MARIANA TIKUMA NUNES

O uso da cardiotocografia como método de diagnóstico da ocorrência de sofrimento fetal (hipóxia fetal) durante a vida intra-uterina de fetos da raça Nelore originados por meio da técnica de transferência nuclear de células somáticas adultas – Clonagem

Dissertação 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 Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:
Clínica Médica

Área de concentração:
Clínica Veterinária

Orientador:
Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Junior

**SÃO PAULO
2009**

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.2160
FMVZ

Nunes, Mariana Tikuma

O uso da cardiocografia como método de diagnóstico da ocorrência de sofrimento fetal (hipóxia fetal) durante a vida intra-uterina de fetos da raça Nelore originados por meio da técnica de transferência nuclear de células somáticas adultas – Clonagem / Mariana Tikuma Nunes. – São Paulo : Mariana Tikuma Nunes, 2009.

112 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, 2009.

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

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Junior.

1. Cardiocografia. 2. Clonagem. 3. Sofrimento fetal. 4. Bovino.
5. Nelore. I. Título.

ERRATA

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 da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
Página de rosto	2º	2ª	intra-uterina de fetos da raça	intrauterina de fetos da raça
Ficha catalográfica	2º	2ª	intra-uterina de fetos da raça	intrauterina de fetos da raça

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "O uso da cardiocografia como método de diagnóstico da ocorrência de sofrimento fetal (hipóxia fetal) durante a vida intra-uterina de fetos da raça Nelore originados por meio da técnica de transferência nuclear de células somáticas adultas - clonagem", protocolado sob o nº1087/2007, utilizando 10 (dez) 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 "The use of the cardiocography as method of diagnosis of the occurrence of fetal suffering (fetal hypoxia) during the intrauterine life of calves of Nelore breed produced by nuclear transfer from somatic cells - cloning", protocol number 1087/2007, utilizing 10 (ten) 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, 11 de abril de 2007

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: **NUNES**, Mariana Tikuma

Título: 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

Dissertação 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 Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho

Ao meu pai,

que sempre me incentivou na carreira de Medicina Veterinária

sempre amou a vida simples no campo

sempre me amou do jeito que eu sou

e está torcendo por mim, mas agora em outro plano.

À minha mãe,

que sempre esteve e sempre vai estar ao meu lado pra tudo que eu

precisar

me ensinou a ser a pessoa que eu sou hoje

me aconselha, apóia e torce pelo meu sucesso

e me ama acima de tudo!

Sem vocês eu não seria nada!

Agradecimentos

Aos meus pais **Helena e Lauro** pelo companheirismo, incentivo e amor imensurável que sempre tiveram por mim. Sem vocês eu não teria chegado até aqui.

À minha querida avó “**Obá**” pelo grande amor que tem a mim e pelos mimos que sempre acompanharam a minha vida.

À minha irmã **Juliana**, a qual eu aprendi a amar e respeitar depois de duras penas.

Ao **Alexandre**, o grande amor da minha vida, que me ensinou a ser uma pessoa muito mais feliz e a gostar das coisas simples da vida.

Ao grande amigo e meu orientador **Eduardo Harry Birgel Júnior**, pela dedicação que sempre teve a mim, pelos ensinamentos e conselhos, pra que eu alcançasse o pleno conhecimento. Pela chance que me deu em poder trabalhar ao seu lado, onde eu pude aprender a veterinária e a integridade de um bom caráter.

À **Fundação de amparo á pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro desta pesquisa. Auxílio FAPESP nº 06/ 07141-5 e processo bolsa nº 06/58014-3.

Ao **Programa de pós-graduação do departamento de Clínica Médica** da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e aos seus **docentes** pela oportunidade ter realizado o mestrado neste departamento e principalmente ao coodenador do curso, **Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson**, por ter me orientado no início do curso.

Ao professor **Flavio Meirelles** pelo apoio, por ter cedido seus animais para a minha pesquisa, pela confiança que sempre teve ao meu trabalho e pelos ensinamentos passados à mim nesse longo período de aprendizagem. E por ter me recebido sempre com as portas abertas.

À professora **Rossana Pulcinelli V. Francisco** por sempre estar ao meu lado quando eu precisava, me aconselhando e passando seus infinitos conhecimentos, pelos esclarecimentos que sempre foi dado à mim e por ter aberto as portas do Hospital das Clínicas de São Paulo para o meu aprendizado.

Ao Professor e amigo, **José Luiz D'Angelino**, que sempre me acompanhou na vida acadêmica abrindo portas, me aconselhou e repartiu seu vasto conhecimento e me ensinou a ser a profissional que eu sou.

Aos professores do Departamento de Clínica Médica, **Profa. Dra. Lilian Gregory** ao **Prof. Wanderley Araújo**, **Prof. Dr. Fernando José Benesi**, ao **Prof. Dr. Enrico Ortolani**, , à **Profa. Dra. Alice Della Libera** e à **Profa. Dra. Maria Claudia Sucupira**, pelos conhecimentos passados à mim durante a residência e mestrado.

Aos professores do departamento de obstetrícia e ginecologia da Faculdade de Medicina da USP, **Prof. Dr. Seizo Miyadahira**, **Prof. Dr. Silvio Martinelli** e **Prof. Dr. Marcelo Zugaib**, pelos conhecimentos passados à mim, pela generosidade que sempre demonstraram por mim e pela grande ajuda que me deram no seguimento do meu trabalho.

Aos inesquecíveis amigos e pais postiços, **Dona Maria e Seu João e sua família**, que cuidaram de mim durante as idas à fazenda, pela amizade e grande carinho que sempre tiveram por mim, por terem me recebido com os braços abertos e por terem sempre me considerado como uma filha. Nunca vou esquecer de vocês!

Aos amigos **Eliza, João Paulo, Fábio, Daniela, Raquel e Fernanda**, que passaram comigo toda essa jornada deste trabalho, sempre me ajudando.

Aos amigos do Hospital de Ruminantes, **Maria, Francisco, Seu Édison, Luisinho, residentes, pós graduandos e estagiários** que permitiram a convivência prazerosa, pelas gargalhadas, pela troca de conhecimento e por toda ajuda que foi dada à mim.

E a todas as pessoas e animais que permitiram a realização dessa pesquisa.

“De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro”

Fernando Sabino

RESUMO

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.** [The use of cardiotocography as a method of diagnosis of the occurrence of fetal distress (fetal hypoxia) during intrauterine life in fetuses of Nelore generated through the technique of somatic adult cell nuclear transfer – Cloning]. 2009. 112 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A presente pesquisa teve a finalidade de padronizar a técnica de cardiotocografia a ser utilizada para avaliar a existência de hipóxia/sofrimento fetal durante a vida intrauterina, procurando estabelecer a partir do 7º mês da gestação os padrões de normalidade da frequência cardíaca fetal para fetos sadios e oriundos de inseminação artificial, bem como avaliar a influência da clonagem nos parâmetros obtidos no exame de cardiotocografia. Foram acompanhadas as gestações de 14 vacas, sendo os animais divididos em três grupos experimentais: Grupo de Clones Mortos – composto de 5 vacas gestantes nas quais acompanhou-se a cardiotocografia de fetos gerados pela técnica de clonagem e nos quais a morte do bezerro ocorreu nas primeiras 36 horas de vida ; Grupo de Clones Vivos – composto de 4 vacas gestantes nas quais acompanhou-se a cardiotocografia de fetos gerados pela técnica de clonagem e que permaneceram vivos após o nascimento; Grupo Controle - composto de 5 vacas gestantes nas quais acompanhou-se a cardiotocografia de fetos gerados por inseminação artificial e que deram origem a bezerros sadios. Os animais foram acompanhados por exames periódicos de cardiotocografia realizados nos seguintes momentos: 90, 60, 30, 15, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 dia antes do parto e no dia do parto. Para a realização dos exames foi utilizado o aparelho de cardiotocografia da marca Philips modelo Avalon FM30, no local onde as vacas se encontravam. Os exames tiveram uma duração de 20 a 40 minutos de traçado, sendo que o transdutor de ultra-som era acomodado de forma a obter o melhor sinal cardíaco fetal. Imediatamente após o nascimento, realizou-se a avaliação da viabilidade de bezerros recém-nascidos pelo método APGAR e a observação de bezerros tingidos de amarelo em decorrência da presença de mecônio nas secreções uterinas. Através dos traçados obtidos com a

cardiotocografia foram analisados os parâmetros da cardiotocografia: linha de base, acelerações transitórias, acelerações prolongadas, variabilidade, taquicardia, bradicardia e desacelerações, sendo ao final calculado o índice cardiotocométrico. Nos animais classificados como hipoativo ou inativo aplicava-se estimulação por palpação retal com beliscamento do espaço interdigital do feto com o objetivo de modificar o comportamento fetal e evitar resultados falso positivos. O exame de cardiotocografia mostrou ser eficaz na avaliação da vitalidade fetal na espécie bovina. Os valores médios e o desvio padrão da frequência cardíaca fetal basal (linha de base) em fetos hígidos foi igual a $116,4 \pm 9,07$ bpm. Considerou-se taquicardia uma frequência cardíaca fetal igual ou maior do que 145 bpm e bradicardia uma frequência cardíaca igual ou menor do que 90 bpm. Considerou-se normal para bovinos uma variabilidade com valores situados entre 5 e 15 bpm. Verificou-se que a presença de acelerações transitórias são indicativas de bem estar fetal, sendo que o número de acelerações transitórias consideradas como fisiológicas varia entre 1 e 5. Desacelerações são indicativas da existência de sofrimento fetal, não sendo observadas em animais hígidos. No grupo de clones mortos, existem modificações da cardiotocografia compatíveis com a ocorrência de sofrimento fetal/ hipóxia intrauterina. Os fetos do grupo de clones mortos apresentaram com maior frequência momentos de hipoatividade fetal do que os fetos do grupo de clones vivos e fetos do grupo controle e os fetos do grupo de clone mortos foram classificados com maior frequência como não reativos ao estímulo de beliscamento das extremidades do que os fetos do grupo controle. Os fetos do grupo de clones mortos apresentaram com mais frequência bradicardia (11,8%) do que a observada no grupo controle (0,00 %). Observou-se que no grupo de clones mortos ($1,4 \pm 1,6$) o número de acelerações transitórias foi significativamente menor do que o observado no grupo de clones vivos ($3,50 \pm 2,70$) e no grupo controle ($2,70 \pm 1,80$).

Palavras-chave: Bovinos. Cardiotocografia. Clonagem animal. Sofrimento fetal. Nelore

ABSTRACT

NUNES, M. T. The use of cardiotocography as a method of diagnosis of the occurrence of fetal distress (fetal hypoxia) during intrauterine life in fetuses of Nelore generated through the technique of somatic adult cell nuclear transfer - Cloning. [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 da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

This research had the purpose to standardize the technique of cardiotocography to be used to assess the presence of hypoxia / fetal distress during intrauterine life, trying to establish from the 7th month of pregnancy the normal range of fetal heart rate in healthy fetuses and from artificial insemination and cloning to evaluate the influence of the parameters obtained in the examination of cardiotocography. Were followed the pregnancies of 14 cows and animals are divided into three experimental groups: Dead Clones Group - composed of 5 pregnant cows which was accompanied the cardiotocography of fetuses generated by the technique of cloning, in which the death occurred in the calf first 36 hours of life; Living Clones Group - composed of 4 pregnant cows which is accompanied cardiotocography of fetuses generated by the technique of cloning and remained alive after the birth, control group - composed of 5 pregnant cows in which follow - the cardiotocography of fetuses generated by artificial insemination and gave rise to healthy calves. The animals were monitored by periodic assessment of cardiotocography performed in the following periods: 90, 60, 30, 15, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 day before parturition and day of birth. For the examinations we used the apparatus of cardiotocography Brand Philips Avalon FM30 model, where the cows were. The tests had a duration of 20 to 40 minutes of track, and the ultrasound transducer was adjusted to obtain the best fetal cardiac signal. Immediately after birth, was held to assess the viability of newborn calves by the method APGAR and the observation of colored yellow calves due to the presence of meconium in the uterine secretions. Through cardiotocography tracings were analyzed with the parameters of cardiotocography : the baseline, acceleration transient, prolonged accelerations, variability, tachycardia, bradycardia, and deceleration modes, and the final calculated the index cardiotocométrico. In the animals classified as inactive or hypoactive stimulation was applied by rectal

palpation of the interdigital space with pinch of the fetus with order to modify the behavior and prevent fetal false positives. An examination of cardiotocography has proven effective in evaluation of fetal vitality in the bovine species. The mean values and standard deviation of the baseline fetal heart rate (from baseline) in healthy fetuses was equal to 116.4 ± 9.07 bpm. Tachycardia was considered a fetal heart rate equal to or greater than 145 bpm bradycardia and a heart rate less than or equal to 90 bpm. It was considered normal for cattle variability with values between 5 and 15 bpm. It was found that the presence of transient accelerations are indicative of fetal well-being, and the number of transient accelerations considered physiological ranges between 1 and 5. Deceleration is indicative of the existence of fetal distress and is not observed in healthy animals. In the group of clones dead, there are changes in cardiotocography consistent with the occurrence of fetal distress / intrauterine hypoxia. The fetuses of the group of clones had killed more often moments of fetal hypoactivity than the fetuses of the group of clones live fetuses and the control group and the group of fetuses dead clone were classified more frequently as non-reactive to stimulation of the pinch ends of the fetuses in the control group. The fetuses of the group of dead clones showed bradycardia more often (11.8%) than that observed in the control group (0.00%). It was observed that the group of dead clones (1.4 ± 1.6) the number of transient acceleration was significantly lower than that observed in the group of live clones (3.50 ± 2.70) and the control group (2.70 ± 1.80).

Key-words: Bovine. Cardiotocography. Animal cloning. Fetal distress. Nellore

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Local anatômico onde foi encontrado o melhor sinal da frequência cardíaca fetal em 100% das vacas.	40
Figura 2 - Traçado de Cardiotocografia com linha de base de 120 batimentos por minuto.	43
Figura 3 - Traçado de Cardiotocografia com variabilidade menor do que 5 47	47
Figura 4 - Traçado de Cardiotocografia com variabilidade igual a 5 47	47
Figura 5 - Traçado de Cardiotocografia com variabilidade igual a 10..... 47	47
Figura 6 - Traçado de Cardiotocografia com variabilidade igual a 15..... 48	48
Figura 7 - Traçado de Cardiotocografia com visualização do ciclo sono-vigília 48	48
Figura 8 - Traçado de Cardiotocografia após estimulação do feto por palpação retal (beliscamento do espaço interdigital) 49	49
Figura 9 - Traçado de Cardiotocografia após estimulação do feto por palpação retal (beliscamento do espaço interdigital) 49	49
Figura 10 - Traçado de Cardiotocografia com aceleração prolongada e aceleração transitória 50	50
Figura 11 - Traçado de Cardiotocografia com desaceleração 51	51
Figura 12 - Traçado de Cardiotocografia com desaceleração prolongada..... 51	51
Figura 13 - Traçado de Cardiotocografia de bezerro com taquicardia fetal..... 53	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Índice cardiotocométrico de Zugaib e Behle (1981).	30
Quadro 2 - Avaliação da viabilidade de bezerros recém-nascidos pelo sistema APGAR.	38
Quadro 3 - Índice cardiotocométrico para bovinos	52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Valores médios da frequência cardíaca fetal obtidas nos fetos do grupo controle. São Paulo, 2007-2009.	44
Gráfico 2 -	Valores médios da frequência cardíaca fetal obtidas nos fetos do grupo controle, por dias anteparto. São Paulo, 2007-2009.	45
Gráfico 3 -	Variação dos valores de variabilidade encontrada nos fetos do grupo controle. São Paulo, 2007-2009.	46
Gráfico 4 -	Taxas de variabilidade de acordo com a atividade ou hipoatividade dos fetos do grupo controle. São Paulo, 2007-2009.	46
Gráfico 5 -	Valores médios da aceleração transitória nos fetos do grupo controle. São Paulo, 2007-2009.	50
Gráfico 6 -	Avaliação da atividade fetal durante o exame de cardiotocografia, classificados de acordo com índice cardiotocométrico, no grupo controle. São Paulo, 2007-2009.	53
Gráfico 7 -	Frequência de fetos reativos e não reativos após a estimulação por beliscamento das extremidades no grupo controle. São Paulo, 2007-2009.	54
Gráfico 8 -	Média e desvio padrão da frequência cardíaca fetal basal (linha de base) observadas no grupo de clones mortos, grupo de clones vivos e grupo controle. São Paulo, 2007-2009.	55
Gráfico 9 -	Valores médios da frequência cardíaca fetal basal (linha de base) obtidas no grupo de clones vivos, grupo de clones mortos e grupo controle. São Paulo, 2007-2009.	56
Gráfico 10-	Valores médios da frequência cardíaca fetal basal (linha de base) obtidas nos fetos do grupo de clones vivos, grupo de clones mortos e grupo controle, distribuídos segundo o momento da realização do exame de cardiotocografia. São Paulo, 2007-2009.	57
Gráfico 11-	Ocorrência de bradicardia fetal (linha de base ≤ 90 bpm) no grupo de clones vivos, grupo de clones mortos e grupo controle. São Paulo, 2007-2009.	58
Gráfico 12-	Ocorrência de taquicardia fetal (linha de base ≥ 145 bpm) no grupo de clones vivos, grupo de clones mortos e grupo controle. São Paulo, 2007-2009.	59

