FABIO CELIDONIO POGLIANI

**Parâmetros ecodopplercardiográficos de bezerros da raça Nelore
originados através de transferência nuclear de
células somáticas adultas – Clonagem**

**São Paulo
2010**

FABIO CELIDONIO POGLIANI

**Parâmetros ecodopplercardiográficos de bezerros da raça Nelore
originados através de transferência nuclear de
células somáticas adultas – Clonagem**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências – Clínica Veterinária.

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Junior

São Paulo

2010

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2261
FMVZ

Pogliani, Fabio Celidonio

Parâmetros ecodopplercardiográficos de bezerros da raça Nelore originados através de transferência nuclear de células somáticas adultas - Clonagem / Fabio Celidonio Pogliani. -- 2010.
107 p. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Junior.

1. Bezerro. 2. Nelore. 3. Clonagem. 4. Ecocardiografia. 5. Doppler. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Parâmetros ecocardiográficos e eletrocardiográficos e avaliação dos fluxos da valva aórtica e pulmonar com ecocardiografia Doppler em bezerros da raça Nelore originados através de transferência nuclear de células somáticas adultas - Clonagem", protocolado sob o nº1102/2007, utilizando 20 (vinte) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Júnior, 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 "Echocardiography and electrocardiography parameters and assessment of the blood flow in the aortic and pulmonary valves using Doppler echocardiography in Nelore calves produced by somatic cell nuclear transfer - Cloning", protocol number 1102/2007, utilizing 20 (twenty) bovines, under the responsibility Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Júnior, 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, 03 de maio de 2007

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: POGLIANI, Fabio Celidonio

Título: Parâmetros ecodopplercardiográficos de bezerros da raça Nelore originados através de transferência nuclear de células somáticas adultas - Clonagem

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

"Because it is there"

George Mallory

Para minhas Mães e meu Pai

***Para minha irmã
(Erba!)***

Amo vocês!

Ao Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Junior

Ao orientador Prof. Eduardo

Ao amigo Eduardo

Ao Prof.Dr. Wanderley Pereira de Araújo

Ao amigo Wando

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles que desde 2005 disponibilizou sua propriedade e seus clones à pesquisa clínica.

A Médica Veterinária Paula Silva e seu pai, Juvenil Silva, por terem acreditado e apoiado esta pesquisa disponibilizando os animais de sua propriedade.

Aos Professores do Departamento de Clínica Médica: Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera, Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani, Prof. Dr. Fernando José Benesi, Profa. Dra. Lilian Gregory, Profa. Dra. Maria Claudia Araripe Sucupira, pelos ensinamentos, bom convívio e amizade.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson pela orientação no início do doutorado.

A Dra. Maria Cristina Donadio Abduch, pelo treinamento, pela oportunidade, incentivo, por acreditar neste trabalho e por transformar a cardiologia e a ecocardiografia em uma arte.

Ao Instituto Veterinário de Imagem – IVI, pela oportunidade de estágios na cardiologia.

As Medicas Veterinárias Valéria e Talita, pelo aprendizado e convivência durante meus estágios no IVI.

A todos os colegas de pós-graduação: Alessandra, Bárbara, Bruna, Camila, Carol, Dudu, Enoch, Fernanda, Fred, Huber, Humberto, João Ari, Juliana, Laura, Leandro, Leo, Maiara, Mariana, Marjorie, Mel, Melina, Patrícia, Priscila, Raquel, Rebeca, Rogério, Tatiana, Vanessa (Cli) e Yuri pela convivência durante estes anos.

A toda equipe da obstetrícia, Zé Rodrigo e Paulinho, e da neonatologia, Profa. Camila, Liege e Cristina. Pela companhia, aprendizado e ajuda nos meus exames.

A D. Maria e “Seu” João pela convivência e ajuda no meu trabalho durante todos esses anos e durante o meu experimento.

Ao Camarão, Miguel e Cidinho, que me ajudaram sem restrições com os bezerros do grupo Controle na temporada em Tremembé.

A Daniela Becker Birgel, pela amizade sincera, por acreditar e indicar meu trabalho na UNIP.

Ao Prof. João Paulo e a UNIP de São José dos Campos pela oportunidade e por confiar no meu trabalho.

A Renata Farinelli pela amizade, convivência nas disciplinas e pela ajuda quando algum clone me impedia de dar aula.

A toda a família Takey: Debora, Keiko, Geraldo e Wendy por toda ajuda (não somente durante este projeto), pela amizade e confiança.

A Raquel, amiga que não se importou com horários e me ajudou a terminar esta tese. Não teria conseguido sem a sua ajuda, sou eternamente grato.

Ao amigo Bruno, pelo açaí com chagas, pela ajuda em inúmeras viagens e atividades no hospital e pela ajuda na confecção das tabelas desta tese.

A Mazé pela amizade, risadas, conversas, aconselhamentos, DVDs e pelas pizzas.

Ao Zé Grisi, o filho do Tchili, pela amizade e pela ajuda inquestionável com a estatística. E pelas piadas também.

Ao Lucas Bianconi, pela amizade, teorias empíricas revolucionárias e impagáveis trilhas.

A toda Borracharia 64. Vocês são impagáveis

Ao Eric “Belga”, Marcelo “Caixa” e Bruno “Fofão”, pela impagável convivência durante esse tempo.

Ao Tio Chico, “The Face”, pela ajuda e verdadeira amizade durante todo o período de pós-graduação.

Aos amigos André LHS e Eduardo Liparelli. Semper Fi.

A todos os estagiários e residentes da Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes que me ajudaram durante as viagens e exames realizados em todos os animais do experimento.

A todos os residentes, estagiários, alunos de graduação e funcionários da Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes da FMVZ-USP pela convivência durante todos esses anos.

A Elza Faquim a Biblioteca pela colaboração na verificação das normas de publicação e produção da ficha catalográfica desta dissertação.

A Ms. Maura Lapa Gonzaga pela dedicação na análise estatística.

A FMVZ –USP e a Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes, por sempre ter proporcionado a oportunidade de aprimorar minha formação técnica e pessoal desde a graduação até a pós-graduação.

À FAPESP por acreditar em nosso trabalho financiando a bolsa de estudo e pelo auxílio financeiro que viabilizou esta pesquisa.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a execução deste trabalho.

RESUMO

POGLIANI, F. C. **Parâmetros ecodopplercardiográficos de bezerros da raça Nelore originados através de transferência nuclear de células somáticas adultas – Clonagem**, 2010. p.107 Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo 2010.

A presente pesquisa avaliou as anomalias e/ou disfunções cardíacas através da determinação e comparação dos parâmetros ecocardiográficos e ecodopplercardiográficos do fluxo da valva pulmonar em bezerros da raça Nelore originados através de transferência nuclear de células somáticas adultas (TNCS) e concebidos por inseminação artificial ou monta natural durante os primeiros 30 dias de vida, com a finalidade de contribuir nos estudos na área de clonagem e no desenvolvimento da clínica de neonatos bovinos. O delineamento experimental envolveu a avaliação ecocardiográfica do coração e avaliação do fluxo da valva pulmonar através de ecocardiografia Doppler distribuídos nos seguintes intervalos: de 0 a 12 horas após o nascimento, de 12 a 24 horas após o nascimento, de 1 a 2 dias de vida, de 2 a 4 dias de vida, de 4 a 7 dias de vida, de 7 a 10 dias de vida, de 10 a 15 dias de vida, de 15 a 20 dias de vida e de 20 a 30 dias de vida. Os bezerros foram divididos em 2 grupos experimentais: 1- Grupo Controle composto por 10 bezerros obtidos por monta natural ou inseminação artificial e 2- Grupo Clones composto por 10 bezerros obtidos por meio de TNCS. Os parâmetros e índices ecocardiográficos foram: diâmetro interno do átrio esquerdo e direito em sístole, diâmetro interno de ventrículo direito em sístole e diástole, espessura do septo interventricular em sístole e diástole, diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole e diástole, parede livre do ventrículo esquerdo em sístole e diástole, diâmetro da aorta em diástole, razão átrio esquerdo em sístole e aorta, tempo de ejeção do ventrículo esquerdo, separação septal do ponto E, encurtamento fracional, fração de ejeção, volumes sistólico, diastólico e de ejeção, débito cardíaco, razão septo interventricular em sístole pela parede livre do ventrículo esquerdo em sístole. A avaliação do fluxo da valva pulmonar foi feita através da mensuração da velocidade máxima, velocidade média, tempo de ejeção, tempo de aceleração, integral de velocidade, volume sistólico, débito cardíaco e frequência cardíaca. Dos 10 animais clonados, 3 morreram em até 48 horas de vida apresentando hipertrofia ventricular congênita concêntrica, comunicação interatrial por não oclusão do forame oval e hipertensão arterial pulmonar. Os clones vivos apresentaram fluxo colorido através

de comunicação interatrial em até 10 dias de vida enquanto que os bezerros do grupo Controle apresentaram fluxo colorido em até 7 dias. O peso vivo dos animais apresentou alta correlação com o perímetro torácico. Os valores do ecocardiograma determinados para o grupo Controle não são indicados para serem usados como valores de referência para os clones, pois variam muito com o peso dos animais e os clones apresentam variação de peso acima do normal para a espécie.

Palavras-chave: Bezerro. Nelore. Clonagem. Ecocardiografia. Doppler.

ABSTRACT

POGLIANI, F. C. **Echodopplercardiographic parameters in Nelore calves produced by adult somatic cell nuclear transfer – Cloning.** 2010. p.107 Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The present research evaluated anomalies and/or cardiac dysfunctions through the determination and comparison of echocardiographic and echodopplercardiographic parameters of pulmonary valve flow on Nelore breed calves originated from the somatic cell nuclear transfer technique (SCNTT) and from Nelore breed calves conceived through artificial insemination or natural mating on its first 30 days of life, with the purpose of contributing on researches on the cloning technique field and on the bovine neonatal clinic development. The experimental design involved heart echocardiographic evaluation and the pulmonary valve echodopplercardiographic evaluation on the following intervals: 0 to 12 hours after birth, 12 to 24 hours after birth, 1 to 2 days old, 2 to 4 days old, 4 to 7 days old, 7 to 10 days old, 10 to 15 days old, 15 to 20 days old and 20 to 30 days old. Calves were allocated in two experimental groups: 1- Control Group composed of 10 calves conceived through artificial insemination and natural mating and 2- Clone Group composed of 10 calves originated from SCNTT. The echocardiographic parameters and indices were: systolic left and right atrium diameters, systolic and diastolic internal diameter, interventricular septum thickness during the systolic and diastolic movement, systolic and diastolic left ventricle internal diameter, left ventricle free wall during systolic and diastolic movement, diastolic aorta diameter, systolic left atrium and aortic root ratio, left ventricle ejection timing, E-point septal separation, fractional shortening, ejection fraction, systolic volume, diastolic volume, ejection volume, systolic interventricular septum and systolic left ventricle ratio. The pulmonary valve flow evaluation was performed through the measurement of the maximum velocity, the average velocity, ejection time, acceleration time, velocity integral, systolic volume, cardiac debit and cardiac frequency. 3 from 10 clones died up to 48 hours after birth, presented congenital concentric ventricle hypertrophy, interatrial communication due to non occlusive oval foramen and pulmonary artery hypertension. The living clones presented colored flow through the interatrial communication until 10 days old while animals from Control Group presented it until 7 days old. Animals' body weight and thoracic perimeter showed high correlation.

The echocardiographic values determined for Control Group are not supposed to be used as reference for clones, because body weight causes great variation on these values and clones present much bigger body weight than what is normal for the species.

Key words: Calf. Nelore. Cloning. Echocardiography. Doppler.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD	Átrio direito
AE	Átrio esquerdo
AEs:Aod	Razão átrio esquerdo em pico de sístole pelo diâmetro da raiz aórtica em diástole
Aod	Diâmetro da aorta em final de diástole
bpm	Batimentos por minuto
cm	Centímetro
cm/s	Centímetros por segundo
cm ²	Centímetros quadrados
DC	Débito cardíaco
DIADs	Diâmetro interno do átrio direito em final de sístole
DIAEs	Diâmetro interno do átrio esquerdo em final de sístole
DIVD	Diâmetro interno do ventrículo direito
DIVDd	Diâmetro interno do ventrículo direito em diástole
DIVDs	Diâmetro interno do ventrículo direito em sístole
DIVE	Diâmetro interno do ventrículo esquerdo
DIVEd	Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole
DIVEs	Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EF	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
FC	Frequência cardíaca
FS	Encurtamento fracional do ventrículo esquerdo
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FZEA	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
IGF-2	Fator de crescimento semelhante à insulina 2
kg	quilograma
L	Litros
L/min	Litros por minuto
MHZ	Megahertz
min	Minutos
mL	Mililitros

mm	Milímetros
m/s	Metros por segundo
ms	Milisegundos
PLVE	Parede livre do ventrículo esquerdo
PLVE _d	Espessura da parede livre do ventrículo esquerdo em diástole
PLVE _s	Espessura da parede livre do ventrículo esquerdo em sístole
s	Sístole
SIV	Espessura do septo interventricular
SIV _d	Espessura do septo interventricular em diástole
SIV _s	Espessura do septo interventricular em sístole
SIVs:PLVE _s	Razão espessura do septo interventricular em sístole pela espessura da parede livre do ventrículo esquerdo em sístole
SSPE	Separação septal do ponto E
TA	Tempo de aceleração
TE	Tempo de ejeção
TEVE	Tempo de ejeção do ventrículo esquerdo
USP	Universidade de São Paulo
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo
VESVD	Via de entrada e saída do ventrículo direito
V _{Max}	Velocidade máxima
V _{Média}	Velocidade média
VS	Volume sistólico
VSVE	Via de saída do ventrículo esquerdo
VTI	Integral de velocidade
°C	grau Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	29
2	OBJETIVOS.....	30
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	31
3.1	DISTURBIOS RELACIONADOS A GESTAÇÃO.....	31
3.2	ALTERAÇÕES NEONATAIS.....	32
3.3	ECOCARDIOGRAMA.....	38
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	42
4.2	EXAME CLÍNICO DO CORAÇÃO.....	43
4.3	EXAME ECOCARDIOGRÁFICO.....	43
4.4	EXAME ELETROCARDIOGRÁFICO.....	48
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1	ELETROCARDIOGRAFIA.....	49
5.2	ECOCARDIOGRAFIA.....	54
5.2.1	Clones vivos até 30 dias.....	55
5.2.2	Clones mortos até 48 horas de vida.....	84
6	CONCLUSÕES.....	100
	REFERENCIAS.....	101

1. INTRODUÇÃO

A transferência nuclear de células somáticas (TNCS) – clonagem é uma biotécnica que permite a geração de um organismo geneticamente igual ao outro e tem sido usada com êxito para a produção de animais viáveis (CAMPBELL et. al., 1996).

O primeiro mamífero clonado através da técnica de TNCS foi a ovelha Dolly que nasceu em 5 de julho de 1996, ficou mundialmente conhecida (WILMUT et al., 1997), e foi seguida da clonagem de outras várias espécies como bovinos, caprinos, murinos, suínos, felinos, equinos e caninos. O sucesso e o grande interesse na clonagem de animais de produção estão relacionados com a possibilidade da reprodução de animais com perfil de excelência, alta produtividade ou características desejáveis em um determinado rebanho (EDWARDS et al., 2003). No Brasil, a clonagem comercial de animais é realizada por empresas privadas desde 2004 com os partos ocorrendo a partir de 2005.

Contudo, eficiência da técnica ainda é baixa resultando em problemas no desenvolvimento desses clones ocasionando alta mortalidade (embrionária, fetal e pós-natal) ou diversas anomalias diagnosticadas durante a gestação e após o nascimento dos animais clonados.

As principais “causas mortis” após o nascimento dos bezerros clonados segundo Santos (2008) foram decorrentes de diversos fatores relacionados às alterações cardíacas, respiratórias e renais.

2. OBJETIVOS

Em continuidade às pesquisas desenvolvidas no Centro de Pesquisa e Diagnóstico de Enfermidades de Ruminantes do Departamento de Clínica Médica desta Faculdade, relacionada aos distúrbios na adaptação neonatal de bezerros da raça Nelore originados através de transferência nuclear de células somáticas adultas (bezerros clonados), a presente pesquisa, pelo delineamento experimental proposto teve a finalidade de:

- 1- avaliar as anomalias e/ou disfunções cardíacas e determinar os parâmetros ecocardiográficos de bezerros clonados durante o primeiro mês de vida;
- 2- avaliar os fluxos da valva pulmonar com ecodopplercardiografia em bezerros clonados;
- 3- estabelecer os valores de referência do ecodopplercardiograma de bezerros da raça Nelore sadios concebidos por inseminação artificial ou monta natural durante os primeiros dias de vida.

3. REVISÃO DE LITERATURA

O advento da clonagem de animais a partir de embriões reconstruídos com núcleos provenientes de células em diferentes estágios de diferenciação tem sido responsável pelo aparecimento de diversas anomalias diagnosticadas durante a gestação e após o nascimento de animais clonados. Ao consultar-se a literatura sobre possíveis transtornos associados à clonagem, há o consenso que os principais problemas seriam a macrossomia ou síndrome do bezerro grande ou LCS (do inglês “large calf syndrome”), os problemas cardiorrespiratórios e as anomalias umbilicais com infecção e persistência do úraco (WILSON et al. 1995; GARRY et al. 1996; CIBELLI et al., 1998; RENARD et al., 1999; HILL et al., 1999, MEIRELLES et al., 2010).

Afora essas alterações, estudos desenvolvidos por pesquisadores do Centro de Pesquisa e Diagnóstico de Enfermidades de Ruminantes - CPDER, do Departamento de Clínica Médica, em conjunto com pesquisadores de outros Departamentos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP (VCI, VPT e VRA), da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP e do Instituto Butantã têm evidenciado a ocorrência de sofrimento fetal relacionado à hipóxia durante a vida intra-uterina, distúrbios do metabolismo de carboidratos, possíveis distúrbios na síntese e absorção de vitaminas, que poderiam estar associados aos quadros freqüentes de alopecia e anemias de grau moderado a severo em bezerros obtidos por transferência nuclear de células somáticas adultas (KOMNINO, 2008; NUNES, 2009; MEIRELLES et al., 2010).

3.1 DISTÚRBIOS RELACIONADOS À GESTAÇÃO

Perdas embrionárias e fetais ocorrem em diferentes períodos de gestação e são descritas por praticamente todos os grupos de pesquisadores.

As falhas no desenvolvimento da placenta estão entre as causas mais comuns de perdas durante a gestação de clones, sendo as perdas iniciais, atribuídas à inadequada transição da nutrição do saco vitelínico para o alantóide em

decorrência da falta de vascularização, à rejeição imune e alterações de placentomas (WELLS et al. 1999; HILL et al. 2002). Em vacas e ovelhas costumam ser mais freqüentes no primeiro trimestre e são atribuídas à vascularização placentária deficiente (CHAVATTE-PALMER et al., 2004). Chavatte-Palmer et al. (2002), constataram em gestações de clones, placentomegalia e reduzido número de placentomas em relação a gestações de animais controle, produzidos *in vitro* (PIV).

Perdas gestacionais também costumam ocorrer na segunda metade da gestação, especialmente em decorrência de hidroalantóide (HEYMAN et al., 1999; PACE et al., 2002; CONSTANT et al., 2006). Outras alterações incluem aumento na espessura do cordão umbilical e membranas placentárias edematosas, sendo essas alterações responsabilizadas por perdas fetais em diferentes estágios de prenhez (WALKER et al., 1996; KRUIP; DENDAAS, 1997; CIBELLI et al., 1998; KATO et al., 1998; YOUNG et al., 1998; WELLS et al., 1999; HILL et al., 1999; HEYMAN et al., 1999).

Além disso, o tempo de gestação prolongado é muito comum em vacas prenhas de clones. Segundo, Matsuzaki e Shiga, (2002) os níveis reduzidos de cortisol encontrados nestes animais seriam insuficientes para preparar o sistema IGF (fator de crescimento insulina-dependente) para o “modo adulto” no final da gestação, resultando em dificuldades durante o parto.

3.2 ALTERAÇÕES NEONATAIS

Síndrome do neonato anormal: a síndrome do neonato grande, gigantismo ou LCS (do inglês “Large Calf Syndrome”) é uma característica que tem sido descrita em gestações tardias e que ocorre em animais provenientes de embriões cultivados *in vitro* (YOUNG et al., 1998). É caracterizada por um desenvolvimento anormal que leva ao nascimento de bezerros com peso e tamanho muito elevados. Esta síndrome é muito freqüente em ruminantes oriundos da clonagem, principalmente aqueles produzidos por TNCS e está fortemente associada à alta mortalidade.

