

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

ADRIELLE LEVATTI

**Alterações bioquímicas e gasométricas no sangue e fluido
alantoideano de receptoras de embriões bovinos clonados a partir
do dia 150 da gestação**

Pirassununga
2022

ADRIELLE LEVATTI

Alterações bioquímicas e gasométricas no sangue e fluido alantoideano de receptoras de embriões bovinos clonados a partir do dia 150 da gestação

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências no programa de Pós-graduação em Biociência Animal.

Àrea de Concentração: Biociência Animal

Orientador: Prof. Dr. Luciano Andrade Silva

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L656a Levatti, Adrielle
Alterações bioquímicas e gasométricas no sangue e fluido alantoideano de receptoras de embriões bovinos clonados a partir do dia 150 da gestação / Adrielle Levatti ; orientador Luciano Andrade Silva. -- Pirassununga, 2022.
77 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Gestação bovina. 2. SCNT. 3. Alantoide. 4. Bioquímica. 5. Hemogasometria. I. Andrade Silva, Luciano, orient. II. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: Levatti, Adrielle

Título: Alterações bioquímicas e gasométricas no sangue e fluido alantoideano de receptoras de embriões bovinos clonados a partir do dia 150 da gestação.

Dissertação apresentada a Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biociência Animal.

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof.

Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.

Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.

Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

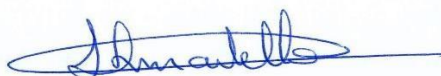
ATESTADO CEUA

ATESTADO CEUA

Pirassununga, 29 de junho de 2022.

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, no cumprimento de suas atribuições e em razão da sua solicitação, atesta:

A proposta de pesquisa intitulada "Alterações bioquímicas e gasométricas no sangue e fluido alantoideano de receptoras de embriões bovinos clonados por SCNT a partir do dia 150 da gestação", desenvolvida sob a responsabilidade de LUCIANO ANDRADE SILVA utilizou-se do banco de amostras e imagens do Laboratório de Teriogenologia Dr. O. J. Ginther – ZMV – FZEA – USP e está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo nessa data, mediante declaração do responsável pela pesquisa de que o banco das amostras e imagens que foram utilizadas na sua proposta foram os mesmos previamente aprovados pela CEUA-FZEA sob os protocolos CEUA 2210140815 e 7715150216.



Profa. Dra. Luciane Silva Martello
Presidente da CPq FZEA/USP (1 fev/22 – 31 jan/24)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, pois sem ele nada disso teria sido possível. Dedico, também, aos meus pais Alexandre e Edinéia pelo apoio e amor incondicional que sempre me deram.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Deus, Nossa Senhora Aparecida e Santa Terezinha pela vida, pela oportunidade e por sempre me guiarem nas escolhas.

Agradeço aos meus pais, Alexandre e Edinéia, pela paciência e dedicação que sempre tiveram comigo.

Ao meu orientador, professor Luciano, pela orientação, amizade e conhecimentos compartilhados nesses anos em que trabalhamos juntos.

Ao meu namorado, Fabricio, por todo amor, paciência e companheirismo durante esta trajetória.

Aos meus irmãos, Aline e Alex, por toda parceria e amor.

Às minhas sobrinhas, Helena e Maria Laura, por toda a alegria e amor.

Aos amigos, alguns mesmo distantes que se fizeram presentes, gratidão pela amizade.

À FZEA/USP pela oportunidade de fazer parte dessa universidade.

Aos membros da banca por terem aceitado o convite para compor a banca de defesa.

Ao Tiago Henrique Camara De Bem, Juliano Sangalli e Rafael Vilar Sampaio pela assistência no laboratório de clonagem.

RESUMO

LEVATTI, A. **Alterações bioquímicas e gasométricas no sangue e fluido alantoideano de receptoras de embriões bovinos clonados a partir do dia 150 da gestação.** 2022. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

A placenta é um órgão vital para a gestação dos mamíferos. Tem como funções principais o transporte de nutrientes e gases, remoção de detritos metabólicos, secreção endócrina de hormônios e regulação do ambiente uterino, além de conferir proteção ao feto durante toda a gestação. No entanto, existem alterações do desenvolvimento placentário que podem interferir ou repercutir negativamente na gestação, como é o caso das alterações morfológicas frequentemente observadas em placentas de gestações de bovinos clonados por transferência nuclear de células somáticas (SCNT). O feto inicia sua fase de intenso crescimento no último trimestre e o complexo útero-placentário é severamente desafiado para suprir as demandas de troca de gases e nutrientes. Com base no exposto, o **capítulo 1** deste trabalho revisa os aspectos sobre a placentação em vacas e suas trocas gasosas, clonagem por SCNT e testes laboratoriais para parâmetros das funções hepática, renal, muscular, lipídica, além de minerais, eletrólitos e açúcares. Juntamente com estes parâmetros, componentes referentes ao equilíbrio ácido-base, hematócrito e hemoglobina também foram revisados. O **capítulo 2** apresenta um artigo científico cuja hipótese central é de que as alterações gestacionais em gestações complicadas podem ser previstas ou detectadas anteriormente por ensaios bioquímicos e/ou análises gasométricas em sangue materno e/ou fluido alantoideano. Vinte e duas vacas Nelore foram utilizadas para coleta de sangue e fluido alantoideano quinzenalmente a partir de 150 dias de gestação até o parto ou aborto. Os dados de cada vaca foram normalizados para o dia de nascimento ou aborto. Três quinzenas antes desses eventos foram utilizadas para todas as análises. Uma descrição abrangente de valores de referência para vários parâmetros bioquímicos e de gases no sangue usando amostras de soro e sangue total, e alguns parâmetros de gasometria no líquido alantoideano de gestações produzidas naturalmente (controle; n = 6) e clone SCNT (clone; n = 16) foi o resultado mais importante deste estudo.

Além disso, esses parâmetros foram estudados em vacas prenhes experimentando parto (controle, n = 3 e clone, n = 8) e abortamento (controle, n = 3 e clones, n = 8). O único parâmetro estudado capaz de ser usado como preditor de abortamento foi o colesterol para gestações de clones. Os níveis de colesterol estavam elevados duas e três semanas antes do abortamento nessas vacas prenhes. Os níveis circulantes de potássio, fósforo, cálcio, glicose e ureia apresentaram níveis distintos entre gestações de fetos produzidos naturalmente e pela clonagem por SCNT, indicando um metabolismo diferente entre esses dois grupos de gestações. Infelizmente, amostras de fluido alantoide não puderam ser analisadas pelos ensaios bioquímicos devido à problemas de leitura de amostras. Apenas os parâmetros pH, pO₂ e pCO₂ apresentam resultados de dados adequados quando analisados pelo equipamento gasométrico portátil.

Palavras-chave: Gestação bovina; SCNT; Alantoide; Bioquímica; Hemogasometria.

ABSTRACT

LEVATTI, A. **Biochemical and gasometric changes in the blood and allantoic fluid of cloned bovine embryo recipients after day 150 of gestation.** 2022. 77 p. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

The placenta is a vital organ for mammalian pregnancy. Its functions are the transport of nutrients and gases, removal of metabolic waste, endocrine secretion of hormones, and regulation of the uterine environment, in addition to conferring fetal protection throughout pregnancy. However, changes in placenta during its development can interfere or negatively affect the pregnancy, as the morphological changes frequently observed in placentas of bovine pregnancies of clones by somatic cell nuclear transfer (SCNT). In addition, the fetus begins its intense growth phase in the last trimester and the uteroplacental complex is severely challenged to meet the demands of gas and nutrient exchange. Based on that, **chapter 1** of this work reviews the aspects of placentation in cows and their gas exchange, SCNT cloning, and laboratory parameters of liver, kidney, muscle, lipid functions, in addition to minerals, electrolytes and sugars. Along with these parameters, other related to acid-base balance, hematocrit and hemoglobin were also reviewed. **Chapter 2** presents a scientific article whose central hypothesis was that gestational changes in complicated pregnancies can be predicted or detected earlier by biochemical assays and/or blood gas analysis in maternal blood and/or allantoic fluid. Twenty-two Nelore cows were used for blood and allantoic fluid collection fortnightly from 150 days of gestation until parturition or abortion. Data for each cow was normalized to the day of birth or abortion. Three fortnights before these events were used for all analyses. A comprehensive description of reference values for various biochemical and blood gas parameters using serum and whole blood samples, and some allantoic fluid blood gas parameters from naturally produced (control; n = 6) and SCNT clone (clone; n) pregnancies = 16) pregnancies was the most important result of this study. In addition, these parameters were studied in pregnant cows experiencing parturition (control, n = 3 and clone, n = 8) and abortion (control, n = 3 and clones, n = 8). The only parameter studied capable of being used as a predictor of abortion was cholesterol for clone pregnancies. Cholesterol levels were elevated two and three

weeks before abortion in these pregnant cows. The circulating levels of potassium, phosphorus, calcium, glucose and urea showed different levels between pregnancies of fetuses produced naturally and by SCNT cloning, indicating a different metabolism between these two groups of pregnancies. Unfortunately, allantoic fluid samples could not be analyzed by biochemical assays due to sample reading problems. Only the pH, pO₂ and pCO₂ parameters present adequate data results when analyzed by the portable gasometric equipment

Keywords: Bovine pregnancy; SCNT; Allantois; Biochemistry; Blood gas analysis

LISTA DE FIGURAS

- Figure 1.** List of end-points evaluated by laboratory biochemical analyzer and by portable blood gasometer using serum, blood, and allantois samples from pregnant cows. The evaluated end-points are presented based on their biological functions.....52
- Figure 2.** Experimental number of the experimental groups and gestational date of each cow when the events birth or abortion had occurred... ..55
- Figure 3.** Means \pm SEM for potassium, phosphor, magnesium, total calcium, ionized calcium, glucose, urea, and cholesterol analyzed by biochemistry assays and portable hemogasometry, respectively from blood serum and total blood of pregnant cows during the three fortnights before natural birth or abortion. Group control refers to pregnancies by IA (N=6; 3 births and 3 abortions) and group clone refers to pregnancies by ET of SCNT embryos (N=16; 8 births and 8 abortions). The main effects of group (subgroup), fortnight and its interaction are shown for each end-point. The squares indicate differences between means between fortnights in the same group ($P < 0.05$).....60