Gráfico 13 - Variação dos valores de variabilidade obtidas nos fetos do grupo de clones vivos, grupo de clones mortos e grupo controle. São Paulo, 2007-2009.	60
Gráfico 14 - Média e desvio padrão do número de acelerações transitórias observadas no grupo de clones mortos, grupo de clones vivos e grupo controle. São Paulo, 2007-2009.	61
Gráfico 15 - Valores médios do número de acelerações transitórias obtidas no grupo de clones vivos, grupo de clones mortos e grupo controle. São Paulo, 2007-2009.....	63
Gráfico 16 - Valores médios do número de acelerações transitórias obtidas nos fetos do grupo de clones vivos, grupo de clones mortos e grupo controle, distribuídos segundo o momento da realização do exame de cardiotocografia. São Paulo, 2007-2009.	64
Gráfico 17 - Frequência do número de acelerações prolongadas no grupo de clones mortos, grupo de clones vivos e no grupo controle. São Paulo, 2007-2009.	65
Gráfico 18 - Média e desvio padrão do número de desacelerações observadas no grupo de clones mortos, grupo de clones vivos e grupo controle. São Paulo, 2007-2009	66
Gráfico 19 - Valores médios do número de desacelerações obtidas no grupo de clones mortos e grupo de clones vivos. São Paulo, 2007-2009.....	67
Gráfico 20 - Ocorrência de hipoatividade fetal durante o exame de cardiotocografia no grupo de clones vivos, grupo de clones mortos e grupo controle.São Paulo, 2007-2009.	68
Gráfico 21 - Número de animais hipoativos nos grupo de clones mortos, grupo de clones vivos e grupo controle, distribuídos segundo o número de vezes que os animais foram classificados como hipoativos (pelo menos uma vez, pelo menos duas vezes e mais que três vezes hipoativo).São Paulo, 2007-2009.	69
Gráfico 22 - Ocorrência de hipoatividade fetal durante o exame de cardiotocografia no grupo de clones vivos, grupo de clones mortos e grupo controle.São Paulo, 2007-2009.	70
Gráfico 23 - Frequência de fetos reativos ou não reativos após a estimulação por beliscamento das extremidades, distribuídos segundo os grupos experimentais (grupo de clones mortos, grupo de clones vivos e grupo controle). São Paulo, 2007-2009.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Constituição dos grupos experimentais para avaliação do exame de cardiotocografia de vacas gestantes de fetos oriundos da técnica de clonagem (Grupo de Clones Mortos e Grupo de Clones Vivos) e de fetos oriundos da técnica de inseminação artificial (Grupo Controle). São Paulo, 2009.	36
Tabela 2 - Número de exames de cardiotocografia realizados em cada animal segundo o momento da sua realização, distribuídos de acordo com os grupos experimentais (grupo clones mortos, grupo clones vivos e grupo controle). São Paulo, 2007-2009.	37
Tabela 3 - Avaliação da viabilidade de bezerros recém-nascidos distribuídos de acordo com os grupos experimentais (grupo clones mortos, grupo clones vivos e grupo controle) São Paulo, 2007-2009.	39
Tabela 4 - Médias e Desvio Padrão da linha de base nos fetos do grupo controle. São Paulo, 2007-2009.	44
Tabela 5 - Valores médios e desvio padrão da frequência cardíaca fetal basal (linha de base) obtidas no grupo de clones vivos, grupo de clones mortos e grupo controle. São Paulo, 2007-2009.	56
Tabela 6 - Valores médios e desvio padrão do número de acelerações transitórias obtidas no grupo de clones vivos, grupo de clones mortos e grupo controle. São Paulo, 2007-2009.	62
Tabela 7 - Avaliação do índice cardiotocométrico obtido no grupo de clones mortos, clones vivos e no grupo controle e distribuídos segundo o momento da realização do exame de cardiotocografia. São Paulo, 2007-2009.	73

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Tabela 5 - Parâmetros Cardiotocográficos de bezerros obtidos pela técnica de clonagem - vaca receptora 7088 (GRUPO CLONE MORTO)-feto A	99
APÊNDICE B - Tabela 9 - Parâmetros Cardiotocográficos de bezerros obtidos pela técnica de clonagem - vaca receptora 6180 (GRUPO CLONE MORTO)-feto B	100
APÊNDICE C - Tabela 10 - Parâmetros Cardiotocográficos de bezerros obtidos pela técnica de clonagem - vaca receptora 5944 (GRUPO CLONE MORTO)-feto C	101
APÊNDICE D - Tabela 11 - Parâmetros Cardiotocográficos de bezerros obtidos pela técnica de clonagem - vaca receptora 5483. (GRUPO CLONE MORTO) -feto E	102
APÊNDICE E - Tabela 12 - Parâmetros Cardiotocográficos de bezerros obtidos pela técnica de clonagem - vaca receptora 5498. (GRUPO CLONE MORTO) -feto F	103
APÊNDICE F - Tabela 13 - Parâmetros Cardiotocográficos de bezerros obtidos pela técnica de clonagem - vaca receptora 09 (GRUPO CLONE VIVO) -feto G	104
APÊNDICE G - Tabela 14 - Parâmetros Cardiotocográficos de bezerros obtidos pela técnica de clonagem - vaca receptora 222. (GRUPO CLONE VIVO) -feto H.....	105
APÊNDICE H - Tabela 15 - Parâmetros Cardiotocográficos de bezerros obtidos pela técnica de clonagem - vaca receptora 130. (GRUPO CLONE VIVO)- feto I	106
APÊNDICE I - Tabela 16 - Parâmetros Cardiotocográficos de bezerros obtidos pela técnica de clonagem - vaca receptora 223 (GRUPO CLONE VIVO) - feto J.....	107
APÊNDICE J - Tabela 17 - Parâmetros Cardiotocográficos de bezerros obtidos por Inseminação Artificial - vaca Luana (GRUPO CONTROLE) - feto I.....	108
APÊNDICE K - Tabela 18 - Parâmetros Cardiotocográficos de bezerros obtidos por Inseminação Artificial - vaca Amanhã (GRUPO CONTROLE) -fetoll	109
APÊNDICE L - Tabela 19 - Parâmetros Cardiotocográficos de bezerros obtidos por Inseminação Artificial - vaca Pérola (GRUPO CONTROLE) - feto III.....	110

APÊNDICE M - Tabela 20 - Parâmetros Cardiotocográficos de bezerros obtidos por Inseminação Artificial - vaca Magali 220 (GRUPO CONTROLE) -feto IV	111
APÊNDICE N - Tabela 21 - Parâmetros Cardiotocográficos de bezerros obtidos por Inseminação Artificial - vaca Flor 237 (GRUPO CONTROLE) -feto V	112

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1	Constituição dos Grupos Experimentais	35
3.2	Execução do exame de cardiotocografia	40
3.3	Análise Estatística	41
4	RESULTADOS	43
4.1	Padronização da técnica de cardiotocografia em bovinos: estabelecimento dos critérios para avaliação e interpretação do exame	43
4.2	Avaliação da influência da clonagem animal na cardiotocografia	55
4.2.1	Influência da clonagem animal na avaliação da frequência cardíaca fetal	55
4.2.2	Influência da clonagem animal na avaliação da variabilidade	60
4.2.3	Influência da clonagem animal na avaliação da aceleração transitória.	61
4.2.4	Influência da clonagem animal na avaliação da desaceleração.	66
4.2.5	Influência da clonagem animal na avaliação do feto segundo o índice cardiotocométrico	68
5	DISCUSSÃO	74
6	CONCLUSÕES	87
	REFERÊNCIAS	90
	APÊNDICES	98

1 INTRODUÇÃO

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. Estudos indicam que as causas dessas perdas estão associadas a distúrbios no desenvolvimento da placenta, possivelmente devido ao crescimento inapropriado da membrana alantóide em decorrência da falta de vascularização nos estágios iniciais do desenvolvimento (WELLS, 1999). Outras alterações foram observadas nos vilos coriônicos da placenta de bovinos clonados, os quais se apresentam em maior número, ocupam menor área de superfície da placenta e são menores em relação aos de bovinos não clonados (LACERDA, 2006). Durante a gestação, a disfunção placentária leva a formação de hidroalantóide, aparecimento de placentomas maiores e em menor quantidade, e membranas placentárias edematosas, sendo essas alterações responsabilizadas por perdas fetais em estágios avançados de prenhez (KRUIP, DENDAAS, 1997).

Apesar dos esforços realizados nos últimos três anos pelos 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 USP e do Instituto Butantã, as taxas de mortalidade dos bezerros clonados, que chegam a termo, é ainda alta: cerca de 50%.

Essas pesquisas têm evidenciado, em bezerros neonatos originados por meio da técnica de transferência nuclear de células somáticas adultas, distúrbios de adaptação neonatal relacionados ao sistema cardio-respiratório associado ao aumento da pressão da artéria pulmonar, produção inadequada do surfactante pulmonar e persistência do Forâmen de Botal e do Ducto Arterioso, comprometendo a capacidade de oxigenação do sangue arterial dos bezerros clonados. Associada a esse fato, foi observada, na grande maioria dos bezerros originados por meio da técnica de transferência nuclear de células somáticas adultas, a ocorrência de macrossomia, característica bastante comum de ruminantes oriundos da clonagem,

sendo o fenômeno referido como síndrome do bezerro grande ou LCS (do inglês “large calf syndrome”), anemias de grau moderado a severo, distúrbios do metabolismo de carboidratos, anomalias umbilicais com infecção e persistência do úraco, devido ao aumento na espessura do cordão umbilical em decorrência de edema na gelatina presente nas estruturas umbilicais, alopecia cuja origem pode estar relacionada com distúrbios na síntese e absorção de vitaminas, bem como sofrimento fetal e hipóxia durante a vida intra-uterina.

A hipóxia /sofrimento fetal tem sido observada em cerca de 40% dos animais clonados, sendo que esses distúrbios associados com a aspiração de mecônio na vida intra-uterina podem estar relacionados ao comprometimento do sistema cardio-respiratório do bezerro clonado, tornando necessária a avaliação da sua vitalidade fetal, pois a gestação do animal clonado é de alto risco.

A presente pesquisa, pelo delineamento experimental proposto, terá a finalidade de padronizar a técnica de cardiotocografia a ser utilizada para avaliar a existência de hipóxia/sofrimento fetal durante a vida intra-uterina, procurando estabelecer, a partir do 7º mês da gestação, os valores de normalidade da frequência cardíaca para fetos sadios e oriundos de inseminação artificial, bem como determinar o padrão de acelerações e desacelerações do batimento cardíaco associado a movimentação do feto e as contrações uterinas e avaliar as possíveis influências da clonagem nos parâmetros obtidos nessa cardiotocografia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Grandes perdas ao longo da gestação são características do desenvolvimento fetal de clones, sendo esse um dos maiores obstáculos a ser vencido durante o desenvolvimento desta técnica (CHAVATTE-PALMER, 2007). Em particular, a clonagem por transferência nuclear é associada com pobre eficiência reprodutiva decorrentes a baixas taxas de gestação e altas perdas gestacionais (PANARACE et al., 2007; KOHAN-GHADR et al., 2008).

Em gestações concebidas naturalmente, anormalidades fetais são a maior causa de perdas na gestação. Entretanto, em animais derivados de clonagem ou em procedimentos de cultura *in vitro*, anormalidades placentárias ocorrem com grande frequência no começo e no final da gestação (HILL et al., 2000), sendo essas frequentemente associadas com abortamento ou morte perinatal em clones (CHAVATTE-PALMER et al., 2002; KOHAN-GHADR et al., 2008).

Apesar dos relatos sobre perdas fetais precoces durante a clonagem devido a alterações no ambiente uterino materno, falhas na interação materno-fetal ou a anormalidade do embrião (HILL et al., 2000; BATCHELDER et al., 2007), aceita-se, atualmente, que o desenvolvimento e sobrevivência fetal, durante a gestação de clones, dependem da morfologia apropriada e desenvolvimento funcional da placenta. Pesquisas publicadas nos últimos anos têm evidenciado demora na implantação e formação de um número reduzido de placentomas em vacas e ovelhas receptoras de embriões de clones, evidenciando o papel da placenta no êxito do processo de clonagem em ruminantes (HILL et al., 2000; DE SOUZA et al., 2001; LEE et al., 2004; CHAVATTE-PALMER et al., 2006; BATCHELDER et al., 2007; KOHAN-GHADR et al., 2008).

Desde o início do desenvolvimento da técnica “*in vitro*” de embriões e da clonagem de bovinos e ovinos, tem sido descrita uma nova síndrome: a Síndrome do bezerro gigante (CHAVATTE-PALMER et al., 2006; BATCHELDER et al., 2007). Além do maior peso ao nascer do que os neonatos nascidos por transferência de embrião, inseminação artificial ou monta natural (CHAVATTE-PALMER et al., 2006; BATCHELDER et al., 2007), verificou-se um crescimento anormal dos órgãos internos com aumento do coração e do tamanho do fígado (CHAVATTE-PALMER et al., 2006). Bezerros e cordeiros afetados por essa síndrome apresentam,

frequentemente, durante a gestação, hidropsia dos envoltórios fetais e edema de placenta (CHAVATTE-PALMER et al., 2006).

A síndrome do neonato gigante tem sido comumente relacionada a gestações prolongadas e a falhas de sinalização do parto, podendo ser observado insuficiência cardíaca esquerda e sofrimento respiratório (CHAVATTE-PALMER et al., 2002). Segundo Hill et al. (1999), a falta de partos espontâneos e aumento da mortalidade perinatal é um achado frequente em animais clonados de células somáticas. Conseqüentemente, o maior peso ao nascer desses bezerros foram acompanhados por alta incidência de distocia e alta porcentagem de mortalidade perinatal (BREUKELMAN, 2004).

As complicações peri e pós-natais observadas nos clones incluem, segundo Panarace et al. (2007), o desenvolvimento de aumento do cordão umbilical (37%), problemas respiratórios (19%), bezerros deprimidos /decúbito prolongado (20%) e contratura do tendão flexor (21%). Batchelder et al. (2007) descreveram a ocorrência de hipóxia, acidose, hipertensão pulmonar, hipertemia, pneumonia e aumento do peso ao nascer.

Devido ao sofrimento fetal que ocorre em consequência da disfunção placentária, geralmente nota-se tingimento de mecônio e frequentemente os animais aspiram esse elemento, o que leva a um quadro inflamatório nos pulmões (KOMNINOU, 2008), sendo esse sinal de sofrimento fetal amiúde observado em clones neonatos (BATCHELDER et al., 2007).

Em humanos, as gestações de alto risco, que evoluem com insuficiência placentária, podem cursar com grau variável de hipoxemia fetal (FRANCISCO et al., 2000).

Num primeiro momento, existe um distúrbio na hemodinâmica fetal, bem como uma hipóxia fetal momentânea; num segundo instante, existe uma provável interferência com o fluxo sanguíneo da placenta resultante da congestão do espaço interviloso e desenvolvimento de uma hipóxia gradual mais persistente (HON, 1962).

Na medicina humana, tornou-se imprescindível, na assistência pré-natal especializada ao neonato de alto risco, a avaliação da vitalidade fetal. O principal objetivo da avaliação da vitalidade fetal é a detecção precoce da hipoxemia fetal, evitando-se assim as sequelas neurológicas pós-natais desencadeadas pela anoxia tecidual antenatal (YAMAMOTO et al., 2000).

Na medicina humana, a avaliação da vitalidade fetal inclui vários exames como a cardiotocografia, avaliação do perfil biofísico fetal, determinação do volume de líquido amniótico e a dopplervelocimetria obstétrica (YAMAMOTO et al., 2000).

Apesar dos métodos de avaliação da vitalidade fetal tenham atingido alto grau de complexidade e de sofisticação, a monitorização da frequência cardíaca fetal (FCF) figura, ainda, como um dos principais meios de avaliação da saúde fetal. Esse método é o que apresenta a maior gama de parâmetros, cujas características refletem, com bastante rigor, a qualidade da oxigenação fetal em humanos (SOUZA, 2006).

A maioria dos casos diagnosticados clinicamente de sofrimento fetal em fetos humanos tem um padrão de frequência cardíaca fetal anormal, devido a uma compressão do cordão umbilical. Seguindo a oclusão da veia umbilical, ocorre uma acentuada diminuição no fluxo sanguíneo da placenta e consequentemente uma diminuição no débito cardíaco com resultante hipotensão. O centro vagal é estimulado por essa rápida mudança na hemodinâmica e a tensão de oxigênio cai rapidamente (HON, 1962).

Os critérios para o diagnóstico de sofrimento fetal, baseado na presença de frequência cardíaca anormal, foram estabelecidos no final do século XIX (COHEN, 1986), sendo que, a partir do final da década de 1950, teve início a vigilância do bem-estar fetal por meio da cardiotocografia. Nessa primeira fase, o exame era realizado no período intraparto, captando-se os sinais cardíacos por dispositivos internos (eletrodos inseridos no couro cabeludo fetal) e as alterações pressóricas intrauterinas por meio de cateteres internos em fetos humanos (SOUZA, 2006). As informações acumuladas sobre as variações na frequência cardíaca fetal intraparto, nos diversos estados de oxigenação fetal e a evolução tecnológica para captação de sinais cardíacos e pressóricos por dispositivos externos, determinaram que o método ganhasse novas dimensões, passando a ser utilizado no período anteparto (LEE, 1976). O monitoramento fetal eletrônico levou a uma considerável redução da mortalidade e morbidade perinatal (ZUGAIB, 1980).

O método sempre se caracterizou por não ser invasivo, facilitando a sua ampla utilização (COSTA, 2006). Em geral, a duração varia de 20 a 30 minutos e a interpretação dos registros inclui a avaliação da frequência cardíaca basal, a variabilidade, a presença de acelerações e desacelerações na frequência cardíaca

fetal, a partir da linha de base e a presença de contrações, em humanos (ZUGAIB, 1981).

Atualmente, a cardiotocografia é um dos exames mais utilizados na avaliação do bem estar fetal e/ou avaliação da vitalidade fetal em fetos humanos, sendo extremamente importante no seguimento das gestações de alto risco, principalmente nas que cursam com insuficiência placentária (HALEY et al., 1997). Este exame baseia-se no comportamento da frequência cardíaca fetal e é efetuado por meio de dispositivo especial (cardiotocógrafo), o qual registra em traçados próprios a frequência cardíaca fetal, as contrações uterinas e os movimentos corpóreos fetais (NOMURA et al, 2002). As alterações no seu padrão são observadas nos diversos estados comportamentais do feto (ciclo sono-vigília), nos distúrbios de sua oxigenação ou em situações decorrentes da utilização de medicações durante a gravidez (ZUGAIB, 1981).

As alterações nos padrões da cardiotocografia estão intimamente relacionadas aos episódios de hipoxemia fetal, e a regulação dos parâmetros da frequência cardíaca fetal é dependente do adequado funcionamento do sistema nervoso autônomo (ZUGAIB, 1980).

O sistema nervoso parassimpático exerce atividade sobre o coração via nervo vago, que conduz impulsos da medula oblonga, no sistema nervoso central, para o nó sino-atrial no coração fetal (COSTA, 2006). A estimulação do sistema parassimpático produz o hormônio acetilcolina liberado nas terminações vagais. O efeito deste hormônio, no coração, está relacionado principalmente à diminuição da frequência rítmica do nódulo sinoatrial, reduzindo a excitabilidade das fibras juncionais atrioventriculares (ZUGAIB, 2000).

O sistema nervoso simpático, além de sua atuação pela adrenalina e noradrenalina, tem fibras com terminações no músculo cardíaco e a sua estimulação causa aumento da frequência cardíaca e do trabalho cardíaco (COSTA, 2006). A interação entre o sistema simpático e parassimpático determina a variabilidade dos batimentos cardíacos. Em estudo com modelo animal, demonstrou-se que o tônus simpático aumenta mais precocemente na gestação, enquanto que o tônus parassimpático é de instalação mais gradativa e torna-se mais ativo em fetos maduros. Por isso, a FCF de repouso decresce com o aumento da idade gestacional

(ZUGAIB, 1980), explicando a queda observada na linha de base em gestações de termo (COSTA, 2006).