Dados apresentados por Wilson et al. (1995), que compararam o peso ao nascimento, desmame (205 dias) e peso aos 365 dias de vida, de bezerros

produzidos por clonagem, transferência de embrião (TE), monta natural (MN) e inseminação artificial (IA), demonstraram que os clones foram em média 20% maiores ao nascimento do que os animais dos demais grupos. Além disso, a variabilidade de pesos ao nascimento nos animais clonados foi de 4 a 12 vezes maior do que dos demais. O crescimento acelerado e a variabilidade não continuaram após o nascimento, sendo que ao desmame e com um ano de idade, os pesos dos clones sofreram menos variações do que ao nascimento e foram semelhantes aos pesos dos animais de transferência de embriões, monta natural e inseminação artificial.

O fenômeno foi denominado por Farin et al. (2006), como “Síndrome do neonato anormal” ou AOS (do inglês “Abnormal offspring syndrome”), que propôs um sistema de quatro classificações de acordo com o seu grau de anormalidade:

- Tipo 1: Desenvolvimento anormal com morte do embrião ou do concepto (reabsorção embrionária/aborto) antes da organogênese completa (até aproximadamente 42 dias de gestação).
- Tipo 2: Desenvolvimento anormal de membranas placentárias e do feto; com morte fetal/aborto entre a fase de completa diferenciação de órgãos e o termo (de 42 a 280 dias de gestação).
- Tipo 3: Na qual a gestação chega ao termo, o feto e/ou a placenta possuem severas anormalidades de desenvolvimento e não há evidência de resposta compensatória pelo feto ou placenta. O parto é normal (eutócico) ou difícil (distócico). Os neonatos estão severamente comprometidos, com alterações clínicas, de parâmetros hematológicos e bioquímicos; a morte ocorre entre a hora do parto ou durante o período neonatal.
- Tipo 4: A gestação chega ao termo e tanto o feto quanto a placenta possuem alterações moderadas; entretanto ocorrem compensações feto-placentárias e adaptações que fazem com que o animal sobreviva apesar dos distúrbios genéticos e fisiológicos. O parto é eutócico ou distócico. Os neonatos podem ter tamanho normal ou serem maiores do que a média da raça e podem ter alterações clínicas e de parâmetros hematológicos e bioquímicos (FARIN et al. 2006).

Santos (2008) na necropsia de 13 bezerros clonados da raça Nelore observou que 100% deles encontravam-se dentro da classificação do tipo 3 da classificação de Farin et al., (2006) sendo que 12 desses animais apresentaram gigantismo tendo

em média 57 Kg de peso. Em decorrência a taxa de crescimento fora da normalidade o referido autor observou alterações em aparelho músculo esquelético como aumento das dimensões ósseas e articulações.

Alterações Cardiorrespiratórias: Falhas na adaptação neonatal a vida extra-uterina estão freqüentemente associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade em bezerros, sendo a maioria dos óbitos observados nos primeiros dias de vida relacionados à ocorrência de asfixia neonatal precoce ou tardia (SZENCI, 1985; BENESI, 1993). Em decorrência aos distúrbios de oxigenação associados à asfixia neonatal, observa-se diminuição da pO_2 e aumento da pCO_2 , circulação preferencial para órgãos vitais e glicólise anaeróbica naqueles não vitais, aumento da lactacidemia e acidose metabólica (BENESI, 1993). Afora isso, tem-se descrito nesses quadros clínicos, a presença de hipertensão pulmonar em resposta a hipóxia persistente e a vasoconstrição, podendo, inclusive, ocorrer reversão da circulação sangüínea pulmonar para o padrão observado na vida fetal com abertura do forame oval e presença de ducto arterioso patente (POULSEN; MCGUIRK, 2009).

Hill et al. (1999), ao estudarem as características clínicas e patológicas de bezerros e fetos transgênicos clonados, diagnosticaram hipertensão pulmonar neonatal em 2 de 5 fetos e em 3 de 8 bezerros, um deles morrendo aos 4 dias de vida, devido à insuficiência de surfactantes pulmonares, associada à hipertensão pulmonar e elevação da pressão venosa sistêmica. Observou-se edema de placenta em ambos os bezerros e em um dos dois fetos que apresentaram anomalias cardiopulmonares. Os pesquisadores sugeriram que estas anormalidades observadas nos bezerros e nos fetos teriam ocorrido no útero associadas às anomalias placentárias, tendo a clonagem e /ou as condições de cultivo embrionário contribuído para tal.

A ocorrência de hipertensão pulmonar persistente em bezerros clonados a partir da transferência nuclear de células somáticas adultas foi descrita também por Chavatte-Palmer et al. (2002) e Tsunoda e Kato (2002).

Segundo Carvalho et al. (2005), a hipertensão pulmonar é uma condição patológica observada em associação à existência de doenças cardíacas, doenças sistêmicas, doenças do parênquima pulmonar ou da vasculatura pulmonar que determinam surgimento de disfunção do endotélio pulmonar expresso por vasoconstrição, inflamação e trombose, sendo que o seu diagnóstico pode ser estabelecido quando a pressão média e sistólica pulmonar obtida em pacientes

humanos exceder, respectivamente, 25 e 30 mmHg. Entre os diversos fatores que podem estar relacionados à ocorrência de hipertensão pulmonar devem ser destacados, ainda, a aspiração de mecônio durante o parto, os quadros de hipóxia persistente causados por pneumonia ou observados em animais criados em altitudes elevadas (POULSEN; MCGUIRK, 2009).

A hipóxia / sofrimento fetal associada à aspiração de mecônio pode estar relacionado ao comprometimento do sistema cardiorrespiratório do animal clonado e foi observada em 55,5 % (5/9) dos bezerros nelores clonados avaliados por Nunes (2009). A referida autora em seu estudo do uso da cardiografia como método diagnóstico de ocorrência de sofrimento fetal durante a vida intrauterina de fetos da raça nelores originados por TNCS observou que os bezerros clonados que se apresentaram tingidos de mecônio ao nascimento morreram entre 1 e 36 horas de vida enquanto que os bezerros clonados que não nasceram tingidos de mecônio sobreviveram.

Associado a essa hipertensão pulmonar, pesquisas realizadas na Universidade de São Paulo tem evidenciado, em bezerros clonados, graves distúrbios cardiorrespiratórios caracterizado por hiperfonese e reforço de bulhas, presença de sopros cardíacos na 1ª e 2ª bulha associados a dispnéias, respiração rude, estertores e diminuição dos valores da PO2 no sangue arterial.

Além da hipertensão pulmonar, outras alterações cardiorrespiratórias foram observadas em bezerros clonados. Mayorka et al. (2005) necropsiaram na FMVZ/USP, dois fetos oriundos de clonagem a partir de células embrionárias (CE) e cinco, oriundos de células somáticas (CS). Nos animais CE as principais alterações encontradas foram: alterações hemolinfáticas, malformação do sistema nervoso central e malformação crânio-facial. Nos animais CS: alterações hemolinfáticas, cardiovasculares e respiratórias, malformação cardíaca e alteração renal. O estudo histológico dos órgãos linfóides revelou alteração estrutural caracterizada como “dismorfogênese”, além de alterações inflamatórias e degenerativas secundárias em diversos órgãos. Os pesquisadores apontaram como a “causa mortis” mais freqüente, o colapso cardiorrespiratório.

O exame ecocardiográfico das dimensões cardíacas entre bezerros clonados e bezerros produzidos por transferência de embriões até 24 horas de vida variaram entre os grupos comparados e indicaram anormalidades circulatórias que, segundo

os autores, são provavelmente originadas durante o período intra-uterino (BATCHELDER et al. 2006).

Santos (2008), em sua dissertação sobre patologia de neonatos de bovinos clonados relatou que 40% dos animais necropsiados apresentaram malformações cardíacas além da existência de hipertrofia concêntrica e excêntrica no coração dos animais necropsiados. O autor relatou que o peso do coração dos bezerros clonados necropsiados apresentou em média 570 g, havendo dois extremos, o peso mais alto foi 743 g enquanto que o mais leve pesou 137 g. Diferenças marcantes entre animais com peso semelhante foram observadas no referido estudo, um bezerro clonado com peso igual a 62 kg possuía um coração com 743 g enquanto que em outro animal de 55 Kg de peso o coração pesou 291g. O peso relativo do coração acompanhou a tendência do peso bruto do animal, não mantendo um padrão nos pesos aferidos.

Deformidades flexurais e articulares: relatadas freqüentemente em bezerros clonados, podem acometer membros anteriores ou posteriores, serem unilaterais ou bilaterais e atingir tendões flexores ou extensores. Garry et al. Em 1996, relataram este tipo de deformidade em 6 de 14 clones da raça Brangus. Todos eles com pesos entre 34 a 66 Kg ao nascimento.

Disfunções imunes: sugerem uma possível deficiência imunológica em clones ou ainda, falhas na eficiência da absorção de imunidade passiva colostrar. Garry et al. Em 1996, relataram que 6 de 8 bezerros clonados de células embrionárias morreram devido à septicemia ou pneumonia.

Anomalias umbilicais com infecção e persistência do úraco: são comuns e estão associadas ao aumento na espessura do cordão umbilical.

Alterações hematológicas: Renard et al. (1999), relataram um caso de aplasia linfóide em um bezerro clone oriundo de TNCS que após seis semanas de desenvolvimento normal, apresentou uma queda súbita na contagem de linfócitos e redução da taxa de hemoglobina, o que o levou ao óbito aos 51 dias de vida, com um quadro de anemia severa. Chavatte-Palmer et al. (2002), avaliaram, as características hematológicas de bezerros produzidos por TNCS, e não evidenciaram diferenças importantes comparados ao grupo controle, composto por animais de FIV. No entanto, verificaram que o volume celular dos eritrócitos destes animais era maior ao nascimento ($p < 0,01$) do que no grupo controle. Segundo os

pesquisadores, o Volume Corpuscular Médio (VCM) elevado, indicaria que a maturação hematológica não foi completa nestes animais.

Lanza et al. (2001) estudaram 24 clones de bovinos e descreveram hematologia, bioquímica e populações de linfócitos normais, entretanto o estudo não continha grupos comparativos. Batchelder et al, (2007) compararam o quadro eritrocitário de 8 bezerros clonados, da raça Holandesa (n=5) e da raça Hereford (n=3), com o de 6 animais controle obtidos por transferência de embrião (TE), da raça Holandesa (n=3) e da raça Hereford (n=3) e concluíram que o número de hemácias foi menor no grupo de bezerros clonados do que nos animais obtidos por TE do nascimento até a primeira hora de vida, sendo os valores semelhantes entre os grupos logo após esse período.

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

Alterações bioquímicas e hormonais: Wells et al. (2004) encontrou diferenças significativas em parâmetros hematológicos, indicadores de lesão muscular, função hepática, proteínas séricas e função renal em clones que sobreviveram até 2 anos de idade.

Alguns pesquisadores acreditam que hormônios estariam relacionados às anomalias peri-natais relatadas em clones. Em geral, estes dados sugerem que mudanças inapropriadas ou insuficientes durante o desenvolvimento podem ser parcialmente responsáveis pelo crescimento exagerado e pelas complicações perinatais associadas com o processo de clonagem. Garry et al. 1996, encontraram concentrações mais baixas de tiroxina e triiodotirosina e mais altas de insulina em clones do que no grupo referência com até 10 minutos de vida e interpretaram esses achados como sendo um indício de distúrbio na regulação de energia intra-útero, que seria responsável tanto pelo tamanho elevado ao nascimento quanto pelos problemas de saúde pós-natais. Chavatte-Palmer et al. (2004), encontraram concentrações mais baixas de T4 e IGF-II e mais altas de leptina em clones do que no grupo controle.

3.3 ECOCARDIOGRAFIA

Apesar do grande significado do exame clínico para o diagnóstico das enfermidades cardíacas, os métodos semiológicos como inspeção direta, palpação, percussão e auscultação não permitem uma avaliação exata do grau de dilatação, da hipertrofia e/ou da disfunção cardíaca, fornecendo informações limitadas sobre anatomia, dimensões e função do órgão (MICHIMA et al., 2007) e tornando necessário que os exames clínicos sejam complementados por avaliações eco e eletrocardiográficas.

O ecocardiograma permite uma avaliação anatômica, quantitativa e funcional do coração de uma maneira segura e não invasiva, possibilitando o diagnóstico das cardiopatias e acompanhamento da terapia dos pacientes doentes (PETRUS, 2006; MICHIMA et al., 2007). A ecodopplercardiografia, além de complementar as informações obtidas pelos modos uni e bidimensional de função sistólica, permite o estudo do enchimento ventricular e da função diastólica, de uma forma rápida e simples, inigualável a qualquer outro método não invasivo (PETRUS, 2006). O ecocardiograma com o auxílio do Doppler pulsátil e colorido permite o diagnóstico preciso de anormalidades cardíacas tais como: defeitos no septo interventricular, defeitos no septo interatrial, persistência do ducto arterioso, estenose aórtica e pulmonar, tetralogia de Fallot, displasia ou atresia de tricúspide (NYLAND e MATTON, 1995) assim como a avaliação indireta da pressão da artéria pulmonar por meio da determinação de parâmetros de fluxo desta artéria (tempo de aceleração, tempo de ejeção, relação tempo de aceleração/tempo de ejeção, entre outros) permitindo a detecção precoce de hipertensão pulmonar (UEHARA, 1993), desta forma, representando, atualmente, uma ferramenta importante para o diagnóstico, manuseio e prognóstico de pacientes com hipertensão pulmonar, sendo ainda capaz de sugerir seu mecanismo etiológico (Sbano et al., 2004).

Em relação à aplicação desta técnica em bovinos, diversos autores (GUGLIELMINI et al., 2002; GENTILE et al., 1998; IVANY; ILLANES, 1999; HONMA et al., 2001; STARKE et al., 2003; THARWAT et al., 2004) têm relatado o seu uso na clínica buiátrica no diagnóstico de enfermidades como pericardite, insuficiência cardíaca congestiva, endocardite bacteriana, cardiomiopatia dilatada ou mesmo em doenças congênitas como a Tetralogia de Fallot.

Entretanto para a correta interpretação dos resultados do ecocardiograma é necessário o conhecimento de valores normais das dimensões das câmaras e paredes musculares cardíacas e dos índices funcionais do miocárdio (O'GRADY et al., 1986), sendo escassos os estudos da descrição quantitativa em bovinos (AMORY et al., 1991; AMORY; LEKEUX, 1991). No Brasil o estudo dos parâmetros ecocardiográficos normais está restrito a pesquisa realizada por Michima et al. (2007), que determinaram por meio do ecocardiograma em modo-B e modo-M os parâmetros cardíacos de bezerros da raça Holandesa, com idade entre 8 e 28 dias. Os autores observaram uma tendência dos bezerros em apresentar menor diâmetro da câmara cardíaca esquerda, apesar de mantidas as relações de espessura e índices funcionais do miocárdio, quando comparados a animais mais velhos (quadros 1 e 2).

	Michima et al. (2007)	Amory et al. (1991)	Amory e Lekeux (1991)	
Raça	Holandesa	Friesian	Friesian	Friesian
Idade (dias)	8 - 28	81,8	18,1	30,6
Peso (kg)	40,34	84,9	33,9	45,4
DIADs (cm)	2,97	-	-	-
DIAEs (cm)	4,11	2,63	2,12	2,29
DIVDd (cm)	2,05	-	1,34	1,57
DIVDs (cm)	1,59	-	0,75	0,99
SIVd (cm)	1,24	1,18	0,92	1,16
SIVs (cm)	1,62	1,92	1,46	1,67
DIVEd (cm)	3,91	5,02	4,15	4,46
DIVEs (cm)	2,52	2,87	2,61	2,73
PLVEd (cm)	0,92	1,09	0,9	1,2
PLVEs (cm)	1,5	1,96	1,48	1,81
Aod (cm)	2,52	-	2,65	2,89

Quadro 1: Valores ecocardiográficos (média) obtidos pela janela paraesternal direita em bezerros de diferentes raças.

	Michima et al. (2007)	Amory et al. (1991)	Amory e Lekeux (1991)	
Raça	Holandesa	Friesian	Friesian	Friesian
Idade (dias)	8 – 28	81,8	18,1	30,6
Peso (kg)	40,34	84,9	33,9	45,4
Volume diastólico (mL)	67,9	-	-	-
Volume sistólico (mL)	25,32	-	-	-
Volume de ejeção (mL)	42,58	-	-	-
Débito cardíaco (L/min)	3,86	-	-	-
AEs: Aod	1,61	0,79	0,81	0,8
SSPE (cm)	0,65	-	-	-
TEVE (s)	0,39	-	-	-
FS %	36,27	42,8	36,9	39,1
EF %	64,67	-	-	-
SIVs: PLVEs	1,11	1,01	1,03	1,01

Quadro 2: Índices ecocardiográficos (média) obtidos para bezerros de diferentes raças

Complementando o exame do coração, a utilização da eletrocardiografia tem sido recomendada, pois além de ser uma técnica não invasiva, permite a obtenção de informações úteis para classificação das arritmias (FREGIN, 1985; CLAXTON, 1988), sendo o método de escolha para a avaliação de problemas cardíacos associados com a produção e condução do estímulo elétrico (De ROTH, 1980).

No que tange ao exame com Doppler nas aplicações cardiovasculares, de acordo com Mathias Júnior (2007), o feixe de ultra-som deve ser alinhado o mais paralelo possível em relação à direção do fluxo (0° ou 180°) e as tentativas de correção do ângulo de interceptação podem resultar em erros significativos nos cálculos da velocidade e não devem ser utilizadas.

Batchelder et al. (2006) compararam através de exame ecocardiográfico dimensões cardíacas entre bezerros clonados e bezerros produzidos por transferência de embriões até 24 horas de vida (quadro 3). Os resultados variaram entre os grupos comparados e indicaram anormalidades circulatórias que, segundo os autores, são provavelmente originadas durante o período intra-uterino.

Parâmetro	Clones		P	Controle	
	Média	Variação		Média	Variação
Parede livre VE (cm)	1,88	1,39-2,48	0,025	1,55	0,93-1,65
Parede livre VD (cm)	1,48	1,31-1,61	0,015	1,25	1,12-1,28
Diâmetro de VD (cm)	0,86	0,35-1,06	0,028	1,27	0,65-1,82
Diâmetro da aorta (cm)	2,43	1,82-2,66	0,09	2,65	1,88-2,85
Diâmetro da artéria pulmonar (cm)	2,56	2,14-2,9	0,058	2,30	2,03-2,48
Velocidade do fluxo na aorta (m/s)	1,32	1,20-1,49	0,019	1,02	0,96-1,10

VE= ventrículo esquerdo - sístole; VD= ventrículo direito – sístole

Fonte: BATCHELDER et al. (2006).

Quadro 3 - Características ecocardiográficas de bezerros clonados

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para melhor distribuição dos constituintes deste capítulo, optou-se por dividir o mesmo em: grupos experimentais, exame clínico do coração, exame ecocardiográfico, exame eletrocardiográfico e análise estatística.

4.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a realização do presente projeto foram acompanhados 20 bezerros da raça Nelore, sendo que 06 bezerros originados por meio de transferência nuclear de células somáticas adultas (bezerros clonados) foram acompanhados durante 30 dias de vida, 1 bezerro clonado foi acompanhado até 48 horas após o nascimento, 3 bezerros clonados acompanhados morreram em até 48 horas de vida e 10 bezerros concebidos por inseminação artificial ou monta natural foram acompanhados até 30 dias de vida. Os 23 animais foram submetidos a exame clínico do sistema cardíaco, eletrocardiograma, ecocardiograma e avaliação dos fluxos da valva pulmonar em 9 momentos, conforme apresentado no quadro 5.

