando aumento de volume; aspecto de alça de comprimento longo e aumento do diâmetro dos vasos que compunham a referida estrutura, evidenciável ao corte; área de pele apresentando aumento de espessura acompanhada por falacrose em região cervical lateral esquerda; linfadenomegalia generalizada e presença de edema subcutâneo em região torácica. Alterações ilustradas na figura 2.

O exame da cavidade abdominal e torácica revelou a presença de efusão peritoneal de aspecto límpido e coloração levemente acastanhada, ocupando um volume de aproximadamente 600 ml; presença de efusão torácica de aspecto seroso e de coloração levemente avermelhada acompanhado de traços de fibrina (hidrotórax sero-fibrinoso); a presença de efusão na cavidade pericárdica de aspecto límpido e coloração amarelo-esverdeada; superfície de lobos pulmonares apresentando aderência de grau leve; linfonodos mesentéricos apresentando linfadenomegalia; grande quantidade de hemolinfonodos em cavidade torácica e abdominal. Alterações ilustradas na figura 3.

O exame do primeiro conjunto, compreendido pela língua, faringe, tonsilas, esôfago, laringe, traquéia, tireóide, pulmões e coração, revelou a presença de áreas hemorrágicas no terço inicial da camada adventícia da traquéia; redução de diâmetro da luz traqueal, em relação ao tamanho do animal; mucosa traqueal de coloração levemente hiperêmica, acompanhada pela presença de líquido de aspecto seroso e aerado de coloração levemente avermelhada em lúmen traqueal e de brônquios bilateralmente, decorrente de edema pulmonar; áreas de enfisema distribuídas difusamente pelo parênquima pulmonar esquerdo e direito, bem como por bordos pulmonares; áreas de atelectasia distribuídas por lobos pulmonares direitos e esquerdos, bem como por bordos pulmonares; áreas de congestão pulmonar distribuída por todo parênquima, porém, mais pronunciadas em áreas dependentes; ao corte, edema pulmonar de grau leve a moderado com exteriorização de líquido sero-

hemorrágico de coloração avermelhada, acompanhado de consistência crepitante à palpação; a presença de pontos de coloração esbranquiçada distribuídos por parênquima pulmonar direito e esquerdo acompanhada de áreas de coloração vermelho intenso em ambos hemi-pulmões e aumento de consistência do parênquima por ocasião da palpação. Alterações ilustradas na figura 4.

A avaliação do coração e grandes vasos revelou a presença de cistos hemáticos de aproximadamente 5 mm de diâmetro, em valvas tricúspide e mitral; a persistência do forame oval; a patência de ducto arterial; o espessamento de trabécula septo marginal esquerda; a presença de coágulos de aspecto cruícos entremeados às valvas tricúspide e mitral; hipertrofia excêntrica de miocárdio ventricular direito e esquerdo; a presença de sufusões e víbices em miocárdios direito e esquerdo; dilatação de grau leve de ventrículo direito; inserção de cordas tendíneas em septo interventricular do ventrículo esquerdo; espessamento de cúspide septal da valva mitral; justaposição de músculos papilares e inserção de cordas tendíneas à parede ventricular lateral direita; justaposição de valvas tricúspide e mitral a parede cardíaca lateral direita e esquerda respectivamente. Alterações ilustradas na figura 5.

O exame do segundo conjunto, compreendido pelo baço e epíplon, revelou as seguintes alterações: hipoplasia de polpa branca e baço de coloração levemente pálida; diminuição do volume do baço; presença de grande quantidade de hemolinfonodos em epíplon. Alterações ilustradas na figura 6.

O exame do terceiro conjunto, compreendido pelos segmentos anatômicos do intestino delgado e intestino grosso, revelou hiperemia de mucosa de grau severo acompanhada por conteúdo de aspecto mucoso e de coloração amarelada, estando ambas as alterações distribuídas por toda extensão do órgão. Alterações ilustradas na figura 6.

O exame do quarto conjunto, compreendido pelo diafragma, fígado, vesícula biliar, pré-estômagos, estômago, segmento inicial do duodeno e pâncreas, revelou a presença de sufusões e víbices em serosas de rúmen e abomaso; fígado de coloração levemente amarelada, sugerindo um processo de degeneração hepática, a mais clara; presença de congestão hepática de grau leve; bordos hepáticos arredondados; linfonodos peri-hepáticos apresentando linfadenomegalia; presença de grumos de aproximadamente 1 mm dentro da vesícula biliar; edema de grau leve de vesícula biliar; bile de consistência pastosa e grumosa. Alterações ilustradas na figura 7.

O exame do quinto conjunto, compreendido pelos sistemas urinário (rim, ureteres, uretra e vesícula urinária), genital masculino (próstata, pênis, prepúcio, bolsa escrotal, testículos e epidídimo) e feminino (vagina, cérvix uterina, corpo, cornos uterinos e ovários) e glândulas adrenais, revelou as seguintes alterações: cápsula fibrosa do rim direito apresentando resistência à tração; cápsula renal esquerda aderida ao parênquima subjacente; dilatação de pelve renal bilateral; dilatação de cálices renais do rim direito; pirâmides renais apresentando coloração vinhosa mais pronunciada em rim direito; hipoplasia renal bilateral; aumento de volume de ambos os rins acompanhado de lesões puntiformes de aproximadamente 1 mm de diâmetro e de coloração esbranquiçada distribuídas pelo parênquima, sugerindo lesão glomerular; ao corte, puderam ser evidenciadas estriações longitudinais de coloração esbranquiçada em região cortical, sugerindo lesão tubular; rim esquerdo apresentando coloração vinho-escura; região cortical de ambos os rins apresentando coloração acastanhada; região medular de ambos os rins apresentando coloração avermelhada de grau moderado. Alterações ilustradas na figura 8.

O exame do sexto conjunto, compreendido pelo sistema nervoso central (meninges, medula espinhal e encéfalo), revelou a presença de espessamento do conjunto de meninges encefálicas, edema cerebral e uma moderada congestão cerebral. Alterações ilustradas na figura 9.

O exame do timo revelou hipoplasia de grau moderado a severo, apresentando o último, praticamente ausência de parênquima tímico.

O exame da medula óssea da calota craniana, úmero e costelas, revelaram diminuição da área medular hematogênica em relação ao diâmetro dos ossos e tamanho do animal, acompanhada de diminuição da intensidade de coloração da medula. Alterações ilustradas na figura 10.

Figura 2- Mostrando as diversas alterações macroscópicas encontradas ao exame externo, (A) O menor clone necropsiado no estudo, pesando 13 kilos. (B) Comparando com a foto A, um animal da mesma idade pesando 63 kilos, no detalhe aumento de volume de grau moderado em articulação metatarso-falangeano. (C) Seta mostrando cicatriz do cordão umbilical. (D) Foto após abertura da cavidade abdominal, no destaque uma severa congestão em região de útero.

Figura 3- Mostrando as coleções líquidas encontradas, (A) Hidropericardio com aspecto seroso. (B) Hidroperitônio serosanguinolento

Figura 4- Mostrando as alterações no sistema respiratório: **(A)** Diâmetro da luz traqueal reduzido para com a idade do animal. **(B)** No destaque área de transição de enfisema e congestão pulmonar. **(C)** Congestão pulmonar intensa, no destaque área de atelectasia pulmonar. **(D)** Foto ilustrando um severo edema pulmonar

Figura 5- Mostrando as principais alterações cardíacas encontradas. **(A)** No detalhe ilustração de uma persistência do forame oval. **(B)** Cistos hemáticos em região valvular, notar a arquitetura de “cachos de uva”. **(C)** No detalhe um defeito no septo interventricular. **(D)** Foto mostrando uma severa hipertrofia concêntrica

Figura 6- Ilustrando alterações esplênicas e intestinais. **(A)** Foto de baço, mostrando uma redução no seu tamanho e uma moderada palidez. **(B)** Foto dos órgãos da cavidade torácica e abdominal “*in situ*”, no detalhe palidez esplênica. **(C)** Foto do intestino delgado e grosso, no detalhe víbices e sufusões em serosa cecal. **(D)** Foto do mesentério, no detalhe linfadenomegalia do linfonodo mesentérico