Apesar do desenvolvimento funcional do sistema simpático e parassimpático ocorrerem lentamente no feto humano, já existe considerável controle da FCF no terceiro trimestre da gravidez. O tônus simpático da FCF permanece praticamente constante com o evoluir da gestação, ao passo que a influência tônica parassimpática aumenta progressivamente com a idade gestacional, provocando gradual diminuição da FCF (COHEN, 1986; ZUGAIB, 2000).

Afora a participação do sistema nervoso autônomo sobre a frequência basal e na variabilidade observada nos traçados cardiotocográficos, desempenham papel importante na regulação da frequência cardíaca fetal os quimiorreceptores e os barorreceptores (ZUGAIB, 2000).

Os barorreceptores estão localizados no arco aórtico e no seio carotídeo, e as alterações de pressão são detectadas rapidamente. A diminuição na frequência cardíaca associada com aumento na pressão sanguínea está relacionada, principalmente, ao aumento do tônus vagal e supressão da atividade simpática (COSTA, 2006). Inversamente, a diminuição da pressão sanguínea está associada ao aumento da frequência cardíaca decorrente da maior atividade simpática e à supressão de impulsos vagais (COHEN, 1986).

Os quimiorreceptores, encontrados no arco aórtico e no sistema nervoso central, são sensíveis às mudanças do gradiente de concentração de oxigênio (O₂) e gás carbônico (CO₂) dissolvidos no sangue. O aumento do CO₂ faz com que os quimiorreceptores sinalizem para a medula oblonga que, por sua vez, ativa o nervo vago e diminui a FCF (ROMANO, 2006).

Além disso, importantes mecanismos fisiológicos, como oscilações termoregulatórias, mudanças maturacionais com o avanço da idade gestacional, estados comportamentais do feto e drogas maternas, podem influenciar a FCF e sua variabilidade em fetos humanos (ROMANO, 2006).

Os sinais de sofrimento fetal são geralmente associados a alterações na frequência cardíaca fetal e na passagem de mecônio (HON, 1961; FENTON, 1962). Mudanças na frequência cardíaca fetal humana são geralmente devido a uma anóxia aguda intermitente, enquanto a liberação de mecônio durante a vida

intrauterina é sinal de anóxia de longa duração (FENTON, 1962). A eliminação precoce do mecônio ocorre, principalmente, pela diminuição dos valores de pH sanguíneo decorrente do acúmulo de dióxido de carbono (FENTON, 1962).

Os protocolos de interpretação dos traçados da cardiotocografia são vários, mas a presença ou ausência de acelerações transitórias da frequência cardíaca fetal, em resposta aos movimentos fetais, é requisito fundamental comum a todos os protocolos de análise. A presença de acelerações transitórias em resposta a movimentos fetais confirma a boa oxigenação intraútero e é o principal indicativo de bem estar fetal (MASCARO, 2002). Segundo Mendenhall et al. (1980) a presença de apenas uma aceleração transitória está associada à boa reserva placentária e adequada capacidade de oxigenação. Estudo da aceleração da FCF anteparto, em 176 pacientes com gestações de alto risco, mostra associação entre acelerações transitórias com traçado inicial intraparto normal e índice de Apgar favorável em exame, realizado cinco minutos após o nascimento (RAYBURN et al., 1978; PHELAN, 1981).

A variabilidade da FCF provou ser um bom indicador para a avaliação da reatividade e bem-estar fetal em condições de não estresse (ROMANO, 2006). Em fetos humanos, independentemente do padrão de FCF, traçados com ausência de variabilidade tendem a ser associados com baixos valores de pH sanguíneo fetal do que aqueles com variabilidade normal (COHEN, 1986). Arabin et al. (1988), avaliando em trabalho retrospectivo em humanos, 2193 cardiotocografias basais, observam que a redução ou ausência de variabilidade, seis semanas antes do parto, associa-se ao baixo índice de Apgar, no momento do nascimento. A redução da variabilidade da FCF, com o tempo, pode parecer ser a principal causa de sofrimento fetal em porcos, como na obstetrícia humana (COHEN, 1997). Ausência de variabilidade da FCF frequentemente acompanha uma asfixia significativa (COHEN, 1986).

Taquicardia e bradicardia fetal são sinais de sofrimento fetal, isso baseado em experiência clínica com auscultação e experimentação em laboratório com animais anestesiados (COHEN, 1986).

O feto pode manifestar taquicardia em resposta a suave e pequena hipoxemia, particularmente quando a atividade uterina é mínima, mas a presença de

fortes contrações geralmente provoca bradicardia intermitente. Quando esta taquicardia é acompanhada de diminuição da variabilidade, a situação é sempre mais ominosa (COHEN, 1986).

Jonker et al. (1993) observaram que, durante as 60 horas de gravação que foram analisadas, um período de vários minutos, os valores de FCF foram extremamente altos (> 180 bpm), isso foi encontrado três vezes. Em um desses casos, a FCF aumentou para 220 bpm e permaneceu em 200 bpm por mais de 4 minutos. O período de taquicardia encontrado também foi semelhante ao encontrado por Jonker et al. (1994), no qual o período de taquicardia foi acompanhado por um aumento do número de movimentos fetais.

Outro critério utilizado para avaliar o sofrimento fetal em fetos humanos é a ocorrência de desacelerações (PALOMÄKI, 2006). As desacelerações são quedas temporárias da FCF e constituem os eventos ominosos da cardiotocografia, podendo ser classificadas como periódicas e não periódicas (ZUGAIB, 2003).

As desacelerações não periódicas, também chamadas de espigas ou DIP 0, não apresentam significado clínico (ZUGAIB, 2000) e são caracterizadas como diminuições de pequena intensidade e duração da frequência cardíaca fetal relacionadas aos movimentos fetais (ZUGAIB, 2003).

Afora as desacelerações não periódicas, podem ser observadas, durante o exame de cardiotocografia, a ocorrência de desacelerações prolongadas que são caracterizadas pela diminuição rápida ou lenta da frequência cardíaca fetal, com amplitude variável e maior do que 15 bpm e duração de dois a 10 minutos, seguido de retorno à linha de base ou, ainda, a ocorrência de desacelerações periódicas do tipo precoce, tardia e umbilical (ZUGAIB, 2000). A classificação do tipo de desaceleração periódica está relacionada com a contração uterina. A desaceleração precoce ou DIP I caracteriza-se por diminuição da FCF e ocorre concomitantemente com as contrações uterinas; as desacelerações tardias ou DIP II caracterizam-se por diminuições lentas da FCF e começam após 20 ou mais segundos do início da contração uterina e desacelerações variáveis ou DIP Umbilical, que consistem em diminuições abruptas da FCF motivadas por compressões do funículo, ocorrem durante as contrações uterinas ou durante movimentos corpóreos fetais (ZUGAIB, 2003).

A ocorrência de desacelerações tardias persistentes, principalmente naquelas em que a frequência cardíaca diminui a 70 bpm, com duração de 60 segundos e

retorno lento à FCF basal, bem como a ocorrência de desacelerações prolongadas, que durem mais de 2 minutos, têm grande significado para o diagnóstico do sofrimento fetal (PALOMÄKI, 2006).

As desacelerações observadas durante a vida fetal em neonato deprimido (Apgar 2) e tingido por mecônio foram associadas por Hon (1962), com a ocorrência de hipóxia fetal, em decorrência da diminuição do fluxo sanguíneo do espaço intervilo e/ou uma condição na qual ocorreu diminuição das reservas de oxigênio fetal.

Baseados nos achados da cardiotocografia, Zugaib e Behle (1981) propuseram o estabelecimento de um índice cardiotocométrico para interpretação dos resultados desse exame, utilizando a linha de base, a variabilidade, a ocorrência de acelerações transitórias e a ocorrência de desacelerações como parâmetros e conferindo pontuação conforme apresentado abaixo:

Parâmetro	Normal	Pontuação
Linha de base	120 a 155bpm	1
Variabilidade	10 a 25bpm	1
Acelerações Transitórias	1	2
Desacelerações	Nenhuma	1

Quadro 1 – Índice cardiotocométrico de Zugaib e Behle, (1981)

Segundo Zugaib e Behle (1981), com base na somatória dos pontos conferidos a cada parâmetro, o feto poderia ser classificado em:

- Ativo: índices quatro e cinco (normal)
- Hipoativo: índices dois e três (suspeito)
- Inativo: índices zero a um (alterado)

A aplicação da estimulação em fetos humanos tem o objetivo de modificar o comportamento fetal, ou seja, alterar o estado de sono para o de vigília e provocar

respostas motora e cardíaca como métodos independentes de avaliação (ZUGAIB, 2003), para melhorar os valores de predição da cardiotocografia, particularmente a especificidade e os valores preditivos do resultado positivo, diminuindo a taxa de falso-positivos (ZUGAIB, 2000). Verificam-se dois tipos de resposta: a motora e a cardíaca, sendo ambas mediadas por via neural. Os fetos hígidos exibem invariavelmente movimentos corpóreos amplos e rápidos. Nota-se, também, incremento na FCF que se mantém por algum tempo, em resposta de catecolaminas (ZUGAIB, 2000). A resposta fetal à estimulação sônica depende do estado funcional do sistema nervoso central que, por seu turno, depende da quantidade de oxigênio disponível. Acredita-se que, a partir da 25ª semana de gestação, o feto capacita-se a responder à estimulação sônica. A partir da 32ª semana, as características da resposta cardíaca se assemelham às do feto de termo (ZUGAIB, 2000).

De acordo com Zugaib (2000), dependendo da resposta cardíaca, após a estimulação, o feto pode ser classificado em:

- Reativo – quando há resposta cardíaca com amplitude de pelo menos 20bpm e duração de pelo menos três minutos.
- Hiporreativo – quando a amplitude for menor que 20bpm e/ou duração for menor que três minutos.
- Não reativo – quando não se verifica resposta cardíaca fetal.

Considera-se uma resposta fetal normal quando o feto está reativo ou quando há a presença de acelerações transitórias após o estímulo.

Na obstetrícia bovina, existe somente uma limitada experiência com a cardiotocografia, pois foram encontradas somente as pesquisas realizadas por Held et al. (1986), Jonker et al. (1989), Jonker et al. (1993), Jonker et al. (1994), Jonker et al. (1996) e Smith (2006), sendo que o padrão de avaliação guarda semelhança à realizada para fetos humanos.

Em pesquisa realizada por Held et al. (1986), foram avaliados os achados de cardiotocografia de 84 fetos bovinos a termo durante a fase de dilatação do parto, sendo que em 30 animais a pressão intrauterina foi simultaneamente determinada. A frequência cardíaca média dos fetos normais, durante a fase de dilatação do parto, foi igual a 118 ± 18 bpm. Baseado nesses resultados, Held et al. (1986)

estabeleceram que a linha de base em fetos hígidos variava entre 80 e 155 bpm. Considerando esse intervalo, os autores afirmaram que 77,4% (65/84) dos fetos apresentavam normocardia, 22,6% (19/84) apresentavam taquicardia, sendo que nenhum animal apresentou bradicardia.

Segundo Held et al. (1986), a avaliação da variabilidade da frequência cardíaca evidenciou que 2,3% (2/84) dos fetos tinham uma variabilidade menor que cinco bpm, 41,7% (35/84) apresentavam variabilidade entre cinco e 10 bpm, 40,5% (34/84) apresentavam uma variabilidade entre 10 e 25 bpm e 15,5% (13/84) apresentavam uma variabilidade maior do que 25 bpm .

Held et al. (1986) encontraram uma correlação entre batimento cardíaco fetal basal, o equilíbrio de ácido no sangue e a viabilidade do bezerro, logo após o parto, sendo que 95 % dos 65 bezerros com normocardia não apresentavam acidose imediatamente após a parição, enquanto 100 % dos 19 fetos com taquicardia apresentavam acidose em exame realizado imediatamente após o parto. Segundo Held et al. (1986), os resultados da sua pesquisa evidenciou que a ocorrência de taquicardia fetal é um indicativo seguro da existência de acidose fetal durante a parição.

Complementando os achados de sua pesquisa, Held et al. (1986) observaram, no grupo de animais com acidose, uma incidência maior de desacelerações prolongadas e aumento da variabilidade, sendo que, em 29,0 % dos bezerros com asfixia neonatal, a variabilidade da FCF era maior do que 25 bpm. Relativo à ocorrência de desacelerações decorrentes à compressão do cordão umbilical, Held et al. (1986) afirmaram que elas são raras em bovinos, devido ao fato do comprimento do cordão umbilical de fetos bovinos ser proporcionalmente menor do que o observado em fetos humanos. Durante os exames realizados, Held et al. (1986) não evidenciaram a ocorrência de desacelerações precoces e tardias em nenhum dos animais examinados.

Jonker et al. (1989) consideraram normal para bovinos uma frequência cardíaca fetal basal, variando entre 90 e 130 bpm, sendo observado um aumento da frequência cardíaca fetal, perto da fase de expulsão do parto.

As mudanças na frequência cardíaca fetal, ligadas a períodos de aumentos da pressão intrauterina, são observadas durante o trabalho de parto dos bovinos, sendo que esse tipo de atividade, também denominado de contração, provoca

pequena diminuição de tensão de O₂ arterial fetal e desacelerações transitórias (JONKER et al., 1993).

Jonker et al. (1993), estudando o padrão de frequência cardíaca fetal e a influência da atividade miometral durante o último mês de gestação em vacas, observaram uma média de duração das contrações de $11,4 \pm 1,1$ minuto, sendo o intervalo de descanso, entre as contrações, o dobro da sua duração. Observou também, que a atividade uterina não apresentou efeito significativo na frequência cardíaca fetal antes, durante ou depois das contrações.

A presença de um baixo nível de atividade uterina, durante as últimas semanas de gestação, foram relatadas para bovinos por Burton (1987) e Kündig (1990).

Burton (1987), estudando a ocorrência de contrações uterinas durante a evolução da parição, observou que antes do início da parição, há a existência de pouca atividade do miométrio, pois nessa fase as contrações uterinas eram de pequena intensidade. O aumento das contrações uterinas pode ser observado entre 24 e 12 horas antes do parto, sendo que, nesse período, observou-se atividade uterina em 36 % do tempo avaliado. Nas últimas 12 horas antes do parto, foram observadas contrações regulares, que se repetiam com a frequência de 0,6 contrações / minuto e com duração de aproximadamente 60 segundos. Com a aproximação do parto, ocorreu um aumento da intensidade das contrações, sendo que, após a ruptura dos anexos fetais, observa-se atividade miometral em 80 % do tempo avaliado, com a duração das contrações de aproximadamente 75 segundos.

Essas observações foram reforçadas por Kündig (1990). E, ao estudar a motilidade uterina de vacas durante a fase final da gestação, constatou que, nas últimas 2-3 semanas de gestação, ocorriam contrações uterinas esparsas, sendo que somente com o início da fase de dilatação do parto, nas últimas 20 horas que antecediam a parição, havia um aumento da frequência e da amplitude das contrações uterinas.

Nos traçados da frequência cardíaca fetal no período anteparto em ovelhas, acelerações são observadas por ativos movimentos fetais (JONKER et al., 1993).

Um aumento da linha de base na cardiotocografia é uma das reações de desenvolvimento de hipoxia e acidose em humanos e em ovelhas (JONKER et al., 1996).

O padrão de frequência cardíaca fetal é usado para observar as condições do feto durante a gestação e também durante o parto, sendo que as acelerações na frequência cardíaca associada ao movimento fetal são consideradas sinal de bem estar fetal, enquanto bradicardia ou taquicardia persistente constituem sinais de sofrimento fetal em ruminantes (SMITH, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Constituição dos Grupos Experimentais

No período de agosto de 2007 a abril de 2009 foram acompanhadas as gestações de 14 vacas, sendo os animais divididos em três grupos experimentais: **Grupo de Clones Mortos** – acompanhou-se a cardiotocografia de 5 vacas gestantes de fetos gerados pela técnica de clonagem, cuja morte do bezerro ocorreu nas primeiras 36 horas de vida ; **Grupo de Clones Vivos** – acompanhou-se a cardiotocografia de 4 vacas gestantes de fetos gerados pela técnica de clonagem, que permaneceram vivos, após o nascimento; **Grupo Controle** - acompanhou-se a cardiotocografia de 5 vacas gestantes de fetos gerados por inseminação artificial, que deram origem a bezerros sadios. Na tabela 1, foram caracterizados os grupos experimentais e apresentados os momentos nos quais os animais foram submetidos ao exame cardiotocográfico Na tabela 2, estão apresentados os números de exames de cardiotocografia realizados em cada animal, segundo o momento da sua realização, distribuídos de acordo com os grupos experimentais.

Considerando-se o número total de exames de cardiotocografia, foram realizados 59 exames no grupo de clones mortos, 39 exames no grupo dos clones vivos e 60 exames no grupo controle. Na tabela 2, foram apresentados os números de exames realizados em cada animal, segundo o momento da sua realização.

Os animais usados neste estudo, cujos fetos foram obtidos pela técnica de transferência nuclear de células somáticas, tiveram idade gestacional no parto de 283 -290 dias. Já os animais, cujos fetos foram obtidos por inseminação artificial, a idade gestacional no parto foi de 280 – 292 dias.

Nas vacas em que os fetos eram clonados, todos os partos foram realizados pela técnica de cesariana. Já nas vacas, cujos fetos foram obtidos por meio de inseminação artificial, em um animal, o parto foi realizado por cesariana e, nos outros quatro, o parto foi natural.

Tabela 1 - Constituição dos grupos experimentais para avaliação do exame de cardiotocografia de vacas gestantes de fetos oriundos da técnica de clonagem (**Grupo de Clones Mortos** e **Grupo de Clones Vivos**) e de fetos oriundos da técnica de inseminação artificial (**Grupo Controle**) - São Paulo - 2007 - 2009.

MOMENTOS DO EXAME DE CARDIOTOCOGRAFIA (dias antes do parto)	GRUPOS EXPERIMENTAIS		
	GRUPO CLONES MORTOS (bezerros obtidos por clonagem e que morreram nas primeiras 36 horas de vida)	GRUPO CLONES VIVOS (bezerros obtidos por clonagem e que sobreviveram)	GRUPO CONTROLE (bezerros obtidos por inseminação artificial)
90 dias	5	0	4
60 dias	5	3	5
30 dias	5	3	5
15 dias	4	3	5
7 dias	2	3	4
6 dias	2	3	4
5 dias	3	3	4
4 dias	5	3	5
3 dias	5	3	4
2 dia	4	4	5
1 dia	5	4	4
Dia do parto	5	4	5

[illegible][illegible]

Imediatamente após o nascimento, realizou-se a avaliação da viabilidade de bezerros recém-nascidos pelo método APGAR, sendo usados quatro parâmetros de julgamento (reação da cabeça ao jato de água, reflexos palpebral e interdigital, movimentos respiratórios e coloração de mucosas), aquilatados e pontuados no primeiro e no quinto minuto após o nascimento. Cada um dos parâmetros será pontuado de zero a dois, fornecendo a soma das pontuações o respectivo grau de vitalidade, sendo classificados como animais sadios ou com boa vitalidade os que tivessem de 7 a 8 pontos; como animais deprimidos ou com vitalidade diminuída os com pontuação entre 4 e 6 pontos e com pouca vitalidade ou inviáveis, os bezerros com soma de pontos entre 0 e 3. Os exames foram realizadas conforme as recomendações propostas por Benesi (1992). No Quadro 2 estão apresentados os parâmetros avaliados.