Momentos dos exames	Número de Bezerros Clonados	Número de bezerros concebidos por inseminação artificial ou monta natural
≤ ½ dia de vida (0 — 12 horas após o nascimento)	10	10
½ — 1 dia de vida (12 — 24 horas após o nascimento)	10	10
1 — 2 dias de vida (24 — 48 horas após o nascimento)	10	10
2 — 4 dias de vida (48 — 96 horas após o nascimento)	6	10
4 — 7 dias de vida	6	10
7 — 10 dias de vida	6	10
10 — 15 dias de vida	6	10
15 — 20 dias de vida	6	10
20 — 30 dias de vida	6	10

Quadro 5 – Constituição dos grupos experimentais para exame clínico do sistema cardíaco, avaliação do eletrocardiograma, ecocardiograma e dos fluxos da valva pulmonar de bezerros da raça Nelore originados por meio da técnica de transferência nuclear de células somáticas adultas e bezerros concebidos por inseminação artificial ou monta natural. São Paulo, 2009.

Os animais do grupo Controle foram pesados para mensuração de sua massa corpórea (kg). O perímetro torácico (cm), na região posterior à axila, passando por sobre a cernelha (crista da escápula), foi mensurado nos animais do grupo Controle e do grupo Clones.

4.2 EXAME CLÍNICO DO CORAÇÃO

No exame físico foi realizado primeiramente o exame geral dos animais, com a avaliação das funções vitais: frequência respiratória e cardíaca, temperatura retal e coloração de mucosas. Posteriormente foi realizada uma avaliação mais específica do coração, através dos meios semiológicos: inspeção, palpação, percussão e auscultação.

Com relação à avaliação do sistema circulatório foram avaliados a existência de sinais de insuficiência cardíaca por meio da avaliação da prova de repleção da jugular, presença pulso venoso patológico e de edema na entrada do peito. Durante a palpação da região cardíaca foram avaliadas as características do choque pré-cordial e a existência de frêmitos cardiogênicos. A percussão foi realizada para avaliar aumento de área de projeção do coração. Na auscultação foram avaliadas as características dos ruídos cardíacos procurando determinar: a frequência, o ritmo, a intensidade e a presença de ruídos adventícios. Inicialmente a auscultação foi realizada na região do choque pré-cordial seguido da auscultação dos focos cardíacos. O exame do sistema circulatório seguiu as recomendações propostas por Rosenberger (1983).

4.3 EXAME ECOCARDIOGRÁFICO

Para a obtenção das imagens, foi realizada a tricotomia do pelame do 3º ao 5º espaço intercostal direito, entre a articulação escápulo-umeral à articulação úmero-rádio-ulnar, região que corresponde à área da janela cardíaca direita, segundo orientações da American Society of Echocardiography (REEF, 1990).

O exame ecocardiográfico foi realizado com o animal em decúbito lateral esquerdo e/ou decúbito esternal com o membro anterior direito posicionado à frente

do membro contralateral para facilitar o exame na janela cardíaca direita a qual oferece maior facilidade de obtenção de imagens, permitindo a mensuração no maior diâmetro do ventrículo esquerdo (MICHIMA, 2003). Para o exame utilizou-se aparelho de ecocardiografia, modelo Sonosite Micromaxx, utilizando-se um transdutor microconvexo de 4-8 MHz. O exame ecocardiográfico, seguindo as orientações recomendadas por Michima et al. (2007), iniciou-se pelo modo bidimensional – modo-B, instituindo-se os planos tomográficos, avaliando a morfologia das estruturas cardíacas e sua movimentação de uma forma global, e a partir de então, procedeu-se o exame em modo-M, observando-se os critérios estabelecidos pela American Society of Echocardiography (REEF, 1990). As mensurações em modo-B foram feitas como descrito por Patteson et al. (1995), e as em modo-M como descritas por Long, Bonagura e Darke (1992).

Nos animais do grupo controle foi realizada primeiramente uma análise qualitativa do coração em modo bidimensional para detectar animais com alterações valvares ou miocárdicas e em seguida era realizada análise com Doppler colorido para detecção de fluxos turbulentos anormais. Somente foram incluídos no estudo do grupo controle animais sem alterações estruturais e valvares.

A avaliação ecocardiográfica foi iniciada com a obtenção das três imagens paraesternais de eixo maior (longitudinal/sagital): quatro câmaras; vias de entrada e de saída do ventrículo direito (VESVD); via de saída do ventrículo esquerdo (VSVE). O corte paraesternal longitudinal direito permitiu a observação das estruturas cardíacas, sua caracterização física e avaliação do tipo e qualidade de movimentação.

O corte longitudinal de quatro câmaras foi utilizado para a mensuração do diâmetro do átrio esquerdo em pico de sístole (AEs), dorsal à valva mitral, como descrito por Vöros et al. (1991) e Michima et al. (2007). Devido à impossibilidade de posicionamento adequado do transdutor pelo tamanho e conformação do tórax em bezerras é possível a ocorrência de equívocos durante a mensuração do átrio direito em pico de sístole (ADs), com a determinação de valores referentes ao apêndice atrial somente, e não do átrio como um todo (MICHIMA et al. 2007). Para tanto avaliou-se qualitativamente o átrio direito, o seu tamanho em relação às outras câmaras cardíacas, em especial o átrio esquerdo, bem como em sua movimentação e na movimentação anormal ou não da valva atrioventricular direita e da presença ou não de alterações congênitas ou adquiridas, como as comunicações interatriais

(MICHIMA et al., 2007). Desta forma, quando possível uma adequada visualização do ADs, foi realizada a mensuração do mesmo nos bezerros clonados e nos bezerros do grupo controle.

Em seguida, girando-se o transdutor em 90° no sentido horário, foram feitas imagens do eixo menor (corte transversal/coronal) do ventrículo esquerdo, observando-se a simetria dos músculos papilares e da forma do ventrículo esquerdo, e do seu modo-M correspondente para a mensuração das seguintes variáveis obtidas em fase final de diástole (d) e em pico de sístole (s): espessura de septo interventricular (SIV), espessura da parede livre do ventrículo esquerdo (PLVE); diâmetro interno do ventrículo direito (DIVD) e diâmetros interno do ventrículo esquerdo (DIVE).

Com o transdutor em modo-B levemente inclinado dorsalmente, obteve-se o plano de eixo menor da valva aórtica e em seu modo-M correspondente foram feitas as mensurações de diâmetro da raiz aórtica em final de diástole (Aod) para obtenção da razão AEs:Aod e do tempo de ejeção, em segundos, do ventrículo esquerdo (TEVE), realizado entre a abertura e fechamento dos folhetos valvares.

Direcionando-se, em modo-B, o transdutor ventralmente, observou-se o eixo menor da valva mitral para obtenção da mensuração do ponto E (ponto de maior abertura do folheto septal da valva mitral no início da diástole) até o septo interventricular (SSPE), em modo-M, que é um indicador do diâmetro da VSVE (REEF, 1998).

De acordo com Michima et al. (2007) procedeu-se a mensuração dos seguintes parâmetros ecocardiográficos:

- a) Corte longitudinal de quatro câmaras - Modo B:
 - Diâmetro interno do átrio esquerdo em pico de sístole (DIAEs), em cm;
 - Diâmetro interno do átrio direito em pico de sístole (DIADs), em cm.
- b) Corte transversal do ventrículo esquerdo – Modo M:
 - Diâmetro interno do ventrículo direito, em diástole (DIVDd) e em sístole (DIVDs), em cm;
 - Espessura do septo interventricular, em diástole (SIVd) e em sístole (SIVs), em cm;
 - Diâmetro interno do ventrículo esquerdo, em diástole (DIVEd) e em sístole (DIVEs), em cm;
 - Espessura da parede livre do ventrículo esquerdo, em diástole (PLVEd) e em sístole (PLVEs), em cm.

c) Corte transversal da valva aórtica – Modo M:

- Diâmetro da raiz aórtica em final de diástole (Aod), em cm;
- Mensuração do tempo de ejeção do ventrículo esquerdo (TEVE), em segundos.

d) Corte transversal da valva mitral – Modo M:

- Mensuração da distância SSPE: distância entre o ponto E (ponto de maior abertura do folheto septal da valva mitral no início da diástole) até o septo interventricular, em cm.

Complementando a avaliação da função cardíaca foram calculados os seguintes índices:

a) Encurtamento fracional do ventrículo esquerdo (“fractional shortening” – FS%), porcentagem da diminuição do diâmetro do ventrículo esquerdo pela sístole, calculado pela fórmula abaixo (BOON, 1998):

$$FS\% = \frac{DIVEd - DIVEs}{DIVEd} \times 100$$

DIVEd

Onde DIVE = diâmetro interno do ventrículo esquerdo (sístole e diástole).

b) Estimativa dos volumes diastólico e sistólico (mL), através da fórmula cúbica modificada por Teicholz (KIENLE e THOMAS, 1995):

$$\text{Fórmula de Teicholz: } V = \frac{7 \times DIVE^3}{2,4 + DIVE}$$

Onde DIVE = diâmetro interno do ventrículo esquerdo (sístole e diástole).

c) Fração de ejeção do ventrículo esquerdo (“ejection fraction” – EF%), porcentagem do volume ejetado durante a sístole ventricular, calculada segundo a fórmula (BOON, 1998):

$$EF\% = \frac{Vd - Vs}{Vd} \times 100$$

Vd

Onde: V = volume do ventrículo esquerdo (sístole e diástole)

d) Volume de Ejeção (mL) - calculado segundo a fórmula:

Volume de Ejeção = Volume Diastólico – Volume Sistólico.

e) Razão diâmetro do átrio esquerdo na sístole: diâmetro da raiz aórtica na diástole (Aes:Aod), potencialmente útil para a avaliação de regurgitação mitral (PATTESON et al., 1995);

f) Débito cardíaco (DC) - volume de sangue bombeado pelo coração em 1

minuto:

$DC \text{ (L/min)} = \text{Volume de Ejeção} \times \text{Frequência Cardíaca};$

g) Razão espessura do septo interventricular (sístole) pela espessura da parede livre do ventrículo esquerdo (sístole) - SIVs:PLVEs.

Foi realizada a avaliação com Doppler do fluxo da valva pulmonar, através da projeção paraesternal transversa direita, corte longitudinal da via de saída do ventrículo direito sendo o volume de amostragem posicionado dentro da artéria pulmonar, perto das cúspides valvares. O fluxograma do local analisado foi obtido a partir de 3 a 5 ciclos cardíacos consecutivos e o resultado considerado foi a média dos valores obtidos.

No exame da valva pulmonar os seguintes parâmetros foram mensurados:

- a) Velocidade máxima (cm/s) - medida no pico máximo do fluxo analisado;
- b) Velocidade média (cm/s) - velocidade principal durante o período de fluxo;
- c) Integral de velocidade (cm) (Velocity Time Integral ou VTI) - área abaixo do fluxo avaliado que representa a distância que o volume de sangue percorre;
- d) Tempo de aceleração (milissegundos) - tempo do início do fluxo até o pico máximo do fluxo avaliado;
- e) Tempo de ejeção (milissegundos) - tempo que vai do início até o final do fluxo;
- f) Volume sistólico (mL) - multiplica-se o VTI pela área do vaso avaliado;
- g) Débito cardíaco (L/min) - obtido multiplicando-se o valor do volume sistólico pela frequência cardíaca;
- h) Frequência cardíaca (bpm) - medida entre dois ciclos cardíacos.

Após traçar, manualmente com o cursor, o contorno do espectro analisado, os índices avaliados foram calculados eletronicamente pelo software instalado no aparelho ecocardiográfico. O valor de área valvar para obtenção do volume sistólico foi realizado medindo-se a distância do ponto de inserção das cúspides valvares da valva pulmonar e então calculado automaticamente pelo aparelho ecocardiográfico.

4.4 EXAME ELETROCARDIOGRÁFICO

Para o exame eletrocardiográfico, foi utilizado o aparelho TEB[®], modelo C10, sendo o animal mantido em decúbito lateral direito com os membros paralelos entre si e perpendiculares ao eixo longitudinal do corpo conforme metodologia descrita por Fregin (1985). Os eletrodos foram fixados à pele com cliques tipo jacaré, seguindo-se a aplicação de álcool nos pontos de fixação (região do olecrano nos membros anteriores e da patela nos membros posteriores).

As derivações utilizadas foram as bipolares DI, DII e DIII e as unipolares aumentadas aVR, aVL e aVF, do plano frontal. Segundo metodologia recomendada por Tilley (1992), os parâmetros eletrocardiográficos avaliados na derivação DII, em velocidade de 25 e 50 mm/s e com sensibilidade de 1 milivolt (mV) igual a 1 centímetro (cm), foram os seguintes: frequência cardíaca, ritmo cardíaco e eixo elétrico cardíaco.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados das variáveis foram resumidos em cada um dos 9 momentos para os grupos Clones e Controle, através das seguintes medidas descritivas: média, desvio-padrão, mediana e amplitude de variação através dos valores mínimo e máximo. A análise estatística inferencial foi feita através de testes não paramétricos, dado o número pequeno de observações, principalmente no grupo de animais clonados vivos.

Os grupos Clones e Controle foram comparados quanto às variáveis, em cada um dos 9 intervalos, através do teste de Mann-Whitney. A comparação foi feita entre grupos apresentando pelo menos 3 observações válidas.

Quanto ao nível de significância (α) adotado, para uma análise conservadora é recomendado controlar o α global de cada teste. Para isso, o nível de significância de 5% em cada teste foi corrigido, dividido pelo número de comparações feitas. Nos testes entre grupos o α adotado foi de 0,006, isto é $5\% / 9$ (o número total de intervalos de comparações); ou seja, níveis descritivos (valores p) inferiores a 0,006 são considerados resultados estatisticamente significantes.

O software utilizado para a realização das análises estatísticas foi o SPSS 15 for Windows[®].

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo optou-se pela apresentação dos resultados dos exames ecocardiográficos juntamente com a discussão dos mesmos. Para facilitar, o capítulo foi subdividido em eletrocardiograma e ecocardiograma. O item ecocardiograma foi subdividido em: clones e clones que morreram até 48 horas de vida. Com o intuito de facilitar a visualização e interpretação dos resultados obtidos optou-se pela apresentação dos dados sob a forma de tabelas e figuras.

5.1 ELETROCARDIOGRAFIA

A realização dos exames eletrocardiográficos não apresentou problemas em relação à técnica, demonstrando que a mesma pode ser realizada de forma satisfatória nos animais com até 30 dias de vida.

O grupo Controle e grupo Clones não apresentaram problemas associados com a produção e/ou condução de estímulos elétricos característicos de arritmias patológicas nos animais do em todos os intervalos de exames realizados.

O ritmo sinusal foi o ritmo mais encontrado em todos os intervalos de exame do grupo Clones e do grupo Controle. Marcapasso migratório foi encontrado em quase que toda a totalidade dos exames realizados em todos os intervalos em ambos os grupos (tabela 1).

O eixo cardíaco demonstrou grande variabilidade entre os grupos e entre todos os intervalos avaliados dentro de cada grupo (figuras 1-3).

De acordo com Hamlin et al. (1984), em virtude da anatomia das fibras cardíacas de Purkinje nos animais ruminantes, a determinação do eixo elétrico possui limitada indicação e valor clínico para animais desta espécie.

Os resultados do eletrocardiograma também não demonstraram anomalias de condução e produção elétrica cardíaca em todos os clones que vieram a óbito em até 48 horas de vida.

Tabela 1 – Ritmos cardíacos dos animais dos grupos Clones e Controle.
São Paulo, 2009

	CLONE S (%)			CONTROLE (%)			
	N	RS MPM	AS MPM	N	RS MPM	AS MPM	RS N
0 - 12h	6	100,0	0,0	10	90,0	10,0	-
12 - 24h	7	100,0	0,0	10	80,0	20,0	-
24 - 48h	7	100,0	0,0	10	80,0	20,0	-
2 - 4d	6	100,0	0,0	10	77,8	22,2	-
4 - 7d	6	100,0	0,0	10	55,6	33,3	11,1
7 - 10d	6	100,0	0,0	10	60,0	40,0	-
10 - 15d	6	100,0	0,0	10	60,0	40,0	-
15 - 20d	6	100,0	0,0	10	30,0	70,0	-
20 - 30d	6	100,0	0,0	10	30,0	70,0	-

N: número de animais; RS MPM: ritmo sinusal com marcapasso migratório; AS MPM: arritmia sinusal com marcapasso migratório; RSN: ritmo sinusal normal.

Figura 1: Distribuição do eixo elétrico cardíaco dos grupos Clones e Controle durante os primeiros 2 dias de vida. São Paulo, 2009

Figura 2: Distribuição do eixo cardíaco dos grupos Clones e Controle entre 2 e 10 dias de vida. São Paulo, 2009

Figura 3: Distribuição do eixo cardíaco dos grupos Clones e Controle entre 10 e 30 dias de vida. São Paulo, 2009

5.2 ECOCARDIOGRAMA

A fim de se avaliar os parâmetros ecocardiográficos e do fluxo da valva pulmonar foram calculados média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação dos valores que foram apresentados nas tabelas 2 a 34 e figuras 6 a 15.

A metodologia empregada para o exame ecocardiográfico e para avaliação dos fluxos da valva pulmonar através da ecocardiografia Doppler foi considerada adequada para avaliação dos grupos Clone e Controle nos primeiros 30 dias de vida.

Os exames realizados nos permitiram, em ambos os grupos, primeiramente através de uma análise qualitativa, observar que o coração de todos os animais estava formado, apresentando as 4 câmaras cardíacas e as respectivas valvas. Não havia derrame pericárdico e pleural e neoformações intra ou extra-cavitárias.

Em relação à morfologia das estruturas cardíacas, não ocorreu alteração ecogênica, e presença de rugosidades em epicárdio e endocárdio em todos os animais do grupo Clones e do grupo Controle avaliados. As valvas atrioventriculares esquerda e direita e a valva aórtica também não apresentaram alterações ecogênicas e de superfície em nenhum exame realizado.

Foi observado, em ambos os grupos, que através da análise qualitativa das dinâmicas valvares, no momento da diástole ventricular as valvas atrioventriculares abriam-se em direção aos ventrículos e fechavam-se com a coaptação de seus folhetos em direção aos átrios durante os momentos de sístole ventricular. A valva aórtica abria-se durante a sístole ventricular em direção à aorta, fechando-se ao final desta etapa do ciclo cardíaco. A musculatura cardíaca apresentou-se menos ecogênica que a superfície endocárdica e epicárdica, com aspecto homogêneo e íntegro, sendo menos espessa na parede livre ventricular direita em relação ao septo interventricular e à parede livre ventricular esquerda. Estas características ecocardiográficas em relação ao comportamento da dinâmica cardíaca e qualidade de imagens não difere do relatado anteriormente por Michima et al. (2007).

No atinente à técnica de mensuração, como foi observado por Vöros, Holmes e Gibbs (1991) e Michima (2003), o modo-M, aliado à vantagem de possuir maior resolução temporal em virtude da maior frequência amostral (PATTESON, 1999) permite uma visualização mais clara do limite entre as estruturas do que o

modo-B. Entretanto, o modo-B torna-se mais eficiente para a observação anatômica do coração e sua movimentação, permitindo uma melhor caracterização qualitativa das estruturas cardíacas (VÖROS, HOLMES; GIBBS; 1991; MICHIMA, 2003).

A janela cardíaca direita mostrou-se adequada à obtenção de imagens uma vez que esta permite a mensuração do maior diâmetro do ventrículo esquerdo (LONG, BONAGURA, DARKE, 1992). Da mesma forma, a utilização da janela parasternal transversa direita para a obtenção de imagens da artéria pulmonar e para avaliação com Doppler do fluxo da artéria pulmonar mostrou-se, como já observado por Marr (1999) e Long, Bonagura e Darke (1992), adequada à realização do presente estudo.

A análise da função sistólica do ventrículo direito é geralmente estimada qualitativamente na prática clínica (MATHIAS JÚNIOR, 2007) devido à forma assimétrica e à falta de pontos anatômicos que permitam uma precisa mensuração do diâmetro desta câmara direita (LONG, BONAGURA, DARKE, 1992; PATTESON et al., 1995). Fato este evidenciado pela grande diferença de valores médios observada quando comparamos os valores de DIVD de diferentes estudos da literatura (quadro 1). Assim, torna-se recomendável a avaliação do ventrículo direito através de análise qualitativa. Esta é feita observando uma forma geralmente de meia lua ao redor do ventrículo esquerdo e correspondendo a cerca de 1/3 de seu tamanho no corte transversal, ao nível das cordoalhas tendíneas (MICHIMA et al., 2007), proporção e conformação que podem ser melhor observados através da Figura 20.