LISTA DE TABELAS

Table 1. Mean \pm SEM of electrolytes and minerals end-points analyzed by biochemistry assays and portable hemogasometry respectively from blood serum and total blood of pregnant cows during the three fortnights before natural birth or abortion. Group control refers to pregnancies by IA (N=6; 3 births and 3 abortions) and group clone refers to pregnancies by ET of SCNT embryos (N=16; 8 births and 8 abortions).....57

Table 2. Mean \pm SEM of liver function end-points analyzed by biochemistry assays and portable hemogasometry respectively from blood serum and total blood of pregnant cows during the three fortnights before natural birth or abortion. Group control refers to pregnancies by IA (N=6; 3 births and 3 abortions) and group clone refers to pregnancies by ET of SCNT embryos (N=16; 8 births and 8 abortions).....59

Table 3. Mean \pm SEM of kidney, muscle, lipid function, and other end-points analyzed by biochemistry assays and portable hemogasometry respectively from blood serum and total blood of pregnant cows during the three fortnights before natural birth or abortion. Group control refers to pregnancies by IA (N=6; 3 births and 3 abortions) and group clone refers to pregnancies by ET of SCNT embryos (N=16; 8 births and 8 abortions).....62

Table 4. Mean \pm SEM of acid-base status and blood components end-points analyzed by biochemistry assays and portable hemogasometry respectively from blood serum and total blood of pregnant cows during the three fortnights before natural birth or abortion. Group control refers to pregnancies by IA (N=6; 3 births and 3 abortions) and group clone refers to pregnancies by ET of SCNT embryos (N=16; 8 births and 8 abortions).....63

Table 5. Mean \pm SEM of acid-base status end-points analyzed by portable hemogasometry from allantois fluid of pregnant cows during the three fortnights before natural birth or abortion. Group control refers to pregnancies by IA (N=6; 3 births and 3 abortions) and group clone refers to pregnancies by ET of SCNT embryos (N=16; 8 births and 8 abortions).....64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µmol/L	Micromol por litro
ADP	Difosfato de adenosina
AGV's	Ácidos graxos voláteis
AI	Artificial insemination
ALP	Alanina aminotransferase
AMP	Monofosfato de adenosina
AST	Aspartato amino transferase
ATP	Trifosfato de adenosina
BE	Excesso de base
BSA	Albumina sérica bovina
Ca	Cálcio
CK	Creatinina quinase
Cl	Cloro
CL	Corpus luteum
Cm	Centimeters
CO ₂	Dióxido de carbono
COC	Cumulus oocyte complex
CONCEA	National Council for the Control of Animal Experimentation
D	Dias
D0	Day 0
D10	Day 10
D8	Day 8
D9	Day 9
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPM	Erro padrão da média
ET	Embryo transfer
FTET	Fixed-time embryo transfer
FZEA	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
G	Gauge
g	Gramma
g/dL	Gramma por decilitro
g/L	Gramma por litro
GGT	Gamaglutamiltransferase
h	Hour
H ₂ O	Água
H ₂ CO ₃	Ácido carbônico
HCO ₃	Bicarbonato
HDL	High density lipoproteins
IM	Intramuscular
IVM	In vitro maturation
K	Potássio
L	Litros
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Low density lipoproteins
mEq/L	Miliequivalentes por litro

Mg	Magnésio
Mg	Miligrama
Mg.mL	Miligrama por mililitro
Mg/dL	Miligrama por decilitro
Mg/kg	Miligrama por quilograma
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercúrio
mmol/L	Milimol por litro
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
Na	Sódio
P	Fósforo
P4	Progesterone
pCO₂	Pressão parcial de dióxido de carbono
PGF2α	Prostaglandin F2 α
pH	Potencial hidrogeniônico
PIV	Produção in vitro
pO₂	Pressão parcial de oxigênio
PPT	Proteínas plasmáticas totais
SNCT	Somatic cell nuclear transfer
SO₂	Grau de saturação da hemoglobina pelo oxigênio
tCO₂	Teor de dióxido de carbono
TE	Transferência de embrião
U/L	Unidade por litro
USA	United States of America
USP	Universidade de São Paulo
VLDL	Very low density lipoprotein

Sumário

INTRODUÇÃO	16
HIPÓTESES	16
CAPÍTULO 1	
1. REVISÃO DE LITERATURA	18
1.1. PLACENTA DE RUMINANTES	18
1.2. TROCAS GASOSAS NA PLACENTA	19
1.3. CLONAGEM POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS	20
1.4. ELETRÓLITOS.....	22
1.4.1. Sódio	22
1.4.2. Potássio.....	23
1.4.3. Cloro.....	24
1.5. MINERAIS	24
1.5.1. Cálcio	24
1.5.2. Fósforo	25
1.5.3. Magnésio	26
1.6. AÇÚCARES	27
1.6.1. Glicose	27
1.6.2. Frutosamina.....	28
1.7. FUNÇÃO RENAL	29
1.7.1. Ureia.....	29
1.7.2. Creatinina	30
1.8. FUNÇÃO MUSCULAR	30
1.8.1. CK	30
1.9. FUNÇÃO LIPÍDICA.....	31
1.9.1. Colesterol	31
1.9.2. Triglicérides	32
1.9.3. Lipoproteínas.....	32
1.10. FUNÇÃO HEPÁTICA.....	32
1.10.1. Proteínas plasmáticas totais	32
1.10.2. Bilirrubina	34
1.10.3. AST	34
1.10.4. GGT.....	35
1.10.5. LDH	35
1.11. COMPONENTES SANGUÍNEOS	35
1.12. COMPONENTES GASOMÉTRICOS E EQUILÍBRIO ÁCIDO-BASE DO SANGUE	36

1.12.1. pO ₂ e pCO ₂	37
1.12.2. TCO ₂	37
REFERÊNCIAS.....	38

CAPÍTULO 2 - BIOCHEMICAL CHANGES IN BLOOD AND ALLANTOIC FLUID DURING THE END OF THE PREGNANCY OF CLONED EMBRYOS BY SCNT IN NELLORE COWS

ABSTRACT.....	45
2.1. INTRODUCTION	46
2.2. MATERIAL AND METHODS.....	48
2.2.1. ANIMALS.....	48
2.2.2. Production of cloned embryos by somatic cell nuclear transfer (SCNT) and transfer to recipient cows.	48
2.2.3. Synchronization of estrus and ovulation induction for fixed-time embryo transfer (FTET) and fixed-time artificial insemination (IATF).....	49
2.2.4. Allantoic fluid and blood samples collection	50
2.2.5. Biochemical and portable hemogasometric analysis.....	51
2.2.6. Data analysis	53
2.2.7. Statistical analysis	54
2.3. RESULTS.....	54
2.4. DISCUSSION	65
REFERENCES.....	72

CAPÍTULO 3

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
--------------------------------------	-----------

INTRODUÇÃO

Em 1997, o dogma de que células somáticas diferenciadas não conseguiam readquirir totipotência gerando um novo indivíduo foi rompido com o anúncio do nascimento do primeiro clone pela técnica de SCNT, a ovelha “Dolly” (WILMUT et al., 1997). Atualmente, o uso da técnica de clonagem por SCNT tem proporcionado grandes avanços em áreas relacionadas à conservação de espécies em extinção, aplicações biomédicas (IBTISHAM et al., 2017), reprodução de animais incapazes de produzirem seus próprios gametas, entre outros.

Apesar de tantos avanços na área de reprodução animal, sabe-se que prenhez de bovinos clonados por SCNT que sobrevivem do início até a metade da gestação apresentam grandes chances de serem complicadas durante o último trimestre de gestação. Síndrome “large offspring”, hidroalantose e placentomegalia são patologias frequentes. O feto inicia sua fase de intenso crescimento no último trimestre e o complexo útero-placentário é severamente desafiado para suprir as demandas de troca de gases e nutrientes. Os efeitos de alterações do desenvolvimento placentário se exacerbam durante este período.

Com base no exposto, este estudo visou identificar alterações bioquímicas e gasométricas no fluido alantoideano e sangue materno durante o período gestacional a partir do dia 150 da gestação em bovinos da raça Nelore, com embriões obtidos pela técnica de SCNT e produzidos *in vivo*. O modelo experimental utilizado com prenhez de clones produzidos por SCNT levou em consideração a maior chance de ocorrência de uma complicação durante a gestação. Os dados obtidos e comparados entre os grupos de animais podem ser úteis para desenvolver um protocolo de pesquisa em saúde gestacional aplicado não só à espécie bovina, mas também a outras espécies de mamíferos.

HIPÓTESES

- Análises bioquímicas e gasométricas do sangue materno e do fluido alantoideano são capazes de diagnosticar o status gestacional e de prever sua evolução.

- Prenhezes de embriões produzidos por SNCT apresentam alterações gasométricas e bioquímicas no sangue materno e fluido alantoideano.