Critério de Avaliação	Pontos		
	0	1	2
Reação da cabeça a um jato de água	Ausente	Diminuída	Espontânea, movimentos ativos
Reflexos palpebral e interdigital	Ausente	Um reflexo positivo	ambos reflexos positivos
Respiração	Ausente	Arritmica	Rítmica
Coloração de mucosas	Azulada	Branco-azulada	Rósea

Quadro 2 - Avaliação da Viabilidade de Bezerros Recém-Nascidos pelo sistema APGAR.

Em complementação a essas avaliações, foram registradas, como características indicativas da ocorrência de hipóxia na vida fetal, as observações de bezerros tingidos de amarelo no momento do nascimento, em decorrência da presença de mecônio nas secreções uterina, sendo avaliado se nesses animais os bezerros eram hígidos e permaneciam vivos ou apresentavam distúrbios com retardo do tempo da mamada do colostro e dificuldades em ficar em estação, associados à morte, nas primeiras 36 horas de vida.

Baseados nesses critérios, os animais puderam ser sub-divididos nos três grupos experimentais, sendo que na tabela 3 estão apresentadas as características observadas, que permitiram afirmar se os animais apresentavam hipóxia durante a vida intrauterina. Pode ser observado nesta tabela que os bezerros clonados

designados de A a E vieram a óbito, apresentaram índices Apgar baixos e nasceram tingidos de mecônio, enquanto os bezerros clonados designados de F a I apresentaram índices Apgar altos, não nasceram tingidos de mecônio e não vieram a óbito, após o nascimento, permanecendo vivos até o momento. Os bezerros do grupo controle designados de I a V apresentaram índices Apgar alto, não nasceram tingidos de mecônio, não morreram, após o nascimento, e continuam vivos até o momento.

Tabela 3 - Avaliação da viabilidade de bezerros recém-nascidos distribuídos de acordo com os grupos experimentais (grupo clones mortos, grupo clones vivos e grupo controle)- São Paulo - 2007-2009.

GRUPOS EXPERIMENTAIS		PARÂMETRO AVALIADO		
		Avaliação da viabilidade de bezerros recém-nascidos pelo método APGAR	Ocorrência de bezerro tingido de mecônio ao nascimento	Óbito nas primeiras 36 horas de vida
GRUPO CLONES MORTOS (bezerros obtidos por clonagem e que morreram nas primeiras 36)	A - 7088	3	sim	sim
	B - 6180	3	sim	sim
	C - 5944	5	sim	sim
	E - 5483	4	sim	sim
	F - 5498	5	sim	sim
GRUPO CLONES VIVOS (bezerros obtidos por clonagem e que sobreviveram)	G - 09	6	não	não
	H - 222	7	não	não
	I - 130	8	não	não
	J - 223	7	sim	não
GRUPO CONTROLE (bezerros obtidos por inseminação artificial)	I - Luana	8	não	não
	II - Amanhã	8	não	não
	III - Perola	8	não	não
	IV - Magali	8	não	não
	V - Flor	8	não	não

3.2 Execução do exame de cardiotocografia

O exame de cardiotocografia foi realizado com o animal em estação contido em tronco de contenção, sendo possível a sua realização em 100 % dos animais utilizados. O local em que foi obtido o melhor sinal da frequência cardíaca fetal foi a região abdominal latero ventral direita, sendo essa área delimitada cranialmente por linha vertical que passava pela 12^a costela e caudalmente por linha vertical, pela tuberosidade ilíaca; ventralmente por linha horizontal, pela articulação cúbita (úmero-rádio-ulnar) e dorsalmente por linha horizontal, pela escápula do lado direito do animal (Figura 1). Nessa região, foi realizada a tricotomia, onde o transdutor do aparelho de cardiotocografia foi colocado para a obtenção da frequência cardíaca fetal e foi usado gel de contato para ultra-som. Foi encontrado, também, o sinal da frequência cardíaca fetal do lado esquerdo do animal, na mesma região descrita acima, em uma das vacas cujo feto era clonado.

Figura 1 - Local anatômico onde foi encontrado o melhor sinal da frequência cardíaca fetal em 100% das vacas

Para a realização dos exames, foi utilizado o aparelho de cardiotocografia da marca Philips, modelo Avalon FM30, no local onde as vacas se encontravam. Os exames tiveram uma duração de 20 a 40 minutos de traçado, sendo que o transdutor de ultra-som era acomodado de forma a obter o melhor sinal cardíaco fetal.

Após um período de estabilização da frequência cardíaca fetal com ausência de acelerações transitórias e baixa variabilidade durante 10 minutos, aplicava-se estimulação por palpação retal com beliscamento do feto, para verificar se o mesmo estava realmente hipoativo ou inativo ou em estado de sono, com isso diminuindo a taxa de falso positivos.

Aqueles traçados que apresentaram perda do sinal da frequência cardíaca fetal em mais de 25% do período da sua realização, bem como aqueles que apresentaram indefinição de linha de base, foram excluídos da análise dos resultados. Verificou-se que a perda do sinal da frequência cardíaca fetal com difícil recuperação do mesmo, ocorria durante movimentos da vaca (movimentos para frente e para trás, coices e tremores abdominais), em decorrência da movimentação ruminal, de acordo com a posição do feto pela intensa movimentação fetal e pela ocorrência de hidropsia dos envoltórios fetais.

Através dos traçados obtidos com a cardiotocografia, foram analisados os parâmetros da cardiotocografia: linha de base, acelerações transitórias, acelerações prolongadas, variabilidade, taquicardia, bradicardia e desacelerações, com isso, avaliamos o bem estar fetal .

3.3 Análise Estatística

Para a realização dos testes estatísticos, foi utilizado o software SPSS for Windows, versão 15.0, 2006.

Na análise estatística das variáveis contínuas (linha de base e acelerações transitórias), calculou-se, inicialmente, a média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação, para a seguir aplicarem-se os testes estatísticos, com nível de significância de 5%. Para avaliar a influência da fase da gestação sobre os

resultados da linha de base, utilizou-se o teste para dados pareados de Wilcoxon, ajustado para comparações múltiplas de Bonferroni. A fim de avaliar a influência dos grupos experimentais (clones mortos, clones vivos e controle) sobre a linha de base e o número de acelerações transitórias, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. As análises foram feitas de acordo com os preceitos de estatística descritiva e analítica indicados por Siegel (1975), Fonseca e Martins (1982) e Bussab e Morettin (2003).

Em relação à análise estatística das variáveis categóricas (variabilidade, desaceleração e classificação), foi calculada a frequência da ocorrência de cada variável, sendo utilizado para a comparação entre os resultados obtidos entre os grupos experimentais (clones mortos, clones vivos e controle) o Teste Exato de Fisher, com nível de significância de 5%, conforme recomendado por Fleiss (1981).

4 RESULTADOS

4.1 Padronização da técnica de cardiotocografia em bovinos: estabelecimento dos critérios para avaliação e interpretação do exame

Estabeleceram-se os critérios para avaliação e interpretação da cardiotocografia em bovinos, sendo que os seguintes parâmetros foram caracterizados e avaliados:

a) Linha de base ou frequência cardíaca fetal (FCF) basal - consiste na média aproximada dos valores da frequência cardíaca fetal (FCF), avaliada num segmento de 10 minutos do traçado cardiotocográfico, excluindo-se desacelerações, acelerações, períodos de acentuada variabilidade e segmentos, onde a variação da FCF apresente diferenças superiores a 25 batimentos por min (bpm). Na figura 2, está apresentado o traçado de cardiotocografia com linha de base de 120 batimentos por minuto.

Figura 2 - Traçado de Cardiotocografia com linha de base de 120 batimentos por minuto

Conforme apresentado na tabela 4 e gráfico 1, a frequência cardíaca média dos fetos normais foi igual a $116,4 \pm 9,07$ bpm. Considerou-se normal para bovinos uma frequência cardíaca fetal basal variando entre 90 a 145 batimentos cardíacos

por minuto. A análise dos resultados apresentados, no gráfico 2, evidencia que, durante a gestação, os valores médios da frequência cardíaca fetal oscilaram entre $103,7 \pm 4,89$ e $136,9 \pm 6,9$ batimentos por minuto, sem que diferenças estatísticas entre os valores da linha de base fossem observadas com o avançar da gestação.

Gráfico 1 - Valores médios da frequência cardíaca fetal obtidos nos fetos do grupo controle - São Paulo - 2007-2009

Tabela 4 - Médias e Desvio Padrão da linha de base nos fetos do grupo controle - São Paulo - 2007-2009

Fetos	média $\pm$ DP	Intervalo ($x \pm 1 s$)	Intervalo ($x \pm 2 s$)	Intervalo ($x \pm 3 s$)
I	$124 \pm 8,25$	115,75 - 132,25	107,50 - 140,50	99,25 - 148,75
II	$109 \pm 6,02$	102,98 - 115,02	96,96 - 121,04	90,94 - 127,06
III	$112 \pm 7,53$	104,47 - 119,53	96,94 - 127,06	89,41 - 134,59
IV	$123 \pm 8,65$	114,35 - 131,65	105,70 - 140,30	97,05 - 148,95
V	$114 \pm 14,9$	99,10 - 128,90	84,2 - 143,8	69,3 - 158,7
Média	$116,4 \pm 9,07$	105,23 - 125,47	99,06 - 134,54	89,10 - 143,61

a – letras coincidentes significam diferença estatística não significante ($p > 0,05$) – Teste de Kruskal Wallis

Gráfico 2 - Valores médios da frequência cardíaca fetal obtidos nos fetos do grupo controle, por dias anteparto - São Paulo - 2007-2009

b) Variabilidade - definida como a oscilação da linha de base da FCF, sendo determinada pela interação do sistema nervoso autônomo simpático com o parassimpático. A variabilidade foi classificada como sendo menor do que 5, 5, 10 e 15 batimentos por minuto, sendo a frequência da sua ocorrência em fetos hígidos (grupo controle) apresentada no gráfico 3. Apesar de ter sido observado no grupo controle que a variabilidade em 25,0 % (15/60) dos exames de cardiotocografia era menor do que cinco (em 10 desses exames, os animais foram classificados como ativos e, em 5, os animais foram classificados como hipoativos), como observado no gráfico 4, considerou-se para fins de classificação como valores normais de variabilidade aqueles situados entre 5 e 15 bpm.

Gráfico 3 - Variação dos valores de variabilidade encontrada nos fetos do grupo controle - São Paulo - 2007-2009

Gráfico 4 - Taxas de variabilidade de acordo com a atividade ou hipoatividade dos fetos do grupo controle - São Paulo - 2007-2009

Nas figuras 3 a 6 estão apresentados os padrões utilizados para essa avaliação.

Figura 3 - Traçado de Cardiotocografia com variabilidade menor do que 5

Figura 4 - Traçado de Cardiotocografia com variabilidade igual a 5

Figura 5 - Traçado de Cardiotocografia com variabilidade igual a 10

Figura 6 - Traçado de Cardiotocografia com variabilidade igual a 15

As alterações nos padrões de variabilidade da frequência cardíaca fetal são observadas nos diversos estados comportamentais do feto (ciclo sono-vigília), nos distúrbios de oxigenação, em situações decorrentes da utilização de medicamentos durante a gestação ou , ainda, após a estimulação do feto (Figuras 7 a 9).

Figura 7 - Traçado de Cardiotocografia com visualização do ciclo sono- vigília

↑ - seta indica o momento da estimulação do feto por beliscamento do espaço interdigital

Figura 8 - Traçado de Cardiotocografia após estimulação do feto por palpação retal (beliscamento do espaço interdigital)

↓ - seta indica o momento da estimulação do feto por beliscamento do espaço interdigital

Figura 9 - Traçado de Cardiotocografia após estimulação do feto por palpação retal (beliscamento do espaço interdigital)

c) Acelerações Transitórias (AT): ascensos transitórios da FCF com amplitude de pelo menos 15bpm, durante pelo menos 15 segundos. É o marcador cardiotocográfico que melhor caracteriza o bem-estar fetal. Verificou-se, conforme apresentado no gráfico 5, que o número de acelerações transitórias no grupo controle variou entre 1,1 e 5,0.

Verificou-se, ainda, que a duração média de cada aceleração transitória era de 39 segundos e a sua amplitude de 24 bpm para o grupo controle. A aceleração é

definida como prolongada quando a duração é maior do que dois minutos e menor do que 10 minutos (Figura 15), sendo esse tipo de aceleração em 5,0 % (3/60) dos exames realizados em fetos hígidos do grupo controle, com duração média das acelerações prolongadas igual a 6 minutos e amplitude de variação igual a 57 bpm.

Gráfico 5 - Valores médios da aceleração transitória nos fetos do grupo controle-São Paulo - 2007-2009

Figura 10 - Traçado de Cardiotocografia com aceleração prolongada e aceleração transitória

d) Desacelerações - são diminuições temporárias da FCF, com amplitude de pelo menos 20bpm, durante pelo menos 30 segundos ou com amplitude de pelo menos 10bpm, durante pelo menos 60 segundos. São indicativos da existência de sofrimento fetal (Figuras 11 e 12). Em nenhum dos 60 exames realizados em fetos

hígidos do grupo controle foi observada a ocorrência de desacelerações da frequência cardíaca fetal.

Figura 11 - Traçado de Cardiotocografia com desaceleração

Figura 12 - Traçado de Cardiotocografia com desaceleração prolongada

e) Taquicardia fetal: é caracterizada pelo aumento da FCF basal. A estimulação simpática promove elevação da frequência de descarga nodal, aumentando a excitabilidade do coração e a força de contração da musculatura cardíaca. A frequência cardíaca fetal basal considerada normal variou entre 90 a 145 bpm. Assim, considerou-se a presença de taquicardia uma frequência cardíaca fetal igual ou acima de 145 bpm. A ocorrência de taquicardia fetal foi observada em 3,33% (2/60) dos traçados de cardiotocografia, realizados nos fetos hígidos do grupo

controle. Na figura 13, está apresentado o traçado de uma vaca que apresentou taquicardia fetal, com frequência variando entre 160 e 190 batimentos por minuto

Figura 13 - Traçado de Cardiotocografia de bezerro com taquicardia fetal

f) Bradicardia fetal – é caracterizada pela diminuição da FCF basal, sendo considerado como presente, quando a frequência cardíaca fetal era igual ou menor do que 90 bpm. A estimulação de quimiorreceptores é considerada um dos mecanismos relacionados à instalação da bradicardia fetal, principalmente na hipoxemia aguda do conceito, promovendo aumento do tônus parassimpático. A ocorrência de bradicardia fetal não foi observada em nenhum dos 60 traçados de cardiotocografia realizados em fetos hígidos do grupo controle.

Para a interpretação dos traçados e classificação do feto, efetuou-se uma adaptação do índice cardiotocométrico para humanos, apresentado por Zugaib e Behle (1981), sendo, no quadro 3, apresentados os parâmetros que permitem a classificação da atividade fetal de fetos bovinos.

Parâmetro	Normal	Pontuação
Linha de base	90 a 145bpm	1
Variabilidade	5 a 15bpm	1
Acelerações Transitórias	1	2
Desacelerações	Nenhuma	1

Quadro 3 - Índice cardiotocométrico para bovinos

O índice cardiotocométrico é o somatório destas pontuações. Com base nestes valores, o feto é classificado em:

- Ativo: índices quatro e cinco (normal).
- Hipoativo: índices dois e três (suspeito).
- Inativo: índices zero e um (alterado).

Conforme apresentado no gráfico 6, no grupo controle, observou-se que, em 80,0% (48/60) dos exames realizados, os fetos hígidos foram classificados como ativos, enquanto que, em 20,0 % (12/60) dos exames, os animais foram classificados como hipoativos e em nenhuma oportunidade foram classificados como inativos.

Gráfico 6 - Avaliação da atividade fetal durante o exame de cardiotocografia, classificados de acordo com índice cardiotocométrico, no grupo controle - São Paulo - 2007-2009

Nos animais classificados como hipoativo ou inativo, aplicava-se estimulação por palpação retal com beliscamento do espaço interdigital do feto, com o objetivo de modificar o comportamento fetal, provocando resposta motora e cardíaca. A resposta fetal normal é caracterizada pela presença de movimentos corpóreos amplos e rápidos e o aumento da frequência cardíaca fetal. Para a classificação do feto como reativo ou não reativo à estimulação, efetuou-se uma adaptação da classificação proposta para fetos humanos por Zugaib (2000).

A presença de acelerações transitórias, após o beliscamento do espaço interdigital do feto, foi considerada como resposta fetal normal, sendo a constatação dessa característica suficiente para classificar o animal como reativo à estimulação.

Naqueles fetos, nos quais não foram observadas acelerações transitórias, porém que apresentaram aumento da frequência cardíaca em pelo menos 20 bpm e duração mínima de três minutos, foram, também, classificados como reativos à estimulação.

Fetos, nos quais não foram observadas acelerações transitórias, que não apresentaram resposta cardíaca ou com aumento da frequência cardíaca menor do que 20 bpm e/ou cuja duração tenha sido menor do que três minutos, foram classificados como não reativos à estimulação.

Conforme apresentado no gráfico 7, no grupo controle, observou-se, em 75 % (3/4) dos exames realizados, que os fetos foram classificados como reativos à estimulação fetal, enquanto em 25,0 % (1/4) dos exames realizados os fetos foram classificados como não reativos.