Figura 7- Ilustração mostrando alterações hepáticas, vesícula biliar e abomasais. **(A)** Foto mostrando o fígado e a vesícula biliar, no detalhe congestão da mucosa. **(B)** Foto mostrando a superfície hepática a qual se apresenta com uma coloração amarelada, sugerindo uma degeneração hepática. **(C)** Foto mostrando a superfície de corte do parênquima hepático, o qual se apresenta com uma coloração amarelada, ilustrando uma degeneração. **(D)** Foto mostrando a mucosa abomasal, no detalhe áreas vinhosas na mucosa, sugerindo um processo de abomasite

Figura 8- Mostrando as lesões renais encontradas nos animais examinados. **(A)** No detalhe a região medular de ambos os rins apresentando coloração avermelhada. **(B)** Foto ilustrando uma leve dilatação da pelve renal. **(C)** No detalhe estriações de coloração esbranquiçada em região córtico-medular, sugerindo uma lesão degenerativa de túbulos renais. **(D)** Foto mostrando a coloração acastanhada presente na superfície do órgão

Figura 9- Mostrando as lesões encontradas no sistema nervoso central (cérebro). **(A)** No detalhe, edema em circunvoluções cerebrais, vista dorsal do cérebro. **(B)** No detalhe moderada congestão de vasos, vista ventral do cérebro

Figura 10- Mostrando uma diminuição da área medular em relação ao diâmetro do osso, na foto foi utilizado como modelo o fêmur. Nota-se ainda uma diminuição na coloração da medula, se apresentando rosada

2 Idade

As idades dos animais necropsiados neste estudo, variaram entre 2 e 19 dias, como mostra o gráfico 1.

Gráfico 1- Mostrando as idades dos animais necropsiados

6.3 Biometria

Foram aferidos os pesos relativos dos animais em relação ao peso vivo dos animais necropsiados, além dos pesos relativos, foram aferidos também os pesos brutos de cada animal, os resultados estão tabulados e representados nos gráficos abaixo (gráfico 2 ao 17):

Gráfico 2- Mostrando a variação dos pesos aferidos nos animais em óbito

Gráfico 3- Mostrando a variação dos pesos aferidos nos órgãos em questão

Gráfico 4- Mostrando a variação dos pesos relativos dos órgãos em relação ao peso dos animais

Gráfico 5- Mostrando a variação dos pesos relativos dos órgãos em relação ao peso do clone um

Gráfico 6- Mostrando a variação dos pesos relativos dos órgãos em relação ao peso do clone dois

Gráfico 7- Mostrando a variação dos pesos relativos dos órgãos em relação ao peso do clone três

Gráfico 8- Mostrando a variação dos pesos relativos dos órgãos em relação ao peso do clone quatro

Gráfico 9- Mostrando a variação dos pesos relativos dos órgãos em relação ao peso do clone cinco

Gráfico 10- Mostrando a variação dos pesos relativos dos órgãos em relação ao peso do clone seis

Gráfico 11- Mostrando a variação dos pesos relativos dos órgãos em relação ao peso do clone sete

Gráfico 12- Mostrando a variação dos pesos relativos dos órgãos em relação ao peso do clone oito

Gráfico 13- Mostrando a variação dos pesos relativos dos órgãos em relação ao peso do clone nove

Gráfico 14- Mostrando a variação dos pesos relativos dos órgãos em relação ao peso do clone dez

Gráfico 15- Mostrando a variação dos pesos relativos dos órgãos em relação ao peso do clone onze

Gráfico 16- Mostrando a variação dos pesos relativos dos órgãos em relação ao peso do clone doze

Gráfico 17- Mostrando a variação dos pesos relativos dos órgãos em relação ao peso do clone treze

6.4 Alterações Patológicas

As principais alterações patológicas evidenciadas neste estudo também foram tabuladas e representada em gráficos, onde há as prevalências de cada entidade foram mensuradas nos gráficos abaixo (gráfico 18 ao 22).

Gráfico 18- Mostrando as principais alterações patológicas encontradas.

Gráfico 19- Mostrando as principais pneumopatias encontradas nos animais necropsiados

Gráfico 20- Mostrando as principais cardiopatias encontradas nos animais necropsiados até o presente momento

Gráfico 21- Mostrando as principais nefropatias encontradas nos animais necropsiados até o presente momento

Gráfico 22- Mostrando as principais hepatopatias encontradas nos animais necropsiados até o presente momento

6.5 Histopatologia

Após a realização das necropsias foram coletados fragmentos de órgãos com alterações para a o exame histopatológico, os tecidos com mais alterações patológicas dignas de nota foram os órgãos do sistema hemolinfático, sistema respiratório e sistema digestório.

A avaliação microscópica do coração revelou áreas presença de cistos hemáticos em região valvular (átrio-ventricular direita e esquerda), com contornos bem definidos tendo no seu interior coloração fortemente eosinofílica, lesão ilustrada na figura 11.

A avaliação microscópica do pulmão revelou áreas de consolidação pulmonar devido atelectasia caracterizadas por expansão incompleta dos sacos alveolares distribuídas difusamente pelo parênquima ou regiões periféricas, congestão capilar e distensão de septos alveolares, edema caracterizado por coloração levemente eosinofílica, homogênea, preenchendo alvéolos, ductos alveolares, bronquíolos e brônquios, difusamente distribuído pelo parênquima, áreas de enfisema alveolar, sub-pleural, e de septo inter-lobular, presença de

trombos em organização aderidos a camada íntima de artérias e arteríolas pulmonares, de coloração eosinofílica, apresentando em seus interiores seqüestro de polimorfonucleares, exudato fibrino-purulento com predominância de células polimorfonucleares preenchendo alvéolos, ductos alveolares e bronquíolos, infiltrado polimorfonuclear em septos alveolares, alvéolos e bronquíolos com predominância de eosinófilos, presença de mecônio caracterizado no interior de alvéolos e bronquíolos caracterizado por coloração acastanhada e homogênea, imaturidade pulmonar de parte de alguns lóbulos pulmonares caracterizada por ausência de septação alveolar secundária, diminuição da quantidade de sacos alveolares, e grande quantidade de células mesenquimais nos septos formados, presença de corpúsculos amiláceos (“corpora amilacea”) no interior de alguns alvéolos caracterizados por contornos arredondados e definidos, coloração basofílica e homogênea, proliferação papilar de epitélio colunar de bronquíolo, presença de mecônio e fibrina no interior de alvéolos caracterizado por coloração mista, eosinofílica e acastanhada, de aspecto heterogêneo lembrando a conformação de fitas, bronquíolo e bronquiectasia. Lesões ilustradas na figura 12.

Ao exame histopatológico, o fígado apresentou uma severa degeneração micro e macro vacuolar acompanhada de uma intensa congestão hepática. Lesão ilustrada na figura 13.

O baço apresentou uma severa rarefação linfóide, com uma grande concentração de linfócito em região peri vascular, entremeio a uma moderada congestão. Nota-se ainda uma diminuição dos folículos linfóides como mostra a figura. Lesões ilustradas na figura 14.

Como o baço os linfonodos examinado apresentaram uma severa rarefação linfóide, com perda de relação cortiço-medular, nota-se ainda edema em região cortical e uma grande quantidade de macrófagos no parênquima. Lesões ilustradas na figura 15.

O Timo apresentou uma severa rarefação linfóide e poucos exemplares de corpúsculos de Hassall, parênquima tímico constituído basicamente por tecido conjuntivo. Lesões ilustradas na figura 16.