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. PLACENTA DE RUMINANTES

A placenta é um órgão vital para a gestação dos mamíferos eutérios, sendo formada por membranas fetais e maternas (PETER, 2013; VEJLSTED, 2010). É um órgão transitório que tem como característica ser composta por células derivadas de dois indivíduos distintos (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004). Na placenta ocorre uma aposição de membranas fetais em fusão ou justapostas com o endométrio materno para promover as trocas entre o feto e a mãe (BROLIO et al., 2010). Tem como funções principais: a) a síntese e secreção endócrina de hormônios, tais como estradiol, lactogênio placentário, progesterona, gonadotrofinas coriônicas e glicoproteínas associadas à gestação (SENGER et al., 2003); b) transporte de nutrientes e gases (PRADO et al., 2015); c) remoção de detritos metabólicos; d) regulação do ambiente uterino-fetal (LANDIM-ALVARENGA, 2006); e) proteção mecânica ao feto durante toda a gestação. GUYTON E HALL (1997) afirmam que a placenta tem como função difundir alimentos da mãe para o sangue do feto, bem como a difusão de excretas do feto para a mãe.

Segundo Leiser e Kaufmann (1994) em ruminantes, a placenta é classificada como zonária cotiledonária devido ao padrão de suas vilosidades coriônicas. O útero apresenta em sua superfície estruturas denominadas carúnculas, que são espessamentos do tecido subepitelial materno, presentes mesmo em animais não prenhes. Durante a gestação estas carúnculas através de suas criptas endometriais se unem com as proliferações vilosas do córion (cotilédones) formando as áreas de conexão placentária denominadas placentônios. Os placentônios podem variar de 70 a 142 unidades dependendo da espécie de ruminante (LACERDA, 2006) e apresentam um formato convexo em bovinos (VEJLSTED, 2010). O sangue do feto e da mãe nunca entra em contato direto, entretanto, as duas circulações são muito próximas na união do endométrio com o córion para possibilitar a passagem de nutrientes e de oxigênio do sangue materno para o fetal e de resíduos na direção contrária (HAFEZ E HAFEZ, 2004).

Na fase inicial da gestação, a morfogênese da placenta está intimamente relacionada com as membranas extraembrionárias, que se diferenciam em saco vitelino, córion, alantoide e âmnio (HAFEZ E HAFEZ, 2004). Ao contrário de outras espécies, em ruminantes, o saco vitelino está presente apenas de forma transitória, degenerando logo após o início da implantação do embrião (VEJLSTED, 2010). No entanto, Assis-Neto et al. (2010) relatam que o saco vitelino desaparece completamente apenas com 50 a 70 dias após a inseminação. Durante uma gestação, a quantidade de fluidos presentes nas cavidades amniótica e alantoideana é rigorosamente regulada.

O córion é a membrana que está em contato com o epitélio uterino durante a gestação. Seu formato é o mesmo da matriz, ou seja, há uma invasão do córion no corpo e em ambos os cornos uterinos. No entanto, seu desenvolvimento é maior no corno gravídico do que no contralateral. Com a progressão da prenhez, o córion torna-se altamente vascularizado acompanhado de inúmeros vilos (LACERDA, 2006). Enquanto isso, o alantoide é contínuo com o desenvolvimento do sistema urogenital do embrião e atua como lugar para deposição de detritos (PETER, 2013). O líquido alantoideano, composto de urina hipotônica, é responsável pela manutenção da pressão osmótica do plasma fetal, a fim de se evitar a perda de líquido para a circulação materna. O alantoide tem como funções principais a justaposição íntima entre o alantocórion e o endométrio durante a fase inicial da união do embrião ao útero e o armazenamento dos produtos da excreção fetal que não são rapidamente transferidos de volta para a mãe. Segundo Batista et al. (2014) o volume de líquido alantoideano é maior no terço inicial e final de gestação, enquanto no terço médio há predominância do líquido amniótico. Drost et al. (2007) afirmam que o volume fisiológico do saco alantoide em bovinos é de aproximadamente 8 a 15L próximo ao parto.

A cavidade amniótica confere uma proteção mecânica ao feto, protegendo-o de pressões externas (CHAVATTE-PALMER e TARRADE, 2016), além de prevenir aderências entre a pele fetal e a membrana amniótica, colabora na dilatação da cérvix e age como lubrificante do canal do parto (HAFEZ E HAFEZ, 2004).

1.2. TROCAS GASOSAS NA PLACENTA

A placenta, além de outras funções, é responsável pelo transporte de gases (oxigênio, monóxido de carbono e dióxido de carbono). Esse transporte ocorre basicamente pelo mecanismo de difusão simples, o que não resulta em um gasto energético (MOORE e PERSAUD, 2008). As trocas gasosas acontecem, ao nível da circulação capilar das criptas e vilosidades nos placentônios (LANDIM-ALVARENGA, 2006). O sucesso do transporte de oxigênio do sangue da mãe para o feto é resultado de três características principais, que variam entre as espécies, sendo: a geometria do fluxo sanguíneo placentário, a pressão parcial de oxigênio e a afinidade e quantidade da hemoglobina fetal com o oxigênio. A diminuição de aporte de oxigênio afeta negativamente o crescimento e desenvolvimento fetal e quando ocorre de forma muito intensa pode levar o animal a óbito (PRADO et al., 2015).

Segundo Moore e Persaud (2008), a eficiência da membrana placentária é aproximadamente a do pulmão em relação às trocas gasosas, sendo a quantidade de oxigênio que chega ao feto controlada através do mecanismo de fluxo-limitação e não por difusão-limitação. Tal fato explica porque a hipóxia fetal ocorre devido a fatores que diminuem o fluxo de sangue uterino ou placentário. A diferença principal entre o pulmão e a placenta é que nela o sistema de troca que ocorre é de líquido para líquido, enquanto nos pulmões o sistema é de gás para líquido (HAFEZ E HAFEZ, 2004). As artérias umbilicais levam sangue não oxigenado do feto para a placenta, enquanto as veias umbilicais levam o sangue oxigenado em direção oposta. O dióxido de carbono passa livremente da circulação materna para a circulação fetal, sendo isso facilitado por mecanismos fisiológicos (HAFEZ E HAFEZ, 2004).

1.3. CLONAGEM POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS

A clonagem por transferência nuclear de células somáticas (SCNT) é uma técnica bem difundida entre os meios de pesquisa. Ela é utilizada para diferentes fins, ou seja, pode ser utilizada para a conservação de espécies em extinção, produção de animais transgênicos, aplicações biomédicas, entre outros (IBTISHAM et al., 2017) sendo esta, uma técnica voltada para animais com alto valor genético (VASCONCELOS, 2016). O desenvolvimento científico nas áreas de criobiologia e tecnologia reprodutiva geraram várias possibilidades para a preservação de germoplasma em animais de produção, tais como embriões, sêmen, fragmentos

testiculares e ovarianos, oócitos, células germinativas primordiais, células somáticas e células-tronco usadas na clonagem animal (WOELDERS et al., 2012). Resumidamente, a técnica de transferência nuclear (SCNT) envolve as seguintes etapas: obtenção das células doadoras de núcleo, obtenção de oócitos doadores de citoplasto, sincronização do ciclo celular, maturação in vitro, enucleação oocitária, introdução do núcleo doador no citoplasto, ativação do oócito reconstituído, cultivo in vitro e transferência dos embriões em receptoras (YAMAZAKI, 2006).

Apesar da técnica de clonagem estar bem difundida na área reprodutiva, sua eficiência ainda é baixa. Meirelles et al. (2010) afirmam que a taxa de viabilidade fetal decorrente da técnica de SCNT gira em torno de 7 a 10%. Wells et al. (1999); Merighe (2007) e Long et al. (2014) afirmam que a taxa de sobrevivência de descendentes viáveis resultantes da técnica de clonagem por SCNT varia entre 5 a 10% de nascidos vivos.

Durante a gestação de um animal clonado existem quatro períodos críticos depois da transferência de embriões (TE) relacionados às perdas gestacionais. O primeiro período ocorre até o dia 30, sendo que a taxa de sobrevivência é de aproximadamente 30% (MERIGHE, 2007). Essas perdas podem estar relacionadas com uma ineficiente sinalização do embrião para o reconhecimento materno da gestação, à falha do embrião na estimulação do remodelamento uterino e a aspectos imunológicos alterados. O segundo período crítico ocorre entre os dias 30 e 60 da gestação. Em torno de 40% dos conceptos que sobreviveram até o dia 30 morrerão neste pequeno período (MERIGHE, 2007) onde placentas hipoplásicas com cotilédones rudimentares são observadas (STICE et al., 1996; HILL et al., 2000; EDWARDS et al., 2003). O terceiro período crítico ocorre durante o segundo trimestre da gestação. Em torno de 50% das gestações são perdidas entre os dias 60 e 180 (MERIGHE, 2007). As placentas aparentam ser normais, mas o número de cotilédones é reduzido e o feto e camadas placentárias podem se apresentar espessos e edematosos.

O quarto e último período crítico corresponde ao último trimestre da gestação. Em torno de 25% das gestações que chegaram até o dia 180 serão perdidas antes da data prevista para o parto (MERIGHE, 2007). Hidroalantose, anasarca fetal, hipertrofia dos cotilédones e edema da área intercotiledonária são as afecções mais encontradas nesse período. O último trimestre gestacional é caracterizado por crescimento fetal intenso e paralelo aumento das trocas transplacentárias de

excreções, gases e nutrientes (REYNOLDS et al., 1986; REYNOLDS et al., 2006). Prenhez de animais clonados por SCNT que sobreviveram durante o início e meio da gestação são frequentemente complicadas durante o último trimestre. Síndrome “large offspring”, hidroalantose e placentomegalia são afecções frequentes (MIGLINO et al., 2007). O feto inicia sua fase de intenso crescimento no último trimestre e o complexo útero-placentário é severamente desafiado para suprir as demandas de troca de nutrientes e gases. Bertolini et al. (2004) indicaram que gestações de PIV, para sustentar conceptos maiores no segundo trimestre de gestação, necessitam de um aumento de duas a quatro vezes nas concentrações de glicose e frutose no plasma fetal e seus respectivos fluidos (âmnio e alantoide), quando comparados com gestações normais. Tal fato pode ser encontrado com certa frequência em placentas de animais clonados por SCNT, onde há aumento do volume placentário com uma maior oferta de nutrientes para o feto, o que seria responsável em partes por um aumento do padrão de crescimento pré-natal e suas respectivas implicações na vida pós-natal.