A forma de meia lua, ainda que assimétrica, foi mantida em todos os exames realizados em todos os bezerros clonados e do grupo controle até 30 dias de vida.

5.2.1 Clones vivos até 30 dias

Foi possível detectar, através de exame com Doppler colorido, a presença de fluxo turbulento entre os átrios direito e esquerdo (figura 4). O Doppler colorido indicou que há a presença de fluxo através do forame oval em intervalos de idade maiores nos animais clonados do que em animais do grupo controle.

Figura 4 - Frequência de animais que apresentaram fluxo turbulento através de comunicação interatrial – forame oval. São Paulo, 2009.

Kasari (1994) relata que o fechamento anatômico do forame oval pode ocorrer em até algumas semanas. Entretanto a oclusão funcional pode acontecer em até 20 minutos após o nascimento uma vez que ocorre, inicialmente, um aumento do fluxo de sangue no pulmão o qual provoca aumento de pressão no AE, pressionando o septo primo contra o septo secundo e então determinando a oclusão funcional do mesmo. Em seres humanos, a comunicação interatrial corresponde a aproximadamente 7% das cardiopatias congênitas, atingindo, predominantemente o sexo feminino na proporção de 2:1, sendo aquele localizado na região da fossa oval o tipo anatômico mais frequente, com 75% dos casos (PEDRA et al., 2006). Entretanto não existem estudos com ecocardiografia Doppler de fluxo colorido que determinem o tempo fisiológico de oclusão do forame oval em bovinos, desta forma fica limitada a comparação e classificação dos tempos da figura 4 em critérios patológicos ou fisiológicos.

A análise dos dados mostrou que os bezerros clonados possuem diferenças nos parâmetros e nos índices ecocardiográficos nos diferentes intervalos de avaliação ecocardiográfica em relação aos bezerros normais (tabela 2 a 34, Figura 4 a 10) .

Comparando os resultados obtidos com os encontrados na literatura (Tabelas 2 a 34 e Quadros 1 e 2), foi possível observar que os animais do grupo controle, quando comparados a resultados de outros estudos ecocardiográficos realizados anteriormente em bezerros de outras raças (AMORY, LEKEUX, 1991; AMORY et al., 1991; MICHIMA et al., 2007), possuem semelhança entre os valores obtidos em

animais com idade e, principalmente, peso mais próximo aos dos animais do citado grupo.

A influência do peso dos animais nos valores ecocardiográficos foi destacado por Michima (2003) em seu estudo ecocardiográfico em cavalos de enduro. A autora comparando os resultados de sua pesquisa com os da literatura, encontrou médias abaixo das encontradas em outros estudos e atribuiu que o fato pode ser explicado pela diferença de peso que existia entre os animais por ela utilizados, que eram menores, em relação ao peso dos animais utilizados em estudos da literatura.

Michima et al. (2007), em posterior estudo ecocardiográfico de bezerros da raça Holandesa, da mesma forma, destaca a importância do peso sobre os parâmetros ecocardiográficos quando compara os resultados encontrados em sua pesquisa com resultados da literatura compulsada.

A destacada importância do peso corpóreo sobre os parâmetros ecocardiográficos foi estudada por Amory e Lekeux (1991) avaliando a influência do crescimento nas variáveis ecocardiográficas funcionais e morfológicas em bezerros. A influência da idade, peso e área de superfície corpórea foram analisadas em relação a 10 dimensões e 6 variáveis funcionais cardíacas. Para tanto, determinaram equações de regressão alométrica e concluíram que a maioria dos parâmetros dimensionados aumentaram com o evoluir das variáveis idade, peso e área de superfície corporal, entretanto, aconselham principalmente, a considerar a variável peso dos animais, não somente em virtude da alta correlação encontrada mas também pela facilidade de obtenção e maior acurácia no resultado desta quando comparada com as outras variáveis. Os autores também concluíram que os índices funcionais ecocardiográficos não são alterados em função do crescimento do animal e podem ser utilizados sem ajustes pertinentes ao tamanho do mesmo.

Como demonstrado por Wilson et al. (1995), bezerros clonados foram, em média, 20% maiores ao nascimento do que bezerros produzidos através de monta natural, inseminação artificial e transferência de embriões, sendo que o peso ao nascimento foi de 4 a 12 vezes maior do que os demais. Entretanto, o peso ao desmame e com um ano de idade sofreu menor variação do que ao nascimento, tornando-se semelhantes.

A macrosomia ou síndrome do bezerro grande é uma das principais alterações encontradas nos clones produzidos a partir de células somáticas adultas. Ainda que o doador de células mais comumente seja um animal de genética e peso

ao nascimento superior à média, o nascimento de animais com peso acima do normal é muito freqüente na clonagem. A média de peso dos animais da raça Nelore nascidos a partir do laboratório de produção de clones a qual esta pesquisa está vinculada é de 38 kg, com amplitude de variação entre 14 e 62 kg (MEIRELLES et al., 2010). Os animais deste laboratório que morreram foram examinados em necropsia e os resultados revelaram que o peso relativo do coração dos bezerros clonados acompanhou a tendência de peso bruto dos mesmos, não mantendo um padrão nos pesos aferidos (SANTOS, 2008).

A média de peso dos animais do grupo controle estudados nesta pesquisa foi de 30,9 kg com amplitude de variação entre 20 – 39 kg ao nascimento (tabela 2, figura 5). Apesar do peso dos animais do grupo Clones não ter sido aferido durante o período estudado, foi possível mensurar o perímetro torácico durante o nascimento e durante o desenvolvimento de todos os animais clonados em todos os intervalos de exames (tabela 3, figura 5). Não somente ao nascimento, mas durante todo o período de execução do estudo, em virtude do manejo nutricional, sanitário e do próprio mérito genético, os animais clonados apresentaram qualitativamente um desenvolvimento corpóreo superior aos animais do grupo controle, sendo este um fato esperado uma vez que as condições normais de criação de animais na pecuária brasileira não reflete as condições de criação dos clones.

Uma vez que as dimensões cardíacas possuem resultados de alta correlação com o peso dos animais (AMORY et al, 1991; AMORY e LEKEUX, 1991; MICHIMA et al., 2007), poderíamos alvitrar diferenças estatísticas significantes entre o peso dos animais do grupo Clones e do grupo Controle entre si ao longo dos intervalos uma vez que existiram diferenças entre parâmetros cardíacos mensurados no mesmo período de tempo.

Ao realizarmos análise de regressão entre o perímetro torácico e o peso dos animais, o resultado revelou forte correlação ($r^2=0,7533$, figura 5). Portanto, poderíamos concomitantemente alvitrar que o perímetro torácico também deveria refletir as diferenças entre os parâmetros cardíacos e desta forma, quando comparamos seus valores médios ao longo tempo, apresentariam diferenças entre si.

Ao analisarmos a tabela 3, figura 5 podemos perceber que para o nível de significância adotado ($p < 0,006$) o perímetro torácico não apresentou diferença estatística significativa durante o período estudado entre os animais dos grupos

Clones e Controle. Contudo, antes de concluirmos a respeito da ausência de diferença entre os grupos para este parâmetro, devemos discutir o poder do teste utilizado. Ao analisarmos melhor os grupos, podemos perceber que o número amostral de clones vivos é pequeno, isto é, 7 animais.

Para uma amostra de 7 animais, considerando a relação entre a diferença das médias dos grupos e o desvio-padrão médio do perímetro torácico e, conseqüentemente, do peso, temos um poder de teste ($1 - B$; onde B é a probabilidade de não encontrar diferença caso ela exista) de apenas 27,45%. Ou seja, a probabilidade do teste utilizado encontrar uma diferença significativa é de apenas 27,45%. Estima-se que para garantir um poder de teste aceitável devemos adotar um nível de 80% e que para tanto seria necessário uma amostra constituída de 27 indivíduos em cada grupo, garantindo assim uma chance razoável de encontrar a diferença, caso ela exista.

A alta variação de peso encontrada para os animais clonados torna a comparação de valores dos parâmetros ecocardiográficos destes com aqueles de animais normais e com a mesma idade, mais sujeita a falhas na conceituação e no diagnóstico de anomalias cardíacas. Caso não consideremos o fator peso, e avaliarmos isoladamente parâmetros relacionados a dimensões cardíacas ao longo do tempo entre os grupos, poderíamos, ao analisar as diferenças entre SIVs, SIVd, PLVEs e PLVEd (tabelas 8, 12, 10 e 14), supor que o coração dos clones passa por um processo de crescente sobrecarga de volume imposta gradualmente que está resultando então em uma hipertrofia excêntrica do miocárdio, esta observada por Santos (2008), mediada pela liberação de catecolaminas quando na verdade também poderíamos inferir que os resultados de aumento nas dimensões refletem a imposição de uma carga obrigatória de volume que é imposta em decorrência dos aumentos significativos do débito cardíaco (tabela 21) - decorrente de maiores demandas metabólicas - e do maior volume sanguíneo circulante (ROSSI, 1992)

Portanto, deveriam ser criados valores de referência específicos de animais clonados sadios para que a elevada influência do peso pudesse ser eliminada ou minimizada o que determinaria o surgimento de um critério de comparação mais fidedigno para animais com pesos maiores.

No que tange à criação de valores de referência para animais clonados, Chavatte-Palmer et al. (2004), considera que um animal clonado não deve ser considerado fisiologicamente normal antes dos 50 dias de vida. Destarte, a criação

de tal intervalo de valores estaria comprometida até o período em que estes animais estivessem fisiologicamente instáveis.

Não existe na literatura compulsada, valores de referência para ecocardiografia Doppler de fluxo de valva pulmonar em bovinos normais de qualquer raça ou idade, dificultando a comparação e a discussão dos resultados.

Nos quadros de hipertensão pulmonar, secundária a hipertrofias ventriculares esquerdas ou secundária à insuficiência respiratória pulmonar, enfermidades comumente encontradas em clones, poderíamos encontrar dilatação de artéria pulmonar, diminuição do tempo de aceleração do fluxoda valva pulmonar, regurgitação de tricúspide e movimentação septal anormal. Os exames ecocardiográficos não revelaram fluxo turbulento sistólico através do Doppler colorido em valva tricúspide, movimento septal paradoxal e os resultados não demonstraram aumento significativo de área de valva pulmonar associado com diminuição significativa no tempo de aceleração do fluxo da valva pulmonar entre os animais dos grupos Clones e Controle até 30 dias de vida.

Tabela 2 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação do peso de bezerros da raça Nelore do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo - 2009

	Peso (Kg)	0 - 12h	12 - 24h	24 - 48h	2 - 4d	4 - 7d	7 - 10d	10 - 15d	15 - 20d	20 - 30d
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	30,9	31,3	32,0	32,7	34,8	36,3	38,3	40,7	42,7
	Desv. Pad.	6,4	6,3	5,0	5,0	5,1	5,4	5,4	5,9	6,2
	Mediana	33,3	32,8	32,8	32,8	34,3	35,8	39,8	42,3	44,5
	Mín. – Máx.	20-39	20-40	23-39,5	25,5-41,5	28-44	28-46	30-46	32-49,5	33,5-52,5

Tabela 3 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação do perímetro torácico de bezerros da raça Nelore do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo - 2009

	FC (bpm)	0 - 12h	12 - 24h	24 - 48h	2 - 4d	4 - 7d	7 - 10d	10 - 15d	15 - 20d	20 - 30d
Clones	N	6	7	7	6	6	6	6	6	6
	Média	75,5	76,4	76,7	77,7	78,5	79,8	82,8	85,3	87,5
	Desv. Pad.	3,7	3,0	3,4	3,8	3,0	2,6	3,5	3,8	2,6
	Mediana	75,5	77,0	77,0	77,0	78,5	80,0	83,5	84,8	87,5
	Mín. – Máx.	71 - 81	72-80	72- 81	73 - 83	74 - 83	77 - 84	77 - 86	80 - 90	83 - 90
Controles	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	74,4	74,7	75,3	76,1	77,2	77,8	79,5	80,4	82,6
	Desv. Pad.	3,5	3,7	2,7	2,6	2,3	2,3	3,0	3,5	3,4
	Mediana	73,5	73,3	74,0	75,5	77,5	77,8	79,8	81,5	83,0
	Mín. – Máx.	70,5 - 80,5	70 - 80,5	72 - 80	73 - 81	74 - 81	75 - 82,5	75 - 83	74 - 84	78 - 88
	Valor p	0,5622	0,3638	0,4747	0,4278	0,4278	0,2198	0,0934	0,0312	0,016

N : número de animais; Teste de Mann Whitney (p<0,006).

Tabela 4 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação da frequência cardíaca de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida. - São Paulo – 2009

	FC (bpm)	0 - 12h	12 - 24h	24 - 48h	2 - 4d	4 - 7d	7 - 10d	10 - 15d	15 - 20d	20 - 30d
Clones	N	6	7	7	6	6	6	6	6	6
	Média	135,3	127	145,3	162	146,3	137	145,8	122,8	118,8
	Desv. Pad.	11,2	11,2	14,0	24,8	17,7	23,8	23,9	16,2	28,9
	Mediana	140,0	128,0	146,0	162,5	146,5	141,0	146,0	122,0	125,0
	Mín. – Máx.	118-146	109-143	128-162	128-194	118-171	104-167	113-171	105-150	68-156
Controles	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	123,8	119,7	119,7	136,3	123,7	117,3	100	99,8	88,6
	Desv. Pad.	14,2	16,0	19,9	33,3	30,9	28,5	20,5	26,8	17,4
	Mediana	127,5	111,0	122,0	129,0	121,0	110,0	96,5	97,5	90,5
	Mín. – Máx.	103-143	103-146	75-146	87-182	85-162	88-167	78-143	71-158	57-118
	Valor p	0,1806	0,3148	0,0097	0,1471	0,2198	0,1806	0,003	0,0559	0,0312

N : número de animais; Teste de Mann Whitney (p<0,006).

Tabela 5 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação do DIAEs de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	DIAEs (cm)	0 - 12h	12 - 24h	24 - 48h	2 - 4d	4 - 7d	7 - 10d	10 - 15d	15 - 20d	20 - 30d
Clones	N	6	7	7	6	6	6	6	6	6
	Média	4,08	4,18	4	4,1	4,32	4,26	4,39	4,41	4,47
	Desv. Pad.	0,53	0,37	0,46	0,34	0,32	0,16	0,31	0,2	0,29
	Mediana	4,15	4,29	4,12	4,19	4,41	4,32	4,44	4,44	4,56
	Mín. – Máx.	3,14-4,62	3,65-4,68	3,15-4,6	3,51-4,4	3,72-4,64	3,99-4,44	3,97-4,81	4,1-4,62	4,09-4,85
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	3,66	3,54	3,66	3,64	3,66	3,71	3,75	3,77	3,84
	Desv. Pad.	0,4	0,31	0,25	0,3	0,34	0,26	0,29	0,27	0,29
	Mediana	3,58	3,46	3,62	3,69	3,71	3,71	3,76	3,67	3,92
	Mín. – Máx.	3,33-4,75	3,24-4,13	3,37-4,12	3,18-4,16	3,14-4,33	3,27-4,03	3,21-4,21	3,34-4,21	3,49-4,25
	Valor p	0,1179	0,0031	0,0553	0,0225	0,0047	0,0008	0,003	0,0005	0,003

N : número de animais; Teste de Mann Whitney (p<0,006).

Tabela 6 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação dos valores de DIADs de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	DIADs (cm)	0 - 12h	12 - 24h	24 - 48h	2 - 4d	4 - 7d	7 - 10d	10 - 15d	15 - 20d	20 - 30d
Clones	N	6	7	7	6	6	6	6	6	6
	Média	3,08	2,85	3,02	3,07	3,27	3,44	3,58	3,46	3,76
	Desv. Pad.	0,45	0,5	0,33	0,3	0,45	0,34	0,35	0,23	0,41
	Mediana	3,14	2,93	3,06	3,11	3,30	3,41	3,67	3,55	3,85
	Mín. – Máx.	2,46-3,57	2,06-3,49	2,42-3,43	2,62-3,35	2,53-3,81	2,87-3,87	3-3,93	3,12-3,65	3,22-4,14
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	2,9	2,72	2,81	2,81	2,81	2,81	2,78	2,75	2,82
	Desv. Pad.	0,51	0,38	0,42	0,25	0,38	0,27	0,26	0,21	0,26
	Mediana	2,76	2,69	2,70	2,74	2,76	2,67	2,70	2,72	2,74
	Mín. – Máx.	2,33-3,96	2,22-3,35	2,32-3,36	2,51-3,27	2,31-3,65	2,56-3,28	2,53-3,33	2,47-3,05	2,57-3,31
Valor p		0,4278	0,6009	0,3638	0,1292	0,0727	0,0028	0,0027	0,001	0,0005

N : número de animais; Teste de Mann Whitney (p<0,006).

Tabela 7 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação do DIVDs de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	DIVDs (cm)	0 - 12h	12 - 24h	24 - 48h	2 - 4d	4 - 7d	7 - 10d	10 - 15d	15 - 20d	20 - 30d
Clones	N	6	7	7	6	6	6	6	6	6
	Média	1,54	1,34	0,94	1,07	1,14	1,23	1,12	1,15	1,1
	Desv. Pad.	0,39	0,72	0,49	0,28	0,12	0,33	0,41	0,28	0,35
	Mediana	1,64	1,41	0,94	1,10	1,17	1,32	1,03	1,17	1,11
	Mín. – Máx.	0,8-1,89	0-2,25	0-1,62	0,62-1,42	0,97-1,26	0,8-1,6	0,77-1,8	0,79-1,47	0,7-1,6
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	1,6	1,4	1,42	1,44	1,64	1,42	1,41	1,17	1,22
	Desv. Pad.	0,3	0,21	0,35	0,28	0,35	0,35	0,38	0,13	0,13
	Mediana	1,66	1,42	1,53	1,52	1,74	1,42	1,23	1,14	1,24
	Mín. – Máx.	1,19-1,97	1,09-1,69	0,74-1,84	0,97-1,87	0,97-2,02	0,76-2,05	1,04-1,96	1,01-1,46	1-1,39
Valor p		0,8749	0,9623	0,0431	0,042	0,0047	0,3676	0,2635	0,8749	0,4923

N : número de animais; Teste de Mann Whitney (p<0,006).

Tabela 8 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação dos valores de SIVs de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	SIVs (cm)	0 - 12h	12 - 24h	24 - 48h	2 - 4d	4 - 7d	7 - 10d	10 - 15d	15 - 20d	20 - 30d
Clones	N	6	7	7	6	6	6	6	6	6
	Média	1,63	1,73	1,83	1,97	1,96	1,97	2,05	2,16	2,13
	Desv. Pad.	0,28	0,33	0,28	0,28	0,24	0,14	0,28	0,49	0,43
	Mediana	1,67	1,67	1,86	1,86	1,96	1,98	2,01	1,99	2,03
	Mín. – Máx.	1,12-1,9	1,17-2,15	1,39-2,29	1,7-2,35	1,57-2,3	1,72-2,13	1,73-2,46	1,83-3,13	1,73-2,94
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	1,35	1,5	1,53	1,51	1,55	1,54	1,55	1,54	1,57
	Desv. Pad.	0,11	0,16	0,14	0,15	0,14	0,21	0,2	0,25	0,19
	Mediana	1,30	1,48	1,50	1,51	1,54	1,58	1,58	1,57	1,55
	Mín. – Máx.	1,21-1,53	1,24-1,8	1,3-1,79	1,25-1,72	1,37-1,86	1,1-1,84	1,22-1,79	1,23-1,9	1,32-1,88
Valor p		0,0312	0,0702	0,025	0,0005	0,003	0,0005	0,001	0,003	0,003

N : número de animais; Teste de Mann Whitney (p<0,006).