Figura 11- Fotomicrografia de coração (H&E escala em barra = 100 μ m) representado por região de válvula átrio-ventricular esquerda ilustrando cisto hemático

Figura 12- Cortes histológicos de pulmão. (A) Foto micrografia (H&E escala em barra = 200µm), mostrando parênquima pulmonar, no detalhe áreas onde não houve expansão alveolar, caracterizado por uma consolidação. (B) Foto micrografia (H&E escala em barra = 100µm), no detalhe área de consolidação pulmonar. (C) Foto micrografia (H&E escala em barra = 50µm), no detalhe área de consolidação pulmonar, acompanhada por uma congestão. (D) Foto micrografia (H&E escala em barra = 25µm), no detalhe alvéolo sem expansão acompanhada de uma congestão pulmonar severa. (E) Foto micrografia (H&E escala em barra = 70µm), no detalhe moderada quantidade de mecônio no interior de alvéolos. (F) Foto micrografia (H&E escala em barra = 70µm) ilustrando uma severa quantidade de mecônio aspirado no interior de alvéolos. (G) Foto micrografia (H&E escala em barra = 100µm) ilustrado um trombo arterioso em organização

Figura 13- Cortes histológicos de fígado. **(A)** Foto micrografia (H&E escala em barra = 50 μ m), mostrando uma degeneração hepática do tipo vacuolar distribuída de forma difusa pelo parênquima hepático. **(B)** Foto micrografia (H&E escala em barra = 20 μ m), mostrando uma degeneração hepática do tipo vacuolar, no detalhe uma célula com um vacúolo no citoplasma deslocando o núcleo para a periferia

Figura 14- Cortes histológicos de baço. **(A)** Foto micrografia (H&E escala em barra = 200µm), mostrando o parênquima esplênico de coloração avermelhada, constituído em sua maior parte por hemácias. **(B)** Foto micrografia (H&E escala em barra = 50µm), mostrando uma rarefação linfóide, no detalhe concentração de linfócitos em região perivascular. **(C)** Foto micrografia (H&E escala em barra = 100µm) mostrando parênquima esplênico com uma especial atenção a rarefação linfóide. **(D)** Foto micrografia (H&E escala em barra = 50µm) de parênquima esplênico, mostrando uma congestão esplênica, no detalhe concentração de linfócitos em região peri vascular

Figura 15- Cortes histológicos de linfonodo. (A) Foto micrografia (H&E escala em barra = 200µm), onde se observa a perda de da relação córtico-medular. (B) Foto micrografia (H&E escala em barra = 100µm), mostrando uma severa rarefação linfóide. (C) Foto micrografia (H&E escala em barra = 200µm), mostrando um intenso edema e perda da arquitetura tecidual. (D) Foto micrografia (H&E escala em barra = 50µm), mostrando uma severa rarefação linfóide, no detalhe focos de concentração de macrófagos.

Figura 16- Cortes histológicos de timo. (A) Foto micrografia (H&E escala em barra = 50μm), mostrando parênquima tímico apresentando uma severa rarefação linfóide, no detalhe corpúsculo de Hassall. (B) Foto micrografia (H&E escala em barra = 25μm), mostrando em maior aumento uma rarefação linfóide. (C) Foto micrografia (H&E escala em barra = 100μm), mostrando parênquima tímico apresentando edema, congestão e rarefação linfóide

6.5 Imunoistoquímica

A avaliação imunoistoquímica demonstrou a presença de linfócitos T em áreas teciduais correspondentes, ou seja, bainhas linfóides peri-arteriolas, lóbulos tímicos e linfonodos, resultado obtido por reação imunoistoquímica positiva para CD3 (figuras 17 a 22). Já em relação aos linfócitos B, as reações imunoistoquímicas revelaram uma deficiência nos compartimentos B dos órgãos linfóides.

Figura 17- Fotomicrografia de linfonodo, controle negativo para CD3(escala em barra = 20μm)

Figura 18- Fotomicrografia de linfonodo, reação positiva para CD3(escala em barra correspondente a figura anterior)

Figura 19- Fotomicrografia de timo, controle negativo para CD3 (escala em barra = 18μm)

Figura 20- Fotomicrografia de timo, reação positiva para CD3(escala em barra = 18μm)

Figura 21- Fotomicrografia de baço, controle negativo para CD3(escala em barra = 18μm)

Figura 22- Fotomicrografia de baço, reação positiva para CD3. Observar concentração linfocitária em região perivascular (escala em barra = 18μm)

Discussão

7 DISCUSSÃO

7.1 Tamanhos dos Animais

O peso do animal foi um parâmetro amplamente utilizado neste trabalho, para indicar alterações encontradas nos diversos tamanhos dos animais necropsiados. Todos os animais necropsiados deste trabalho apresentaram algum tipo de alteração no desenvolvimento no tamanho do animal, seja um aumento do tamanho caracterizando gigantismo como uma diminuição, caracterizado por um animal pequeno se diferenciando dos outros. Ambas as alterações se enquadram na SNA. (YOUNG et al.; 1998) relata que o gigantismo esteja associado à manipulação embrionária ou em problemas ocorridos na placentação, seja ela em fertilizações “*in vitro*”, ou em transferências nucleares a partir de células embrionárias ou células somáticas, alterações estas acompanhadas de malformações de órgãos como coração, fígado, baço e timo. Dos treze animais necropsiados neste trabalho apenas um animal não apresentou aumento no seu tamanho, com um peso de 13 kg, o clone três se diferenciou dos outros doze animais, os quais apresentaram um aumento no tamanho durante o seu desenvolvimento, tendo uma média de 57 kg. Devido a uma taxa de crescimento fora dos padrões de normalidade, houve o desenvolvimento de alterações em aparelho músculo-esquelético, observadas neste estudo, tais como aumento das dimensões ósseas, aumento de volume em grau pronunciado em articulações, em musculatura foi evidenciado uma perda de arquitetura tecidual, alterações também relatadas por outros grupos de pesquisadores (YOUNG et al.; 1998; FARIN, et al.; 2006).

A SNA como já descrita é classificada em quatro tipos diferentes, usando como parâmetro o grau de lesões apresentadas pelos animais (FARIN, et al.; 2006). Dos animais necropsiados neste estudo, 100 % deles se alocaram dentro da SNA tipo III, aonde a gestação vem a termo, mas com severas anormalidades, entre elas o gigantismo, malformações de órgãos e tecidos os quais serão descritos no tópico a seguir. Parâmetros bioquímicos alterados e nenhuma resposta compensatória do feto, tais alterações não compatíveis com uma sobrevivência do feto, sendo que eles vêm a óbito ainda no período perinatal. Ao todo foram produzidos vinte e um clones oriundos de células somáticas adultas, houve 52,3% de óbitos, e 47,7% de altas, sendo estes animais alocados dentro do grupo IV de classificação da SNA. Ao

contrário dos resultados obtidos neste trabalho (CHAVATTE-PALMER, et al.; 2004) relata que em seu estudo houve 59 nascimentos de bovinos clonados oriundos de células somáticas sendo que 98,3% sobreviveram após o nascimento, 88,1% sobreviveram após 24 horas de vida, 78% sobreviveram após 48 horas de vida, 74,6% sobreviveram após uma semana de vida e 67,8% sobreviveram mais que um mês, com isso 22% dos animais se alocaram dentro do grupo III e 74,6% dentro do grupo IV.

7.2 Biometria

Dados biométricos como o peso de órgãos, peso bruto dos animais e pesos relativos dos órgãos em relação ao peso vivo do animal, foram aferidos, resultados estes forneceram inúmeras informações as quais serão discutidas a seguir.

Os animais necropsiados neste trabalho apresentaram pesos relativamente parecidos, porém, houve uma variação de 48,8 kg entre o animal mais pesado e o animal mais leve. O animal mais leve pesou 13,2 kg e o animal mais pesado 62 kg, esta grande diferença foi observada em animais cujo protocolo de transferência nuclear adotado foi o mesmo, indica o envolvimento destes animais com a SNA. Apesar destes dois extremos apresentados no parágrafo anterior serem alto, a média apresentada foi de 50 kg de peso vivo, sendo que animais provenientes de inseminação artificial e reprodução natural pesam em média 29 kg (HORTA, 1999), com estes resultados, pode ser evidenciado tanto um aumento no tamanho e no peso de fetos clonados, caracterizando o gigantismo, quanto uma diminuição do tamanho e peso se comparado a média corresponde pela espécie bovina, resultados estes compatíveis com os apresentados na literatura consultada (YOUNG et al.; 1998).