Sendo assim, a clonagem está associada a anormalidades da gestação que podem culminar em prolongamento gestacional, abortos, anomalias, diminuição ou ausência de sinais de parto e menor sobrevivência de neonatos. Comumente, estas falhas estão relacionadas a alterações placentárias (VASCONCELOS, 2016). No entanto, os problemas observados em clones não se restringem unicamente às disfunções da placenta, mas também a disfunções cardiocirculatórias, respiratórias, hepáticas, articulares, renais, imunológicas e até disfunções multissistêmicas no feto (GUIMARÃES et al., 2012).

1.4. ELETRÓLITOS

1.4.1. Sódio

O sódio é o cátion mais abundante do plasma e está presente principalmente no líquido extracelular. Tem como funções principais a manutenção da pressão osmótica e volume sanguíneo, manutenção de funções fisiológica de nervos e músculos (BOHN, 2015).

A concentração de sódio sanguínea é maioritariamente o balanço existente entre a ingestão e a excreção urinária. O aumento da concentração de sódio é

denominado hipernatremia, podendo ocorrer devido à diminuição da ingestão ou à perda de água que ultrapasse a perda de eletrólitos. Outros fatores podem desencadear esse aumento, tais como a ingestão excessiva de sal ou após a administração de soluções hipertônicas (BOHN, 2015).

Hiponatremia é caracterizada pela diminuição dos teores de sódio, podendo ser decorrente de aumento da água corporal ou devido à perda de sódio foi muito superior à de água (BOHN, 2015). Vale ressaltar que a indicação de concentração de sódio sérico é em relação à quantidade de água no fluido extracelular, não fornecendo informações diretas sobre o teor total de sódio no organismo animal, ou seja, animais com hipernatremia ou hiponatremia podem apresentar aumento, redução ou valores dentro dos limites de referência para a espécie (DIBARTOLA, 2011a). Kaneko et al. (2008) e Radostits et al. (2000) preconizaram valores de referência para o sódio sérico de bovinos no limite entre 132 a 152 mmol/L.

1.4.2. Potássio

O potássio é considerado o principal cátion intracelular do organismo (BOHN, 2015). Uma das funções mais importantes é seu papel na geração de potencial de repouso de membrana celular (DIBARTOLA E MORAES, 2011). Além de ter um papel crítico na manutenção da excitabilidade cardíaca e neuromuscular (KANEKO et al., 2008).

Segundo DIBARTOLA E MORAES (2011) o balanço externo de potássio é mantido através da sua saída, principalmente, via excreção urinária e a sua entrada via ingestão alimentar. Em animais hígidos, o potássio adentra no corpo apenas através no trato gastrointestinal, e praticamente todo o potássio oriundo da ingestão de alimentos é absorvido no estômago e no intestino delgado. O transporte de potássio no intestino delgado é passivo, enquanto o transporte ativo, o qual é responsivo à aldosterona, ocorre no cólon. Sua excreção ocorre a nível renal (90 a 95%) e intestinal (cólon – 5 a 10%). Em contrapartida o balanço interno de potássio ocorre através da translocação do cátion entre o líquido intracelular e o líquido extracelular.

Alterações nas concentrações séricas de potássio são decorrentes de disfunções em musculatura cardíaca e esquelética. Doenças do trato urinário, renais e pós-renais que levam a diminuição da excreção renal são causas para o aumento

da concentração plasmática de potássio. Enquanto isso, vômito e diarreia do intestino delgado são causas de hipopotassemias (BOHN, 2015).

Os valores de referências para bovinos encontrados em literatura constam teores de potássio entre 3,9 a 5,8 mmol/L (KANEKO et al., 2008; RADOSTITS et al., 2000).

1.4.3. Cloro

O cloro é considerado o principal ânion presente no líquido extracelular e age no transporte de água e eletrólitos, tal como o sódio. O cloro é um ânion conjugado que atua no metabolismo ácido-base. A fim de manter sua eletroneutralidade, o cloro dispõe de dois mecanismos, ou seja, se move na mesma direção que o sódio sendo carregado positivamente ou é substituído pelos íons bicarbonato e se carrega negativamente.

Ao analisar a concentração plasmática de cloro também é necessário observar as concentrações de sódio, uma vez que os diagnósticos são semelhantes aos da hiponatremia/hipernatremia caso tenha aumento ou diminuição concomitante de cloro e sódio. Todavia, se a alteração do cloro for maior que a de sódio, é necessário avaliar o íon bicarbonato através de um exame hemogasométrico (BOHN, 2015).

Há uma discreta variação entre os valores de referência para os teores de cloro em bovinos. Enquanto Kaneko et al. (2008) descrevem esses valores entre 97 a 111 mmol/L, Radostits et al. 2000 preconizam valores entre 95-110 mEq/L.

1.5. MINERAIS

1.5.1. Cálcio

Trata-se de um mineral que tem como característica funções reguladoras essenciais, tais como mecanismos enzimáticos para o metabolismo de hormônios, além da manutenção da contração muscular e estrutura celular (RODRIGUEZ et al., 2004). Age também na formação de dentes, atua na coagulação do sangue juntamente com a vitamina K. Minerais como o cálcio e fósforo são mediados por transportadores e mecanismos dependentes de energia (HAFEZ E HAFEZ, 2004). O cálcio está fortemente associado ao metabolismo gestacional, uma vez que ao longo da gestação, minerais como o ferro, cálcio, fósforo estão envolvidos no aumento do

peso corporal do feto, o qual possui uma habilidade única para retirar cálcio do organismo materno, caso a mãe não tenha um fornecimento ideal do mineral via alimentação.

Ferguson e Hoenig (2011) descrevem o cálcio total sérico em três formas distintas: 10% estão sob a forma de complexos de cálcio, ou seja, citrato, fosfato, sulfato de cálcio, lactato e íons bicarbonato; 40% se encontram aderidos às proteínas, sendo a albumina a principal proteína de ligação do cálcio no soro; 50% na forma ionizada, a qual pode-se considerar a forma biologicamente ativa, sendo esta afetada diretamente pelo equilíbrio ácido-base. Radostits et al. (2000) preconizam valores de referência para o cálcio total em bovinos entre 9,7 a 12,4 mg/dL; enquanto o cálcio ionizado se mantém dentro do intervalo em 4,8 a 6,2 mg/dL nesta mesma espécie.

Situações de alcalose metabólica levam a uma diminuição de cálcio ionizado e podendo ocasionar quadros de hipocalcemia subclínica. Em relação à fisiologia do mineral, quando a concentração de cálcio no líquido extracelular cai para níveis abaixo do normal, as glândulas paratireoides são diretamente estimuladas, favorecendo a secreção de seu hormônio paratireóideo. Tal hormônio atua diretamente sobre os ossos e aumenta a reabsorção de sais ósseos, com a consequente liberação de grandes quantidades de cálcio no líquido extracelular e elevação do nível de cálcio até seu valor normal. Por outro lado, quando a concentração de cálcio se torna muito alta, ocorre depressão da secreção de hormônio paratireóideo, de modo que quase não ocorra reabsorção óssea. No entanto, o sistema osteoblástico para a formação de novo osso continua depositando cálcio, removendo assim o cálcio do líquido extracelular, com a consequente redução da concentração de íons cálcio até sua faixa de normalidade (GUYTON E HALL, 1997).

1.5.2. Fósforo

O fósforo é um mineral necessário para diversas funções vitais do organismo, está presente tanto a nível intracelular quanto extracelular. Em fluidos intracelulares, ele está presente na forma de fosfato, onde desempenha um papel fundamental na síntese e degradação de compostos. Possui também a capacidade de transferência e armazenamento de energia através da formação de difosfato de adenosina (ADP),

trifosfato de adenosina (ATP) e monofosfato de adenosina (AMP). Enquanto isso, o fósforo presente no fluido extracelular age como tampão para o equilíbrio ácido-base do organismo animal (CARLSON, 2009).

O fósforo, tal como o cálcio, tem sua regulação mediada por metabólitos da vitamina D, fatores dietéticos e pelos hormônios calcitonina e paratormônio (CARLSON, 2009). O hormônio calcitonina é responsável pela diminuição na concentração sérica de cálcio e fósforo enquanto o paratormônio possui uma potente ação fosfatúrica, ou seja, enquanto o paratormônio aumenta a concentração de cálcio, age concomitantemente diminuindo a de fósforo. Aliado a isto, tem-se a vitamina D que age aumentando a concentração de cálcio e fósforo através da absorção do mesmo via trato gastrointestinal (BOHN, 2015).

Diferentemente de outros animais onde a excreção do fósforo é realizada pelos rins, em ruminantes a excreção se dá, principalmente, via trato gastrintestinal. Tal fato contribui para um quadro de hiperfosfatemia em animais com obstrução gastrintestinal superior. Outro fator desencadeante de aumento na concentração sérica de fósforo são quadros de acidose, uma vez que há diminuição da absorção do eletrólito pela célula. Episódios de diarreia, vômito ou doenças que afetam a absorção intestinal levando a quadros de hipofosfatemia (BOHN, 2015). Bovinos que possuem uma dieta pobre em fósforo podem apresentar hipofosfatemia, tal como fêmeas que desenvolvem quadros de paresia da parturiente (CARLSON, 2009).

Radostits et al. (2000) e Kaneko et al. (2008) recomendam valores para fósforo em bovinos entre 5,6 a 6,5 mg/dL.