Gráfico 7 - Frequência de fetos reativos e não reativos após a estimulação por beliscamento das extremidades no grupo controle - São Paulo - 2007-2009

4.2 Avaliação da influência da clonagem animal na cardiocardiografia

6.2.1 Influência da clonagem animal na avaliação da frequência cardíaca fetal.

Na tabela 5 e nos gráficos 8 a 12, foram apresentados os resultados obtidos para a frequência cardíaca fetal basal (linha de base) dos animais avaliados nesta pesquisa

A tabela 5 e o gráfico 8 mostram que os valores médios e o desvio padrão da frequência cardíaca fetal basal (linha de base), no grupo de clones mortos, grupo de clones vivos e grupo controle, foram, respectivamente: $111 \pm 16,6$, $107,5 \pm 9,2$ e $116,4 \pm 9,07$ bpm. Nos fetos clonados mortos, foi encontrada uma variação da frequência cardíaca fetal de 80 a 160 bpm. Nos fetos clonados vivos, uma variação da frequência cardíaca fetal de 85 a 195 bpm e nos fetos obtidos por inseminação artificial (grupo controle), uma variação da frequência cardíaca fetal de 100 a 145 bpm.

a - letras coincidentes significam diferença estatística não significante ($p > 0,05$) – Teste de Kruskal Wallis

Gráfico 8 - Média e desvio padrão da frequência cardíaca fetal basal (linha de base) observados no grupo de clones mortos, grupo de clones vivos e grupo controle - São Paulo - 2007-2009

Tabela 5 - Valores médios e desvio padrão da frequência cardíaca fetal basal (linha de base) obtidos no grupo de clones vivos, grupo de clones mortos e grupo controle - São Paulo - 2007-2009

GRUPOS EXPERIMENTAIS		NÚMERO DE EXAMES	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
GRUPO CLONES MORTOS	A	14	106	15,98
	B	12	115	20,28
	C	11	97	23,20
	E	10	118	13,98
	F	12	119	9,56
	Média Geral	11,8	111	16,6
GRUPO CLONES VIVOS	G	10	104	6,99
	H	11	97	6,50
	I	11	115	13,13
	J	7	114	10,18
	Média Geral	9,8	107,5	9,2
GRUPO CONTROLE	I	10	124	8,25
	II	14	109	6,02
	III	12	112	7,53
	IV	12	123	8,65
	V	12	114	14,90
	Média Geral	12,0	116,4	9,07

linha de base

Gráfico 9 - Valores médios da frequência cardíaca fetal basal (linha de base) obtidos no grupo de clones vivos, grupo de clones mortos e grupo controle - São Paulo - 2007-2009

A análise dos resultados apresentados no gráfico 10, bem como a interpretação da análise estatística, evidenciou que a frequência cardíaca fetal no grupo de clones mortos ($92,2 \pm 10,3$ bpm) foi significativamente menor do que o observado para o grupo controle ($112,0 \pm 10,9$ bpm), em exames realizados dois dias antes do parto. Nos demais momentos avaliados, não se evidenciou a existência de diferenças significantes entre os três grupos experimentais (clones mortos, clones vivos e grupo controle).

ab - letras não coincidentes significam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) – Teste de Kruskal Wallis

Gráfico 10 - Valores médios da frequência cardíaca fetal basal (linha de base) obtidos nos fetos do grupo de clones vivos, grupo de clones mortos e grupo controle, distribuídos segundo o momento da realização do exame de cardiotocografia - São Paulo - 2007-2009

O gráfico 11 mostra a ocorrência de bradicardia fetal (linha de base ≤ 90 bpm) no grupo de clones mortos, grupo de clones vivos e grupo controle. O grupo dos clones mortos apresentou em 11,8% dos exames realizados bradicardia fetal, sendo essa frequência significativamente maior do que o observado no grupo de clones vivos (2,56% dos exames), enquanto os fetos do grupo controle não apresentaram momentos de bradicardia fetal.

ab - letras não coincidentes significam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) – Teste Exato de Fischer

Gráfico 11 - Ocorrência de bradicardia fetal (linha de base ≤ 90 bpm) no grupo de clones vivos, grupo de clones mortos e grupo controle - São Paulo - 2007-2009

O gráfico 12 mostra a ocorrência de taquicardia fetal (linha de base ≥ 145 bpm) no grupo de clones vivos, grupo de clones mortos e grupo controle. A análise dos resultados evidencia que os fetos do grupo de clones mortos apresentaram, em 6,78% dos exames realizados, taquicardia; os fetos do grupo de clones vivos obtiveram uma taxa de 5,13% de taquicardia e os fetos do grupo controle apresentaram taquicardia em apenas 3,33% dos exames realizados. A análise estatística não evidenciou a existência de diferenças significantes entre os três grupos experimentais (clones mortos, clones vivos e grupo controle).

a - letras coincidentes significam diferença estatística não significativa ($p > 0,05$) – Teste Exato de Fischer

Gráfico 12 - Ocorrência de taquicardia fetal (linha de base ≥ 145 bpm) no grupo de clones vivos, grupo de clones mortos e grupo controle - São Paulo - 2007-2009

4.2.2 Influência da clonagem animal na avaliação da variabilidade

O gráfico 13 mostra a variação dos valores de variabilidade obtidos nos fetos do grupo de clones vivos, grupo de clones mortos e grupo controle. Nos três grupos experimentais, foram encontrados valores de variabilidade classificados como menor que 5, igual a 5, igual a 10 e igual a 15 batimentos por minuto. Pode-se observar que houve uma maior concentração de exames, cujos valores de variabilidade foram igual a 5, no grupo de clones mortos (52,5%) e no grupo controle (68,3%); já no grupo de clones vivos foi encontrada uma maior concentração de exames com variabilidade de valor igual a 10. A análise dos resultados não evidencia diferença nos padrões de variabilidade entre os três grupos, não havendo no grupo de clones mortos alterações desse parâmetro que pudesse ser indicativo de sofrimento fetal.

Gráfico 13 -Variação dos valores de variabilidade obtidos nos fetos do grupo de clones vivos, grupo de clones mortos e grupo controle - São Paulo - 2007-2009

4.2.3 Influência da clonagem animal na avaliação da aceleração transitória.

A análise dos resultados apresentados na tabela 6 e no gráfico 14 mostra que o número de acelerações transitórias (média $\pm$ desvio padrão), no grupo de clones mortos ($1,4 \pm 1,6$), foi significativamente menor do que os observados no grupo de clones vivos ($3,5 \pm 2,7$) e no grupo controle ($2,7 \pm 1,8$).

ab - letras não coincidentes significam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) – Teste Exato de Fischer

Gráfico 14 - Média e desvio padrão do número de acelerações transitórias observadas no grupo de clones mortos, grupo de clones vivos e grupo controle - São Paulo - 2007-2009

Tabela 6 - Valores médios e desvio padrão do número de acelerações transitórias obtidos no grupo de clones vivos, grupo de clones mortos e grupo controle - São Paulo - 2007-2009

GRUPOS EXPERIMENTAIS		NÚMERO DE EXAMES	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
GRUPO CLONES MORTOS	A	14	2,6	2,3
	B	12	1,8	2
	C	11	0,8	1,3
	E	10	0,6	0,8
	F	12	1,3	1,6
	Média Geral	11,8	1,4	1,6
GRUPO CLONES VIVOS(	G	10	2,5	2,2
	H	11	3,5	2,8
	I	11	5	3,9
	J	7	3	2,1
	Média Geral	9,8	3,5	2,7
GRUPO CONTROLE	I	10	1,3	1,4
	II	14	1,1	1,1
	III	12	2	1,3
	IV	12	5	3,5
	V	12	4	1,9
	Média Geral	12,0	2,7	1,8

Considerando-se individualmente cada um dos animais examinados, observou-se, conforme apresentado no gráfico 15, que, nos cinco fetos clonados que morreram nas primeiras horas de vida, o número de acelerações transitórias variou entre 0,6 e 2,6, enquanto, no grupo de clones vivos, o número de acelerações transitórias variou entre 2,5 e 5,0 e, no grupo controle, variou entre 1,1 e 5,0. Verificou-se, ainda, que a duração média de cada aceleração transitória era de 35 segundos e a sua amplitude de 24 bpm para o grupo de clones mortos, sendo que esses valores não diferiram daqueles obtidos para o grupo de clone vivo e grupo controle, nos quais a duração média de cada aceleração transitória foi, respectivamente, de 38 e 39 segundos e a amplitude de variação igual a 22 e 24 bpm.

Gráfico 15 -Valores médios do número de acelerações transitórias obtidos no grupo de clones vivos, grupo de clones mortos e grupo controle - São Paulo - 2007-2009

No gráfico 16 foram apresentados os valores médios de acelerações transitórias, segundo o momento de realização do exame (últimos 90 dias de gestação).

Gráfico 16 - Valores médios do número de acelerações transitórias obtidos nos fetos do grupo de clones vivos, grupo de clones mortos e grupo controle, distribuídos segundo o momento da realização do exame de cardiotocografia - São Paulo - 2007-2009

Além das acelerações transitórias, observou-se, também, a ocorrência de acelerações prolongadas (Gráfico 17). No grupo de clones vivos, a frequência de acelerações prolongadas (25,6% - 10/39) foi significativamente maior do que a observada no grupo de clones mortos (0,0% - 0/59) e no grupo controle (5,0% - 3/60). No grupo de clones vivos, a duração média das acelerações prolongadas foi de 2,7 minutos e a amplitude foi de 37 bpm, enquanto, no grupo controle, a média de duração foi igual a 6 minutos e a amplitude de igual a 57 bpm.

ab - letras não coincidentes significam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) – Teste Exato de Fischer

Gráfico 17 -Frequência do número de acelerações prolongadas no grupo de clones mortos, grupo de clones vivos e no grupo controle - São Paulo - 2007-2009

4.2.4 Influência da clonagem animal na avaliação da desaceleração.

Apenas os grupos de clones mortos e clones vivos apresentaram desacelerações. Nos fetos clonados, observou-se quatro momentos de desaceleração da FCF, dois momentos em fetos do grupo de clones mortos e dois em fetos do grupo de clones vivos. Os gráficos 18 e 19 mostram a média e desvio padrão da desaceleração no grupo de clones mortos, clones vivos e grupo controle. Analisando os resultados individuais, observa-se que dois animais do grupo de clones mortos apresentaram desacelerações com médias de $0,07 \pm 0,27$ e $0,08 \pm 0,29$ e dois animais do grupo de clones vivos apresentaram desacelerações com médias de $0,1 \pm 0,32$ e $0,14 \pm 0,38$.

a - letras coincidentes significam diferença estatística não significante ($p > 0,05$) – Teste Exato de Fischer

Gráfico 18 - Média e desvio padrão do número de desacelerações observadas no grupo de clones mortos, grupo de clones vivos e grupo controle - São Paulo - 2007-2009

Gráfico 19 - Valores médios do número de desacelerações obtidos no grupo de clones mortos e grupo de clones vivos - São Paulo - 2007-2009

4.2.5 Influência da clonagem animal na avaliação do feto segundo o índice cardiotocométrico.

Baseado nas características cardiotocográficas anteriormente apresentadas (linha de base, variabilidade, presença de acelerações transitórias e desacelerações), obteve-se o índice cardiotocométrico que permitiu classificar os animais segundo sua atividade em ativos, hipoativos e inativos e segundo sua reação, após estímulo por palpação retal com beliscamento do feto em reativos e não reativos.

O gráfico 20 mostra a ocorrência de hipoatividade fetal durante o exame de cardiotocografia no grupo de clones mortos, grupo de clones vivos e grupo controle. A análise dos resultados evidenciou que os fetos do grupo de clones mortos tiveram uma maior ocorrência de momentos de hipoatividade fetal do que os fetos do grupo de clones vivos e fetos do grupo controle.

ab - letras não coincidentes significam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) – Teste Exato de Fischer

Gráfico 20 - Ocorrência de hipoatividade fetal durante o exame de cardiotocografia no grupo de clones vivos, grupo de clones mortos e grupo controle - São Paulo - 2007-2009

A análise individual de cada um dos animais, utilizados na presente pesquisa, mostra, conforme apresentado no gráfico 21, que o número de vezes que cada animal foi classificado como hipoativo variou segundo o grupo experimental que

pertencia (grupo de clones mortos, grupo de clones vivos e grupo controle). Conforme pode ser visualizado nesse gráfico, todos os 5 fetos do grupo de clones mortos apresentaram-se hipoativos em três ou mais exames de cardiocotografia, enquanto dos 4 animais, que compuseram o grupo de clones vivos, nenhum apresentou hipoatividade em três ou mais exames, um animal apresentou hipoatividade em dois exames realizados e quatro apresentaram hipoatividade em apenas uma oportunidade. Relativo aos cinco animais, que compuseram o grupo controle, observou-se que dois apresentaram hipoatividade em três ou mais exames, um apresentou hipoatividade em dois exames realizados e dois não apresentaram hipoatividade em nenhum dos exames realizados.

Gráfico 21 -Número de animais hipoativos nos grupo de clones mortos, grupo de clones vivos e grupo controle, distribuídos segundo o número de vezes que os animais foram classificados como hipoativos (pelo menos uma vez, pelo menos duas vezes e mais que três vezes hipoativo) - São Paulo - 2007-2009]

Considerando-se individualmente cada animal examinado, observa-se, conforme apresentado no gráfico 22, que no grupo de clones mortos o percentual de exames nos quais havia hipoatividade variou entre 14,3 % (2 entre 14 exames realizados no clone A) e 81,8% (9 entre 11 exames realizado no clone C), enquanto que no grupo de clones vivos a frequência de exames com hipoatividade variou

entre 9,0 % (1 entre 11 exames realizados no clone I) e 27,3% (3 entre 11 exames realizados no clone H) e no grupo controle entre 0,0 % (0 entre 12 exames realizados no clone IV e V) e 40% (4 entre 10 exames realizados no clone I).

Gráfico 22 - Ocorrência de hipoatividade fetal durante o exame de cardiotocografia no grupo de clones vivos, grupo de clones mortos e grupo controle - São Paulo - 2007-2009

Em complemento ao exame de cardiotocografia, os fetos com hipoatividade e/ou inatividade foram estimulados por meio de beliscamento das extremidades, durante exame de palpação retal, sendo a finalidade deste exame classificar os fetos como reativos ou não reativos ao estímulo. Conforme apresentado no gráfico 23, observou-se que os fetos do grupo de clone mortos foram classificados com maior frequência como não reativos, depois da estimulação por beliscamento das extremidades, do que os fetos do grupo de clones vivos e do grupo controle. Deve ser salientado que, em quatro momentos de hipoatividade no grupo de clones mortos, não foi possível a realização da palpação retal para estimulação por beliscamento das extremidades do feto, enquanto que, em oito momentos, esse exame não foi possível no grupo controle.

ab - letras não coincidentes significam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) – Teste Exato de Fischer

Gráfico 23 -Frequência de fetos reativos ou não reativos após a estimulação por beliscamento das extremidades, distribuídos segundo os grupos experimentais (grupo de clones mortos, grupo de clones vivos e grupo controle) - São Paulo - 2007-2009

Finalizando a avaliação do índice cardiotocométrico, foram apresentados, na tabela 7, os resultados distribuídos segundo o momento da realização do exame. Conforme pode ser visualizado nessa tabela, verifica-se que, no grupo de clones mortos, durante todo o período estudado (últimos 90 dias de gestação), uma maior ocorrência de fetos hipoativos não reativos foi observada do que nos outros grupos experimentais (grupo clones vivos e grupo controle). Verifica-se, ainda, que, no grupo de clones mortos, existem modificações da carditocografia compatíveis com a ocorrência de sofrimento fetal, que já podiam ser observadas em exames realizados entre 90 e 30 dias antes do parto, enquanto que, no grupo de clones vivos indicativos de sofrimento fetal, somente eram observadas no dia da parição.

Nas tabelas 8 a 21 dos apêndices estão consubstanciados os resultados obtidos na pesquisa.

Tabela 7 - Avaliação do índice cardiotométrico obtido no grupo de clones mortos, clones vivos e no grupo controle e distribuídos segundo o momento da realização do exame de cardiotocografia - São Paulo - 2007-2009

Dias antes do parto	Grupo de Clones Mortos					Grupo de Clones Vivos				Grupo Controle				
	7088	6180	5944	5483	5498	9	222	130	223	Luana	Amanhã	Pérola	Magali	Flor
90	ativo	hipoativo não reativo	hipoativo não reativo	hipoativo não reativo	ativo					ativo		ativo	ativo	ativo
60	ativo	Ativo	hipoativo não reativo	ativo	hipoativo não reativo		hipoativo reativo	ativo	ativo	ativo	ativo	ativo	ativo	ativo
30	ativo	Ativo	ativo	hipoativo não reativo	ativo		ativo	ativo	ativo	ativo	hipoativo reativo	ativo	ativo	ativo
15	ativo	Ativo	ativo		ativo		ativo	ativo	ativo	hipoativo	ativo	ativo	ativo	ativo
7	ativo				hipoativo	ativo	ativo	ativo			ativo	hipoativo	ativo	ativo
6	ativo			ativo		ativo	hipoativo reativo	ativo			hipoativo	ativo	ativo	ativo
5	ativo			hipoativo não reativo	ativo	ativo	ativo	ativo			hipoativo	hipoativo	ativo	ativo
4	ativo	Ativo	hipoativo	hipoativo não reativo	ativo	ativo	ativo	ativo		hipoativo não reativo	ativo	ativo	ativo	ativo
3	hipoativo não reativo	Ativo	hipoativo	hipoativo não reativo	ativo	ativo	ativo	ativo			hipoativo	ativo	ativo	ativo
2		Ativo	hipoativo não reativo	ativo	ativo	hipoativo não reativo	ativo	ativo	ativo	hipoativo reativo	ativo	hipoativo reativo	ativo	ativo
1	Inativo	hipoativo não reativo	hipoativo não reativo	hipoativo não reativo	ativo	ativo	ativo	ativo	ativo	ativo		ativo	ativo	ativo
Dia do parto	hipoativo não reativo	Ativo	hipoativo não reativo	hipoativo não reativo	hipoativo não reativo	ativo	hipoativo não reativo	hipoativo não reativo	hipoativo não reativo	hipoativo	ativo	ativo	ativo	ativo

5 DISCUSSÃO

Apesar da técnica de transferência nuclear de células somáticas-clonagem já estar bastante difundida mundialmente, persistem as dificuldades na obtenção de bezerros vivos. Diversos autores relataram uma alta mortalidade pré e peri-natal como resultado da produção de clones por transferência nuclear de célula somática (WELLS et al., 1997; SCHNIENEKE et al., 1997; KATO et al., 1998; RENARD et al., 1999; WELLS et al., 2004; CHAVATTE-PALMER et al., 2004; BATCHELDER et al., 2007) relacionada a um desenvolvimento anormal da placenta (KRUIP, DENDAAS, 1997; WELLS, 1999; LACERDA, 2006).

A insuficiência placentária culmina na ocorrência de perdas fetais durante a fase gestacional, alterações congênitas nos neonatos, complicações peri e pós natais, sofrimento fetal crônico e agudo e alta taxa de mortalidade neonatal.

A hipóxia /sofrimento fetal tem sido observada em cerca de 40% dos animais clonados, sendo que esses distúrbios associados com a aspiração de mecônio, na vida intrauterina, podem estar relacionados ao comprometimento do sistema cardio-respiratório do bezerro clonado. Na presente pesquisa, a hipóxia /sofrimento fetal foi observada em 55,5% (5/9) dos animais clonados estudados.

Os bezerros clonados, incluídos no grupo de clones mortos, tiveram índices Apgar baixos ao nascimento, apresentaram-se tingidos de mecônio e morreram entre uma e 36 horas de vida, enquanto que os bezerros clonados, incluídos no grupo de clones vivos, apresentaram índices Apgar altos, não nasceram tingidos de mecônio e não vieram a óbito após o nascimento, permanecendo vivos até o momento. Anteriormente, Batchelder et al. (2007) correlacionaram bezerros clonados tingidos de mecônio ao nascimento com uma maior incidência de mortalidade nas primeiras horas de vida. Em humanos, Hon (1962) mostrou que os neonatos, com índice Apgar baixos como 2, apresentaram-se tingidos de mecônio, sendo descrito por Fenton e Steer (1962) que as taxas de mortalidade em neonatos humanos, que nasceram tingidos de mecônio, era de 22,2 %.