Foram aferidos os pesos dos seguintes órgãos: timo, pulmão direito, pulmão esquerdo, coração, rim direito, rim esquerdo, fígado, tireóide (bilateral) e o baço. Todos os órgãos avaliados sofreram algum tipo de variação no seu peso, conforme o animal necropsiado. O coração foi o órgão que menos apresentou variação nos pesos aferidos, em contraste o fígado foi o órgão que obteve o maior grau de desuniformidade apresentando 420% de desvio entre o fígado mais leve e o fígado mais pesado.

Além do peso bruto, os pesos obtidos dos órgãos foram submetidos ao cálculo do peso relativo de cada um em relação ao peso vivo do animal.

O timo apresentou uma variação mediana em seu peso bruto, havendo uma discrepância em dois animais, o clone seis apresentou um timo pesando 99 g e o clone doze um timo pesando 80 g, sendo que a média apresentada pelos outros animais foi de 40 g, mantendo. No exame relativo ao peso vivo do animal, o clone três, sete e o clone treze apresentaram um timo com peso relativo maior que os demais, com uma diferença de 200%.

O pulmão direito em seu peso bruto apresentou uma grande variação, a diferença foi de 910 g, entre o pulmão mais pesado, que apresentou 1,02 kg e o pulmão mais leve, que apresentou 110 g, valor correspondente este a 910%. Entre estes dois extremos os animais mantiveram uma uniformidade mais próxima ao peso mais alto, que foi de 1,02 kg. Ao contrário do peso bruto, o peso relativo do pulmão direito, não apresentou diferenças tão grandes entre os pesos aferidos, mantendo uma uniformidade nos animais necropsiados,

O pulmão esquerdo obteve um peso bruto menor que o pulmão direito, tal fato pela presença do lobo acessório no pulmão direito. A diferença foi de 845 g, entre o pulmão mais pesado, que apresentou 962 g e o pulmão mais leve, que apresentou 117 g. Como no pulmão direito os valores presentes entre estes dois extremos mantiveram uma uniformidade mais próxima ao peso mais alto, que foi de 962 g. O peso relativo do pulmão esquerdo em relação ao peso vivo do animal, não apresentou nenhuma discrepância nos valores apresentados, mantendo assim uma uniformidade.

O coração apresentou uma média no peso bruto de 570 g, havendo também dois extremos, a diferença entre o peso mais alto 743 g e peso mais baixo 137g, foi de 606 g. Diferenças marcantes entre animais com o peso relativamente próximos foram observadas, o clone sete com 62 kg de peso bruto o coração pesou 743 g, já o clone nove com 55 kg de peso bruto o coração pesou 291 g. O peso relativo do coração acompanhou a tendência do peso bruto, não mantendo um padrão nos pesos aferidos.

O rim esquerdo em seu peso bruto não apresentou uma uniformidade nos valores, os resultados obtidos são bem diferentes que os outros órgãos, de maneira que houve uma diferença de até 717 g, valor relativamente alto. Ao peso relativo do rim esquerdo, como a medida do peso bruto do animal, não obteve uma uniformidade nos valores obtidos, variando de animal para animal.

O rim direito ao contrário do rim esquerdo apresentou uma uniformidade considerável nos valores obtidos, a diferença entre os valores apresentados variou 246 g, sendo a média de 160 g de peso bruto. O peso relativo do rim direito revelou uma uniformidade nos valores obtidos, apresentando uma média de 0,30 % em relação ao peso vivo do animal, exceto o clone um que apresentou 0,13 % e o clone dois 0,17% em relação ao peso vivo do animal. Não há particularidades anatômicas que possam diferenciar o rim esquerdo do rim direito, a diferença biométrica apresentada entre os dois rins pode estar associada a diversos fatores no desenvolvimento deste órgão.

O fígado como o rim esquerdo não apresentou uma uniformidade nos pesos brutos apresentados, os valores variaram entre 430g e 2,6 kg, apresentando uma diferença de 2,17 kg entre o menor e o maior valor, os resultados intermediários também não apresentaram uma uniformidade, variando muito o valor. O peso relativo do fígado em relação ao peso vivo do animal apresentou dois extremos, o de menor significância 1,2% do peso vivo do animal e o de maior significância 5% do peso vivo do animal, os valores intermediários diminuíram a discrepância apresentada ao peso bruto do órgão, aumento a uniformidade entre os animais.

Os pesos das glândulas tireóides foram aferidos com ambas as glândulas (direita e esquerda) juntas. O peso bruto das glândulas variou 10 g, sendo o menor peso aferido 4 g e o maior 14 g, os pesos intermediários obtiveram uma margem de erro de 3 g para mais ou para menos, resultados estes indicam uma baixa uniformidade entre os pesos aferidos das glândulas examinadas. O peso relativo como o peso bruto não apresentou uma uniformidade entre as glândulas, os valores variaram muito, o menor valor obtido foi 0,007 g em relação ao peso vivo do animal e o maior 0,08% em relação ao peso vivo do animal.

O baço, um dos órgãos alvo deste estudo, apresentou na análise de seu peso bruto uma variação muito grande entre os valores obtidos, houve animal em que seu baço pesou 14 g de peso bruto em outro extremo um animal cujo baço pesou 375 g, uma variação muito grande, tendo em vista que as idades dos animais não variaram mais que 19 dias, os resultados intermediários também não apresentaram uma uniformidade. O peso relativo baço em relação ao peso vivo do animal, como o peso bruto não revelou uma uniformidade entre os órgãos examinados.

7.3 Malformações de Órgãos

As malformações evidenciadas nos animais necropsiados ficaram restritas ao coração e aos membros locomotores. As alterações em membros locomotores são representadas por deformações ósseas tanto em membros torácicos como em membros pélvicos, e por deformidades em articulações. As articulações acometidas são principalmente as articulações cárpicas e társicas, ambas bilaterais, lesões estas relatadas por outros grupos de pesquisadores (YOUNG et al.; 1998; CHAVATTE-PALMER et al.; 2004; FARIN, et al.; 2006).

7.4 Alterações Cardíacas

Malformações cardíacas foram evidenciadas em pelo menos 40% dos animais necropsiados neste estudo, há publicações onde os autores descrevem que malformações cardíacas podem estar relacionadas com hiper-expressão dos genes VEGF, BMP4, PCAF, FGF10 e Xist (LI, et al.; 2005).

Cardiopatas foram relatadas por Garry et al. (1996). Em seu estudo, quarenta bezerros derivados de células embrionárias foram clonados e destes, oito animais vieram a óbito e foram necropsiados. Apenas um apresentava alterações cardíacas tais como dilatação e arredondamento do coração acompanhado de efusões pleurais. De maneira semelhantemente HILL et al. (1999) relataram outras lesões cardíacas, como, dilatação do ventrículo direito com espessamento bilateral de parede ventricular associados ao aumento do diâmetro da artéria pulmonar e ducto arterial patente. Neste trabalho foram observadas, tanta as alterações relatadas anteriormente, como a presença de alterações em outras estruturas cardíacas tais como valvas atrioventriculares, cordas tendíneas, músculos papilares, trabéculas septo-marginais, persistência do forame oval, defeito do septo interventricular e presença de cistos hemáticos em região valvular, tais lesões contribuíram para os quadros de anasarca, hipertensão pulmonar, edema pulmonar e congestão hepática. Cistos hemáticos foram evidenciados em todos os animais cardiopatas necropsiados neste trabalho, a localização predominante destes cistos foi em região válvulas átrio-ventriculares (bilateral).

7.5 Alterações Pulmonares

Neste trabalho foram evidenciados corpúsculos amiláceos intra-bronquiolares e alveolares, evidenciados durante o exame histopatológico, caracterizam-se por serem estruturas arredondadas, basofílicas e concêntricamente lameladas. Podem ser encontrados em diversas condições patológicas pulmonares; entretanto, não houve até o momento nenhuma publicação relatando e elucidando os mecanismos envolvidos na sua formação em animais clonados.

Como a presença de corpúsculos amiláceos, os casos de infiltração eosinofílica pulmonar observados neste trabalho não foram descritos até hoje em animais clonados. Este tipo de infiltrado pulmonar é um achado histopatológico comum em diversas afecções que tem como base distúrbios de origem imunológica. Geralmente é secundária a casos de infecções helmínticas e bronquite alérgica. Excluídas estas entidades, a patogenia deste tipo de exsudato é pouco compreendida em medicina humana e veterinária.