1.5.3. Magnésio

O magnésio é um macromineral presente no organismo animal. É o quarto cátion mais abundante no organismo e o segundo mais abundante no compartimento intracelular (GONZÁLEZ et al., 2009). Em torno de 99% do magnésio corpóreo encontram-se no espaço intracelular de ossos, músculos e tecidos moles. No espaço extracelular, localiza-se 1% do magnésio e, deste, apenas 25% podem ser encontrados no plasma. Portanto, o magnésio plasmático representa pequena fração do pool total (TRINDADE, 2006).

É essencial para a função enzimática, inclusive as que estão relacionadas à transferência de grupos fosfato, reações químicas que requerem ATP e etapas

relacionadas à replicação e transcrição do DNA e tradução do mRNA (GONZÁLEZ et al., 2009). As concentrações de magnésio sanguínea são reguladas pelo paratormônio, regulação esta semelhante ao que ocorre com o íon cálcio (TRINDADE, 2006).

Segundo GOFF (2014) os distúrbios decorrentes de alterações no equilíbrio ácido-base têm pouco efeito sobre a distribuição do magnésio sérico. Pode-se notar que a manutenção da concentração plasmática normal de magnésio é quase totalmente dependente da absorção dietética do mineral. González et al. (2000) afirmam que valores baixos de magnésio resultam em sérias consequências para os ruminantes podendo levá-los ao óbito. Casos de hipomagnesemia são acompanhados por retenção de placenta, tetania, hiperexcitabilidade, distúrbios ruminais, além de queda na produção de leite. A hipomagnesemia pode ser consequência de uma excessiva lipólise em decorrência de uma deficiência energética da dieta. Já a hipermagnesemia não resulta em graves transtornos para os animais acometidos, uma vez que o excesso de magnésio tende a ser eliminado via excreção urinária.

Os valores de referência de magnésio para a espécie bovina, segundo Kaneko et al. (2008) e Radostits et al. (2000), são 1,8 a 2,3 mg/dL.

1.6. AÇÚCARES

1.6.1. Glicose

A glicose é um carboidrato simples, denominado monossacarídeo, que atua como fonte de energia para a manutenção e regulação do organismo, tem papel importante para os tecidos nervosos, além de atuar diretamente na síntese de polissacarídeos estruturais, glicoproteínas e glicolipídeos de membranas celulares (CAÑIZARES et al., 2009).

Em ruminantes a maior fonte de glicose sanguínea é oriunda do processo de fermentação ruminal através da ação microbiana. A fermentação gera os ácidos graxos voláteis, denominados pela sigla AGV's, sendo eles o ácido acético, propiônico e butírico. Uma vez que os ruminantes absorvem esses AGV's, ocorre a gliconeogênese no fígado a partir do ácido propiônico, sendo este responsável pela maior fonte de glicose sanguínea (ALLISON, 2015a). A quantidade de ácido

propiónico absorvida pelas papilas ruminais em animais que possuem uma dieta satisfatória é frequentemente suficiente para suprir as demandas para a síntese de glicose (CAÑIZARES et al., 2009).

Quadros de hipoglicemia em bovinos podem ser decorrentes de cetose, onde a gliconeogênese no fígado é incapaz de suprir a necessidade de glicose devido à alta produção de leite e a cetose ocorre através do aumento da mobilização de gordura. Em contrapartida, em quadros de “febre do leite”, há hiperglicemia em associação com hipocalcemia e hipofosfatemia. Situações de exaustão física, dor ou excitação associadas a liberação de catecolaminas estimulam a liberação de gH, inibindo a secreção de insulina e conseqüentemente estimulando a glicogenólise, levando a uma elevação nos níveis de glicose, assim como em casos de hiperglicemia por estresse, onde há liberação endógena de corticosteroides que estimulam a gliconeogênese e a liberação de glucagon, desenvolvendo resistência à insulina. (ALLISON, 2015a).

Em quadros de hipoglicemia ou hiperglicemia em bovinos pode-se observar valores de glicose fora dos valores de referências, ou seja, valores acima ou abaixo de 45 a 75 mg/dL (KANEKO et al., 2008; RADOSTITS et al., 2000).

1.6.2. Frutosamina

São cetoaminas estáveis, compostas por moléculas de glicose unidas a moléculas de proteína, através da glicação (ARMBRUSTER, 1987). Tal processo constitui a soma entre uma proteína e um carboidrato sem a ação controladora de uma enzima. Em humanos, a quantidade de frutosamina no soro é aumentada em caso de diabetes mellitus devido à alta concentração de açúcar no sangue (ARMBRUSTER, 1987).

Segundo Reusch et al. (1993) a mensuração de frutosamina não é influenciada por oscilações de açúcares de curta duração no sangue, fato que pode ocorrer em situações de estresse no momento da colheita por exemplo. Sendo assim, a frutosamina é capaz de refletir a concentração média de açúcar no sangue nas últimas duas a três semanas anteriores a colheita (ARMBRUSTER, 1987).

Jensen et al. (1993) relataram que é possível realizar a mensuração de frutosamina em amostras de soro bovino e isto pode ser indicativo de quadros de cetose subclínica em animais com aptidão leiteira. Os mesmos autores

preconizaram valores de referência para a espécie entre 213,4 a 265 $\mu\text{mol/L}$ para a frutossamina plasmática.

1.7. FUNÇÃO RENAL

1.7.1. Ureia

Nos organismos ureotélicos, a amônia é convertida em ureia nas mitocôndrias dos hepatócitos, através do ciclo da ureia. A produção de ureia ocorre quase exclusivamente via hepática e representa o destino da maior parte da amônia canalizada para o fígado. Após os hepatócitos, a ureia passa para a circulação sanguínea, que a transporta até os rins, onde é excretada através da urina (NELSON E COX, 2002).

Em animais monogástricos as mensurações dos níveis plasmáticos de ureia e creatinina são capazes de detectar alterações e afecções renais, além de estimar o grau de funcionamento dos rins. Embora esses testes não sejam tão satisfatórios quanto às provas de depuração renal, os testes são de fácil execução e demonstram o grau de perturbação do meio interno, devido à incapacidade do organismo de excretar os produtos metabólicos finais das proteínas (GUYTON E HALL, 1997).

Segundo Meuten (2015) os ruminantes por possuírem uma flora ruminal capaz de degradar a ureia em aminoácidos e assimilá-los, o que resulta em ganho proteico e significativa excreção de ureia pelo trato gastrointestinal. Sendo assim torna-se difícil correlacionar o aumento de ureia e creatinina com a densidade urinária para predizer doenças renais em ruminantes. A correlação entre o aumento de ureia sem haver aumento concomitante de creatinina tem sido usada para predizer uma possível estase ruminal ou sangramento de trato gastrointestinal. Enquanto isso, uma diminuição está relacionada à diurese por fluidoterapia ou a habilidade única que cavalos e bovinos tem em metabolizar e excretar ureia pelo trato gastrointestinal.

Kaneko et al. (2008) consideram os valores fisiológicos para a concentração de ureia nitrogenada em bovinos entre 20 a 30 mg/dL, em contrapartida, Radostits et al. (2000) consideram os valores entre 6 a 27 mg/dL, podendo notar uma diferença entre os autores.

1.7.2. Creatinina

A creatinina é derivada do catabolismo da creatina presente no tecido muscular. A creatina é um metabólito utilizado para armazenamento energético no músculo sob a forma de fosfocreatina. A degradação de fosfocreatina em creatinina ocorre de maneira constante, sendo uma reação não enzimática irreversível, dependente de fatores estequiométricos (GONZÁLEZ E SCHEFFER, 2003).

Sua molécula é um pouco maior que a da ureia, de modo que praticamente não ocorre reabsorção. Sendo assim, toda a creatinina filtrada do filtrado glomerular passa pelo sistema tubular e é excretada pelos rins através da urina (GUYTON E HALL, 1997). Assim como a ureia, sua mensuração plasmática é indicativa de alterações a nível renal. Segundo Meuten (2015) quando a concentração sérica de creatinina encontra-se dentro dos valores de referência não é significativo de que os rins estejam normais, ou seja, é indicativo que mais de 25% da massa renal estão funcionando adequadamente para excretar creatinina e mantê-la dentro do intervalo de normalidade, sendo este entre 1,0 a 2,0 mg/dL para bovinos (KANEKO et al., 2008; RADOSTITS et al.; 2000). Uma vez que só se observa alterações nos níveis de ureia e creatinina quando a função renal está com redução de 75% na taxa de filtração glomerular.

1.8. FUNÇÃO MUSCULAR

1.8.1. CK

A enzima creatina quinase, intitulada pela sigla CK, é uma enzima músculo-específica altamente sensível. Encontra-se presente em menores quantidade em órgãos como diafragma, estômago, pâncreas, placenta, intestino, rins, bexiga, pulmões, útero, próstata, baço e tireoide. Sua maior atividade está presente no músculo esquelético, cérebro e tecido cardíaco. Fígado e eritrócitos são essencialmente desprovidos de CK (MOTTA, 2009). Apesar de a enzima ser encontrada no cérebro, lesões cerebrais não causam aumento da atividade de CK no sangue e sim no líquido cefalorraquidiano devido à barreira hematoencefálica (ALLISON, 2015b).

Em relação a níveis séricos de CK pode haver um aumento destes níveis quando há lesão em músculo esquelético, como no caso de injeções

intramusculares, contenção física, isquemia ou necrose muscular, exercícios exaustivos, traumas e convulsões durante o transporte. Bovinos que apresentam o quadro de “vaca caída” irão ter um aumento da atividade de CK decorrente de um quadro de necrose muscular isquêmica (ALLISON, 2015b).

No músculo, esta enzima fornece ATP para a contração pela fosforilação do ADP do fosfato de creatina. Elevações nas atividades totais da CK foram relatadas em uma grande variedade de espécies com distúrbios musculares caracterizados por necrose de miofibras (KANEKO et al., 2008). Por ser uma enzima de meia vida curta (quatro horas) um aumento persistente nos níveis plasmáticos, 35 a 280 U/L segundo Radostits et al. (2008), é indicativo de lesão muscular contínua e ativa (MORAIS et al., 2000). Segundo Allison (2015b) em relação à musculatura cardíaca, torna-se pouco provável que um aumento sérico de CK seja decorrente de lesão no músculo cardíaco, uma vez que o volume muscular é relativamente pequeno quando comparado a musculatura esquelética.