Tabela 9 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação do DIVEs de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	DIVEs (cm)	0 - 12h	12 - 24h	24 - 48h	2 - 4d	4 - 7d	7 - 10d	10 - 15d	15 - 20d	20 - 30d
Clones	N	6	7	7	6	6	6	6	6	6
	Média	2,05	2,02	2,1	1,95	2,29	2,39	2,46	2,69	2,96
	Desv. Pad.	0,34	0,27	0,32	0,37	0,35	0,25	0,24	0,37	0,19
	Mediana	2,01	2,07	2,15	2,01	2,31	2,36	2,43	2,73	2,93
	Mín. – Máx.	1,56-2,56	1,56-2,41	1,65-2,54	1,35-2,37	1,91-2,86	2,06-2,83	2,12-2,78	2,09-3,13	2,69-3,19
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	2,46	2,35	2,29	2,44	2,42	2,62	2,71	2,72	2,77
	Desv. Pad.	0,29	0,27	0,3	0,44	0,31	0,44	0,43	0,32	0,44
	Mediana	2,35	2,39	2,21	2,35	2,40	2,52	2,70	2,70	2,84
	Mín. – Máx.	2,17-2,99	1,95-2,75	1,99-2,78	1,77-3,3	1,91-3	2,14-3,68	2,1-3,62	2,26-3,31	2,06-3,61
Valor p		0,0312	0,0431	0,4747	0,042	0,4923	0,3676	0,2635	0,7925	0,1806

N : número de animais; Teste de Mann Whitney (p<0,006).

Tabela 10 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação do PLVEs de bezeros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	PLVEs (cm)	0 - 12h	12 - 24h	24 - 48h	2 - 4d	4 - 7d	7 - 10d	10 - 15d	15 - 20d	20 - 30d
Clones	N	6	7	7	6	6	6	6	6	6
	Média	1,59	1,64	1,73	1,86	1,83	1,82	1,9	1,95	2,06
	Desv. Pad.	0,27	0,15	0,19	0,1	0,12	0,14	0,2	0,19	0,24
	Mediana	1,53	1,70	1,69	1,87	1,81	1,86	1,94	1,94	1,97
	Mín. – Máx.	1,28-2,02	1,46-1,82	1,46-1,94	1,73-1,97	1,68-2,02	1,57-1,95	1,63-2,1	1,75-2,3	1,86-2,49
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	1,28	1,29	1,3	1,29	1,39	1,35	1,35	1,39	1,4
	Desv. Pad.	0,12	0,1	0,11	0,13	0,13	0,17	0,12	0,1	0,16
	Mediana	1,31	1,29	1,30	1,31	1,43	1,39	1,33	1,39	1,39
	Mín. – Máx.	1,1-1,44	1,11-1,42	1,11-1,5	1,07-1,5	1,11-1,54	1,1-1,59	1,18-1,53	1,25-1,53	1,19-1,74
Valor p		0,011	0,0001	0,0002	0,0002	0,0002	0,0005	0,0002	0,0002	0,0002

N : número de animais; Teste de Mann Whitney (p<0,006).

Tabela 11 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação do DIVDd de bezeros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	DIVDd (cm)	0 - 12h	12 - 24h	24 - 48h	2 - 4d	4 - 7d	7 - 10d	10 - 15d	15 - 20d	20 - 30d
Clones	N	6	7	7	6	6	6	6	6	6
	Média	1,86	1,93	1,6	1,7	1,83	1,87	1,82	1,87	1,9
	Desv. Pad.	0,45	0,6	0,54	0,48	0,31	0,24	0,43	0,3	0,34
	Mediana	1,96	2,17	1,52	1,56	1,81	1,87	1,65	1,96	1,82
	Mín. – Máx.	1,16-2,36	0,72-2,43	0,84-2,47	1,18-2,39	1,43-2,34	1,5-2,23	1,44-2,61	1,44-2,22	1,45-2,36
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	2,09	2,02	1,93	1,96	2,1	1,91	1,91	1,68	1,71
	Desv. Pad.	0,39	0,29	0,34	0,26	0,41	0,31	0,36	0,17	0,26
	Mediana	1,88	2,03	1,93	1,91	2,10	1,80	1,91	1,67	1,67
	Mín. – Máx.	1,7-2,78	1,49-2,48	1,41-2,42	1,62-2,32	1,56-2,65	1,53-2,47	1,42-2,54	1,47-2,03	1,4-2,19
Valor p		0,6354	0,8125	0,1331	0,2198	0,3676	1	0,7925	0,2635	0,2635

N : número de animais; Teste de Mann Whitney (p<0,006).

Tabela 12 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação do SIVd de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	SIVd (cm)	0 - 12h	12 - 24h	24 - 48h	2 - 4d	4 - 7d	7 - 10d	10 - 15d	15 - 20d	20 - 30d
Clones	N	6	7	7	6	6	6	6	6	6
	Média	1,13	1,13	1,27	1,44	1,43	1,36	1,43	1,32	1,43
	Desv. Pad.	0,15	0,21	0,39	0,35	0,2	0,21	0,26	0,19	0,31
	Mediana	1,15	1,13	1,18	1,42	1,41	1,33	1,36	1,26	1,37
	Mín. – Máx.	0,87-1,28	0,8-1,43	0,83-2,05	0,96-2,02	1,14-1,65	1,05-1,68	1,2-1,88	1,13-1,57	1,13-1,93
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	0,96	1,01	1,06	1,08	1,13	1,13	1,16	1,1	1,1
	Desv. Pad.	0,1	0,08	0,12	0,1	0,09	0,12	0,21	0,12	0,12
	Mediana	0,96	0,99	1,09	1,04	1,15	1,10	1,09	1,05	1,15
	Mín. – Máx.	0,84-1,1	0,91-1,12	0,9-1,23	1,01-1,35	0,98-1,23	0,99-1,31	0,89-1,63	0,94-1,28	0,87-1,28
	Valor p	0,0312	0,1613	0,1088	0,042	0,0047	0,016	0,0312	0,0312	0,0225

N : número de animais; Teste de Mann Whitney ($p < 0,006$).

Tabela 13 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação do DIVEd de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	DIVEd (cm)	0 - 12h	12 - 24h	24 - 48h	2 - 4d	4 - 7d	7 - 10d	10 - 15d	15 - 20d	20 - 30d
Clones	N	6	7	7	6	6	6	6	6	6
	Média	3,99	3,98	4	4,05	4,23	4,15	4,39	4,76	5,14
	Desv. Pad.	0,59	0,46	0,43	0,29	0,14	0,35	0,19	0,37	0,26
	Mediana	3,90	3,97	3,95	4,00	4,29	4,10	4,36	4,86	5,13
	Mín. – Máx.	3,3-4,78	3,55-4,92	3,25-4,48	3,72-4,38	3,95-4,33	3,8-4,68	4,14-4,61	4,31-5,26	4,76-5,49
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	3,69	3,7	3,76	3,8	3,84	3,99	4,01	4,14	4,21
	Desv. Pad.	0,28	0,2	0,26	0,42	0,27	0,37	0,34	0,35	0,37
	Mediana	3,75	3,72	3,67	3,87	3,83	4,04	3,91	4,11	4,17
	Mín. – Máx.	3,27-4,18	3,34-3,99	3,56-4,39	2,97-4,46	3,4-4,26	3,47-4,46	3,41-4,58	3,66-4,69	3,58-4,89
	Valor p	0,4923	0,1613	0,1088	0,3132	0,003	0,4923	0,0225	0,0075	0,0005

N : número de animais; Teste de Mann Whitney ($p < 0,006$).

Tabela 14 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação de PLVEd de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	PLVEd (cm)	0 - 12h	12 - 24h	24 - 48h	2 - 4d	4 - 7d	7 - 10d	10 - 15d	15 - 20d	20 - 30d
Clones	N	6	7	7	6	6	6	6	6	6
	Média	0,86	0,85	0,95	1,12	1,01	1,14	1,16	1,19	1,11
	Desv. Pad.	0,14	0,1	0,07	0,26	0,13	0,12	0,11	0,13	0,09
	Mediana	0,84	0,89	0,93	1,01	0,99	1,13	1,14	1,16	1,10
	Mín. – Máx.	0,69-1,1	0,7-0,94	0,87-1,06	0,91-1,59	0,88-1,18	0,98-1,33	1,04-1,36	1,08-1,44	1,01-1,24
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	0,71	0,78	0,77	0,8	0,85	0,87	0,88	0,86	0,9
	Desv. Pad.	0,07	0,14	0,05	0,1	0,09	0,09	0,08	0,09	0,1
	Mediana	0,70	0,76	0,76	0,79	0,87	0,89	0,88	0,85	0,91
	Mín. – Máx.	0,63-0,86	0,65-1,15	0,7-0,86	0,66-0,99	0,69-0,97	0,7-0,98	0,78-1,06	0,74-1,02	0,76-1,1
Valor p		0,011	0,1613	0,0001	0,0017	0,016	0,0002	0,0005	0,0002	0,0017

N : número de animais; Teste de Mann Whitney (p<0,006).

Tabela 15 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação do Aod de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	Aod (cm)	0 - 12h	12 - 24h	24 - 48h	2 - 4d	4 - 7d	7 - 10d	10 - 15d	15 - 20d	20 - 30d
Clones	N	6	7	7	6	6	6	6	6	6
	Média	2,25	2,27	2,3	2,26	2,33	2,47	2,57	2,63	2,84
	Desv. Pad.	0,16	0,22	0,31	0,15	0,15	0,18	0,23	0,26	0,25
	Mediana	2,29	2,22	2,24	2,28	2,34	2,55	2,63	2,60	2,93
	Mín. – Máx.	2,01-2,44	2,02-2,66	2,01-2,98	2,01-2,41	2,11-2,49	2,22-2,63	2,23-2,85	2,34-3	2,49-3,14
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	2,12	2,16	2,19	2,2	2,23	2,26	2,34	2,39	2,42
	Desv. Pad.	0,12	0,11	0,13	0,13	0,12	0,12	0,12	0,17	0,18
	Mediana	2,10	2,13	2,21	2,21	2,20	2,23	2,31	2,41	2,42
	Mín. – Máx.	1,97-2,33	2,03-2,34	2,04-2,36	2-2,4	2,1-2,47	2,05-2,45	2,21-2,58	2,11-2,66	2,11-2,68
Valor p		0,1806	0,3148	0,7396	0,2635	0,1806	0,0225	0,0753	0,0727	0,0075

N : número de animais; Teste de Mann Whitney (p<0,006).

Tabela 16 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação do TEVE de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	TEVE (s)	0 - 12h	12 - 24h	24 - 48h	2 - 4d	4 - 7d	7 - 10d	10 - 15d	15 - 20d	20 - 30d
Clones	N	6	7	7	6	6	6	6	6	6
	Média	0,28	0,27	0,2	0,19	0,18	0,18	0,18	0,21	0,21
	Desv. Pad.	0,05	0,08	0,02	0,05	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
	Mediana	0,29	0,26	0,21	0,19	0,18	0,18	0,19	0,21	0,21
	Mín. – Máx.	0,21-0,35	0,16-0,39	0,16-0,23	0,12-0,27	0,16-0,22	0,16-0,22	0,16-0,21	0,18-0,24	0,17-0,24
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	0,24	0,23	0,24	0,23	0,22	0,24	0,23	0,25	0,24
	Desv. Pad.	0,02	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03	0,03	0,05	0,02
	Mediana	0,24	0,23	0,23	0,22	0,23	0,24	0,24	0,24	0,25
	Mín. – Máx.	0,21-0,27	0,2-0,28	0,2-0,29	0,18-0,32	0,17-0,25	0,18-0,27	0,15-0,26	0,18-0,36	0,21-0,27
	Valor p	0,0553	0,5362	0,033	0,1806	0,016	0,0047	0,016	0,0559	0,0225

N : número de animais; Teste de Mann Whitney ($p < 0,006$).

Tabela 17 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação de SSPE de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	SSPE (cm)	0 - 12h	12 - 24h	24 - 48h	2 - 4d	4 - 7d	7 - 10d	10 - 15d	15 - 20d	20 - 30d
Clones	N	6	7	7	6	6	6	6	6	6
	Média	0,65	0,61	0,5	0,61	0,64	0,58	0,61	0,65	0,74
	Desv. Pad.	0,2	0,18	0,21	0,2	0,19	0,15	0,06	0,1	0,12
	Mediana	0,7	0,7	0,6	0,6	0,7	0,6	0,6	0,7	0,7
	Mín. – Máx.	0,41-0,89	0,28-0,84	0,13-0,69	0,32-0,89	0,31-0,82	0,33-0,79	0,51-0,67	0,49-0,78	0,54-0,87
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	0,63	0,63	0,63	0,59	0,58	0,64	0,7	0,64	0,69
	Desv. Pad.	0,1	0,14	0,17	0,12	0,14	0,2	0,18	0,18	0,18
	Mediana	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7	0,6	0,7
	Mín. – Máx.	0,45-0,77	0,46-0,89	0,46-0,89	0,41-0,86	0,4-0,85	0,39-1,1	0,37-1,08	0,42-1,05	0,49-1,08
	Valor p	0,8749	0,7396	0,3148	0,7128	0,6354	0,7925	0,1806	0,5622	0,3676

N : número de animais; Teste de Mann Whitney ($p < 0,006$).

Tabela 18 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação do volume diastólico de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	Vol Diast. (mL)	0 12h	12 24h	24 48h	2 4d	4 7d	7 10d	10 15d	15 20d	20 30d
Clones	N	6	7	7	6	6	6	6	6	6
	Média	71,5	70,2	71,2	72,4	80,1	77	87,3	106,4	126,6
	Desv. Pad.	25,1	20,8	17,4	12,2	6,2	15,4	8,7	18,9	14,6
	Mediana	66,3	68,8	67,9	69,9	82,4	74,5	85,8	110,4	125,5
	Mín. – Máx.	44,1-106,5	52,6-113,9	42,5-91,5	58,9-86,8	67,9-84,4	62-101,3	75,9-97,8	83,5-133	105,4-146,8
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	58,3	58,2	61	62,8	63,8	70,3	70,9	76,6	80
	Desv. Pad.	10,5	7,3	10,8	16,1	10,6	15,1	14,1	15,4	16,8
	Mediana	59,8	58,9	56,8	64,7	63,1	71,5	66,3	74,7	77,1
	Mín. – Máx.	43,2-77,7	45,4-69,6	53-87,2	34,2-90,5	47,4-81,3	49,8-90,5	47,8-96,3	56,6-101,9	53,7-112,3
Valor p		0,4923	0,1613	0,1088	0,3132	0,003	0,4923	0,0225	0,0075	0,0005

N : número de animais; Teste de Mann Whitney (p<0,006).

Tabela 19 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação do volume sistólico de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	Vol. Sist. (mL)	0 12h	12 24h	24 48h	2 4d	4 7d	7 10d	10 15d	15 20d	20 30d
Clones	N	6	7	7	6	6	6	6	6	6
	Média	14	13,5	15	12,6	18,6	20,3	21,8	27,6	34,1
	Desv. Pad.	5,9	4,3	5,4	5,4	7,3	5,4	5,2	8,9	5,3
	Mediana	12,8	13,9	15,3	12,9	18,3	19,3	20,7	27,8	33,0
	Mín. – Máx.	6,7-23,7	6,7-20,4	7,8-23,2	4,6-19,5	11,3-31,1	13,7-30,3	14,8-29	14,2-38,8	26,8-40,6
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	22	19,5	18,5	22	21,1	26,1	28,4	28,2	29,8
	Desv. Pad.	6,8	5,6	6,3	10,2	6,7	12,2	11,6	8,1	11,4
	Mediana	19,1	20,0	16,4	19,0	20,2	22,8	27,1	27,0	30,5
	Mín. – Máx.	15,6-34,7	11,9-28,3	12,6-29	9,3-44,1	11,3-35	15,1-57,4	14,4-55,2	17,3-44,5	13,7-54,8
Valor p		0,0312	0,0431	0,4747	0,042	0,4923	0,3676	0,2635	0,7925	0,1806

N : número de animais; Teste de Mann Whitney (p<0,006).

Tabela 20 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação do volume de ejeção de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	Vol. Ej. (mL)	0 - 12h	12 - 24h	24 - 48h	2 - 4d	4 - 7d	7 - 10d	10 - 15d	15 - 20d	20 - 30d
Clones	N	6	7	7	6	6	6	6	6	6
	Média	57,4	56,7	56,3	59,8	61,5	56,7	65,5	78,8	92,5
	Desv. Pad.	20,8	17,4	13,2	11,1	5,8	16,6	10,1	15	12
	Mediana	55,3	53,1	57,3	58,3	63,6	56,0	65,1	83,6	89,7
	Mín. – Máx.	32,4-89,1	42,4-93,5	34,8-74,5	47,4-77,4	52,4-68	35,6-81	52,7-77	52,4-94,2	78,7-107,2
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	57,4	56,7	56,3	59,8	61,5	56,7	65,5	78,8	92,5
	Desv. Pad.	7,1	4,6	10,8	11,3	8,9	13,3	10,1	11,6	11,1
	Mediana	34,9	38,8	41,0	41,4	39,5	43,9	41,1	45,7	49,2
	Mín. – Máx.	26,8-46,6	30,9-44,3	30,1-70,5	22,1-55,6	35,4-61,7	20,5-60	30,2-63,5	32,3-67,4	34,1-67,6
	Valor p	0,0312	0,0007	0,033	0,0047	0,0017	0,1471	0,003	0,0017	0,0002

N : número de animais; Teste de Mann Whitney ($p < 0,006$).

Tabela 21 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação do débito cardíaco de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	DC (L/min)	0 - 12h	12 - 24h	24 - 48h	2 - 4d	4 - 7d	7 - 10d	10 - 15d	15 - 20d	20 - 30d
Clones	N	6	7	7	6	6	6	6	6	6
	Média	7,6	7,1	8,2	9,8	9	7,9	9,6	9,6	11,1
	Desv. Pad.	2,2	1,9	2,3	2,8	1,6	3	2,3	1,7	3,2
	Mediana	7,3	6,3	8,6	8,9	8,7	8,5	9,8	10,4	11,4
	Mín. – Máx.	4,5-10,5	5,8-11	4,5-12,1	7,5-15	7,5-11,6	3,7-11,8	6-12	6,5-11,1	5,3-14,6
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	4,5	4,6	5,1	5,6	5,3	5,1	4,2	4,7	4,4
	Desv. Pad.	0,9	0,9	1,4	2	1,8	1,8	1,1	1,3	1
	Mediana	4,4	4,6	5,1	5,4	5,2	4,9	4,0	4,5	4,4
	Mín. – Máx.	3,3-5,9	3,4-6,5	2,6-7,4	2,2-8,1	3-8,8	3,4-9,1	2,8-6,9	3,2-7,9	2,5-6,2
	Valor p	0,003	0,0012	0,0097	0,003	0,0017	0,0727	0,0005	0,0005	0,001

N : número de animais; Teste de Mann Whitney ($p < 0,006$).

Tabela 22 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação do AEs:Aod de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	AEs:Aod	0 - 12h	12 - 24h	24 - 48h	2 - 4d	4 - 7d	7 - 10d	10 - 15d	15 - 20d	20 - 30d
Clones	N	6	7	7	6	6	6	6	6	6
	Média	1,81	1,85	1,75	1,81	1,86	1,73	1,7	1,69	1,58
	Desv. Pad.	0,21	0,24	0,22	0,09	0,13	0,07	0,09	0,15	0,08
	Mediana	1,80	1,82	1,75	1,79	1,84	1,71	1,72	1,72	1,56
	Mín. – Máx.	1,56-2,18	1,61-2,32	1,4-2,05	1,72-1,98	1,74-2,11	1,66-1,82	1,55-1,78	1,43-1,87	1,46-1,67
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	1,73	1,64	1,65	1,67	1,65	1,5	1,61	1,56	1,59
	Desv. Pad.	0,24	0,18	0,19	0,2	0,2	0,55	0,16	0,21	0,15
	Mediana	1,70	1,62	1,61	1,67	1,65	1,66	1,64	1,65	1,59
	Mín. – Máx.	1,45-2,33	1,41-2,01	1,43-2,02	1,33-2,08	1,31-2,04	0-1,92	1,27-1,86	1,02-1,73	1,24-1,78
Valor p		0,3132	0,0553	0,3638	0,0727	0,011	0,1471	0,1645	0,1471	0,4923

N : número de animais; Teste de Mann Whitney (p<0,006).