Atualmente, embora existam muitas informações disponíveis sobre a produção de surfactante pelos pneumócitos do tipo II, há ainda grande preocupação dos pesquisadores em relação à acurácia e o desempenho da produção desta substância em animais clonados. O surfactante atua diminuindo a tensão superficial alveolar, a qual permite e auxilia a manutenção da expansão alveolar no neonato. Neste sentido (HILL, et al.; 1999), suspeita que a deficiência de surfactante fosse o que provavelmente causou a incompleta expansão pulmonar em um dos bezerros clonados em seu estudo, esta deficiência pode ter sido causada por uma diminuição na produção de surfactante pelos pneumócitos do tipo II. Semelhantemente, neste estudo pudemos evidenciar variados graus de atelectasia e hipertensão pulmonar neonatal. Outra possibilidade para justificar o aqui verificado em deficiência de surfactante, seria uma severa diluição do mesmo pela alta presença de líquido amniótico, o qual foi inspirado pelos animais, se fazendo presente nas vias aéreas dificultando a completa expansão alveolar. Neste contexto a literatura é farta de exemplos de substâncias vaso-dilatadoras que podem substituir o surfactante no primeiro momento como o Citrato de Sildenafil, a administração deste fármaco teria um efeito dilatador, atuando em brônquios e em artérias (CATAPANO-MINOTTI, et al.; 2008).

O quadro de hipertensão pulmonar esta presente também no feto normal, sendo que após o início da circulação neonatal a vasoconstrição responsável pela hipertensão passa a não existir mais, tornando a insuflação pulmonar completa (MIYASHITA, et al.; 2002), fato este inexistente nos animais examinados neste trabalho, onde foi observada hipertensão pulmonar em animais cuja circulação neonatal já estava estabelecida. Após a insuflação dos pulmões com ar, a resistência ao fluxo sanguíneo pulmonar diminui subitamente, culminando em uma resistência pulmonar reduzida pelo efeito vasodilatador direto do oxigênio sobre as arteríolas pulmonares (EDWARDS et al.; 2003). Outro fator que poderia estar envolvido é a deficiência de surfactante, como descrito anteriormente, a qual por causar expansão incompleta dos alvéolos, impede a adequada oxigenação e, portanto, vasoconstrição pulmonar reflexa, o que contribui para o quadro de hipertensão pulmonar.

Em outras espécies domésticas o pulmão se desenvolve durante o período gestacional, porém, nos ruminantes o pulmão continua seu desenvolvimento também no período pós natal. A imaturidade pulmonar fisiológica dos ruminantes, em conjunto com uma hipertensão pulmonar, levou os animais a um quadro de insuficiência pulmonar, culminando em hipóxia tecidual, o que contribuiu para a baixa taxa de sobrevivência pós-natal observada neste trabalho.

Microscopicamente, os alvéolos estão pouco desenvolvidos e colapsados e um material eosinofílico delineando a superfície dos alvéolos (membrana hialina) está presente; esta é composta de fibrinogênio, fibrina e debris celulares. A avaliação de alguns pulmões revelou certo grau de imaturidade pulmonar, porém com ausência de membrana hialina. Outras condições que causem injúria ao epitélio alveolar e ou endotélio vascular, como por exemplo, a aspiração de fluido amniótico e ou mecônio, como visto na figura 12, como evidenciadas neste trabalho, também podem levar a formação desta membrana.

A avaliação das células do epitélio bronquiolar não revelou indícios de alterações do ponto de vista morfológico, de alterações inflamatórias ou degenerativas que pudessem estar relacionadas à proliferação papilar. Pouco existe na literatura trabalhos descrevendo alterações proliferativas pulmonares que atingem neonatos clonados, tais como as alterações descritas acima e nos resultados.

Outras publicações científicas relatam diversas alterações pulmonares em bezerros clonados tais como espessamento de parede alveolar, hiperplasia de células de revestimento alveolar, hemorragia, congestão, inflamação (LI, et al.; 2005), pneumonia intersticial atípica

com proliferação massiva de pneumócitos do tipo II, histiocitose, proteinose alveolar, macrófagos multinucleados, sacos alveolares maiores e em menor número, morte celular alveolar extensiva e numerosas células de vício cardíaco (HILL, et al.; 1999).

7.6 Relação pneumopatia x cardiopatia.

A hipertensão pulmonar pode ser basicamente definida como o aumento do regime pressórico vascular pulmonar além dos níveis considerados normais para a espécie. Geralmente é secundária a anomalias estruturais cardiovasculares que aumentem o fluxo, pressão sanguínea ou a resistência vascular pulmonar, ou ainda a resistência átrio-ventricular esquerda ao fluxo sanguíneo.

Os resultados da necropsia de alguns animais demonstram lesões compatíveis com hipertensão pulmonar concomitante à pressão venosa sistêmica elevada, tais como cardiomiopatia hipertrófica e ou dilatada do ventrículo direito e esquerdo (edema pulmonar), congestão hepática e pulmonar passiva e edema pulmonar; do ponto de vista microscópico, alterações tais como edema pulmonar provavelmente de origem cardiogênica, congestão capilar de septos alveolares e congestão sinusoidal hepática podem estar relacionadas. Hill, et al. (1999), encontraram alterações semelhantes em seu estudo, as quais sempre acompanhadas de lesões cardíacas, o que reforça mais a teoria de ser uma origem cardiogênica.

Após o nascimento a pressão arterial é regulada pelo diâmetro luminal e pelo número de arteríolas pulmonares. A vasoconstrição destas arteríolas pode ser estimulada por hipóxia alveolar e pressão venosa pulmonar aumentada (HILL, et al.; 1999). Portanto, a provável hipertensão pulmonar observada em nosso estudo pode ter contribuído para a vasoconstrição local, o que garantiria um mecanismo de retro-alimentação positiva.

As lesões trombóticas mostradas neste trabalho, representado por uma trombose pulmonar pode ser deflagrada em estados de hipercoagulabilidade, estase ou turbulência sanguínea ou dano ao endotélio vascular. Em alguns animais necropsiados pudemos evidenciar trombose arterial e arteriolar nos pulmões. Com base nas cardiopatias encontradas nos animais avaliados, a origem e formação destes trombos poderiam estar relacionadas a possíveis distúrbios na hemodinâmica normal dos animais clonados. Além disso, a presença

de trombos arteriais e arteriolares em vasos pulmonares podem contribuir para o agravamento da condição hipertensiva pulmonar, lesão esta presente com muita frequência neste trabalho.

7.7 Aspectos Anatomopatológicos

Com base nos dados obtidos neste estudo, pudemos observar que as principais alterações anatomo-patológicas encontradas nos animais necropsiados neste trabalho são semelhantes às aquelas encontradas por outros grupos de pesquisadores.

Alterações estruturais do cordão umbilical foram observadas em todos os animais necropsiados (100%), em maior ou menor grau, com especial ênfase para o aumento no diâmetro dos vasos umbilicais, em concordância com os achados de outros pesquisadores (WELLS et al.; 1997) . Hill et al (1999), reportaram que de cinco fetos clonados (quatro natimortos e um abortado) derivados de fibroblastos, dois apresentavam o diâmetro dos vasos umbilicais três vezes maior do que o esperado para um neonato. As alterações observadas neste trabalho são caracterizadas por uma intensa congestão interna em região umbilical, em região externa os cordões umbilicais apresentaram não cicatrizados e com inflamação, tornando o local uma possível entrada de agentes infecciosos. Acredita-se que estas alterações de estruturas de cordão umbilical se devem a algum fator relacionado à placentação.