1.9. FUNÇÃO LIPÍDICA

1.9.1. Colesterol

O colesterol é classificado como um álcool policíclico de cadeia longa, encontrado nas membranas celulares e transportado no plasma sanguíneo. Pode apresentar-se na forma livre ou esterificada com ácidos graxos do tipo éster de colesterol. Atua como precursor da síntese de hormônios esteroides, sais biliares, vitamina D e participa da formação das membranas celulares (FERNANDES et al., 2012). Animais herbívoros necessitam sintetizar seu próprio colesterol, uma vez que não conseguem obtê-lo através da dieta, para isso utilizam-se de mecanismos hepáticos, como exportação de colesterol e os ésteres de colesterol para a circulação sanguínea como constituinte das lipoproteínas (RADIN, 2015).

Em ruminantes, a mensuração de colesterol no sangue é realizada com a finalidade de avaliar o balanço energético do animal, uma vez que indica o grau de deposição e de mobilização das reservas energéticas na forma de gordura (FERNANDES et al., 2012). Segundo Gonzáles (2000) a diminuição dos níveis plasmáticos de colesterol, albumina, glicose e magnésio no sangue são indicativos de comprometimento da função hepática. Os valores de referência para a espécie bovina são de 80 a 120 mg/dL segundo Kaneko et al. (2008).

1.9.2. Triglicérides

Triglicérides são lipídios originados pela esterificação dos ácidos graxos não esterificados (NEFA's) ao composto alcoólico glicerol. Tais lipídios atuam na composição da gordura. Tem como funções principais o isolamento térmico, elétrico e atua como reserva energética (OLIVEIRA, 2015). A síntese de triglicérides ocorre em órgãos como intestino delgado, fígado, glândula mamária e tecido adiposo. Os valores de referência são de 0 a 14 mg/dL (KANEKO et al., 2008).

1.9.3. Lipoproteínas

As lipoproteínas são grandes aglomerados não celulares de lipídios e proteínas e encontram-se suspensos na linfa ou no plasma sanguíneo. Tem como funções o transporte da maioria dos lipídios para os tecidos e a esterificação do colesterol (KANEKO et al., 2008). Em relação a sua estrutura as lipoproteínas possuem moléculas apolares (triacilglicerol e colesterol) ao centro da molécula, enquanto o exterior é revestido por moléculas polares (proteínas e fosfolipídios). Sua síntese ocorre a nível hepático e intestinal.

As principais classes de lipoproteínas são definidas pela sua densidade em quilomícrons (KANEKO et al., 2008), sendo elas: HDL (high-density lipoproteins) são caracterizados como lipoproteínas de alta densidade. Em espécies domésticas, o HDL é normalmente a lipoproteína plasmática mais abundante em estado de jejum. Tem como função o transporte de colesterol de órgãos periféricos para o fígado (KANEKO et al., 2008). LDL (low-density lipoproteins) são lipoproteínas de baixa densidade. Sua principal função é o transporte de colesterol para o fígado e outros tecidos (RADIN, 2015). Já as lipoproteínas VLDL (very-low-density lipoproteins) são caracterizados como lipoproteínas de densidade muito baixa. A secreção de VLDL no plasma é o principal método pelo qual os hepatócitos exportam triacilglicerol, sendo este o principal componente lipídico da VLDL. Segundo Poncheki (2019) os valores para VLDL são de 0 a 2,8 mg/dL podendo ser calculado através da fórmula $VLDL = TG/5$.

1.10. FUNÇÃO HEPÁTICA

1.10.1. Proteínas plasmáticas totais

As proteínas plasmáticas totais referem-se às proteínas contidas no plasma, ou seja, a albumina, globulina e fibrinogênio. Tem como funções a formação da base das estruturas das células, órgãos e tecidos; tamponamento do equilíbrio ácido-base; catálise de reações bioquímicas e manutenção da pressão osmótica coloidal (KANEKO et al., 2008). Casos de hipoproteïnemia estão relacionados com déficits alimentares, causas patológicas decorrentes de distúrbios hepáticos, renais e intestinais, também casos de hemorragias e parasitismo. O aumento no teor de proteínas plasmáticas totais pode ser decorrente de desidratação, choque, perda de fluidos corpóreos, entre outros. Os valores de referência para bovinos encontram-se entre 6,74 a 7,46 g/dL segundo Kaneko et al. (2008) e 5,7 a 8,1 g/dL segundo Radostits et al. (2000).

A albumina é a principal proteína plasmática sintetizada no fígado. Contribui com 80% da osmolaridade do plasma sanguíneo, além de atuar como transportadora de ácidos graxos livres, metais, bilirrubina e tem papel de reserva proteica (GONZÁLEZ et al., 2000), além de atuar na manutenção da pressão osmótica (KANEKO et al., 2008). No caso de injúria tecidual, a albumina é a primeira proteína a ser perdida (SILVA et al. 2008). É considerado o indicador mais sensível para determinar o status nutricional proteico do animal, uma vez que valores persistentemente baixos sugerem um consumo inadequado de proteína (BRONDANI et al., 2016).

Os valores para albumina em bovinos tem discrepâncias em seus valores na literatura consultada, valores de 3,03 a 3,55 g/dL segundo Kaneko et al. (2008) e 2,1 a 3,6 segundo Radostits et al. (2000).

A globulina é representada através de um grupo heterogêneo de proteínas de diferentes tamanhos. Há diversos tipos de globulinas presente no plasma sanguíneo, entre elas pode-se citar as imunoglobulinas, fatores de coagulação, proteínas do sistema complemento, enzimas e proteínas que transportam lipídios, vitaminas, entre outros. A produção da maioria das proteínas acontece a nível hepático, exceto as imunoglobulinas que têm sua síntese em órgãos linfoides (ALLISON, 2015a). Os valores para a globulina bovina são de 3,0 a 3,48 g/dL segundo Kaneko et al. (2008).

Vale ressaltar que alterações, sejam elas decorrentes da diminuição ou do aumento de globulina e albumina, nem sempre irão gerar uma alteração detectável no teor da proteína total (ALLISON, 2015a).

1.10.2. Bilirrubina

A bilirrubina é uma substância de coloração amarelada encontrada na bile, sua produção se origina pelo metabolismo hepático através da degradação de glóbulos vermelhos e liberação de moléculas do grupo heme. Urina e fezes são vias de eliminação da bilirrubina. Está presente no organismo animal em três formas: conjugada ou direta onde já houve metabolização hepática e associação com o ácido glicurônico; não-conjugada ou indireta, é a bilirrubina logo após a sua síntese e ligação à albumina; e por último, a bilirrubina total que é composta pela soma das bilirrubinas direta e indireta. Os valores de referência para os bovinos em relação à bilirrubina total, direta e indireta são, respectivamente, 0,01 a 0,5 mg/dL; 0,04 a 0,44 mg/dL; 0,03 mg/dL; segundo Kaneko et al. (2008).

Allison (2015a) descreve que um aumento na concentração sérica de bilirrubina, aumento este denominado de hiperbilirrubinemia, pode ser decorrentes de três mecanismos distintos: colestase, onde há uma menor excreção de bilirrubina; Destruição exacerbada de eritrócitos, que geram um aumento da produção; menor absorção ou conjugação pelos hepatócitos. Casos de hiperbilirrubinemia em ruminantes normalmente são decorrentes de hemólise, uma vez que doenças primárias da vesícula e trato biliar são incomuns nestas espécies.

Bertoni e Trevisi (2013) relatam que fêmeas gestantes saudáveis apresentaram um leve aumento nos teores de bilirrubina total momentos antes do parto e atingiram um pico ao redor do sétimo dia pós-parto, os valores foram restabelecidos para a normalidade entre a quarta e quinta semana lactacional. Esse aumento nos valores pode ser atribuído, principalmente, a uma menor síntese das enzimas responsáveis pela depuração da bilirrubina.

1.10.3. AST

A AST denominada aspartato aminotransferase é uma enzima não específica encontrada em diferentes tipos de células do organismo animal, entre elas pode-se citar os eritrócitos, células da musculatura cardíaca e esquelética e os hepatócitos. É uma enzima avaliada nas provas de função hepática em bovinos e equinos como marcador de dano à hepatócitos, embora danos musculares e hemólise também possam ser causas de aumento de sua atividade sérica (KREUTZER, TURK E CASTEEL, 2008).

Devido à sua baixa hepatoespecificidade o aumento nos teores séricos de AST pode ser devido não apenas à lesões de hepatócitos mas também relacionado à lesões musculares. Para minimizar essa questão, é aconselhado determinar a atividade de uma enzima músculo-específica, como a CK, concomitante a análise de AST (ALLISON, 2015a). Segundo Kaneko et al. (2008) e Radostits et al. (2000) os valores para a AST de bovinos são de 78 a 132 U/L.

1.10.4. GGT

A gamaglutamiltransferase é uma enzima de indução, sendo um importante marcador de distúrbios hepatobiliares e de colestase. A GGT sérica é um dos indicadores mais confiáveis de lesão hepática e obstrução biliar em grandes animais (CARLSON, 2009). Pode-se observar em ruminantes e cavalos intervalos de referência mais restritos que a ALP, o que se torna mais útil para o diagnóstico de colestases (Stockham e Scott, 2011). Segundo Kaneko et al. (2008) e Radostits et al. (2000) os valores para bovinos estão entre 6,1 a 17,4 U/L. Allison (2015a) descreve que a maior parte da enzima GGT presente no soro sanguíneo tem origem hepática. As células do epitélio renal também são capazes de liberar a enzima na urina, porém, ao contrário do que acontece com células hepáticas, não há aumento enzimático no soro.