Tabela 23 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação da fração de encurtamento do ventrículo esquerdo de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	FS (%)	0 - 12h	12 - 24h	24 - 48h	2 - 4d	4 - 7d	7 - 10d	10 - 15d	15 - 20d	20 - 30d
Clones	N	6	7	7	6	6	6	6	6	6
	Média	48,6	49,1	47,6	51,8	46	42	43,8	43,5	42,4
	Desv. Pad.	5,7	4,3	4,5	8,4	7,2	7,8	5,9	6,6	2,8
	Mediana	49,2	48,8	48,1	47,3	46,3	45,5	45,4	43,8	42,5
	Mín. – Máx.	41,2-56,1	42,9-56,1	43-55,2	45,7-64,7	33,6-53,9	27,4-48,5	34,9-50,8	33,6-52	37,8-46,5
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	33,4	36,5	39	35,9	37	34,3	32,4	34,2	34,5
	Desv. Pad.	5,2	5,1	7,5	7,9	6,2	9,4	7,5	5,6	7,3
	Mediana	33,7	37,4	42,0	40,6	38,7	36,0	34,3	32,7	33,3
	Mín. – Máx.	23,7-40,6	26,8-42,4	26,8-49,2	21,7-43,6	25,2-44,4	17,5-48,1	21-43	27-41,8	26,2-46,4
Valor p		0,0002	0,0001	0,0097	0,0002	0,0312	0,1179	0,0075	0,0225	0,042

N : número de animais; Teste de Mann Whitney (p<0,006).

Tabela 24 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação da fração de ejeção de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	EF (%)	0 - 12h	12 - 24h	24 - 48h	2 - 4d	4 - 7d	7 - 10d	10 - 15d	15 - 20d	20 - 30d
Clones	N	6	7	7	6	6	6	6	6	6
	Média	80,2	80,8	79,3	82,7	77,1	72,8	74,8	74,1	73
	Desv. Pad.	5,4	4,1	4,4	6,7	8	9,8	6,7	7,5	3,3
	Mediana	81,1	80,6	80,1	79,2	78,0	77,3	76,9	74,6	73,1
	Mín. – Máx.	73,3-87,2	74,7-87,2	74,3-86,4	77,5-92,7	62,7-85,1	54-79,9	64,5-82,3	62,7-83,3	67,7-77,5
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	62,5	66,8	69,5	65,5	67,1	62,9	60,6	63,2	63,3
	Desv. Pad.	7,5	6,9	9,6	11,2	8,4	13,6	11	7,6	9,8
	Mediana	63,7	68,1	73,8	72,4	69,8	66,2	63,8	61,5	62,3
	Mín. – Máx.	48-72,1	53,1-74,2	53,2-80,8	45-75,4	50,3-76,1	36,6-79,9	42,7-74,4	53,2-72,9	51,2-78,3
	Valor p	0,0002	0,0001	0,033	0,0002	0,0559	0,0934	0,011	0,0225	0,0934

N : número de animais; Teste de Mann Whitney ($p < 0,006$).

Tabela 25 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação da razão SIVs:PLVEs de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	SIVs:PLVEs	0 - 12h	12 - 24h	24 - 48h	2 - 4d	4 - 7d	7 - 10d	10 - 15d	15 - 20d	20 - 30d
Clones	N	6	7	7	6	6	6	6	6	6
	Média	1,05	1,06	1,07	1,06	1,07	1,09	1,08	1,11	1,03
	Desv. Pad.	0,22	0,17	0,17	0,1	0,12	0,12	0,13	0,24	0,18
	Mediana	1,12	1,10	1,10	1,01	1,06	1,08	1,08	1,05	0,96
	Mín. – Máx.	0,78-1,29	0,69-1,18	0,72-1,22	0,97-1,2	0,88-1,22	0,95-1,29	0,9-1,26	0,93-1,57	0,88-1,35
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	1,02	1,13	1,17	1,17	1,13	1,15	1,16	1,11	1,13
	Desv. Pad.	0,18	0,2	0,08	0,07	0,14	0,2	0,16	0,16	0,12
	Mediana	1,04	1,15	1,16	1,18	1,16	1,14	1,15	1,11	1,13
	Mín. – Máx.	0,6-1,29	0,7-1,4	1,07-1,31	1,02-1,24	0,89-1,3	0,95-1,67	0,91-1,5	0,86-1,39	0,91-1,27
	Valor p	0,6354	0,4173	0,2698	0,0312	0,4923	0,4923	0,4278	0,7128	0,2198

N : número de animais; Teste de Mann Whitney ($p < 0,006$).

Tabela 26 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação da velocidade máxima do fluxo da valva pulmonar de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	V. Máx (m/s)	0 12h	12 24h	24 48h	2 4d	4 7d	7 10d	10 15d	15 20d	20 30d
Clones	N	2	2	2	4	5	5	5	5	5
	Média	77,6	92,7	96,7	97	101,7	106,7	118,8	113,8	102,6
	Desv. Pad.	20,4	7,1	1,8	10,4	3,1	12,7	6,9	21,6	13,8
	Mediana	77,6	92,7	96,7	92,6	100,9	109,0	119,4	111,1	105,6
	Mín. – Máx.	63,2-92	87,6-97,7	95,5-98	90,2-112,5	98,7-106,7	93-125,3	110,2-127,4	91,5-137	81,3-116,6
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	84	90	92,6	87	89,7	86,1	80,5	85,2	81,3
	Desv. Pad.	10,2	12,6	11	17,1	12,6	15,5	9,3	12,5	8,7
	Mediana	82,6	89,5	90,6	81,8	86,3	83,3	77,4	84,5	81,0
	Mín. – Máx.	69,5-104	67,3-112,4	80,9-111,9	64,6-119,9	72,3-109,4	68,7-123,8	72,4-100,8	68,3-109	66,6-95,9
	Valor p	-	-	-	0,1878	0,1645	0,0127	0,0007	0,0127	0,0127

N : número de animais; Teste de Mann Whitney (p<0,006).

Tabela 27 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação da velocidade média do fluxo da valva pulmonar de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	V. Média (m/s)	0 12h	12 24h	24 48h	2 4d	4 7d	7 10d	10 15d	15 20d	20 30d
Clones	N	2	2	2	4	5	5	5	5	5
	Média	60,7	64,2	68,4	74,1	75,2	75,6	87,3	84,6	73,9
	Desv. Pad.	21,8	3,4	3,8	9,0	2,0	9,0	3,2	16,5	10,3
	Mediana	60,7	64,2	68,4	73,0	75,7	72,6	88,2	81,6	72,7
	Mín. – Máx.	45,3-76,1	61,8-66,6	65,7-71,1	64,9-85,7	72,8-77,9	67,3-85,3	82-90,1	67,8-105,4	61,2-88,5
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	63,4	66,2	64,2	64,5	63,9	63,6	59,2	62	58,3
	Desv. Pad.	9,6	10,4	10,6	12,4	9,8	13,1	6,8	8,7	8,0
	Mediana	62,8	64,2	66,0	59,9	60,4	60,3	55,8	62,0	58,1
	Mín. – Máx.	51,9-81,7	48-88,1	43,5-83,8	46,5-83,5	49-81,6	50,4-97,7	51,7-72,7	49-77,5	45,8-75,7
	Valor p	-	-	-	0,1419	0,028	0,028	0,0007	0,0127	0,0127

N : número de animais; Teste de Mann Whitney (p<0,006).

Tabela 28 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação da integral de velocidade do fluxo da valva pulmonar de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	VTI (m)	0 - 12h	12 - 24h	24 - 48h	2 - 4d	4 - 7d	7 - 10d	10 - 15d	15 - 20d	20 - 30d
Clones	N	2	2	2	4	5	5	5	5	5
	Média	13,7	15,9	14,4	15	15,1	15	16,5	20,4	16,3
	Desv. Pad.	4,0	4,6	1,7	2,2	1,5	1,3	1,7	8,6	0,9
	Mediana	13,7	15,9	14,4	15,4	15,2	15,2	17,1	17,3	16,8
	Mín. – Máx.	10,9-16,6	12,7-19,2	13,2-15,6	12-17,3	13,2-17,2	13-16,1	13,7-17,9	15,4-35,7	14,7-16,9
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	16,1	16,3	16,4	15	14,8	15	14,3	15	14,8
	Desv. Pad.	2,4	3,5	3,0	1,8	2,0	1,6	1,8	2,2	0,9
	Mediana	15,7	15,5	17,2	15,2	15,3	15,7	14,6	14,6	15,0
	Mín. – Máx.	13,1-21,8	11,5-23,9	12-20,8	12,8-17,7	11,6-17,9	11,5-16,5	11,1-16,2	12-17,5	13,1-16,1
Valor p		-	-	-	1	1	0,7679	0,0193	0,0753	0,0193

N : número de animais; Teste de Mann Whitney ($p < 0,006$).

Tabela 29 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação do tempo de aceleração do fluxo da valva pulmonar de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	T.A. (ms)	0 - 12h	12 - 24h	24 - 48h	2 - 4d	4 - 7d	7 - 10d	10 - 15d	15 - 20d	20 - 30d
Clones	N	2	2	2	4	5	5	5	5	5
	Média	107,7	111,8	93,0	107,7	108,6	104,7	96,9	98,8	121,3
	Desv. Pad.	2,1	30,5	2,9	27,4	15,9	12,8	15,2	13,0	24,9
	Mediana	107,7	111,8	93,0	107,3	112,0	102,5	100,7	102,9	136,3
	Mín. – Máx.	106,3-109,2	90,3-133,3	90,9-95	75-141,3	84-124	87,1-120	80-115,8	80-112,5	90-143,3
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	106,2	101,4	108,8	109,9	103,4	105	109,6	101,9	110,8
	Desv. Pad.	21,6	30,1	25,5	15,5	15,4	21,4	29,1	23,1	29,6
	Mediana	106,3	98,4	110,7	108,9	101,8	100,4	104,2	94,2	109,4
	Mín. – Máx.	75-135,7	60-168,3	70-137,5	88,6-138,9	84,3-134,2	73,3-137,5	70,1-164,3	66,7-140,8	62-162
Valor p		-	-	-	0,7333	0,4396	0,953	0,5941	0,953	0,6787

N : número de animais; Teste de Mann Whitney ($p < 0,006$).

Tabela 30 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação do tempo de ejeção do fluxo da valva pulmonar de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	T.E. (ms)	0 - 12h	12 - 24h	24 - 48h	2 - 4d	4 - 7d	7 - 10d	10 - 15d	15 - 20d	20 - 30d
Clones	N	4	4	4	5	5	5	5	5	5
	Média	166,9	155,5	159,9	168,4	176	172,6	171,6	191,9	204,4
	Desv. Pad.	67,6	81,5	43	52,7	15,8	22	15,8	32,9	21,2
	Mediana	171,5	137,7	162,8	181,7	170,0	165,0	171,7	191,7	190,0
	Mín. – Máx.	93,3-231,4	86,7-260	106,7-207,5	88,3-223,3	163,3-203,3	151,4-200	147,2-186,3	143,1-234	187-230
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	246,3	233,6	242,7	232,2	224,5	234,5	234,8	223,7	244,9
	Desv. Pad.	21,2	31	39,4	36,8	26,8	33,4	34	77,8	26,2
	Mediana	248,3	237,5	249,1	222,9	217,9	240,0	236,6	246,4	243,6
	Mín. – Máx.	215-276,3	183,3-285,8	187,1-304,2	186,7-289	181,7-266,7	160-269	173,3-280,5	20,7-287,5	193,1-293,3
Valor p		0,024	0,1059	0,014	0,028	0,0013	0,0047	0,0027	0,0753	0,0047

N : número de animais; Teste de Mann Whitney (p<0,006).

Tabela 31 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação da área da valva pulmonar de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	Área valvar (cm ²)	0 - 12h	12 - 24h	24 - 48h	2 - 4d	4 - 7d	7 - 10d	10 - 15d	15 - 20d	20 - 30d
Clones	N	5	5	4	5	5	5	5	5	5
	Média	3,23	3,22	2,9	3,07	3,42	3,68	3,82	4,3	4,17
	Desv. Pad.	0,37	0,54	0,43	0,55	0,64	0,47	0,53	0,59	0,6
	Mediana	3,17	3,46	3,06	3,14	3,33	3,60	3,70	4,45	4,15
	Mín. – Máx.	2,75-3,77	2,46-3,66	2,27-3,2	2,38-3,63	2,46-4,19	3,24-4,45	3,33-4,64	3,3-4,87	3,2-4,71
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	3,11	3,11	3,17	3,23	3,29	3,29	3,36	3,29	3,39
	Desv. Pad.	0,13	0,16	0,1	0,15	0,27	0,11	0,19	0,38	0,29
	Mediana	3,09	3,16	3,17	3,20	3,22	3,28	3,33	3,28	3,30
	Mín. – Máx.	2,93-3,27	2,81-3,27	2,99-3,27	3,02-3,56	3,02-3,98	3,14-3,46	3,14-3,8	2,46-4,01	3,14-4,19
Valor p		0,4396	0,5135	0,1878	0,7679	0,371	0,0553	0,0553	0,0127	0,0992

N : número de animais; Teste de Mann Whitney (p<0,006).

Tabela 32 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação do volume sistólico do fluxo da valva pulmonar de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	Vol. Sist. (mL)	0 12h	12 24h	24 48h	2 4d	4 7d	7 10d	10 15d	15 20d	20 30d
Clones	N	2	2	2	4	5	5	5	5	5
	Média	40,6	53,3	44	44,3	51,6	54,9	63,4	83,8	67,6
	Desv. Pad.	6,8	23,9	3,7	11,8	12,1	4,3	12,6	20,1	7,9
	Mediana	40,6	53,3	44,0	39,6	47,5	54,7	66,1	74,6	69,7
	Mín. – Máx.	35,8-45,5	36,4-70,2	41,3-46,6	36,2-61,7	38,1-64,9	49,5-60,1	46,9-79,4	70,1-117,9	54,1-74,9
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	50,2	50,5	51,7	48,5	48,5	49,4	48	49,4	50,3
	Desv. Pad.	8,3	10,7	9,2	6,2	6,6	5,5	7,2	10,8	3,9
	Mediana	47,9	50,3	54,2	50,1	49,0	49,7	47,8	48,8	50,1
	Mín. – Máx.	42,1-71,3	37,6-75,8	39-67,8	38,6-58,9	38,9-60,8	38,2-56,1	35,1-60,4	33,1-69,5	43,5-58,1
	Valor p	-	-	-	0,2398	0,8591	0,0753	0,0193	0,0007	0,0013

N : número de animais; Teste de Mann Whitney ($p < 0,006$).

Tabela 33 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação do débito cardíaco do fluxo da valva pulmonar de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	DC (L/min)	0 12h	12 24h	24 48h	2 4d	4 7d	7 10d	10 15d	15 20d	20 30d
Clones	N	2	2	2	4	5	5	5	5	5
	Média	5,6	6,83	6,54	6,71	7,33	7,49	8,74	10,36	8,03
	Desv. Pad.	0,57	1,67	0,9	2,03	1,66	1,55	2,5	3,84	2,09
	Mediana	5,60	6,83	6,54	6,43	7,40	6,83	7,93	9,11	7,05
	Mín. – Máx.	5,19-6	5,64-8,01	5,91-7,17	4,53-9,44	4,81-8,98	5,85-9,51	5,95-12,7	7,26-16,86	6,58-11,68
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	5,63	5,84	5,86	6,02	6,02	5,25	4,53	4,82	4,51
	Desv. Pad.	1,07	1,19	0,96	1,87	1,47	1,23	0,97	0,93	0,88
	Mediana	5,73	5,69	5,79	5,14	5,97	5,39	4,39	5,12	4,27
	Mín. – Máx.	4,1-7,22	4,06-7,96	4,66-7,56	4,53-9,95	3,98-7,94	3,48-7,96	3,13-6,31	3,33-6,05	3,62-6,52
	Valor p	-	-	-	0,7333	0,1645	0,0047	0,0013	0,0007	0,0007

N : número de animais; Teste de Mann Whitney ($p < 0,006$).

Tabela 34 – Média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação da frequência cardíaca do fluxo da valva pulmonar de bezerros da raça Nelore do grupo Clones e do grupo Controle nos primeiros 30 dias de vida - São Paulo – 2009

	FC (bpm)	0 - 12h	12 - 24h	24 - 48h	2 - 4d	4 - 7d	7 - 10d	10 - 15d	15 - 20d	20 - 30d
Clones	N	3	4	5	5	5	5	5	5	5
	Média	131,3	129,8	142	156,6	142,4	137	137,8	121,2	118,8
	Desv. Pad.	14	28,2	10,7	22	13,5	29,9	26	16,3	24,7
	Mediana	132,0	133,0	143,0	153,0	141,0	138,0	132,0	122,0	112,0
	Min. – Máx.	117-145	98-155	128-154	125-179	126-156	107-182	108-169	103-143	95-156
Controle	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Média	112,3	116,7	114,9	123,2	124,1	106,1	95,9	99,8	90,1
	Desv. Pad.	14,6	17,4	16,7	28,2	25,7	21	23,5	20,9	18,8
	Mediana	112,5	120,0	117,5	117,5	121,0	99,0	93,5	98,5	86,0
	Min. – Máx.	92-132	91-148	87-138	85-169	85-160	89-158	72-146	72-141	69-129
	Valor p	0,1119	0,4535	0,008	0,0553	0,2065	0,0553	0,0127	0,0992	0,0193

N : número de animais; Teste de Mann Whitney (p<0,006).

Figura 5 – Peso do grupo Controle, perímetro torácico do grupo Clones e Controle e gráfico de regressão entre o peso e perímetro torácico de bezerras Nelore nos primeiros 30 dias de vida. São Paulo, 2009. PT: perímetro torácico..

Figura 6 - Parâmetros e índices ecocardiográficos de bezerras Nelore dos grupos Clones e Controle nos primeiros 30 dias de vida. São Paulo, 2009. FC: frequência cardíaca; DC: débito cardíaco; DIAEs: diâmetro interno do átrio esquerdo em final de sístole; DIADs: diâmetro interno do átrio direito em final de sístole.

Figura 7 - Parâmetros ecocardiográficos de bezerros Nelore dos grupos Clones e Controle nos primeiros 30 dias de vida. São Paulo, 2009. DIVDs: diâmetro interno do ventrículo direito em sístole; DIVDd: diâmetro interno do ventrículo direito em diástole; SIVs: espessura do septo interventricular em sístole; SIVd: Espessura do septo interventricular em diástole; DIVEs: diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole; DIVED: diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole; PLVEs: espessura da parede livre do ventrículo esquerdo em sístole; PLVED: espessura da parede livre do ventrículo esquerdo em diástole.

Figura 8 - Parâmetros e índices ecocardiográficos de bezerros Nelore dos grupos Clones e Controle nos primeiros 30 dias de vida. São Paulo, 2009. Aod: diâmetro da aorta em final de diástole; TEVE: tempo de ejeção do ventrículo esquerdo ; SSPE: separação septal do ponto E; AEs:Aod: razão diâmetro do átrio esquerdo na sístole pelo diâmetro da raiz aórtica na diástole; SIVs:PLVEs: razão espessura do septo interventricular em sístole pela espessura da parede livre do ventrículo esquerdo sístole.

Figura 9 - Parâmetros e índices ecocardiográficos de bezerras Nelore do grupo Clones e Controle nos primeiros 30 dias de vida. São Paulo, 2009. Vol. Sistólico: volume sistólico; Vol. Diastólico: volume diastólico; Vol. Ejeção: volume de ejeção; DC: débito cardíaco; FS: fração de encurtamento; EF: fração de ejeção.

Figura 10 - Parâmetros e índices do fluxo da valva pulmonar avaliados através da ecocardiografia Doppler em bezerros Nelore dos grupos Clones e Controle nos primeiros 30 dias de vida. São Paulo, 2009. V. Máx.: velocidade máxima; V. Méd.: velocidade média; VTI: integral de velocidade; TA: tempo de aceleração; TE: tempo de ejeção; Vol. Sistólico: volume sistólico; DC: débito cardíaco; FC: frequência cardíaca.

5.2.2 Clones mortos até 48 horas de vida

Durante o estudo foram avaliados 3 clones que morreram até 48 horas de vida. Em virtude do reduzido número disponível de animais neste grupo, a análise estatística não foi realizada da mesma forma que os animais clonados e do grupo controle e, portanto, a discussão foi feita de forma principalmente qualitativa para facilitar a análise e a interpretação clínica dos poucos dados. Os resultados dos poucos intervalos de avaliação que foram possíveis de ser realizados estão apresentados de forma individual nas tabelas 35 e 36.

Primeiramente, ao realizarmos a análise do átrio direito, esta é realizada qualitativamente e, quando possível, os resultados do diâmetro interno desta câmara, em fase de sístole, foram mensurados. Quantitativamente, o valor médio do DIADs (2,85 cm) nas primeiras 12 horas de vida encontra-se próximo ao valor médio determinado para o grupo controle no mesmo intervalo (2,9 cm) e encontra-se abaixo do valor médio encontrado para o grupo Clones (3,08cm).