Hepatopatias foram descritas por Wilmut et al. (1997) em seu estudo, animais da espécie ovina foram clonados a partir de células embrionárias fetais e somáticas adultas. Aos 110 dias de gestação, quatro fetos derivados de células embrionárias vieram a óbito sendo que dois destes apresentaram desenvolvimento anormal do fígado por ocasião da necropsia. As principais hepatopatias evidenciadas em nosso estudo foram degeneração hepática, hepatomegalia, congestão hepática, alterações de vesícula biliar (bile de aspecto grumoso, edema de mucosa) também foram observadas em nosso estudo. A degeneração vacuolar observada nos animais avaliados assemelha-se do ponto de vista exclusivamente morfológico àquela denominada degeneração hepatocelular gordurosa. A etiologia é diversa; intoxicações, privação alimentar, cetose em animais ruminantes, diabetes mellitus, hipóxia hepatocelular e deficiências nutricionais figuram entre as mais importantes do ponto de vista não experimental. Entretanto, nos animais domésticos o maior percentual deste tipo de alteração deve-se a interferências no metabolismo energético. Devemos levar em consideração à

existência de outros tipos de degeneração do tipo vacuolar como, por exemplo, a hidrópica e a por acúmulo de glicogênio, sendo que a diferenciação baseia-se na utilização de outras técnicas histológicas. A congestão hepática em aspecto de “noz moscada” ou não, deve-se ao fato dos animais necropsiados neste estudo, possuírem cardiopatias, diversas cardiopatias podem levar ao quadro de congestão hepática, partindo do princípio em que o retorno venoso esteja comprometido tanto por insuficiência cardíaca direita ou por um aumento do débito cardíaco em direção aos órgãos abdominais, comprometendo o retorno venoso, alteração esta provocada por uma hipertrofia do ventrículo esquerdo, ambas as alterações presentes nos animais necropsiados neste trabalho, justificando a congestão hepática relatada. O edema de mucosa observado em vesícula biliar trata-se de uma alteração hemodinâmica, alteração esta decorrente do quadro de anasarca. Outras hepatopatias foram relatadas, atrofia centro lobular, colapso lobular multifocal e proliferação de ductos biliares; escassez de ductos biliares intra-hepáticos associada e cirrose secundária; necrose extensiva do fígado (OGONUKI, N. et al.; 2002), hepatopatias estas não observadas neste trabalho.

Wells et al. (1997), observaram graus variados de edema e hidronefrose em quatro cordeiros clonados e abortados. Dilatação de pelve e cálices renais, lesões tubulares, lesões glomerulares e hipoplasia renal foram observadas neste estudo. A excreção da urina fetal durante o período gestacional é feita em meio ao líquido alantóide, porém com a disfunção renal, a filtração glomerular, excreção e reabsorção tubular estão comprometidas, havendo um excesso na sua eliminação. Tal disfunção, talvez seja decorrente das afecções observadas no útero e em outras estruturas presentes na região umbilical.

Alterações dos órgãos do sistema hemolinfóide foram descritas por Renard et al. (1999), onde marcada atrofia tímica foi observada nos animais pesquisados. Hipoplasia de polpa branca no baço, hipoplasia de baço, linfadenomegalia caracterizado principalmente por edema nos linfonodos e hipoplasia tímica foram observadas nos animais necropsiados neste estudo. O edema observado nos linfonodos ficou restrito a região cortical, lesão derivada do quadro de anasarca apresentado pelos animais.

Acredita-se que fatores relacionados ao processo de clonagem em si, à manipulação do embrião, ao meio de cultivo e a reprogramação gênica contribuam para as altas taxas de insucesso e morte dos animais clonados, insucessos estes representados neste trabalho por cardiopatias, pneumopatias e nefropatias, presentes na vida neonatal, lesões também relatadas em publicações científicas (GARRY et. al.; 1996, HILL et. al.; 1999).

Considerações finais

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os processos patológicos que culminaram com “*causa mortis*” dos animais necropsiados foram variadas, como as suas respectivas lesões. O presente trabalho se propôs estudar do ponto de vista anatomopatológico as lesões presentes nos animais necropsiados, descrevendo-as e elucidando os diversos processos de “*causa mortis*” presentes. Os mecanismos associados com a “*causa mortis*” dos animais necropsiados variaram em três diferentes origens: cardíaca, pulmonar e renal. Dentro as alterações cardíacas presentes, podemos ressaltar malformações e presença de cistos hemáticos em variados graus, tais alterações culminaram em deficiência cardíaca e deficiência respiratória secundária. As lesões pulmonares foram bem restritas a alterações hemodinâmicas, representado por hipertensão pulmonar primária e secundária, congestão e edema pulmonar, notou-se ainda presença de trombos arteriais. Lesões renais foram pouco freqüentes, mas se fez presente, apenas um animal necropsiado veio a óbito por insuficiência renal, ao exame necroscópico, o clone 12 apresentou ambos os rins pequenos, coloração castanha escura e com ambas as cápsulas renais completamente separadas do órgão, deixando o rim “solto” em seu interior, havendo sustentação apenas em região de hilo.

As lesões encontradas neste trabalho vêm corroborar o que outros trabalhos sobre clonagem animal vem mostrando, confirmando o envolvimento de lesões cardíacas, pulmonares e renais na perda de animais em clonagem da espécie bovina.

Conclusões

9 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- A técnica de TN utilizada pode estar relacionada ao desenvolvimento de malformações em animais clonados.
- O tamanho do animal em todas suas variações, presentes em 100% dos animais necropsiados neste estudo, contribuíram para o agravamento dos problemas de locomoção e sustentação dos animais.
- As “causa mortis” foram decorrentes de diversos fatores, relacionados às alterações cardíacas, respiratórias e renais.
- As lesões histológicas evidenciadas estão diretamente relacionadas, com as lesões macroscópicas apresentadas pelos animais necropsiados neste trabalho.
- Após o a reação de imunoistoquímica, foi constatado uma deficiência do compartimento B, nos órgãos linfóides examinados.
- O protocolo de biometria corporal demonstrou ser bastante útil para o estudo do desenvolvimento pós-natal de bovinos clonados.

Referências

REFERÊNCIAS

- BAGUISI A.; BEHBOODI E.; MELICAN D. T.; POLLOCK J. S.; DESTREMPES M. M.; CAMMUSO C.; WILLIAMS J. L.; NIMS S. D.; PORTER C. A.; MIDURA P.; PALACIOS M. J.; AYRES S. L.; DENNISTON R. S.; HAYES M. L.; ZIOMEK C. A.; MEADE H. M.; GODKE R. A.; GAVIN W. G.; OVERSTROM E. W.; ECHELARD Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. **Nat.Biotechnol.**, v.17, n. 5, p. 456-461, 1999.
- BATCHELDER C. A.; HOFFERT K. A.; BERTOLINI M.; MOYER A. L.; MASON J. B.; PETKOV S. G.; FAMULA T. R.; ANDERSON G. B. Effect of the nuclear-donor cell lineage, type, and cell donor on development of somatic cell nuclear transfer embryos in cattle. **Cloning Stem Cells**, v. 7, n. 4, p. 238-254, 2005.
- BETTHAUSER J.; FORSBERG E.; AUGENSTEIN M.; CHILDS L.; EILERTSEN K.; ENOS J.; FORSYTHE T.; GOLUEKE P.; JURGELLA G.; KOPPANG R.; LESMEISTER T.; MALLON K.; MELL G.; MISICA P.; PACE M.; PFISTER-GENSKOW M.; STRELCHENKO N.; VOELKER G.; WATT S.; THOMPSON N.; BISHOP M. Production of cloned pigs from in vitro systems. **Nat.Biotechnol.** v. 18, p. 10, p. 1055-1059, 2000.
- BUCZINSKI S. M.; FECTEAU G.; LEFEBVRE R. C.; SMITH L. C. Fetal well-being assessment in bovine near-term gestations: current knowledge and future perspectives arising from comparative medicine. **Can.Vet.J.** v. 48, p. 2, p. 178-183, 2007.
- BUHLER L. H. Xenotransplantation literature update March-April, 2004. **Xenotransplantation.** v. 11, p. 4, p. 383-386, 2004.
- BYRNE J. A.; PEDERSEN D. A.; CLEPPER L. L.; NELSON M.; SANGER W. G.; GOKHALE S.; WOLF D. P.; MITALPOV S. M. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. **Nature** v. 450, n. 7169, p. 497-502, 2007.
- CAMPBELL K. H.; FISHER P.; CHEN W. C.; CHOI I.; KELLY R. D.; LEE J. H.; XHU J. Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives. **Theriogenology** v.68, p. S214-S231, 2007. Supplement 1.
- CAMPBELL K. H.; MCWHIR J.; RITCHIE W. A.; WILMUT I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. **Nature** v. 380, n. 6569, p. 64-66, 1996.
- CATAPANO-MINOTTI G.; CORSONELLO A.; GUADALUPI G.; SPANI R.; ANTONELLI-INC. Treatment of severe pulmonary hypertension secondary to scleroderma: a three-drug approach. **Intern.Med.** v. 47, n. 6, p. 511-513, 2008.
- CHAVATTE-PALMER P.; REMY D.; CORDONNIER N.; RICHARD C.; ISSENMAN H.; LAIGRE P.; HEYMAN Y.; MIALOT J. P. Health status of cloned cattle at different ages. **Cloning Stem Cells** v. 6, n. 2, p. 94-100, 2004.
- CIBELLI J. B.; CAMPBELL K. H.; SEIDEL G. E.; WEST M. D.; LANZA R. P. The health profile of cloned animals. **Nat.Biotechnol.** v. 20, n. 1, p. 13-14, 2002.