1.10.5. LDH

A enzima lactato desidrogenase, representada pela sigla LDH, está presente no citoplasma de grande parte das células no organismo. Lesões em diferentes tecidos resultam em extravasamento de LDH para o sangue e espaço extracelular, sendo assim, trata-se de uma enzima altamente inespecífica (ALLISON, 2015a).

Hemólise, necrose muscular e hepática estão entre as principais causas de elevações da enzima (KREUTZER, TURK E CASTEEL, 2008). Valores de referência para bovinos foram preconizados dentro da faixa de 692 a 1445 U/L segundo Kaneko et al. (2008) e Radostits et al. (2000). A enzima LDH, mesmo sendo menos específica que a CK e AST, em casos de lesões musculares se apresenta com elevação de sua concentração (BALARIN et al., 2005).

1.11. COMPONENTES SANGUÍNEOS

O hematócrito é a porcentagem de sangue composta pelos eritrócitos, enquanto a concentração de hemoglobina fornece a indicação mais direta da capacidade de transporte de oxigênio do sangue e deve ser aproximadamente um terço do hematócrito se os eritrócitos possuírem um tamanho normal (BROCKUS, 2011). Os valores de referências para bovinos preconizados em literatura são de 21 a 30% para o hematócrito e 8 a 12 g/dL para a hemoglobina segundo Weiss e Wardrop (2010).

Casos de desidratação ou mudanças de fluidos para órgãos viscerais causam um aumento nos valores de hemoglobina e hematócrito. Em contrapartida, uma hiper-hidratação com fluidos parenterais provocam uma redução os valores (BROCKUS, 2011).

1.12. COMPONENTES GASOMÉTRICOS E EQUILÍBRIO ÁCIDO-BASE DO SANGUE

Um tampão biológico é um composto que pode ser doador ou receptor de prótons (íons de hidrogênio) para minimizar mudanças de pH. O organismo possui dois sistemas tampões principais para a manutenção dos líquidos corporais: tampão bicarbonato, o qual se classifica como o tampão primário do fluido extracelular; tampão não bicarbonato, composto pelos fosfatos orgânicos e inorgânicos e pelas proteínas, que compõem o sistema tampão intracelular primário (DIBARTOLA, 2011b).

O tampão bicarbonato é o mais importante tampão biológico, uma vez que a concentração de cada um de seus componentes é capaz de regulação, ou seja, o dióxido de carbono através do sistema respiratório e o íon bicarbonato através dos rins. Conseqüentemente, o pH do sangue pode ser aumentado ou diminuído conforme a necessidade (GUYTON E HALL, 1997). A concentração do íon bicarbonato é mantida através da produção e conservação de bicarbonato de sódio pelos túbulos renais (GEORGE E ZABOLOTZKY, 2011).

O pH faz referência a concentração de íons hidrogênio no sangue, essa concentração é mantida dentro dos limites no organismo através dos tampões fosfato, proteínas e bicarbonato. Para avaliação do paciente é utilizado apenas a mensuração do tampão bicarbonato (GEORGE E ZABOLOTZKY, 2011). Os valores de referência para o pH bovino são de 7,31 a 7,53 segundo Kaneko et al. (2008) e 7,35 a 7,50 (RADOSTITS et al., 2000).

Um aumento na razão $\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_3$ causa alcalemia e indica alcalose, enquanto uma diminuição causa acidemia e indica acidose. O pH deve ser determinado através da razão, e não pela concentração individual (GEORGE E ZABOLOTZKY, 2011).

1.12.1. $p\text{O}_2$ e $p\text{CO}_2$

A pressão parcial de oxigênio, denominada pela sigla $p\text{O}_2$, refere-se à quantidade de oxigênio ligada a hemoglobina. É um parâmetro utilizado para a avaliação da oxigenação pulmonar, assim como a $p\text{CO}_2$ para a ventilação pulmonar. Ambas as pressões parciais são inversamente proporcionais (DUMONT et al., 2014).

Em sangue arterial os valores de $p\text{O}_2$ para bovinos encontram-se dentro do limite de 83 a 95 mmHg segundo Sucupira e Ortolani (2003).

O dióxido de carbono (CO_2) é um ácido com capacidade de combinação com a água (H_2O) na presença da enzima anidrase carbônica para formação do ácido carbônico (H_2CO_3). O dióxido de carbono é continuamente removido através da ventilação alveolar para a manutenção da pressão parcial de CO_2 (PCO_2) em, aproximadamente, 40 mmHg (DIBARTOLA, 2011b).

1.12.2. TCO_2

A mensuração do TCO_2 é outra maneira de verificar o HCO_3^- no plasma. Trata-se do CO_2 total liberado quando o soro ou plasma é misturado com um ácido forte (GEORGE E ZABOLOTZKY, 2011). Os valores de TCO_2 para bovinos encontram-se no intervalo de 21,2 a 32,2 mmol/L segundo KANEKO et al. (2008).

REFERÊNCIAS

- ALLISON, R. W. Avaliação laboratorial da função hepática. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 853-903, 2015^a.
- ALLISON, R. W. Avaliação laboratorial das lesões musculares. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1010-1019, 2015b.
- ASSIS-NETO, A. C.; PEREIRA, F. T. V.; SANTOS, T. C.; AMBROSIO, C. E.; LEISER, R.; MIGLINO, M. A. Morpho-physical recording of bovine conceptus (bos indicus) and placenta from days 20 to 70 of pregnancy. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 45, p. 760-772, 2010.
- ARMBRUSTER, D. A. Fructosamine: Structure, analysis and clinical usefulness. **Clin Chem**. v. 33, p. 2153–2163, 1987.
- BALARIN, M. R. S.; LOPES, R. S.; KOHAYAGAWA, A.; LAPOSY, C. B.; FONTEQUE, J. H. Avaliação da glicemia e da atividade sérica de aspartato aminotransferase, creatinoquinase, gama-glutamilttransferase e lactato desidrogenase em equinos puro sangue inglês (PSI) submetidos a exercícios de diferentes intensidades. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 211-218, 2005.
- BATISTA, F. A.; ROCHA, C. M. B. M.; MEGDA, T. T.; SCHMIDT, J.; LUDWIG, P. B.; PIZZIGATTI, D. Quantificação dos líquidos fetais, placentônios e peso do útero em vacas aneloradas ao longo da gestação. **Veterinária em Foco**. v. 12, n. 1, p. 20-25, 2014.
- BERTOLINI, M.; MOYER, A. L.; MASON, J. B.; BATCHELDER, C. A; HOFFERT, K. A.; BERTOLINI, L. R.; CARNEIRO, G. F.; CARGILL, S. L.; FAMULA, T. R.; CALVERT, C. C.; SAINZ, R. D.; ANDERSON, G. B. Evidence of increased substrate availability to in vitro-derived bovine foetuses and association with accelerated conceptus growth. **Reproduction**, v.128, p. 341–354, 2004.
- BERTONI, G.; TREVISI, E. Use of the liver activity index and other metabolic variables in the assessment of metabolic health in dairy herds. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 29, p. 413-431, 2013.
- BOHN, A. A. Avaliação laboratorial dos eletrólitos. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed., Rio de Janeiro: Editora Roca Ltda., p. 807-1010, 2015.
- BROCKUS, C. W. In: LATIMER, K. S. **Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology**, 5 ed., Chichester: Wiley-Blackwell, p. 03-44, 2011.

- BROLIO, M. P.; AMBRÓSIO, C. E.; FRANCIOLLI, A. R.; MORINI, A. C.; GUERRA, R. R.; MIGLINO, M. A. A barreira placentária e sua função de transferência nutricional **Rev. Bras. Reprod. Anim.** Belo Horizonte: v. 34, n. 4, p. 222-232. 2010.
- BRONDANI, W. C.; LEMES, J. S.; FERREIRA, O. G. L.; ROLL, V. F. B.; DEL PINO, F. A. B. Perfil metabólico de ovelhas em gestação. **Arch. Zootec.** v. 65, p. 1-6, 2016.
- CAÑIZARES, G. I. L.; RODRIGUES, L.; CAÑIZARES, M. C. Metabolismo de carboidratos não-estruturais em ruminantes. **Archives of Veterinary Science**, v.14, n.1, p.63-73, 2009.
- CARLSON, G. P. Clinical Chemistry Tests. In: SMITH, B. P. **Large Animals Internal Medicine**. 4 ed., St Louis: Mosby Elsevier, 2009, cap. 22, p. 375-397.
- CHAVATTE-PALMER, P.; TARRADE, A. Placentation in different mammalian species. **Annales d'Endocrinologie** v. 77, p. 67–74, 2016.
- DIBARTOLA, S. P.; MORAES, H. A. D. Disorders of Potassium: Hypokalemia and Hyperkalemia. In: DIBARTOLA, S. P. **Fluid, Electrolyte, And Acid-Base Disorders In Small Animal Practice** 4^a ed., Elsevier Saunders, p. 92-119, 2011.
- DIBARTOLA, S. P. Disorders of Sodium and Water: Hyponatremia and Hyponatremia In: DIBARTOLA, S. P. **Fluid, Electrolyte, And Acid-Base Disorders In Small Animal Practice** 4^a ed., Elsevier Saunders, p. 45-79, 2011a.
- DIBARTOLA, S. P. Introduction to Acid-Base Disorders In: DIBARTOLA, S. P. **Fluid, Electrolyte, And Acid-Base Disorders In Small Animal Practice**, 4^a ed., St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders, p. 231-252, 2011b.
- DROST, M. Complications during gestation in the cow. **Therio**. v. 68, p. 487-491, 2007.
- DUMONT, C. B. S.; BELLO, C. A. O.; VIANNA, A. R. C. B.; GODOY, R. F.; LIMA, E. M. M. Venous hemogasometry of equines finalists in 90 km endurance races. **Pesq. Vet. Bras.** v. 34, n.6, p. 589-592, 2014.
- EDWARDS, J. L.; SCHRICK, F. N.; MCCRACKEN, M. D.; VAN AMSTEL, S. R.; HOPKINS, F. M.; WELBORN, M. G.; DAVIES, C. J. Cloning adult farm animals: a review of the possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer. **Amer J Reprod Immunol**, v. 50, p. 113-176, 2003.
- FERGUSON, D. C.; HOENIG, M. Endocrine System. In: LATIMER, K. S. **Duncan & Prasse's veterinary laboratory medicine: clinical pathology**, 5th ed., Ames, Iowa: Wiley-Blackwell Publishing. p. 295-328, 2011.
- FERNANDES, S. R.; FREITAS, J. A.; SOUZA, D. F.; KOWALSKI, L. H.; DITTRICH, R. L.; ROSSI JUNIOR, P.; SILVA, C. J. A. Lipidograma como ferramenta na avaliação do metabolismo energético em ruminantes. **Bras. Agrociência**, Pelotas, v.18, n.1-4, p.21-32, 2012.