De acordo com Michima et al. (2007), o átrio direito possui diâmetro menor que o átrio esquerdo. Esta situação manteve-se até as primeiras 12 horas de vida, entretanto, a partir das 12 horas seguintes ocorre a mudança desse padrão.

De acordo com Abduch (2004), um aumento de pressão na artéria pulmonar promove dilatação do tronco e ramos da artéria pulmonar, do átrio e ventrículo direito e comumente encontra-se associada à regurgitação das valvas pulmonar e tricúspide.

Os valores encontrados para o DIADs dos Clones 1 e 2 , 3,24 e 3,42 cm, respectivamente, encontram-se numericamente aumentados quando comparados com os respectivos valores encontrados para o DIAEs no mesmo momento, 3,0 e 2,63cm, respectivamente. Qualitativamente, o átrio direito encontrava-se aumentado de tamanho quando comparado com o átrio esquerdo nos clones que morreram até 48 horas de vida, exceto para o Clone 10. Da mesma forma, quando comparamos este grupo com os valores médios do grupo Clones e do grupo Controle no intervalo entre 12 e 24 horas de vida, 2,85 e 2,72 cm, respectivamente, os valores são maiores, indicando uma dilatação de DIADs.

O aumento do DIADs, por sua vez, determina o aparecimento de uma insuficiência da valva tricúspide, pois a mesma não possui dimensões suficientes

para coaptar totalmente o diâmetro atrial aumentado. Tal fato pode ver melhor visualizado através do exame de Doppler colorido no qual foi determinado o fluxo turbulento sistólico no interior do átrio direito – insuficiência valvar tricúspide - nos clones que morreram até 48 horas durante os exames realizados a partir das 0 até 12 horas de vida e das 12 até 48 horas de vida, respectivamente (Figuras 5, 6, 7, 8 e 9).

A insuficiência valvar tricúspide está presente em cerca de 90% de humanos com hipertensão arterial pulmonar (Sbano et al, 2004). Nos animais clonados que morreram até 48 horas de vida encontramos, em diferentes graus, insuficiência valvar tricúspide em 100% dos mesmos.

De forma geral, nos Clones 1 e 2, o ventrículo direito não assumiu, tal como preconizado por Michima et al. (2007), a proporção de 1/3 do ventrículo esquerdo (Tabelas 6 e 7, Figuras 11 e 12) em nenhum dos momentos em que o exame foi realizado. O aumento do diâmetro interno do ventrículo direito acima desta proporção é uma indicação de sobrecarga de volume, fato este melhor evidenciado quando existe movimento septal paradoxal, sendo compatível com o desenvolvimento de hipertensão pulmonar (ABDUCH, 2004).

No que tange aos valores médios do DIVD, em sístole e diástole, dos Clones 1 e 2, os mesmos encontram-se com valor acima do valor médio encontrado para os animais dos grupos Clones e Controle. Desta forma, pode-se concluir que os Clones 1 e 2 apresentaram sobrecarga de volume no ventrículo direito (Figuras 11 e 12) a qual pode estar diretamente relacionada com o desenvolvimento de hipertensão pulmonar no bezerro clonado.

Através da análise com Doppler colorido, foi observado a presença de fluxo turbulento entre os átrios indicando a presença de comunicação interatrial (Figuras 3 e 4) nos animais que morreram até 48 horas de vida sendo esta alteração confirmada posteriormente na necropsia dos animais. Associado e conseqüente à este fator anatômico, devemos destacar que o Clone 1 também apresentou em sua oximetria, em todos os momentos de avaliação, saturação de oxigênio sanguíneo reduzida, o que ajuda a corroborar o diagnóstico de hipertensão pulmonar.

Ainda a partir de análise qualitativa podemos descrever que o coração dos Clones 1 e 2, apresentava o VE hipertrofiado, com marcante aumento da espessura da PLVE e do SIV e diminuição do DIVE (Figura 11). A movimentação das estruturas estava normal, porém com contração segmentar diminuída. Quantitativamente,

podemos observar que os valores, em sístole e diástole, dos parâmetros PLVE e SIV estão aumentados em relação aos grupos Clones e Controle e os valores do DIVE dos clones que morreram até 48 horas de vida estão diminuídos em relação aos valores dos grupos Clones e Controle. Tal avaliação qualitativa e quantitativa nos permite concluir que o coração dos Clones 1 e 2 sofreu um processo congênito de hipertrofia concêntrica do miocárdio.

O Clone 10, que também veio a óbito nas primeiras 48 horas de vida, qualitativamente apresentou suas estruturas cardíacas normalmente formadas e desenvolvidas. Quantitativamente, porém, podemos observar que os valores, em sístole e diástole, do SIV e da PLVE encontram-se aumentados em comparação com os valores médios do grupo Controle e o valor do DIVE, em sístole e diástole (Tabela 8), está diminuído quando comparado com os valores médios do grupo Controle. Estes valores nos permitem concluir que o mesmo também possuía uma hipertrofia concêntrica do miocárdio. O animal veio a óbito e, durante a necropsia, foi possível observar macroscopicamente que o mesmo apresentava concomitantemente grave comprometimento renal, pulmonar e hepático.

A hipertrofia cardíaca, ou cardiomiopatia hipertrófica, é uma resposta morfológica adaptativa a uma sobrecarga crônica de trabalho imposta ao coração e pode ser categorizada em dois tipos básicos: concêntrica, ocorrendo em resposta a uma sobrecarga crônica de pressão na qual a espessura da parede ventricular aumenta sem o aumento do volume da câmara, e excêntrica, em resposta a uma sobrecarga crônica de volume na qual o volume da câmara aumenta sem um relativo aumento na espessura da parede ventricular (ROSSI, 1992). A hipertrofia cardíaca pode ainda ser classificada como simétrica ou assimétrica. No primeiro caso, todas as paredes apresentam aumento na espessura em graus equivalente; no segundo, uma das paredes encontra-se hipertrofiada em um grau muito superior que as demais (ABDUCH, 2004).

Como os bezerros clonados que morreram até 48 horas de vida apresentavam aumento da espessura da parede ventricular não associada ao aumento de volume da câmara, podemos concluir que os animais apresentaram hipertrofia congênita concêntrica de miocárdio.

Qualquer alteração no lado esquerdo do coração que leve à congestão do átrio e, portanto, à congestão venosa retrógrada pode causar hipertensão pulmonar (ABDUCH, 2004). Através do exame ecocardiográfico realizado nas primeiras horas

após o nascimento, ficou evidente que o Clone 1 apresentou hipertrofia cardíaca concêntrica congênita (Figura 11), fato este que poderia determinar uma congestão atrial esquerda que por sua vez induziria uma consequente congestão venosa retrógrada podendo então provocar o aparecimento ou o agravamento de uma hipertensão pulmonar.

De acordo Abduch (2004), a dilatação do tronco e ramos da artéria pulmonar ocorre como consequência ao aumento da pressão. Foi possível mensurar a área valvar correspondente à artéria pulmonar no Clone 10. Os valores encontrados para os intervalos 0 — 12h e 12 — 24h, 3,43 e 3,56 cm², respectivamente, encontram-se aumentados quando comparados com os valores médios encontrados nos mesmos intervalos para o grupo Clones (3,23 e 3,22cm²) e grupo Controle (3,11 e 3,11cm²).

O Doppler mostrou fluxo turbulento sistólico no interior do átrio esquerdo - insuficiência valvar mitral - nos clones que morreram até 48 horas de vida: Clones 1, 2 em todos os exames realizados e no Clone 10 entre as 12 até 24 horas de vida (Figura 10). A congestão atrial esquerda determinada através da hipertrofia concêntrica não demonstrou aumento das dimensões atriais no exame ecocardiográfico uma vez que os valores médios encontrados para os clones que morreram até 48 horas encontram-se abaixo dos valores médios encontrados para o grupo Clones e Controle. Desta forma podemos concluir que a insuficiência valvar de mitral detectada através do Doppler é de origem primária e não secundária a uma distensão das dimensões do átrio esquerdo, a qual determinaria uma falha na coaptação dos folhetos valvares.

A hipertrofia leva a uma diminuição no relaxamento e ao aumento do estresse sobre a parede, com consequente disfunção diastólica e prejuízo ao enchimento ventricular (ABDUCH, 2004). A avaliação de uma provável disfunção diastólica através da análise do fluxo bifásico através das valvas atrioventriculares pelo Doppler não foi possível de ser realizada em virtude da disposição anatômica do coração em bezerros aliada com a conformação torácica dos mesmos, as quais não permitiram adequadas projeções acústicas do órgão nas tradicionais janelas de projeção cardíaca esquerda e direita para análise com Doppler, não permitindo uma avaliação com precisão de medidas, uma vez que não existe perfeito alinhamento entre o fluxo e a linha de exame do Doppler, reduzindo a acurácia e induzindo erros nos valores obtidos e de interpretação uma vez que o ângulo formado entre o fluxo das valvas atrioventriculares e o feixe de ultrassom não corresponde ao

preconizado. De acordo com Mathias Júnior (2007), o feixe de ultrassom deve ser alinhado o mais paralelo possível em relação à direção do fluxo (0° ou 180°) e as tentativas de correção do ângulo de interceptação podem resultar em erros significativos nos cálculos e não devem ser utilizadas.

Uma das enfermidades clínicas mais comumente relatadas e encontradas em bezerros clonados é a hipertensão pulmonar. Sbrana et al (2004) relata que a Organização Mundial de Saúde classifica etiologicamente esta enfermidade como: 1- hipertensão arterial pulmonar primária: relacionada com algumas condições como comunicação interatrial, comunicação interventricular e persistência do padrão de circulação fetal e outras; 2- hipertensão venosa pulmonar: relacionada com insuficiência ventricular esquerda sistólica e/ou diastólica, doenças do miocárdio, valvopatias mitral e aórtica e outras; 3- hipertensão arterial pulmonar associada a doenças do sistema respiratório e/ou hipoxemia crônica: relacionada com doença pulmonar intersticial, doença pulmonar obstrutiva crônica, hipoventilação alveolar, doença pulmonar neonatal e outras; 4- hipertensão arterial pulmonar de doenças tromboticas e/ou embólicas; 5- hipertensão arterial pulmonar resultante de doenças vasculares pulmonares inflamatórias.

A partir do ponto em que o animal já nasce com o ventrículo hipertrofiado e assumindo que, durante a vida intra-uterina o pulmão não está funcional, o aparecimento precoce de hipertensão pulmonar a partir do nascimento destes animais pode ser considerado como uma consequência da hipertrofia ventricular esquerda – hipertensão venosa pulmonar relacionada com insuficiência ventricular – podendo, a partir do nascimento, gradativamente se associar com a insuficiência respiratória pulmonar – hipertensão arterial pulmonar associada com doenças respiratórias – e ainda sofrendo agravamento devido à comunicação interatrial – hipertensão arterial pulmonar primária - para agravar ainda mais o quadro de hipertensão pulmonar nos animais clonados. Desta forma encontramos um quadro multifatorial que determina o aparecimento de hipertensão pulmonar nos animais clonados que morreram em até 48 horas de vida.

O método ecocardiográfico mais preciso e confiável para a estimativa não-invasiva das pressões em artéria pulmonar baseia-se na medida da velocidade do fluxo regurgitante da valva tricúspide. Esta velocidade reflete a diferença de pressão entre o VD e o AD (SBANO et al., 2004). Todos os animais clonados que morreram até 48 horas de vida apresentaram refluxo em valva tricúspide. Entretanto, da

mesma forma que encontramos dificuldade na realização da avaliação de uma disfunção diastólica através do exame de fluxo pelo Doppler, a análise do fluxo regurgitante da valva tricúspide não poderia ter sido realizada de forma acurada em virtude da angulação entre o fluxo regurgitante e a linha de amostra do Doppler a qual iria induzir erros nos valores obtidos e que, por sua vez, poderiam induzir erros no diagnóstico da enfermidade.

A avaliação da função sistólica global do ventrículo esquerdo foi realizada através da obtenção dos índices de FS e EF. Porém, no clones que morreram até 48 horas de vida, quando o ventrículo perde sua forma habitual e existe alteração da contração segmentar, a EF deve ser calculada através do método de Simpson e não através do resultado segundo a fórmula de Teicholz (MATHIAS JÚNIOR, 2007). O método de Simpson requer o traçado manual das bordas endocárdicas, sendo importante que a imagem obtida seja de boa qualidade. Para tanto, a melhor projeção utilizada para este método é através da janela apical, janela esta que não apresenta qualidade satisfatória em bezerros. Neste caso, em que a qualidade de imagens é inadequada para o uso do método de Simpson, recomenda-se, segundo Mathias Júnior (2007), fazer uma análise qualitativa subjetiva da EF.

Analisando quantitativamente a função sistólica do ventrículo esquerdo do Clone 1, de acordo com os índices ecocardiográficos, obteve-se para a EF o valor de 100% (Tabela 6) no momento até 12 horas de vida e de 94,5% das 12 até as 24 horas de vida. Isto não deve ser considerado um valor fidedigno uma vez que o ventrículo não consegue ejetar 100% de seu volume, este resultado se deve em função do ventrículo do referido animal apresentar alteração em sua forma habitual, portanto não sendo indicado o cálculo de EF através da Fórmula de Teicholz, a qual induz a erros, como observado nos valores de EF e FS descritos na Tabela 6. Desta forma, se faz necessário a avaliação qualitativa subjetiva da EF como recomendado por Mathias Júnior (2007).

Através da análise qualitativa da estrutura física, do tipo e qualidade de movimentação do ventrículo esquerdo em modo-B e em modo-M, foi possível perceber alteração na forma habitual, a existência de hipertrofia concêntrica do miocárdio dos Clones 1 e 2 (Figuras 1, 2 e 11), a qual provoca diminuição da luz ventricular e explica o resultado errôneo encontrado para esta EF.

De acordo com Li et al. (2005), bezerros clonados que morrem até 2 dias após o parto apresentam expressão gênica aberrante de alguns genes que

determinam o aparecimento de anomalias cardíacas tais como hipertrofia do miocárdio e forame oval patente além de outras enfermidades pulmonares e renais. Através dos resultados obtidos nos exames clínico e ecocardiográfico e em necropsia, podemos alvitar que os clones que morreram em até 48 horas poderiam apresentar erros em sua expressão gênica durante o desenvolvimento intra-uterino determinando o desenvolvimento de anormalidades anatômicas e funcionais cardíacas em sua fase perinatal e que, irreversivelmente, induzem o óbito prematuro nestes animais.

Tabela 35 - Valores individuais, médias e desvio padrão dos parâmetros ecocardiográficos de bezerros clonados da raça Nelore que morreram em até 48 horas de vida.

FC (bpm)	Clone	0	12	24
		- 12h	- 24h	- 48h
	1	97	146	-
	2	150	154	146
	10	143	115	-
	Média	130	138,33	146
	DP	28,79	20,6	-

FC: frequência cardíaca.

AEs (cm)	Clone	0	12	24
		- 12h	- 24h	- 48h
	1	3,05	3,0	-
	2	2,74	2,63	2,29
	10	4,05	3,65	-
	Média	3,28	3,09	2,29
	DP	0,68	0,52	-

AEs: diâmetro do átrio esquerdo em pico de sístole

ADs (cm)	Clone	0	12	24
		- 12h	- 24h	- 48h
	1	-	3,24	-
	2	2,83	3,42	2,75
	10	2,87	3,14	-
	Média	2,85	3,27	2,75
	DP	0,03	0,14	-

ADs: diâmetro do átrio direito em pico de sístole.

DIVDs (cm)	Clone	0	12	24
		- 12h	- 24h	- 48h
	1	0,98	2,18	-
	2	1,39	1,73	1,27
	10	2,34	2,22	-
	Média	1,8	2,04	1,27
	DP	0,72	0,27	-

DIVDs: diâmetro interno do ventrículo direito em sístole.

SIVs (cm)	Clone	0	12	24
		- 12h	- 24h	- 48h
	1	2,74	2,24	-
	2	1,50	1,72	1,96
	10	1,31	1,44	-
	Média	1,85	1,80	1,96
	DP	0,78	0,41	-

SIVs: septo interventricular em sístole.

DIVEs (cm)	Clone	0	12	24
		- 12h	- 24h	- 48h
	1	0	1,34	-
	2	1,62	1,35	0,97
	10	1,9	1,82	-
	Média	1,17	1,50	0,97
	DP	1,03	0,27	-

DIVEs: diâmetro interno do ventrículo direito em sístole

PLVEs (cm)	Clone	0	12	24
		- 12h	- 24h	- 48h
	1	3,36	1,96	-
	2	1,50	1,78	2,15
	10	1,42	1,35	-
	Média	2,10	1,70	2,15
	DP	1,10	0,31	-

PLVEs: parede livre do ventrículo esquerdo em sístole.

DIVDd (cm)	Clone	0	12	24
		- 12h	- 24h	- 48h
	1	2,35	2,86	-
	2	2,09	2,07	1,35
	10	2,6	2,32	-
	Média	2,35	2,42	1,35
	DP	0,26	0,4	-

DIVDd: diâmetro interno do ventrículo direito em diástole

	Clone	0	12	24
		-12h	-24h	-48h
SIVd (cm)	1	2,13	1,9	-
	2	1,49	1,56	1,1
	10	1,17	1,12	-
	Média	1,6	1,53	1,1
	DP	0,49	0,39	-

SIVd: septo interventricular em diástole.

	Clone	0	12	24
		-12h	-24h	-48h
DIVEd (cm)	1	1,80	4,26	-
	2	2,32	1,86	1,96
	10	3,46	3,19	-
	Média	2,53	3,10	1,96
	DP	0,85	1,20	-

DIVEd: diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole.

	Clone	0	12	24
		-12h	-24h	-48h
PLVEd (cm)	1	2,13	1,4	-
	2	0,84	1,48	1,56
	10	0,94	0,85	-
	Média	1,3	1,24	1,56
	DP	0,72	0,34	-

PLVEd: parede livre do ventrículo esquerdo em diástole.

	Clone	0	12	24
		-12h	-24h	-48h
Aod (cm)	1	2,95	3,19	-
	2	2,4	2,29	2,43
	10	2,51	2,22	-
	Média	2,62	2,57	2,43
	DP	0,29	0,54	-

Aod: diâmetro da aorta em final de diástole.

	Clone	0	12	24
		-12h	-24h	-48h
TEVE (s)	1	0,37	0,27	-
	2	0,27	0,29	0,26
	10	0,24	0,22	-
	Média	0,29	0,26	0,26
	DP	0,07	0,04	-

TEVE: tempo de ejeção do ventrículo esquerdo.

	Clone	0	12	24
		-12h	-24h	-48h
SSPE (cm)	1	0,47	0,05	-
	2	0	0	0
	10	0,63	0,51	-
	Média	0,37	0,34	0
	DP	0,33	0,29	-

SSPE: separação septal do ponto E.

	Clone	0	12	24
		-12h	-24h	-48h
Vol. Diast. (mL)	1	9,65	81,25	-
	2	18,51	10,57	12,40
	10	49,48	40,65	-
	Média	25,88	46,81	12,40
	DP	20,91	31,82	-

Vol. Diast.: volume diastólico.

	Clone	0	12	24
		-12h	-24h	-48h
Vol. Sist. (mL)	1	0	4,5	-
	2	7,4	4,59	1,89
	10	11,17	10,0	-
	Média	6,19	7,30	1,89
	DP	5,68	2,75	-

Vol. Sist.: volume sistólico.

	Clone	0 -12h	12 -24h	24 -48h
Vol.	1	9,65	76,75	-
Ejeção	2	11,12	5,98	10,51
(mL)	10	38,31	30,65	-
	Média	19,96	39,51	10,51
	DP	16,14	33,70	-

Vol. ejeção: volume de ejeção.

	Clone	0 -12h	12 -24h	24 -48h
DC	1	0,93	11,2	-
(L/min)	2	1,66	0,92	1,53
	10	5,48	3,52	-
	Média	2,69	5,47	1,53
	DP	2,44	5,06	-

DC: débito cardíaco.