CIBELLI J. B.; STICE S. L.; GOLUEKE P. J.; KANE J. J.; JERRY J.; BLACKWELL C.; PONCE DE LEON F. A.; ROBL J. M. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. **Science** v. 280, n. 5367, p. 1256-1258, 1998.

COZZI E.; SEVESO M.; HUTABBA S.; FABRIS S.; CAVICCHIOLI L.; ANCONA E. An update on xenotransplantation. **Vet.Res.Comm.** v. 31, p. 15-25, 2007. Supplement 1.

DE SOUSA P. A.; DOBRINSKY J. R.; ZHU J.; ARCHIBALD A. L.; AINSLIE A.; BOSMA W.; BOWERING J.; BRACKEN J.; FERRIER P. M.; FLETCHER J.; GASPARRINI B.; HARKNESS L.; JOHNSTON P.; RITCHIE M.; RITCHIE W. A.; TRAVERS A.; ALBERTINI D.; DINNYES A.; KING T. J.; WILMUT I. Somatic cell nuclear transfer in the pig: control of pronuclear formation and integration with improved methods for activation and maintenance of pregnancy. **Biol.Reprod.** v. 66, n. 3, p. 642-650, 2002.

DINNYES A.; DE SOUSA P.; KING T.; WILMUT I. Somatic cell nuclear transfer: recent progress and challenges. **Cloning Stem Cells** v. 4, n. 1, p. 81-90, 2002.

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

FARIN C. E.; FARIN P. W.; PIEDRAHITA J. A. Development of fetuses from in vitro-produced and cloned bovine embryos. **J.Anim Sci.** 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.

FERNANDEZ-GONZALEZ R.; MOREIRA P.; A. BILBAO, A. JIMENEZ, M. PEREZ-CRESPO, M. A. RAMIREZ, FONSECA F. RODRIGUEZ DE, B. PINTADO, A. GUTIERREZ-ADAN. Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** v. 101, n. 16, p. 5880-5885, 2004.

GOVONI K. E.; TIAN X. C.; KAZMER G. W.; TANEJA M.; ENRIGHT B. P.; RIVARD A. L.; YANG X.; ZINN S. A. Age-related changes of the somatotrophic axis in cloned Holstein calves. **Biol.Reprod.** v. 66, n 5, p. 1293-1298, 2002.

HALL V. J.; RUDDOCK N. T.; COONEY M. A.; KORFIATIS N. A.; TECIRLIOGLU R. T.; DOWNIE S.; WILLIAMSON M.; FRENCH A. J. Production of a cloned calf using zona-free serial nuclear transfer. **Theriogenology** v. 65, n. 2, p. 424-440, 2006.

HEYMAN Y.; RICHARD C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ H.; LAZZARI G.; CHAVATTE-PALMER P.; VIGNON X.; GALLI C. Zootechnical performance of cloned cattle and offspring: preliminary results. **Cloning Stem Cells** v. 6, n. 2, p. 111-120, 2004.

HILL J. R.; BURGHARDT R. C.; JONES K.; LONG C. R.; LOONEY C. R.; SHIN T.; SPENCER T. E.; THOMPSON A. N.; WINGER Q. A.; WESTHUSIN M. E. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biol.Reprod.** v. 63, n. 6, 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. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). **Theriogenology** v. 51, n. 8, p. 1451-1465, 1999.

HORTA A. E. M. Large Calf Syndrome Associated to the transfer of in vitro produced embryos. **Revista Portuguesa de Zootecnia** v. 6, n. 01, p. 27-41, 1999.

HUMPHERYS D.; EGGAN K.; AKUTSU H.; HOCHEDLINGER K.; RIDEOUT W. M.; BINISZKIEWICZ D.; YANAGIMACHI R.; JAENISCH R. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. **Science** v. 293, n. 5527, p. 95-97, 2001.

JONKER F. H. Fetal death: comparative aspects in large domestic animals. **Anim Reprod.Sci.** v. 82-83, p.415-430, 2004.

LAGUTINA I.; LAZZARI G.; R DUCHI.; TURINI P.; TESSARO I.; BRUNETTI D.; COLLEONI S.; CROTTI G.; GALLI C. Comparative aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona-free method in cattle, horse, pig and sheep. **Theriogenology** v. 67, n. 1, p. 90-98, 2007.

LAI L.; KOLBER-SIMONDS D.; PARK K. W.; CHEONG H. T.; GREENSTEIN J. L.; IM G. S.; SAMUEL M.; BONK A.; RIEKE A.; DAY B. N.; MURPHY C. N.; CARTER D. B.; HAWLEY R. J.; PRATHER R. S. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. **Science** v. 295, n. 5557, p. 1089-1092, 2002.

LANZA R. P.; CIBELLI J. B.; DIAZ F.; MORAES C. T.; FARIN P. W.; FARIN C. E.; HAMMER C. J.; WEST M. D.; P DAMIANI. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. **Cloning** v. 2, n. 2, p. 79-90, 2000.

LANZA R. P.; CIBELLI J. B.; FABER D.; SWEENEY R. W.; HENDERSON B.; NEVALA W.; WEST M. D.; WETTSTEIN P. J. Cloned cattle can be healthy and normal. **Science** v. 294, n. 5548, p.1893-1894, 2001.

LANZA, R. P.; CHUNG, H. Y.; YOO, J. J.; WETTSTEIN, P. J.; BLACKWELL, C.; BORSON, N.; HOFMEISTER, E.; SCHUCH, G.; SOKER, S.; MORAES, C. T.; WEST, M. D.; ATALA, A. Generation of histocompatible tissues using nuclear transplantation. **Nat.Biotechnol** v. 20, n. 7, p. 689-696, 2002.

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

LEE R. S.; PETERSON A. J.; DONNISON M. J.; RAVELICH S.; LEDGARD A. M.; LI N.; OLIVER J. E.; MILLER A. L.; TUCKER F. C.; BREIER B.; WELLS D. 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. **Biol.Reprod.** v.70, n. 1, p. 1-11, 2004.

LI S.; LI Y.; DU W.; ZHANG L.; YU S.; DAI Y.; ZHAO C.; LI N. Aberrant gene expression in organs of bovine clones that die within two days after birth. **Biol.Reprod.** v. 72, n. 2, p. 258-265, 2005.

LIN L.; LI Q.; ZHANG L.; ZHAO D.; DAI Y.; LI N. Aberrant epigenetic changes and gene expression in cloned cattle dying around birth. **BMC.Dev.Biol.** v. 8, p.14, 2008.

LIU Z.; SCHATTEN H.; HAO Y.; LAI L.; WAX D.; SAMUEL M.; ZHONG Z. S.; SUN Q. Y.; PRATHER R. S. The Nuclear Mitotic Apparatus (NuMA) protein is contributed by the donor cell nucleus in cloned porcine embryos. **Front Biosci.** v. 11, p.1945-1957, 2006.

MCCREATH K. J.; HOWCROFT J.; CAMPBELL K. H.; COLMAN A.; SCHNIEKE A. E.; KIND A. J. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. **Nature** v.405, n. 6790, p. 1066-1069, 2000.