Diante das observações apresentadas no parágrafo anterior, decidiu-se pela divisão dos animais clonados em dois grupos denominados de clones mortos e clones vivos, sendo que no primeiro grupo foram incluídos os cinco animais com diagnóstico de sofrimento fetal.

Na medicina humana, a cardiotocografia é um dos exames mais utilizados na avaliação do bem estar fetal e/ou avaliação da vitalidade fetal, extremamente importante no seguimento das gestações de alto risco, principalmente nas que cursam com insuficiência placentária (HALEY et al., 1997), sendo o seu principal objetivo a detecção precoce da hipoxemia fetal, evitando-se assim as sequelas neurológicas pós-natais desencadeadas pela anoxia tecidual antenatal.

Apesar dos métodos eletrônicos de avaliação da vitalidade fetal, monitorando a frequência cardíaca fetal, já serem utilizados há muito tempo na medicina, como método de rotina, verifica-se que na veterinária o seu uso ainda é limitado, havendo poucas pesquisas sobre o tema (HELD et al., 1986; JONKER et al., 1989; JONKER et al., 1996; SMITH, 2006).

A pequena quantidade de informações sobre a cardiotocografia em bovinos torna necessário que novas pesquisas sejam conduzidas, tanto em animais clonados quanto em animais obtidos por meios tradicionais de reprodução, a fim de possibilitar uma melhora da técnica de cardiotocografia e melhor conduta com o bezerro nascido.

Os resultados obtidos na presente pesquisa permitem afirmar que a cardiotocografia foi um método eficiente para a avaliação da vitalidade fetal, sendo um exame de fácil realização, por ser uma técnica não invasiva e realizada no período anteparto.

A qualitativa similaridade dos padrões de frequência cardíaca fetal em fetos humanos e animais em situações parecidas, sugerem a possibilidade de respostas fisiológicas parecidas (HON, 1962), porém a existência de particularidades relacionadas à espécie bovina torna necessário que adaptações sejam realizadas na técnica para a sua melhor utilização nessa espécie animal.

Durante a padronização da técnica para bovinos, as seguintes particularidades merecem ser ressaltadas:

De forma similar, as observações de Jonker et al. (1994) demonstram que a melhor região para a realização do exame de cardiotocografia foi a parede abdominal latero-ventral direita, permitindo que em 100 % das vacas examinadas a obtenção do traçado fosse de boa qualidade para a interpretação dos resultados.

A duração média dos exames foi de 20 a 40 minutos, estando esse tempo em concordância com os recomendados por Jonker et al. (1994).

A maior dificuldade durante o exame de cardiotocografia foram as perdas do sinal da frequência cardíaca fetal, com difícil recuperação do mesmo, durante movimentos da vaca (movimentos para frente e para trás, coices e tremores abdominais), intenso movimento fetal e movimento ruminal. Para Jonker et al. (1994) um maior deslocamento do feto foi a principal causa de falhas no registro. Para Cohen (1997), os movimentos maternos, como levantar, beber água, movimentos para frente e para trás e movimentos fetais foram as principais causas de perda de sinal, mas os movimentos maternos pareceram ser a maior causa de perda de sinal. Uma grande distância entre o transdutor e o coração fetal foi outra causa de perda de sinal.

Alterações fisiológicas no padrão do traçado de cardiotocografia são observadas em diversos estados comportamentais do feto humano (ZUGAIB, 1981) e bovino (JONKER et al., 1993; JONKER et al., 1994). A ocorrência de alterações fisiológicas no traçado de cardiotocografia foi constatada em diversos exames realizados em bovinos do grupo controle da presente pesquisa. Ao analisar os dados obtidos, verifica-se que em 20,0% (12/60) dos exames realizados, os bezerros do grupo controle foram classificados como hipoativos, ou seja, apresentavam variabilidade menor do que 5 bpm e ausência de acelerações transitórias, padrão semelhante àquele visto no sono fisiológico fetal descrito para fetos humanos por Zugaib (1981). Deve ser ressaltado que a hipoatividade encontrada em alguns exames realizados em fetos do grupo controle, poderiam refletir, ainda, um estado de hipoglicemia fetal transitória.

Apesar das mudanças na frequência cardíaca fetal ligada a períodos de aumentos da pressão intrauterina poderem ser observadas durante a parição dos bovinos (HELD et al., 1986; JONKER et al., 1993), deve ser salientado que essas contrações, diferente do que é observado em mulheres grávidas, não foram identificadas e/ou caracterizadas como existentes durante a fase final da gestação dos bovinos. Segundo Burton (1987) e Kündig (1990), nas últimas semanas de gestação dos bovinos, a atividade uterina é de pequena intensidade, existindo grande períodos de inatividade do miométrio, sendo que nas últimas 24 horas anteparto, observou-se um aumento da frequência e da amplitude das contrações uterinas. Burton (1987) observou que entre 24 e 12 horas, antes do parto, existia

atividade uterina / contração uterina em 36% do tempo avaliado, enquanto que, nas últimas 12 horas anteparto, observou-se contrações uterinas regulares, com frequência de 0,6 contrações / minuto e com duração de aproximadamente 60 segundos. Na única pesquisa em bovinos, na qual avaliou-se o padrão de frequência cardíaca fetal e a influência da atividade miometral, durante o último mês de gestação em vacas, verificou-se que a atividade uterina não apresentou efeito significativo na frequência cardíaca fetal antes, durante ou depois das contrações (JONKER et al., 1993). Assim, diferente do que é realizado na cardiotocografia humana (ZUGAIB, 1981), não é possível em bovinos uma avaliação que correlacione contração uterina, diminuição de tensão de O₂ arterial fetal e ocorrência de desacelerações transitórias, com exceção de exames realizados durante a fase de dilatação do parto.

Dessa forma, a ocorrência de desacelerações periódicas precoces (DIP I) e tardias (DIP II) não podem ser caracterizadas como existentes na cardiotocografia de bovinos, mesmo naqueles animais que se encontrem nas últimas 24 horas anteparto, sendo necessária a sua adequada caracterização, pois Held et al. (1986) não evidenciaram a presença de desacelerações precoces ou tardias, mesmo em partos distócicos, nos quais os fetos tenham nascidos asfixiados.

Segundo Held et al. (1986), no grupo de animais com acidose / asfixia, foi observada uma maior incidência de desacelerações prolongadas associadas a um aumento da variabilidade da frequência cardíaca fetal.

Relativo à ocorrência de desacelerações umbilicais (DIP umbilical) decorrentes da compressão de cordão umbilical, Held et al. (1986) afirmaram que elas são raras em bovinos devido ao fato do comprimento do cordão umbilical de fetos bovinos ser proporcionalmente menor do que observado em fetos humanos.

A frequência cardíaca fetal foi de $116,4 \pm 9,07$ bpm com variação entre 100 a 145 bpm. Esses valores são maiores do que os relatados por Jonker et al. (1994), que acharam uma média da FCF basal de 105 ± 1.5 bpm, com uma variação de 90 a 125, e semelhantes aos relatados por Held et al. (1986), que observaram, em fetos hígidos, durante a fase de dilatação do parto, uma frequência cardíaca igual a 118 ± 18 bpm.

Na presente pesquisa, considerou-se normal para bovinos uma frequência cardíaca fetal basal variando entre 90 e 145 bpm, sendo encontrado proposto na

literatura limites de normalidade variando entre 80 e 155 bpm (HELD et al., 1986) e entre 90 e 130 bpm (JONKER et al., 1989).

Considerou-se a presença de taquicardia uma frequência cardíaca fetal igual ou maior que 145 bpm e foi considerada a presença de bradicardia uma frequência cardíaca fetal igual ou menor que 90 bpm. Em humanos, de acordo com os critérios adotados por Zugaib e Behle (1981), considera-se que está havendo taquicardia fetal quando os valores são maiores do que 155 bpm. De forma similar, Held et al (1986) propuseram, para fetos bovinos, que valores maiores que 155 bpm caracterizavam taquicardia e valores menores que 80 bpm, bradicardia.

A bradicardia ou taquicardia persistente constituem sinais de sofrimento fetal em ruminantes (COHEN, 1986; SMITH, 2006). O feto pode manifestar taquicardia em resposta à suave e pequena hipoxemia, particularmente quando a atividade uterina é mínima. Em condições nas quais a hipoxemia está associada à presença de fortes contrações uterinas, observa-se o aparecimento de bradicardia intermitente. Deve, entretanto, ser considerado como ominosa, quadro nos quais a taquicardia está acompanhada de diminuição da variabilidade (COHEN, 1986).

Held et al. (1986) evidenciaram que a ocorrência de taquicardia fetal em bovinos é um indicativo seguro de acidose fetal subparto, pois 100% dos fetos com taquicardia apresentavam acidose em exame realizado imediatamente após o parto.

Apesar da taquicardia ser considerada um sinal precoce de sofrimento fetal, deve ser ressaltado que a sua ocorrência não está obrigatoriamente relacionada a um distúrbio patológico, pois foi observado, na presente pesquisa, taquicardia fetal em 3,33 % dos traçados de cardiotocografia realizados nos fetos hígidos do grupo controle.

Segundo Jonker et al. (1993) podem ser observados períodos que duram vários minutos nos quais os valores de FCF foram extremamente altos (> 180 bpm).

Em nenhum dos fetos hígidos avaliados na presente pesquisa bem como naquela conduzida por Held et al. (1986), observou-se a presença de bradicardia fetal.

Apesar da diminuição da frequência cardíaca fetal com o evoluir da gestação ter sido bem estabelecida para fetos humanos (COHEN, 1986; ZUGAIB, 2000; COSTA, 2006) e também ter sido observado por Cohen (1997) em suínos, os dados da presente pesquisa não puderam comprovar que a FCF basal de fetos bovinos

diminui nas últimas semanas de gestação, pois a comparação entre as médias não apresentaram diferenças estatísticas significantes.

Em estudo com modelo animal, demonstrou-se que o tônus simpático aumenta mais precocemente na gestação, enquanto que o tônus parassimpático é de instalação mais gradativa e torna-se mais ativo em fetos maduros. Por isso, a FCF de repouso decresce com o aumento da idade gestacional (ZUGAIB, 1980), explicando a queda observada na linha de base em gestações de termo. (COSTA, 2006).

Deve ser diferenciada a ocorrência de taquicardia e acelerações prolongadas, sendo a aceleração definida como prolongada quando a sua duração varia entre 2 e 10 minutos e a taquicardia quando a FCF está igual ou maior do que 145 bpm por no mínimo 10 minutos do traçado. Na presente pesquisa, observou-se acelerações prolongadas em 5,0 % (3/60) dos exames realizados em fetos hígidos do grupo controle.

A ocorrência de acelerações transitórias associada à movimentação fetal são consideradas sinal de bem estar fetal, em ovinos e bovinos (JONKER et al., 1993; SMITH, 2006), sendo que nos bezerros hígidos (grupo controle) o seu número variou entre 1,1 e 5 acelerações. Esses resultados são menores do que os relatados por Jonker et al. (1994) que verificaram uma média de $7,1 \pm 1,0$ acelerações transitórias. Jonker et al. (1994) relacionaram a presença de movimentos corpóreos fetais com uma maior frequência de acelerações transitórias.

Neste estudo, nos fetos do grupo controle, foi encontrado uma média de duração das acelerações transitórias de 38 segundos e uma amplitude de variação igual a 22 bpm, diferindo somente no valor da duração do encontrado por Bocking (1985), que observou em fetos ovinos uma duração da aceleração transitória de $18,8 \pm 1,5$ segundos e uma amplitude de $25,3 \pm 1,2$ bpm.

Os protocolos de interpretação dos traçados da cardiotocografia são vários, mas a presença ou ausência de acelerações transitórias da frequência cardíaca fetal, em resposta aos movimentos fetais, é requisito fundamental comum a todos os protocolos de análise utilizados na medicina. A presença de acelerações transitórias em resposta a movimentos fetais confirma a boa oxigenação intraútero e é o principal indicativo de bem estar fetal (RAYBURN et al, 1978; PHELAN, 1981; MASCARO, 2002). Segundo Mendenhall et.al. (1980), a presença de apenas uma

aceleração transitória está associada à boa reserva placentária e adequada capacidade de oxigenação.

Relativo à variabilidade da frequência cardíaca fetal, observou-se que nos fetos hígidos ela variou de menor que cinco até 15 bpm, sendo observado que em 25,0 % (15/60) dos exames de cardiotocografia em fetos hígidos do grupo controle a variabilidade era menor do que cinco. Essas observações estão de acordo com as referidas por Jonker et al. (1994), onde a variabilidade da FCF basal em fetos bovinos oscilou entre menor que 5 a 20 bpm, com valores médios de $10,8 \pm 0,7$ bpm.

Segundo Held et al. (1986), a variabilidade da frequência cardíaca em fetos bovinos, durante a fase de dilatação do parto, evidenciou que 2,3% (2/84) dos fetos apresentavam uma variabilidade menor que cinco bpm; 41,7% (35/84), entre cinco e 10 bpm; 40,5% (34/84), entre 10 e 25 bpm; 15,5% (13/84), maior do que 25 bpm, sendo que em 29,0 % dos bezerros com asfixia neonatal a variabilidade da FCF era maior do que 25 bpm.

Esses resultados são menores do que os observados em fetos humanos, pois Souza (2006) relatou uma variabilidade entre cinco a 20 bpm, enquanto os padrões de normalidade considerados por Zugaib e Behle (1981) variavam entre 10 e 25 bpm.

Evidenciou-se, dessa forma, que o comportamento da variabilidade da frequência cardíaca em fetos bovinos apresenta uma característica de resposta fisiológica e patológica diferente da relatada na medicina, pois em fetos humanos, independentemente do padrão de FCF, traçados com redução ou ausência de variabilidade são frequentemente associados com quadros de asfixia / sofrimento fetal (COHEN, 1986; ARABIN et al., 1988; COHEN, 1997; ROMANO, 2006).

Na medicina, é considerado sinal de sofrimento fetal um feto que apresente hipoatividade ou inatividade com ausências de acelerações transitórias, perda de variabilidade ou diminuição desta e presença de desacelerações (ZUGAIB, 1981), sendo que os dados da presente pesquisa confirmam opiniões emitidas por Jonker et al. (1994) e Smith (2006) de que acelerações na frequência cardíaca associadas a movimento fetal são consideradas sinal de bem estar fetal para fetos bovinos, enquanto bradicardia ou taquicardia persistentes constituem sinais de sofrimento fetal para essa espécie animal (HELD et al., 1986; SMITH, 2006). Considerou-se, na

presente pesquisa, como sofrimento fetal a ocorrência de hipoatividade associada a não reatividade do feto, após a estimulação por beliscamento das extremidades.

Para a interpretação dos traçados e classificação do feto bovino como ativo, hipoativo ou inativo, efetuou-se uma adaptação do índice cardiotocométrico utilizado para fetos humanos proposto por Zugaib e Behle (1981). O índice cardiotocométrico foi calculado pelo somatório das pontuações atribuídas aos parâmetros avaliados, sendo atribuído 1 ponto, quando a linha de base encontrava-se entre 90 e 145 batimentos por minuto; 1 ponto, quando a variabilidade da frequência cardíaca fetal oscilava entre cinco e 15 batimento por minuto; 2 pontos, pela presença de pelo menos uma aceleração transitória e um ponto, pela ausência de desacelerações. Os fetos foram classificados como ativo (normal), quando o somatório de pontos foi igual a cinco ou quatro pontos, hipoativo (suspeito), quando foram atribuídos três ou dois pontos e inativo (alterado), quando foram atribuídos 1 ou nenhum ponto.

Seguindo as recomendações de Zugaib (2003), nos animais hipoativos ou inativos, realizou-se a aplicação de estimulação fetal com o objetivo de modificar o comportamento fetal, ou seja, alterar o estado de sono para o de vigília e provocar resposta motora e cardíaca nos fetos. Apesar de recomendado na medicina (ZUGAIB, 2003), a estimulação sonora mostrou-se ineficaz, quando foi utilizada em fetos bovinos. Assim, optou-se por realizar a estimulação por palpação retal com beliscamento do espaço interdigital do feto, sendo os resultados obtidos excelentes.

A resposta normal em fetos da espécie bovina foi caracterizada pela presença de movimentos corpóreos amplos e rápidos e o aumento da frequência cardíaca fetal. Para a classificação do feto como reativo ou não reativo à estimulação, efetuou-se uma adaptação da classificação proposta para fetos humanos por Zugaib (2000).

A presença de acelerações transitórias após o beliscamento do espaço interdigital do feto foi considerada como resposta fetal normal, sendo a constatação dessa característica suficiente para classificar o animal como reativo à estimulação.

Aqueles fetos, nos quais não foram observadas acelerações transitórias, porém que apresentaram aumento da frequência cardíaca em pelo menos 20 bpm e duração mínima de três minutos, foram, também, classificados como reativos à estimulação.

Fetos, nos quais não foram observadas acelerações transitórias e que não apresentaram resposta cardíaca ou com aumento da frequência cardíaca menor do que 20 bpm e/ou cuja duração tenha sido menor do que três minutos, foram classificados como não reativos a estimulação.

Apesar da técnica de cardiotocografia não estar perfeitamente padronizada para bovinos, os resultados obtidos na presente dissertação indicaram de forma inquestionável que os bezerros clonados que morreram, nas primeiras 36 horas de vida (Grupo de clones mortos), apresentaram alterações no seu traçado cardiotocográfico, permitinso afirmar que esses animais encontravam-se em sofrimento fetal, devido à hipóxia que ocorria durante a vida intrauterina. Os resultados desta pesquisa indicam que o sofrimento fetal já está presente em exames realizados entre 90 e 30 dias antes do parto.

Os resultados obtidos evidenciaram que o diagnóstico de sofrimento fetal, durante a vida intrauterina, nem sempre foi possível quando baseado em apenas um exame, porém, quando utilizava-se o conjunto de exames realizados, era possível fazer afirmações corretas sobre a sua ocorrência.

No grupo de clones que sobreviveram (Grupo de clones vivos), foram encontradas alterações compatíveis com sofrimento fetal, por exemplo, a ocorrência de desacelerações. A decisão de não intervir na evolução do processo com a interrupção da gestação por meio da cesariana, permitiu visualizar que esses animais apresentavam em exames de cardiotocografia realizados no dia subsequente, resultados compatíveis com bem estar fetal, por exemplo, a observação de acelerações transitórias.