	Clone	0 -12h	12 -24h	24 -48h
AEs:Aod	1	1,04	0,94	-
	2	1,14	1,14	1,21
	10	1,61	1,64	-
	Média	1,26	1,24	1,21
	DP	0,31	0,36	-

AE:Aod: razão diâmetro do átrio esquerdo em sístole pelo diâmetro aórtico em diástole

	Clone	0 -12h	12 -24h	24 -48h
FS	1	100	68,54	-
(%)	2	30,17	27,4	51,0
	10	45,09	42,95	-
	Média	58,42	46,30	51,0
	DP	36,77	20,77	-

FS: fração de encurtamento do ventrículo esquerdo

	Clone	0 -12h	12 -24h	24 -48h
EF	1	100	94,5	-
(%)	2	60,0	56,56	84,7
	10	77,43	75,40	-
	Média	79,14	75,49	84,7
	DP	20,05	18,97	-

EF: fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

	Clone	0 -12h	12 -24h	24 -48h
SIV:PLVEs	1	0,81	1,14	-
	2	1	0,96	0,92
	10	0,92	1,07	-
	Média	0,91	1,06	0,92
	DP	0,09	0,09	-

SIV:PLVEs: razão espessura do septo interventricular pela espessura da parede livre do ventrículo esquerdo na sístole

Tabela 36: Valores individuais dos parâmetros ecoopplercardiográficos de bezerros clonados da raça Nelore que morreram em até 48 horas de vida.

	Clone 10	
	0 — 12 h	12 — 24h
VMáx (cm/s)	61,36	51,93
Vmédia (cm/s)	42,62	39,22
VTI (cm)	10,29	10,96
TA (ms)	114	138
TE (ms)	208,75	250
Volume Sistólico (mL)	35,30	39,05
Débito cardíaco (L/min)	4,76	4,41
FC (bpm)	135	113
Área Valvar (cm2)	3,43	3,56

VMáx: velocidade máxima; Vmédia: velocidade média; VTI: integral de velocidade; TA: tempo de aceleração; FC: frequência cardíaca.

Figura 11- Imagem ecocardiográfica em Modo-B das quatro câmaras do Clon 1, com idade entre 0 - 12 h. As setas indicam os folhetos coaptados das valvas atrioventriculares esquerda e direita. Notar presença de hipertrofia de miocárdio. AD: átrio direito; AE: átrio esquerdo; VD: ventrículo direito; VE: ventrículo esquerdo; SIV: septo interventricular; PLVE: parede livre do ventrículo esquerdo

Figura 12 - Imagem ecocardiográfica em Modo-B das quatro câmaras do Clon 1, com idade entre 12 - 24h. As setas indicam os folhetos coaptados das valvas atrioventriculares esquerda e direita. Notar presença de hipertrofia de miocárdio. AD: átrio direito; AE: átrio esquerdo; VD: ventrículo direito; VE: ventrículo esquerdo; SIV: septo interventricular; PLVE: parede livre do ventrículo esquerdo

Figura 13 - Imagem ecocardiográfica em Modo-B das quatro câmaras do Clon 1, com idade entre 0 - 12 h. O Doppler colorido em região de septo interatrial indica a presença de comunicação interatrial através do forame oval patente. AE: átrio esquerdo; AD: átrio direito; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; CIA: comunicação interatrial

Figura 14 - Imagem ecocardiográfica em Modo-B das quatro câmaras do Clon 2, com idade entre 12 - 24 h. O Doppler colorido em região de septo interatrial indica a presença de comunicação interatrial através do forame oval patente. AE: átrio esquerdo; AD: átrio direito; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; CIA: comunicação interatrial

Figura 15 - Imagem ecocardiográfica em Modo-B das quatro câmaras do Clone 1, com idade entre 0 | 12h. O Doppler colorido indica a presença de fluxo turbulento sistólico no interior do átrio direito – insuficiência valvar tricúspide. AE: átrio esquerdo; AD: átrio direito; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito

Figura 16 - Imagem ecocardiográfica em Modo-B das quatro câmaras do Clone 2, com idade entre 12 | 24h. O Doppler colorido indica a presença de fluxo turbulento sistólico no interior do átrio direito – insuficiência valvar tricúspide. AE: átrio esquerdo; AD: átrio direito; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito

Figura 17 - Imagem ecocardiográfica em Modo-B das quatro câmaras do Clone 10, com idade entre 12 - 24h. O Doppler colorido indica a presença de fluxo turbulento sistólico no interior do átrio esquerdo – insuficiência valvar mitral. AE: átrio esquerdo; AD: átrio direito; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito

Figura 18 - Imagem ecocardiográfica em Modo-B das quatro câmaras do Controle 2, com idade entre 2 - 4d. A seta indica a presença do Forame Oval patente determinando a comunicação interatrial. CIA: comunicação interatrial; AE: átrio esquerdo; AD: átrio direito; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito

Figura 19 - Imagem ecocardiográfica em Modo-B das quatro câmaras do Controle 2, com idade entre 4 – 7d. A seta indica a oclusão do septo interatrial. SIA: septo interatrial; AE: átrio esquerdo; AD: átrio direito; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito

Figura 20 - Imagem ecocardiográfica em Modo-M de corte transversal do ventrículo esquerdo e direito do Clone 9, com idade entre 4 – 7dias. A seta indica o ventrículo direito em forma de meia lua ao redor do ventrículo esquerdo e corresponde a cerca de 1/3 do tamanho da câmara esquerda. VD: ventrículo direito; SIV: septo interventricular; VE: ventrículo esquerdo; PLVE: parede livre de ventrículo esquerdo

6 CONCLUSÕES

A interpretação e discussão dos resultados obtidos na presente pesquisa sobre ecocardiografia de bezerros da raça Nelore, originados por meio da técnica de transferência nuclear de células somáticas adultas – Clonagem, possibilitaram as conclusões a seguir detalhadas:

1ª Conclusão – O exame de ecodopplercardiográfico se mostrou eficaz na avaliação cardíaca de bezerros sendo que:

- a) a janela cardíaca direita mostrou ser adequada para a realização das mensurações dos parâmetros e índices cardíacos;
- b) a projeção paraesternal transversa direita mostrou ser adequada para avaliação dos fluxos da valva pulmonar através do Doppler.

2ª Conclusão – A avaliação do eletrocardiograma evidenciou que o ritmo sinusal com marcapasso migratório é predominante em bezerros da raça Nelore.

3ª Conclusão – A presença de fluxo através do forame oval foi detectado pelo Doppler colorido em bezerros clonados em até 10 dias de vida enquanto que em bezerros originados através de inseminação artificial ou monta natural em até 7 dias de vida.

4ª Conclusão – Os valores ecocardiográficos obtidos para o grupo Clones não devem ser usados como referência para bezerros Nelore originados a partir de inseminação natural ou monta natural em função da grande variação de peso vivo entre eles.

5ª Conclusão – Os valores obtidos para o grupo Controle podem ser utilizados como referência para bezerros Nelore originados a partir de inseminação artificial ou monta natural.

6ª Conclusão – Existe correlação entre o perímetro torácico e o peso vivo dos animais.

7ª Conclusão – No grupo de clones mortos existem mal formações congênitas compatíveis com a ocorrência de sofrimento fetal/hipóxia intra-uterina e/ou expressão gênica aberrante sendo que a mal formação predominante é a hipertrofia ventricular excêntrica.

8ª Conclusão - Os clones mortos que apresentaram hipertrofia concêntrica de ventrículo desenvolveram hipertensão arterial pulmonar sendo que a ecocardiografia Doppler auxiliou o diagnóstico desta enfermidade secundária.

REFERÊNCIAS

- ABDUC, M.C.D. Ecocardiografia. In: CARVALHO, C. F. **Ultra-sonografia em pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004. p. 287-345.
- AMORY, H.; GENICOT, B.; ROLLIN, F.; BEDUIN, J.M.; LEKEUX, P. Normal electro- and vectocardiographic data in the growing Friesian calf using a semi-orthogonal lead system. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v. 40, p. 81 - 92, 1993.
- AMORY, H.; JAKOVLJEVIC, S.; LEKEUX, P. Quantitative M-mode and two-dimensional echocardiography in calves. **Veterinary Record**, London, v. 128, p. 25 - 31, 1991.
- AMORY, H.; LEKEUX, P. Effects of growth on functional and morphological echocardiographic variables in Friesian calves. **Veterinary Record**, London, v. 128, p. 349 - 354, 1991.
- BATCHELDER, C. A.; BERTOLINI, M.; MASON, J. B.; MOYER, A. L.; HOFFERT, K. A.; PETKOV, S. G.; FAMULA, T. R.; ANGELOS, J.; GEORGE, L. W.; ANDERSON, G. B. Perinatal physiology in cloned and normal calves: Hematological and biochemical profiles. **Cloning Stem Cells**, New York, v. 9, n.1, 83 – 96, 2007.
- BATCHELDER, C. A.; WHITCOMB, M. B.; BERTOLINI, M.; MASON, J. B.; PETKOV, S. G.; HOFFERT, K. A.; GEORGE, L. W.; ANDERSON, G. B. Neonatal physiological status of cloned and control calves. **Reproduction, Fertility and Development**, Australian, v. 18, p. 120, 2006.
- BENESI, F.J. Síndrome asfixia neonatal dos bezerros. Importância e avaliação crítica. Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, v.16, p.38-48, 1993.
- CAMPBELL, K. H.; MCWHIR, J.; RITCHIEW, W. A. WILMUT, I. Sheep cloned by nuclear transfer from a culture cell line. *Nature*, v. 380, n. 6569, p. 64 – 66, 1996.
- CHAVATTE-PALMER, P.; HEYMAN, Y.; RICHARD, C.; MONGET, P.; LE BOURHIS, D.; KANN, G.; CHILLIARD, Y.; VIGNON, X.; RENARD, J. P. Clinical, hormonal, e hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. **Biology of Reproduction**, Wisconsin, v. 66, p. 1596 - 1603, 2002.

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

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

CLAXTON, M. S. Electrocardiographic evaluation of arrhythmias in six cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Illinois, v. 192, p. 516 - 521, 1988.

CONSTANT, F.; GUILLOMOT, M.; HUGHES, J.; DEAN, W.; FERGUSON-SMITH, A.; FUNDELE, R.; STEWART, F.; KELSEY, G.; FOWDEN, A.; SIBLEY, C.; REIK, W. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. **Nature**, London, v. 417, p. 945-948, 2002

DE ROTH, L. Electrocardiographic parameters in normal lactating Holstein cow. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 21, p. 271 - 277, 1980.

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

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, p. 178-191, 2006.

FREGIN, F. G. Electrocardiography. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 1, p. 419 - 432, 1985.

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

GENTILE, A.; GUGLIELMINI, C.; BEVILACQUA, D.; CIPONE, M. Echocardiographic findings in four cases of bovine pericarditis (dairy cows – Emilia-Romagna). In: CONGRESSO NAZIONALE DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI BUIATRIA, 30.; 1998, Piacenza. **Anais...** Piacenza: Società Italiana di Buiatria, 1998. p. 217 - 224.

GUGLIELMINI, C.; ZAPPULLI, V.; TESTONI, S.; CASTAGNARO, M. Bovine dilated cardiomyopathy. Clinical-echocardiographic and pathologic findings in one case. In: CONGRESSO NAZIONALE DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI BUIATRIA, 35.; 2002, Marina di Ravenna. **Anais...** Marina di Ravenna: Società Italiana di Buiatria, 2002. p. 305 - 311.

HAMLIN, R. L.; GLOWER, D. D. JR.; PIMMEL, R. L. Genesis of QRS in the ruminant: graphic stimulation. **American Journal of Veterinary Research**, v.45, p. 938 – 941, 1984.

HEYMAN, Y.; CHAVATTE-PALMER, P.; LEBOURHIS, D.; DENIAU, F.; LAIGRE, P.; VIGNON, X.; RENARD, J. P. Evaluation of pregnancies after transfer of cloned bovine blastocysts from fetal or adult somatic cells. In: MEETING - ASSOCIATION EUROPEENNE DE TRANSFERT EMBRYONNAIRE, 15., 1999, Lyon. **Proceedings...** France: European Embryo Transfer Association, 1999. p.166.

HILL, J. R.; CHAVATTE-PALMER, P. Pregnancy and neonatal care of cloned animals. In: CIBELLI, J.; LANZA, R. P.; CAMPBELL, K.H.S.; WEST, M. D. **Principles of Cloning**. New York: Academic Press 2002. 247 – 266.

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

HONMA, A.; MIYAHARA, K.; SHIRAI, A.; YAMADA, K.; HIROSE, T.; SATO, M. Long-term serial echocardiographic evaluation of Holstein dairy heifers with bacterial endocarditis. **Journal of the Japan Veterinary Medical Association**, Tokyo, v. 54, n. 7, p. 537 - 541, 2001.

IVANY, J. M.; ILLANES, O. G. Congestive heart failure due to epicardial lymphosarcoma in a Holstein cow. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 40, n. 11, p. 819 - 820, 1999.

KASARI, T.R. Physiologic mechanisms of adaptation in the fetal calf at birth. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.10, n. 1, p.127 - 136, 1994.

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

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

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

Lanza, R. P.; Cibelli, J.B.; Faber, D.; Sweeney R. W.; Henderson, B.; Nevala, W.; West, M. D.; Wettstein, P. J. Cloned Cattle Can Be Healthy and Normal. **Science**, v. 294, p. 1893-1894, 2001

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. **Biology of Reproduction**, v. 72, p. 258 – 265, 2005.

LONG, K. J.; BONAGURA, J. D.; DARKE, P. G. G. Standardised imaging technique for guided M-mode and Doppler echocardiography in the horse. **Equine Veterinary Journal**, Cambridge, v. 24, p. 226 - 235, 1992.

MARR, C.M. Doppler echocardiography. In: MARR, C.M. **Cardiology of the Horse**. London: W.B. Saunders, 1999. p. 117 - 134.

MATHIAS JUNIOR, W. Manual de Ecocardiografia. São Paulo: Manole, 2007. 126p

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

MAYORKA, P. C.; MEIRELLES, F. V.; VISINTIN, J. A.; BIRGEL JR., E. H.; MIGLINO, M. A.; DAGLI, M. L. Z. D. Patologia de fetos e neonatos bovinos clonados. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, supl.1, p. 113, 2005.

MEIRELLES, F. V.; BIRGEL JR, E. H.; PERECIN, F.; BERTOLINI, M.; TRALDI, A. S.; PIMENTEL, J. R. V.; KOMNINOU, E. R.; SANGALLI, J. R.; FANTINATO NETO, P.; NUNES, M. T; POGLIANI, F. C.; MEIRELLES, F. D. P.; KUBRUSLY, F. S.; VANNUCCHI, C. I.; SILVA, L. C. G. Delivery of cloned offspring: experience in Zebu

cattle (*Bos indicus*). **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, p.1 – 10, 2010.

MICHIMA, L. E. S.; LEAL, M. L. R.; BERTAGNON, H. G.; FERNANDES, W. R.; BENESI, F. J. Avaliação Ecocardiográfica em bezerros da raça Holandesa. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, v. 27, n. 12, p. 481 - 486, 2007.

MICHIMA, L.E.S. **Avaliação de dimensões e índices cardíacos obtidos por ecocardiografia de equinos de enduro criados no Estado de São Paulo**. 2003. 71f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo - 2003.

NUNES, M. T. **O uso da cardiotocografia como método de diagnóstico da ocorrência de sofrimento fetal (hipóxia fetal) durante a vida intrauterina de fetos da raça Nelore, originados por meio da técnica de transferência nuclear de células somáticas adultas - Clonagem**. 2009. 112 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo - 2009.

O'GRADY, M. R.; BONAGURA, J. D.; POWERS, J. D.; HERRING, D. S. Quantitative cross-sectional echocardiography in the normal dog. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 27, n. 2, p. 34 – 49, 1986.

PACE, M. M.; AUGENSTEIN, M. L.; BETTHAUSER, J. M.; CHILDS, L. A.; EILERTSEN, K. J.; ENOS, J. C.; KOPPANG, R. W.; LANGE, G.; LESMEISTER, T. L.; MALLON, K. S.; MELL, G. D.; MISICS, P. M.; PFISTER-GENSKOW, M.; STRELCHENKO, N. S.; VOELKER, G. R.; WATT, S. R.; BISHOP, M. D. Ontogeny of cloned cattle to lactation. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 334-339, 2002.

PATTESON, M. Two-dimensional and M-mode echocardiography. In: MARR, C.M. **Cardiology of the Horse**. London: W.B. Saunders, 1999. p. 93 - 116.

PATTESON, M. W.; GIBBS, C.; WOTTON, P. R.; CRIPPS, P. J. Echocardiographic measurements of cardiac dimensions and indices of cardiac function in normal adult Thoroughbred horses. **Equine Veterinary Journal**, Cambridge, v. 27, p. 18 - 27, 1995. Suplemento 19.

PEDRA, C. A.C.; BRAGA, S.L.N.; ESTEVES, C.A.; SANTANA, M.V.T.; FONTES, V.F. O Papel da Ecocardiografia no Tratamento Percutâneo dos Defeitos Septais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. V.86, Nº 2, p.87 - 96 - 2006.
PEDRA, S.R.F.F.; PONTES JUNIOR, S.C.; CASSAR, R.S.C;

- PETRUS, L. C. **Avaliação dos fluxos das valvas aórtica e pulmonar com ecocardiograma Doppler pulsátil em cães clinicamente sadios**. 2006. 124f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo - 2006.
- POULSEN, K.P. & McGUIRK, S.M., Respiratory Disease of the Bovine Neonate. **Vet. Clin. Food Animal** ,25, 121-137, 2009
- REEF, V. B. Echocardiographic examination in the horse: the basics. **Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 12, n. 9, p. 312 - 319, 1990.
- REEF, V. B. Cardiovascular ultrasonography. In: REEF, V.B. **Equine diagnostic ultrasound**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. cap.5, p.215 - 272.
- REEF, V.B; McGUIRK, S.M. Doenças do Sistema Cardiovascular. In: SMITH, B.P. **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais**.São Paulo: Manole, 2006.p.443-478.
- RENARD, J. P.; CHASTANT, S.; CHESNÉ, P.; RICHARD, C.; MARCHAL, J.; CORDONNIER, N.; CHAVATTE, P.; VIGNON, X. Lymphoid hypoplasia and somatic cloning.**The Lancet**, v. 353, p. 1489 - 1491, 1999.
- ROSENBERGER, G. **Exame clínico dos bovinos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. 429 p.
- ROSSI, M. A. Hipertrofia cardíaca nas sobrecargas de pressão e de volume: fenômenos biológicos distintos e diferentes? **Medicina (Ribeirão Preto)**. v.25, n.2, p. 214 - 225, 1992.
- SANTOS, C.R. **Patologia de bovinos neonatos clonados**. 2008. 101f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo - 2008.
- SBANO,J. C. N.; TSUTSUI, J. M.; TERRA-FILHO, M.; MATHIAS JUNIOR, W. Papel da ecodopplercardiografia na avaliação da hipertensão arterial pulmonar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v.30,n.1, p.89-97,2004.
- STARKE, A.; HOLLENBERG, C.; STRATTNER, A. WOHLSEIN, P.; REHAGE J. Ultrasound examinations of endocarditis in cattle. In: Congress, 4., 2003, Lovran. **Proceedings...**Croatia: Central European Buiatric, 2003. p. 349 - 357 2003.

SZENCI, O. Role of acid-base disturbances in perinatal mortality of calves. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 33, p. 205–220, 1985.

THARWAT, M.; SATO, H.; KUROSAWA, T.; OIKAWA, S.; NAKADE, T.; KOIWA, M. Tetralogy of fallot in a calf: clinical, ultrasonographic, laboratory and postmortem findings. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 66, n. 1, p. 73 - 76, 2004.

Tsunoda, Y.; Kato, Y. Recent progress and problems in animal cloning. **Differentiation** v. 69, p.158–161, 2002

UEHARA, Y. An attempt to estimate the pulmonary artery pressure in dogs by means of pulsed Doppler echocardiography. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 55, n. 2, p. 307 - 312, 1993.

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

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

WELLS, D. N.; FORSYTH, J. T.; Mc MILLAN, V, OBACK, B. Review: The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. Cloned cattle and their offspring. **Cloning and Stem Cells**, New York, v. 6, n. 2, p. 101 - 110, 2004.

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

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

YOUNG, L. E.; SINCLAIR, K. D.; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Reviews of Reproduction**, v. 3, p. 155 - 163, 1998.
MATHIAS JUNIOR, W. Manual de Ecocardiografia. São Paulo: Manole, 2007. 126p.