MIGLINO M. A. Clonagem Animal e Placentação. **Ciência e Cultura** v.03, p. 31-32, 2004.

MIYASHITA N.; SHIGA K.; YONAI M.; KANEYAMA K.; KOBAYASHI S.; KOJIMA T.; GOTO Y.; KISHI M.; ASO H.; SUZUKI T.; SAKAGUCHI M.; NAGAI T. Remarkable differences in telomere lengths among cloned cattle derived from different cell types. **Biol.Reprod.** v. 66, n. 6, p.1649-1655, 2002.

OGONUKI N.; INOUE K.; YAMAMOTO Y.; NOGUCHI Y.; TANEMURA K.; SUZUKI O.; NAKAYAMA H.; DOI K.; OHTOMO Y.; SATOH M.; NISHIDA A.; A OGURA. Early death of mice cloned from somatic cells. **Nat.Genet.** v.30, n. 3, p. 253-254, 2002.

ONO Y.; SHIMOZAWA N.; ITO M.; KONO T. Cloned mice from fetal fibroblast cells arrested at metaphase by a serial nuclear transfer. **Biol.Reprod.** v.64, n. 1, p. 44-50, 2001.

PACE M. M.; AUGENSTEIN M. L.; BETTHAUSER J. M.; CHILDS L. A.; EILERTSEN K. J.; ENOS J. M.; FORSBERG E. J.; GOLUEKE P. J.; GRABER D. F.; KEMPER J. C.; KOPPANG R. W.; LANGE G.; LESMEISTER T. L.; MALLON K. S.; MELL G. D.; MISICA P. M.; PFISTER-GENSKOW M.; STRELCHENKO N. S.; VOELKER G. R.; WATT S. R.; BISHOP M. D. Ontogeny of cloned cattle to lactation. **Biol.Reprod.** v.67, n. 1, p. 334-339, 2002.

PANARACE M.; AGUERO J. I.; GARROTE M.; JAUREGUI G.; SEGOVIA A.; CANE L.; GUTIERREZ 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, n. 1. p. 142-151, 2007.

PIEDRAHITA J. A.; MIR B. Cloning and transgenesis in mammals: implications for xenotransplantation. **Am.J.Transplant.** v. 4, p. 43-50, 2004. Supplement 6.

POLEJAEVA I. A.; CHEN S. H.; VAUGHT T. D.; PAGE R. L.; MULLINS J.; BALL S.; DAI Y.; BOONE J.; WALKER S.; AYARES D. L.; COLMAN A.; CAMPBELL K. H. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature** v. 407, n. 6800, p. 86-90, 2000.

RENARD J. P.; CHASTANT S.; CHESNE P.; RICHARD C.; MARCHAL J.; CORDONNIER N.; CHAVATTE P.; VIGNON X. Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. **Lancet** v.353, n. 9163, p. 1489-1491, 1999.

RHIND S. M.; KING T. J.; HARKNESS L. M.; BELLAMY C.; WALLACE W.; DESOUSA P.; WILMUT I. Cloned lambs--lessons from pathology. **Nat.Biotechnol.** v.21, n. 7, p. 744-745, 2003.

RUDENKO L.; MATHESON J. C.; SUNDLOF S. F. Animal cloning and the FDA--the risk assessment paradigm under public scrutiny. **Nat.Biotechnol.** v. 25, n. 1, p. 39-43, 2007.

SCHMIDT M.; GREVE T.; AVERY B.; BECKERS J. F.; SULON J.; HANSEN H. B. Pregnancies, calves and calf viability after transfer of in vitro produced bovine embryos. **Theriogenology** v. 46, n. 3, p. 527-539, 1996.

SHI D.; LU F.; WEI Y.; CUI K.; YANG S.; WEI J.; LIU Q. Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. **Biol.Reprod.** v. 77, n. 2, p. 285-291, 2007.

SHIN T.; KRAEMER D.; PRYOR J.; LIU L.; RUGILA J.; HOWE L.; BUCK S.; MURPHY K.; LYONS L.; WESTHUSIN M. A cat cloned by nuclear transplantation. **Nature** v. 415, n. 6874, p. 859, 2002.

SILVA T. J. C. Clonagem - O que aprendemos com Dolly? **Ciência e Cultura** v. 03, p. 27-30, 2004.

SUGIYAMA A.; K OZAKI.; TAKEUCHI T.; NARAMA I. Cardiac vascular hamartoma in two slaughtered cattle. **J.Comp Pathol.** v. 136, n. 2-3, p. 202-205, 2007.

SUK J.; BRUCE A.; GERTZ R.; WARKUP C.; WHITELAW C. B.; BRAUN A.; ORAM C.; RODRIGUEZ-CEREZO E.; PAPATRYFON I. Dolly for dinner? Assessing commercial and regulatory trends in cloned livestock. **Nat.Biotechnol.** v.25, n. 1, p. 47-53, 2007.

TANAKA S.; ODA M.; TOYOSHIMA Y.; WAKAYAMA T.; TANAKA M.; YOSHIDA N.; HATTORI N.; OHGANE J.; YANAGIMACHI R.; SHIOTA K. Placentomegaly in cloned mouse concepti caused by expansion of the spongiotrophoblast layer. **Biol.Reprod.** v. 65, n. 6, p. 1813-1821, 2001.

VANDERWALL D. K.; WOODS G. L.; ROSER J. F.; SCHLAFFER D. H.; SELLON D. C.; TESTER D. F.; WHITE K. L. Equine cloning: applications and outcomes. **Reprod.Fertil.Dev.** v.18, n. 1-2, p. 91-98, 2006.

VANDERWALL D. K.; WOODS G. L.; SELLON D. C.; TESTER D. F.; SCHLAFFER D. H.; WHITE K. L. Present status of equine cloning and clinical characterization of embryonic, fetal, and neonatal development of three cloned mules. **J.Am.Vet.Med.Assoc.** v. 225, n. 11, p. 1694-1699, 2004.

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, n. 6691, p. 369-374, 1998.

WILMUT I.; BEAUJEAN N.; DE SOUSA P. A.; DINNYES A.; KING T. J.; PATERSON L. A.; WELLS D. N.; YOUNG L. E. Somatic cell nuclear transfer. **Nature** v. 419, n. 6907, p. 583-586, 2002.

WOODS G. L.; K WHITE. L.; VANDERWALL D. K.; LI G. P.; ASTON K. I.; BUNCH T. D.; MEERDO L. N.; PATE B. J. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. **Science** v. 301, n. 5636, p. 1063, 2003.

YAMAGUCHI M.; ITO Y.; TAKAHASHI S. Fourteen-week feeding test of meat and milk derived from cloned cattle in the rat. **Theriogenology** v.67, n 1, p. 152-165, 2007.

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

ZATZ M. Clonagem, células tronco e bancos de cordão umbilical. **Ciência e Cultura** v. 03, p. 22-26, 2004.

Anexus

ANEXO - A

Solução Citrato 10 mM

A solução de citrato foi preparada adicionando-se 18 ml da solução A e 82 ml da solução B em 1000 ml de água destilada, pH 6,0.

- Solução A: 29,4 g de ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) em 1000 ml de água destilada.
- Solução B: 21,01 g de citrato de sódio dihidratado ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$) em 1000 ml de água destilada.

Solução Tampão Fosfato (PBS)

Para a preparação da solução Tampão Fosfato, foram utilizados três reagentes abaixo listados, posteriormente diluídos em água destilada, pH 7,0, solução dez vezes concentrada.

- Cloreto de Sódio (Synth – NaCl)***** 8,5 g
- Fosfato de Sódio dibásico dihidratado (Merck – $Na_2 HPO_4 \cdot 2H_2O$)***** 3,89 g
- Fosfato de Sódio monobásico (Merck – $KH_2 PO_4$)***** 10,61g

Anticorpos primários

Linfócitos T

Para marcação de linfócitos T foi utilizado o anticorpo policlonal, coelho anti-humano, CD3 (Dako Corporation, Código A 0452, Carpinteria, USA).

Linfócitos B

Para marcação de linfócitos B foi utilizado o anticorpo monoclonal, camundongo anti-humano, CD79 α (clone HM 57, Dako Corporation, Código M 7051, Carpinteria, USA).