Em primeira análise, essas observações poderiam sugerir que o método era ineficiente para a detecção de quadros de sofrimento fetal em bezerros, principalmente aqueles relacionados a quadros crônicos de hipóxia intrauterina. Segundo Fenton (1962), a liberação de mecônio, durante a vida intauterina, é sinal de anóxia de longa duração, sendo que a eliminação precoce de mecônio é devido, principalmente, pela diminuição dos valores de pH sanguíneo decorrente do acúmulo de dióxido de carbono.

Mudanças na frequência cardíaca fetal humana são geralmente devido a uma anóxia intermitente (HON, 1961).

Como segunda hipótese poder-se-ia supor que a hipóxia intrauterina teria grau variável, podendo inclusive ser intermitente e de pequena intensidade, o que

explicaria alguns exames indicarem sofrimento fetal, para a seguir serem obtidos resultados indicativos de bem estar fetal. Os achados clínicos observados na presente pesquisa indicam que existe uma evolução diferente nos animais, ou seja, os distúrbios e a sua intensidade poderiam variar e estariam relacionados com a maior ou menor incidência de morte. A presença de animais tingidos de mecônio, índice APGAR menor do que 3 ao nascimento e morte nas primeiras 36 horas de vida foram indicativos de hipóxia de maior intensidade, enquanto animais, que apresentaram índice APGAR entre 7 e 8 ao nascimento, estariam submetidos a um ambiente uterino com oxigenação normal ou submetidos a hipóxia de pequena intensidade e, como consequência, não existiram alterações cardio-respiratórias incompatíveis com a vida extra uterina.

Para uma melhor caracterização do estado de hipóxia intrauterina, serão necessários, no futuro, exames recomendados por Yamamoto et al. (2000) na medicina, para a avaliação do bem estar fetal como: avaliação do perfil biofísico fetal, determinação do volume de líquido amniótico e dopplervelocimetria obstétrica.

A adaptação do índice cardiotocométrico para bovinos, a partir daquele proposto por Zugaib e Behle (1981) na medicina, e a padronização da técnica para estimulação fetal por meio do beliscamento das extremidades dos fetos bovinos, seguidos da adaptação / estabelecimento de critérios utilizados na medicina (ZUGAIB, 2003), que permitissem classificar os fetos como reativos ou não reativos, possibilitaram a demonstração do sofrimento fetal em bezerros clonados.

Os resultados da presente pesquisa mostram que os fetos do grupo de clones mortos tiveram uma maior ocorrência de momentos de hipoatividade e inatividade fetal do que os fetos do grupo de clones vivos e fetos do grupo controle.

A estimulação dos fetos hipoativos por meio de beliscamento das extremidades, durante exame de palpação retal, evidenciou que os fetos do grupo de clone mortos foram classificados com maior frequência como não reativos do que os fetos do grupo controle. Segundo Mascaro (2002), fetos humanos que apresentaram maior quantidade de momentos de hipoatividade com não reatividade tiveram uma maior frequência de mortalidade perinatal, enquanto Souza (2006), comparando a resposta fetal à estimulação em gestações de humanos normais e gestações de alto risco, observou que houve uma maior incidência de fetos não reativos no grupo de alto risco.

Os clones, durante a vida fetal, passam por fases de sofrimento fetal, com momentos de hipoatividade e não reatividade após estímulo, confirmando que o estado de hipoatividade está relacionado a hipóxia, durante a vida intrauterina, e não a momento de hipoatividade relacionados ao estado de sono ou a hipoglicemia.

Ao avaliar as características que compõem a cardiotocografia (linha de base, variabilidade, presença de acelerações transitórias e desacelerações), separadamente, constatou-se que os clones tingidos de mecônio e que morreram nas primeiras horas de vida apresentavam com mais frequência bradicardia e o número de acelerações transitórias era significativamente menor do que o observado nos grupos que não estavam em sofrimento fetal.

A análise dos resultados obtidos para a frequência cardíaca fetal basal (linha de base), no grupo de fetos clonados mortos, mostra que a média da linha de base foi de $109 \pm 11,4$ bpm, sendo encontrada uma variação da frequência cardíaca fetal de 80 a 160 bpm, enquanto no grupo de clones vivos a média da linha de base foi de $107,5 \pm 8,6$ bpm com uma variação da frequência cardíaca fetal de 85 a 195 bpm. Pela análise estatística, esses resultados foram semelhantes aos observados no grupo controle ($116,4 \pm 9,07$ bpm com variação da frequência cardíaca fetal de 100 a 145 bpm). A demonstração inquestionável que os animais clonados, principalmente, do grupo de clones mortos, estavam submetidos a uma condição de hipóxia / sofrimento fetal, só foi possível quando se analisou o percentual de exames de animais com bradicardia nos três grupos experimentais.

A análise dos resultados evidencia que os fetos do grupo de clones mortos apresentaram em 11,8% dos exames bradicardia fetal, sendo esses percentuais significativamente maiores do que os observados no grupo controle (0,00%).

Segundo Cohen (1986) e Smith, (2006), a presença de bradicardia fetal é sinal de sofrimento fetal em ruminantes, sendo relatado que as contrações uterinas geralmente provocam bradicardia intermitente.

Apesar da literatura (COHEN, 1986; JONKER, 1996; SMITH, 2006) descrever que uma hipoxemia de pequena intensidade causa taquicardia fetal, tal fenômeno não pode ser demonstrado de forma insofismável para os bezerros clonados, pois a análise estatística não evidenciou diferença significante entre os percentuais obtidos nos três grupos (clones mortos – 6,78%, clones vivos – 5,13%, grupo controle – 3,33%).

A análise da presença ou ausência de acelerações transitórias da frequência cardíaca fetal, em resposta aos movimentos fetais, é fundamental para a interpretação da cardiotocografia, sendo que os resultados obtidos na presente pesquisa mostram que o número médio de acelerações transitórias observadas no grupo de clones mortos ($1,4 \pm 1,6$) foi significativamente menor do que os observados no grupo de clones vivos ($3,5 \pm 2,7$) e no grupo controle ($2,7 \pm 1,8$).

Considera-se que a presença de acelerações transitórias é um dos mais importantes indicadores de bem-estar fetal para humano (MENDENHALL et.al., 1980; MASCARO, 2002) e ruminantes (JONKER et al., 1993; JONKER, 1994; SMITH, 2006). Dessa forma, relacionou-se o menor número de acelerações transitórias, observadas no grupo de clones que morreram nas primeiras 36 horas de vida, à diminuição do bem estar fetal decorrente da má oxigenação do feto.

Entretanto, merece ser destacado que, nos bezerros clonados que morreram nas primeiras 36 horas, após o nascimento (grupo clones mortos), observou-se momentos nos quais as acelerações transitórias estavam presentes e momentos nos quais os traçados carditocográficos obtidos não indicavam a presença dessas acelerações mesmo após estimulação fetal. Em nosso entender, essas observações não são contraditórias e indicam, na verdade, uma condição de hipóxia intrauterina intermitente e de grau variável, fazendo com que haja momentos de bem estar fetal intercalados com momentos de sofrimento fetal.

Diante das observações realizadas por Rayburn et.al. (1978) e Phelan (1981), que, em pacientes humanos de alto risco, a presença de acelerações transitórias em traçado carditocográfico realizado intraparto tem sido relacionado a índice de Apgar bom, sugere-se que a utilização dos achados da cardiotocografia poderiam ser utilizados durante a parição de fetos clonados, para estimar o grau de sofrimento fetal que o animal foi submetido, durante a fase final da gestação, orientando protocolos de terapia dos distúrbios cardio-respiratórios a serem instituídos imediatamente após o parto.

Com relação à ocorrência de desacelerações da frequência cardíaca fetal, observou-se a sua ocorrência em quatro momentos, dois em fetos do grupo de clones mortos e dois em fetos do grupo de clones vivos, sendo que Held et al. (1986) relacionaram a ocorrência de acidose / asfixia neonatal de bezerros à maior incidência de desacelerações prolongadas. Deve ser novamente ressaltado, que em bovinos, as contrações uterinas são observadas somente durante a parição

(BURTON, 1987; KÜNDIG, 1990). Assim, classificações que associam desacelerações com o momento da contração uterina (desacelerações precoces, tardias e umbilicais) são desprovidas de significado na avaliação desse exame em bovinos, exceção feita aos exames realizados intra-parto.

Apesar de Ikeda (1998) descrever que, em fetos ovinos, nos quais a asfixia foi induzida por oclusão do cordão umbilical, existe uma diminuição da variabilidade, os resultados obtidos na presente pesquisa não evidenciaram diferença nos padrões de variabilidade entre os três grupos, não havendo, no grupo de clones mortos, alterações desse parâmetro que pudesse ser indicativo de sofrimento fetal. Ao analisar os resultados obtidos, durante a padronização, observou-se, inclusive, que um número significativo de animais classificados como ativos apresentavam variabilidade menor do que cinco, indicando que essa condição pode ser observada em animais hígidos. Dessa forma, as conclusões obtidas por Arabin et al. (1988), na qual crianças com a baixo índice de Apgar apresentavam redução ou ausência de variabilidade, nas últimas seis semanas antes do parto, não podem ser extrapoladas para fetos bovinos, ou seja, a utilização desse parâmetro para avaliar a existência de sofrimento fetal somente deve ser efetuada com cuidado, evitando-se erros de interpretação.

6 CONCLUSÕES

Conforme os resultados obtidos neste estudo dos parâmetros da cardiotocografia e da avaliação da vitalidade fetal dos fetos obtidos pela técnica de clonagem, firmou-se as seguintes conclusões:

1ª Conclusão: No grupo de clones mortos, existem modificações da cardiotocografia compatíveis com a ocorrência de sofrimento fetal/ hipóxia intrauterina, que já podem ser observadas, a partir de exames realizados entre 90 e 30 dias antes do parto, sendo que:

a) os fetos do grupo de clones mortos apresentaram com mais frequência bradicardia;

b) o número de acelerações transitórias no grupo de clones mortos foi significativamente menor do que o observado no grupo de clones vivos e no grupo controle;

c) os fetos do grupo de clones mortos apresentaram com maior frequência momentos de hipoatividade fetal do que os fetos do grupo de clones vivos e fetos do grupo controle;

d) os fetos do grupo de clones mortos foram classificados com maior frequência como não reativos ao estímulo de beliscamento das extremidades do que os fetos do grupo controle.

2ª Conclusão: O exame de cardiotocografia se mostrou eficaz na avaliação da vitalidade fetal na espécie bovina. Estabeleceram-se os critérios para avaliação da cardiotocografia em bovinos, sendo que os seguintes parâmetros foram caracterizados e avaliados:

a) Linha de base ou frequência cardíaca fetal (FCF) basal - considerou-se normal para bovinos uma frequência cardíaca fetal basal variando entre 90 a 145 batimentos cardíacos por minuto. Considerou-se taquicardia uma frequência cardíaca fetal igual ou maior do que 145 bpm e bradicardia uma frequência cardíaca igual ou menor do que 90 bpm.;

- b) Variabilidade - considerou-se normal para bovinos valores situados entre 5 e 15 bpm;
- c) Acelerações Transitórias (AT) - são indicativas de bem estar fetal e o número de acelerações transitórias consideradas como fisiológicas varia entre 1 e 5;
- d) Desacelerações -. São indicativos da existência de sofrimento fetal, não sendo observadas em animais hígidos.

3ª Conclusão: Estabeleceu-se o Índice Cardiotocométrico para bovinos, sendo a atividade fetal de fetos bovinos classificada em ativo (normal) quando a somatória de pontos foi igual a cinco ou quatro pontos, hipoativo (suspeito) quando foram atribuídos três ou dois pontos e inativo (alterado) quando foram atribuídos 1 ou nenhum ponto.

Índice cardiotocométrico para bovinos

Parâmetro	Normal	Pontuação
Linha de base	90 a 145bpm	1
Variabilidade	5 a 15bpm	1
Acelerações Transitórias	1	2
Desacelerações	Nenhuma	1

4ª Conclusão: A aplicação de estimulação fetal, por meio da palpação retal com beliscamento das extremidades, foi eficaz em alterar o estado de sono para o de vigília e provocar resposta motora e cardíaca nos fetos, permitindo classificá-los como reativos ou não reativos à estimulação. A presença de acelerações transitórias após o beliscamento do espaço interdigital do feto foi considerada como resposta fetal normal, sendo a constatação dessa característica suficiente para classificar o animal como reativo à estimulação. Naqueles fetos, nos quais não foram observadas acelerações transitórias, porém que apresentaram aumento da frequência cardíaca em pelo menos 20 bpm e duração mínima de três minutos, foram, também, classificados como reativos à estimulação. Fetos, nos quais não foram observadas acelerações transitórias e que não apresentaram resposta cardíaca ou com aumento

da frequência cardíaca menor do que 20 bpm e/ou cuja duração tenha sido menor do que três minutos, foram classificados como não reativos à estimulação.

REFERÊNCIAS

ARABIN, B.; LORENZ, U.; RUTTIGERS, H.; KUBLI, F., et al. Course and predictive value of fetal heart rate parameters. **American Journal Perinatology**, v. 5, n. 3, p. 272-277, 1988.

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

BENESI, F. J. **Hematologia de bezerros recém-nascidos. Influência da asfixia neonatal do tipo do parto e da ingestão de colostro sobre a crase sangüínea.** 1992, 126f. Tese (Livre-docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

BREUKELMAN, S. P.; REINDERS, J. M. C.; JONKER, F. H.; DERUIGH, L.; KAAL, L. M.; VANWAGTENDONK, A. M.; VOS, P. L. A. M.; DIELEMAN, S. J.; BECKERS, J. F.; PERÉNYI, Zs; TAVERNE, M. A. M. Fetometry and fetal heart rates between day 35 and 108 in bovine pregnancies resulting from transfer of either MOET, IVP-co-culture or IVP-SOF embryos. **Theriogenology**, v. 61, p. 867-882, 2004.

BURTON, M. J.; DZIUK, H. E.; FAHNING, M. L.; ZEMJANIS, R. Myometrial activity during natural and dexamethasone-induced parturition in the cow. **American Journal Veterinary Research**, v. 48, n. 1, p. 37-44, 1987.

BUSSAB, W. O.; MORETTIN, P. A. **Estatística básica.** 5. ed., São Paulo: Saraiva, 2003.

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

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

CHAVATTE-PALMER, P.; REMY, D.; CORDONNIER, N.; RICHARD, C.; ISSENMANN, H.; LAIGRE, P.; et al. Health status of cloned cattle at different ages. **Cloning and Stem Cells**, v. 6, p. 94-100, 2004.

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

COHEN, S.; MULDER, E. J. H.; VAN OORD, H. A.; JONKER, F. H.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; TAVERNE, M. A. M. Noninvasive monitoring of fetal heart rate during the last ten days of gestation in sows. **American Journal Veterinary Research**, v. 58, n. 11, p. 1285-1290, 1997.

COHEN, W. R.; YET, S. Y., The abnormal fetal heart rate baseline. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 29, n. 1, p. 73-82, 1986.

COSTA, V. N. **Cardiotocografia computadorizada em gestantes com diabetes mellitus: efeitos da glicemia capilar materna na frequência cardíaca fetal**. 2006, 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

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

FRANCISCO, R. P. V.; YAMAMOTO, R. M.; MIYADAHIRA, S.; CUNHA, C. L.; ZUGAIB, M. Correlação entre testes para avaliação da vitalidade fetal, Ph da artéria umbilical e os resultados neonatais em gestações de alto risco. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 22, n. 8, p. 503-510, 2000.

FENTON, A. N.; STEER, C. M. Fetal distress. **American Journal Obstet & Gynecology**, v. 83, n. 3, p. 354-362, 1962.

FLEISS, J. L. **Statistical methods for rates and proportions**. New York: John Wiley, 1981.

FONSECA, J. S.; MARTINS, G. A. **Curso de estatística**, 3. ed. São Paulo: Atlas, 1982.

HALEY, J.; TUFFNELL, D. J.; JOHNSON, N. Randomised controlled trial of cardiotocography versus umbilical artery doppler in the management of small for gestational age fetuses. **Brazilian Journal Obstetetric Gynaecology**, v. 104, p. 431- 435, 1997.

HELD, T. H.; SCHEIDEGGER, A.; GRUNERT E. Kardiotocographische befunde bei lebensfrischen und asphyktischen Rinderferten während der Aufweitungspphase der geburt. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, v. 33, p. 422-431, 1986.

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

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

HON, E. H. Eletronic evaluation of the fetal heart rate. **American Journal Obstet & Gynecology**. v. 83, n. 3, p. 333 -353, 1962.

HON, E. H.; BRADFIELD, A. H.; HESS, O. W. The electronic evaluation of the fetal heart rate. **American Journal Obstet & Gynecology**, v. 82, n. 2, p.291-300, 1961.

IKEDA, T.; MURATA, Y.; QUILLIGAN, E. J.; PARER, J. T.; THEUNISSEN, I. M.; CIFUENTES, P.; DOI, S.; PARK, S. D. Fetal heart rate patterns in postasphyxiated fetal lambs with brain damage. **American Journal Obstetric and Gynecology**, v. 179, n. 5, p. 1329-1337, 1998.

JONKER, F. H.; TAVERNE, M. A. M.; WEYDEN, G. C. Cardiography in cows: A method for monitoring calves during delivery. **Theriogenology**, v. 31, n. 2, p. 425-436, 1989.

JONKER, F. H.; VAN GEIJN, H. P.; CHAN, W. W.; RAUSH, W. D.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; TAVERNE, M. A. M. Characteristics of fetal heart rate changes during the expulsive stage of bovine parturition in relation to fetal outcome. **American Journal Veterinary Research**, v. 57, n. 9, p. 1373-1381, 1996.

JONKER, F. H.; VAN OORD, H. A.; VAN GEIJN, H. P.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; TAVERNE, M. A. Feasibility of continuous recording of fetal heart rate in the near term bovine fetus by means of transabdominal Doppler. **The Veterinary Quarterly**, v. 16, n. 3, p. 165-168, 1994.

JONKER, F. H.; WEYDEN, G. C. ;TAVERNE, M. A. M. Fetal heart rate patterns and influence of myometrial activity during the last month of gestation in cows. **American Journal Veterinary Research**, v. 54, n. 1, p. 158-161, 1993.

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

KOHAN-GHADR, H. R.; LEFEBVRE, R. C.; FECTEAU, G.; SMITH, L. C.; MURPHY, B. D.; SUZUKI JUNIOR, J.; GIRARD, C.; HÉLIE, P. Ultrasonographic and histological

characterization of the placenta of somatic nuclear transfer-derived pregnancies in dairy cattle, **Theriogenology**, v. 69, p. 218-230, 2008.

KOMNINOU, E. R **Contribuição ao estudo da hematologia de bezerros da raça nelore, originados por meio da técnica de transferência nuclear de célula somática (TNCS) – Clonagem**. 2008.145 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

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

KÜNDIG, H.; THUN, R.; ZEROBIN, K.; BACHMANN, B. The uterine motility of cattle during late pregnancy, labor and puerperium. I. Spontaneous motility. **Schweiz Arch Tierheilkd**, v. 132, n. 2, p. 77-84, 1990.

LACERDA, P. M. O. **Aspectos estereológicos do vilos coriônicos da placenta de bovinos clonados**. 2006.77 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

LEE, C. Y.; DI LORETO, P. C.; LOGRAND, B.; et al. Fetal activity acceleration determination for the evaluation of fetal reserve. **Obstetrics and Gynecology**, v. 48, n. 1, p. 19-26, 1976.

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

LUZ, N. P.; LIMA, C. P.; LUZ, S. H.; FELDENS, V. L.; et al. Auditory evoked responses of the human fetus. I. Behavior during progress of labor. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 59, n. 5, p. 395-404, 1980.

MASCARO, M. S.; CALDERON, I. M. P.; MAESTÁ, R. A. A. C.; BOSSOLAN, G.; RUDGE, M. V. C. Cardiotocografia anteparto e prognóstico perinatal em gestações complicadas pelo diabetes: influência do controle metabólico materno. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 24, n. 9, 2002.

MENDENHALL, H. W.; O'LEARY, J.A.; PHILLIPS, K. O.; et al. The nonstress test: the value of a single acceleration in evaluating the fetus at risk. **American Journal Obstetric and Gynecology**, v. 136, n. 1, p. 87-91, 1980.

NOMURA, R. M. Y.; FRANCISCO, R. P. V.; MIYADAHIRA, S.; ZUGAIB, M., Modelo matemático para predição da acidose metabólica no nascimento em gestações com diástole zero ou reversa. **Revista Brasileira Ginecologia e Obstetrícia**, v. 24, n. 4, p. 261-269, 2002.

NOMURA, R. M. Y.; FRANCISCO, R. P. V.; STEINMAN, D. S.; MIYADAHIRA, S.; ZUGAIB, M. Análise computadorizada da cardiotocografia anteparto em gestações de alto risco. **Revista Brasileira Ginecologia e Obstetrícia**, v. 24, n. 1, p. 29-36, 2002.

PALOMÄKI, O.; LUUKKAALA, T.; LUOTO, R.; TUIMALA, R. Intrapartum cardiotocography-dilemma of interpretational variation. **Journal Perinatology Medicine**, v. 34, n. 4, p. 298-302, 2006.

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

PHELAN, J. P. The nonstress test: a review of 3,000 test. . **American Journal Obstetric and Gynecology**, v. 139, n. 1, p. 7-10, 1981.

RAYBURN, W.F.; DUHRING, J. L.; DONALDSON, M.; et al. A study of fetal acceleration tests. **American Journal Obstetric and Gynecology**, v. 132, n. 1, p. 33-35, 1978.

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

ROMANO, M.; BRACALE, M.; CESARELLI, M.; CAMPANILE, M.; BIFULCO, P.; DE FALCO, M.; SANSONE, M.; DI LIETO, A. Antepartum cardiotocography: A study of fetal reactivity in frequency domain. **Computers in Biology and Medicine**, v. 36, p. 619-633, 2006.

SCHNIEKE, A. E.; KIND, A. J.; RITCHIE, W. A.; MYCOCK, K.; SCOTT, A. R.; RITCHIE, M.; WILMUT, I.; COLMAN, A.; CAMPBELL, K. H. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. **Science**, v. 278, p. 2130-2133, 1997.

SIEGEL, S. **Estatística não-paramétrica: para as ciências do comportamento**. São Paulo: McGraw Hill, 1975.

SMITH, B. P. **Tratado de medicina interna de grandes animais**. 3. ed., São Paulo: Manole, 2006, p. 263.

SOUZA, A. C. **Cardiotocografia estimulada em gestações de baixo risco: estudo comparativo da resposta cardíaca fetal à estimulação vibratória e sônica**. 2006, 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

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

WELLS, D. N.; FORSYTH, J. T.; McMILLAN V, et al. The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. Cloned cattle and their offspring. **Cloning and Stem Cells**, v. 6, p. 101-110, 2004.

WELLS, D. N.; MISCA, P. M.; DAY, A. M.; TERVIT, H. R. Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: a comparison between in vivo-and-in vitro-matured cytoplasts. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 385-393, 1997.

YAMAMOTO, R. M.; FRANCISCO, R. P. V.; MIYADAHIRA, S.; NETO, J. D. B.; ZUGAIB, M. Avaliação da vitalidade fetal em gestantes diabéticas: análise dos resultados neonatais. **Revista Brasileira Ginecologia e Obstetricia**, v. 22, n. 9, p. 557-566, 2000.

ZUGAIB, M.; FORSYTHE, A. B.; NUWAYHID, B., et al., Mechanisms of beat-to-beat variability in the heart rate of the neonate lamb. II. Effects of hypoxia. **American Journal Obstetrics Gynecology**, v. 138, p. 453-458, 1980.

ZUGAIB, M.; BEHLE, I. **Monitoração fetal eletrônica**. São Paulo: Roca, 1981. 36 p.

ZUGAIB, M.; BITTAR R. E. **Protocolos assistenciais: clínica obstétrica da Faculdade de Medicina da USP** 2. ed., São Paulo: Atheneu, 2003. p. 54-68.

ZUGAIB, M.; MIYADAHIRA, S.; NOMURA, R. M. Y.; FRANCISCO, R. P. V. **Vitalidade Fetal- Propedêutica e avaliação**. São Paulo: Atheneu, 2000, p. 9-15, 85-116.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Tabela 8 - Parâmetros Cardiotocográficos de bezerros obtidos pela técnica de clonagem - vaca receptora 7088 (GRUPO CLONE MORTO) - feto A

Data	dias antes parto	Linha base (bpm)	variabilidade	Aceleração Transitória	Desaceleração	Classificação segundo Índice cardiotocométrico
23/nov/07	90	125	5	7	0	ativo
20/dez/07	60	115	5	3	0	ativo
22/jan/08	30	115	10	3	0	ativo
29/jan/08	15	100	5	3	0	ativo
4/fev/08	7	100	5	1	0	ativo
5/fev/08	6	95	5	2	0	ativo
6/fev/08	5	90	10	5	0	ativo
7/fev/08	4	90	5	4	0	ativo
8/fev/08	3	100	5	0	0	Hipoativo não reativo
10/fev/08- 8h34 min	1	110	5	6	0	ativo
10/fev/08 -18h12 min	1	150	5	0	1	inativo
10/fev/08 -20h40min	1	100	5	1	0	ativo
10/fev/08 -23h27 min	1	100	5	1	0	ativo
11/fev/08 - 12h36 min	dia do parto	100	5	0	0	Hipoativo não reativo

APÊNDICE B - Tabela 9 - Parâmetros Cardiotocográficos de bezerros obtidos pela técnica de clonagem - vaca receptora 6180 (GRUPO CLONE MORTO) - feto B

data	dias antes parto	Linha base (bpm)	variabilidade	Aceleração Transitória	Desaceleração	Classificação segundo Índice cardiotocométrico
4/fev/08	90	140	5	0	0	Hipoativo não reativo
28/fev/08	60	125	<5	5	0	ativo
24/mar/08	30	120	10	1	0	ativo
7/abr/08	15	90	<5	2	0	ativo
12abr/08	4	110	<5	3	0	ativo
13/abr/08	3	105 com mudança LB 130	10	5	0	ativo
14/abr/08	2	85	10	2	0	ativo
15/abr/08 - 11h01min	1	160	10	0	0	hipoativo
15/abr/08 - 15h02min	1	110	<5	0	0	Hipoativo não reativo
15/abr/08 - 22h48min	1	110	5	0	0	Hipoativo reativo
16/abr/08 - 4h27min	dia do parto	120	<5	2	0	ativo
16/abr/08 - 12h07min	dia do parto	110	5	2	0	ativo

APÊNDICE C - Tabela 10 - Parâmetros Cardiotocográficos de bezerros obtidos pela técnica de clonagem - vaca receptora 5944 (GRUPO CLONE MORTO) - feto C

Data	dias antes parto	Linha base (bpm)	variabilidade	Aceleração Transitória	Desaceleração	Classificação segundo Índice cardiotocométrico
22/jan/08	90	125	5	0	0	Hipoativo não reativo
28/fev/08	60	115	5	0	0	Hipoativo não reativo
24/mar/08	30	95	5	3	0	ativo
7/abr/08	15	85	5	1	0	ativo
12/abr/08	4	80	<5	2	0	hipoativo
13/abr/08	3	80	<5	3	0	hipoativo
14/abr/08	2	80	5	0	0	Hipoativo não reativo
15/abr/08 - 10h23 min	1	85	5	0	0	Hipoativo não reativo
15/abr/08 - 23h38min	1	150 mudança LB 90	10	0	0	hipoativo
16/abr/08 - 5h05min	dia do parto	90	<5	0	0	Hipoativo não reativo
16/abr/08 - 11h24min	dia do parto	80	<5	0	0	Hipoativo não reativo

APÊNDICE D - Tabela 11 - Parâmetros Cardiotocográficos de bezerros obtidos pela técnica de clonagem - vaca receptora 5483. (GRUPO CLONE MORTO) - feto E

data	dias antes parto	Linha base (bpm)	variabilidade	Aceleração Transitória	Desaceleração	Classificação segundo Índice cardiotocométrico
07/abr/08	90	120	<5	0	0	Hipoativo não reativo
23/abr/08	60	125	<5	2	0	ativo
23/mai/08	30	110	10	0	0	Hipoativo não reativo
09/jun/08	6	105	<5	2	0	ativo
10/jun/08	5	110	5	0	0	Hipoativo não reativo
11/jun/08	4	115	5	0	0	Hipoativo não reativo
12/jun/08	3	120 mudança LB 130	5	0	0	Hipoativo não reativo
13/jun/08	2	100	5	1	0	ativo
14/jun/08	1	150	10	0	0	Hipoativo não reativo
15/jun/08	dia do parto	125	5	0	0	Hipoativo não reativo

APÊNDICE E - Tabela 12 - Parâmetros Cardiotocográficos de bezerros obtidos pela técnica de clonagem - vaca receptora 5498. (GRUPO CLONE MORTO) - feto F

data	dias antes parto	Linha base (bpm)	variabilidade	Aceleração Transitória	Desaceleração	Classificação segundo Índice cardiotocométrico
14/abr/08	90	125	5	5	0	ativo
23/abr/08	60	120	10	0	0	Hipoativo não reativo
23/mai/08	30	120	5	0	0	ativo
01/jun/08	15	120	<5	2	0	ativo
08/jun/08	7	120	10	0	1	hipoativo
10/jun/08	5	120	<5	1	0	ativo
11/jun/08	4	105	<5	2	0	ativo
12/jun/08	3	130	5	3	0	ativo
13/jun/08	2	100	5	1	0	ativo
14/jun/08	1	115	<5	2	0	ativo
15/jun/08- 1h20min	dia do parto	135	<5	0	0	Hipoativo não reativo
15/jun/08- 9h14min	Dia do parto	115	5	0	0	Hipoativo não reativo

APÊNDICE F - Tabela 13 - Parâmetros Cardiotocográficos de bezerros obtidos pela técnica de clonagem - vaca receptora 09 (GRUPO CLONE VIVO) - feto G

data	dias antes parto	Linha base (bpm)	variabilidade	Aceleração Transitória	Desaceleração	Classificação segundo Índice cardiotocométrico
15/fev/09	7	105 mucança LB 115	5	1	0	ativo
16/fev/09	6	100	10	4	0	ativo
17/fev/09	5	95	5	4	0	ativo
18/fev/09	4	115	10	4	0	ativo
19/fev/09	3	100	10	1/2AP	0	ativo
20/fev/09 – 8h56min	2	110	10	0	1	Hipoativo não reativo
20/fev/09 – 16h29min	2	100	5	1	0	ativo
21/fev/09 – 7h42min	1	115	10	7	0	ativo
21/fev/09 – 18h51min	1	100	10	2	0	ativo
22/fev/09	dia do parto	100	10	1	0	ativo

APÊNDICE G - Tabela 14 - Parâmetros Cardiotocográficos de bezerros obtidos pela técnica de clonagem - vaca receptora 222. (GRUPO CLONE VIVO) - feto H

data	dias antes parto	Linha base (bpm)	variabilidade	Aceleração Transitória	Desaceleração	Classificação segundo Índice cardiotocométrico
09/fev/09	60	105	5	2	0	Hipoativo reativo
04/mar/09	30	100	5	5	0	ativo
18/mar/09	15	100	5	10	0	Ativo com diminuição de variabilidade reativo após estimulação
23/mar/09	7	100	5	1/1 AP	0	ativo
24/mar/09	6	90	5	1 AP	0	Hipoativo reativo
25/mar/09	5	100	5	6	0	ativo
26/mar/09	4	85	5	3	0	ativo
27/mar/09	3	95	5	4/1AP	0	ativo
28/mar/09	2	90	5	4	0	ativo
29/mar/09	1	105/ taquicardia 195	10	2/1AP	0	ativo
30/mar/09	Dia do parto	100	10	0	0	Hipoativo não reativo

APÊNDICE H - Tabela 15 - Parâmetros Cardiotocográficos de bezerros obtidos pela técnica de clonagem - vaca receptora 130. (GRUPO CLONE VIVO) - feto I

data	dias antes parto	Linha base (bpm)	variabilidade	Aceleração Transitória	Desaceleração	Classificação segundo Índice cardiotocométrico
09/fev/09	60	120	5	11	0	ativo
04/mar/09	30	120	5	11	0	ativo
18/mar/09	15	150	5	7	0	ativo
23/mar/09	7	110	10	1	0	ativo
24/mar/09	6	115	10	8	0	ativo
25/mar/09	5	110	10	3	0	ativo
26/mar/09	4	105	10	2	0	ativo
27/mar/09	3	110	5	3	0	ativo
28/mar/09	2	100	10	3/1AP	0	ativo
29/mar/09	1	120	5	6	0	ativo
30/mar/09	Dia do parto	110	15	0	0	Hipoativo não reativo

APÊNDICE I - Tabela 16 - Parâmetros Cardiotocográficos de bezerros obtidos pela técnica de clonagem - vaca receptora 223 (GRUPO CLONE VIVO) - feto J

data	dias antes parto	Linha base (bpm)	variabilidade	Aceleração Transitória	Desaceleração	Classificação segundo Índice cardiotocométrico
16/fev/09	60	115	10	1/1AP	0	ativo
04/mar/09	30	125	10	4	0	ativo
18/mar/09	15	120	10	2/2AP	0	ativo
29/mar/09	2	120	10	6	0	ativo
30/mar/09 -6h17min	1	100	10	4	0	ativo
30/mar/09- 21h01min	1	120	10	4	1	ativo
31/mar/09	Dia do parto	100	10	0	0	Hipoativo não reativo

APÊNDICE J - Tabela 17 - Parâmetros Cardiotocográficos de bezerros obtidos por Inseminação Artificial - vaca Luana (GRUPO CONTROLE) - feto I

data	dias antes parto	Linha base (bpm)	variabilidade	Aceleração Transitória	Desaceleração	Classificação segundo Índice cardiotocométrico
4/out/07	90	130	5	1	0	ativo
19/out/07	90	135	5	1	0	ativo
30/out/07	60	130	5	4	0	ativo
2/nov/07	60	130	5	3	0	ativo
30/nov/07	30	120	<5	2	0	ativo
		110/				
		taquicardia				
15/dez/07	15	240	10	0	0	hipoativo
23/dez/07	4	115	<5	0	0	Hipoativo não reativo
25/dez/07	2	115	5	0	0	Hipoativo reativo
26/dez/07	1	120	5	2	0	ativo
27/dez/07	dia do parto	120	5	0	0	hipoativo

APÊNDICE K - Tabela 18 - Parâmetros Cardiotocográficos de bezerros obtidos por Inseminação Artificial - vaca Amanhã (GRUPO CONTROLE) -fetoll

data	dias antes parto	Linha base (bpm)	variabilidade	Aceleração Transitória	Desaceleração	Classificação segundo Índice cardiotocométrico
11/ago/07	60	115	5	1	0	ativo
13/ago/07	60	120	5	aceleração prolongada	0	ativo
21/ago/07	30	115	5	0	0	hipoativo
3/set/07	21	115	5	2	0	Hipoativo reativo
6/set/07	18	110	<5	1	0	ativo
7/set/07	17	110	<5	2	0	ativo
10/set/07	15	110	5	aceleração prolongada	0	ativo
17/set/07	7	105	<5	2	0	ativo
18/set/07	6	100	5	0	0	hipoativo
19/set/07	5	105	<5	0	0	hipoativo
20/set/07	4	100	5	4	0	ativo
21/set/07	3	105	5	0	0	hipoativo
22/set/07	2	105	5	1	0	ativo
24/set/07	dia do parto	105	5	1	0	ativo

APÊNDICE L - Tabela 19 - Parâmetros Cardiotocográficos de bezerros obtidos por Inseminação Artificial - vaca Pérola (GRUPO CONTROLE) - feto III

data	dias antes parto	Linha base (bpm)	variabilidade	Aceleração Transitória	Desaceleração	Classificação segundo Índice cardiotocométrico
11/jan/08	90	130	5	3	0	ativo
15/fev/08	60	120	<5	2	0	ativo
10/mar/08	30	120	<5	1	0	ativo
27/mar/08	15	110	<5	3	0	ativo
4/abr/08	7	105	<5	0	0	hipoativo
5/abr/08	6	105	<5	3	0	ativo
6/abr/08	5	110	<5	0	0	hipoativo
7/abr/08 - 18h01min	4	110	<5	3	0	ativo
8/abr/08	3	110	5	3	0	ativo
9/abr/08	2	105	<5	3	0	hipoativo reativo
10/abr/08	1	110	<5	1	0	ativo
11/abr/08 - 16h06min	dia do parto	110	5	4	0	ativo

APÊNDICE M - Tabela 20 - Parâmetros Cardiotocográficos de bezerros obtidos por Inseminação Artificial - vaca Magali 220 (GRUPO CONTROLE) - feto IV

data	dias antes parto	Linha base (bpm)	variabilidade	Aceleração Transitória	Desaceleração	Classificação segundo Índice cardiotocométrico
07/mai/08	90	140	5	2	0	ativo
15/mai/08	60	130	5	1	0	ativo
16/jun/08	30	130	5	6	0	ativo
25/jun/08	15	125	5	10	0	ativo
16/jul/08	7	110	5	4	0	ativo
17/jul/08	6	110	5	7	0	ativo
18/jul/08	5	120	5	11	0	ativo
19/jul/08	4	120	10	2	0	ativo
20/jul/08	3	120	5	8	0	ativo
21/jul/08	2	130	10	1	0	ativo
22/jul/08	1	120	5	4	0	ativo
23/jul/08	dia do parto	120	5	3	0	ativo