GEORGE, J. W. E ZABOLOTZKY, S. M. Water, Electrolytes and Acid Base. In: LATIMER, K. S. **Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology**, 5 ed., Chichester: Wiley-Blackwell, p. 145-171, 2011.

GOFF, J. P. Calcium and magnesium disorders. **Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.**, v. 30, p. 359-381, 2014.

GONZÁLEZ, E. P.; RODRÍGUEZ, F. S.; GARCÍA, E. C. Homeostasis del magnesio. Etiopatogenia, clínica y tratamiento de la hipomagnesemia. A propósito de un caso. **Nefrología**, v. 29(6), p. 518-524, 2009.

GONZÁLEZ, F. H. D. Indicadores sanguíneos do metabolismo mineral em ruminantes. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; BARCELLOS, J.; PATIÑO, H. O.; RIBEIRO, L. A. **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, p. 29-49, 2000.

GONZÁLEZ, F. H. D. Uso do perfil metabólico no diagnóstico de doenças metabólico-nutricionais em ruminantes. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; BARCELLOS, J.; PATIÑO, H. O.; RIBEIRO, L. A. **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, p. 87-106, 2000.

GONZÁLEZ, F. H. D., SCHEFFER, J. F. S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: González, FH.D., Campos, R. (eds.): **Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil**. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p. 73-89, 2003.

GONZÁLEZ, F. H. D; CONCEIÇÃO, T. R.; SIQUEIRA, A. J. S.; LA ROSA, V. L. Variações sanguíneas de ureia, creatinina, albumina e fósforo em bovinos de corte no Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**, v. 20, p. 59 - 62, 2000.

GUIMARÃES, C. F, MEIRELLES, M. G., OLIVEIRA, B. M. M., POGLIANI, F. C., FERNANDES, C. B. Clonagem em ruminantes: anomalias placentárias e disfunções perinatais. **Veterinária em Foco**, v. 9, n. 2, p. 100-109, 2012.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9 ed. Rio de Janeiro Guanabara Koogan, 1997, 1151 p.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**, 7 ed., São Paulo: Manole, 514 p., 2004.

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 firsttrimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biol Reprod**. v. 63, p. 1787-1794, 2000.

IBTISHAM, F.; FAHD QADIR, M. M.; XIAO M.; AN, L. Animal Cloning Applications and Issue. **Russian Journal of Genetics**, v. 53, n. 9, p. 965–971, 2017.

JENSEN, L.; PETERSEN, M. B.; HOUE, H. Determination of the Fructosamine Concentration in Bovine Serum Samples. **J. Vet. Med. A.** v. 40, p. 111-117, 1993.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica.** 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 448 p.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals.** 6th ed., Academic Press, San Diego, 2008, 916 p.

KREUTZER, K. V.; TURK, J. R.; CASTEEL, S. W. **Clinical Biochemistry in Toxicology.** In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* 6th ed., Academic Press, Burlington, p. 821-837, 2008.

LACERDA, P. M. O. **Aspectos estereológicos dos vilos coriônicos da placenta de bovinos clonados.** 2016. 77 p. Tese de Mestrado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2006.

LANDIM-ALVARENGA, F. C. Reconhecimento materno do conceito e início da placentação. In: PRESTES, N. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. **Obstetrícia Veterinária.** 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 272 p., 2006.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental and Clinical Endocrinology**, v. 102, n. 3, p. 122-134, 1994.

LONG, C. R.; WESTHUSIN, M. E.; GOLDING, M. C. Reshaping the transcriptional frontier: Epigenetics and somatic cell nuclear transfer. **Mol Reprod Dev.** v. 81(2), p. 183–193, 2014.

MEIRELLES, F. V.; BIRGEL, E. H.; PERECIN, F.; BERTOLINI, M.; TRALDI, A. S.; et al. Delivery of cloned offspring: experience in Zebu cattle (*Bos indicus*). **Reprod Fertil Dev.** v. 22, p. 88–97, 2010.

MERIGHE, G. K. F. **Passagem celular, sexo e transcrição X-específica interferem no desenvolvimento embrionário e fetal de bovinos produzidos por transferência nuclear.** 131 f. 2007. Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MEUTEN, D. Avaliação e interpretação laboratorial do sistema urinário. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária.** 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 689-806, 2015.

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

MOORE, L. K.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Básica,** 7ª. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 365 p., 2008.

MORAIS, M. G.; RANGEL, J. M.; MADUREIRA, J. S; SILVEIRA, A. C. Variação sazonal da bioquímica clínica de vacas aneloradas sob pastejo contínuo de *Brachiaria decumbens*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte: v. 52, n. 2, p. 98-104, 2000.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica para o laboratório: Princípios e interpretações.** Médica Missau, São Paulo: 4 ed., 419 p., 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; **Lehninger Princípios da Bioquímica**, 3. ed., São Paulo: Sarvier, 2002, 1009 p.

OLIVEIRA, B. M. M. **Avaliação do perfil sanguíneo de vacas prenhes e vazias submetidas à IATF com sêmen avaliado por sondas fluorescentes e sua relação com hemodinâmica uterina.** 167 p. 2015. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

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

PONCHEKI, J. K. **Beta-hidroxibutirato e perfil de ácidos graxos do leite bovino no início da lactação: efeitos sobre produção, reprodução e sanidade.** 2019. 119 f. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

PRADO, C. V. G. B.; SANTOS, A. C. M.; CARNIATTO, C. H. O.; MIGLINO, M. A. Transporte placentário de gases – Revisão. **Rev. Ciên. Vet. Saúde Públ.**, v. 2, n. 1, p. 034-044, 2015.

PRESTES, N. C.; CHALHOUB, M. C. L.; LOPES, M. D.; TAKAHIRA, R. K. Amniocentesis and biochemical evaluation of amniotic fluid in ewes at 70, 100 and 145 days of pregnancy. **Small Rumin Res.** v. 39, p. 277-281, 2001.

RADIN, M. J. Avaliação laboratorial dos lipídeos. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária.** 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1020-1052, 2015.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos.** 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 1770 p.

REUSCH, C. E.; LIEHS, M. R.; HOYER, M.; VOCHEZER, R.; Fructosamine: A new parameter for diagnosis and metabolic control in diabetic dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine.** v. 7, p. 177–182, 1993.

REYNOLDS, L. P.; CATON, J. S.; REDMER, D. A.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; VONNAHME, K. A.; BOROWICZ, P. P.; LUTHER, J. C.; WALLACE, J. M.; WU, G.; SPENCER, T. E. Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. **J Physiol**, v. 572, p. 51–58, 2006.

REYNOLDS, L. P.; FERREL, C. L.; ROBERTSON, D. A.; FORD, S. P. Metabolism of the gravid uterus, foetus and uteroplacenta at several stages of gestation in cows. **J Agric Sci**, v.106, p. 437-444, 1986.

RODRÍGUEZ, I.; PÉREZ, C.C.; ESPAÑA, F.; DORADO, J.; HIDALGO, M.; SANZ, J. Niveles químicos plasmáticos en vacas repetidoras tras I.A. **Archivos de Zootecnia**, v. 53, n. 201, p. 59-68, 2004.

SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2. ed. Washington: Pullman, 2003, 373 p.

SILVA, E. B. et al. Característica leucocitária, relação albumina/globulina, proteína plasmática e fibrinogênio de bovinos da raça Nelore, confinados e terminados a pasto. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 98, p. 2191-2196, 2008.

STICE, S. L.; STRELCHENKO, N. S.; KEEFER, C. L.; MATTHEWS, L. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. **Biol Reprod**, v. 54, p. 100-10, 1996.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology**. 2 ed., Iowa State: Ames, 2011, 748 p.

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

TRINDADE, C. E. P. Magnésio e asfixia perinatal. **Revista Paulista de Pediatria**. São Paulo: v. 24, n. 1, p. 4-5, 2006.

VASCONCELOS, B. O. **Apoptose em Placentônios Bovinos de Gestações de Conceitos Naturais e de Transgênicos Clonados**. 2016. 56 p. Tese De Mestrado - Universidade Estadual Paulista Júlio De Mesquita Filho, Dracena, 2016.

VEJLSTED, M. Comparative placentation. In: HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Essentials of domestic animal embryology**. New York: Elsevier, p. 455, 2010.

WEISS, D. J.; WARDROP, J. K. (Ed.) **Schalm's Veterinary Hematology**, 6 ed., Ames-USA: Wiley-Blacwell Publication, 2010, 1206 p.

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

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

WOELDERS, H.; WINDIG, J.; HIEMSTRA, S. J. How developments in cryobiology, reproductive technologies and conservation genomics could shape gene banking strategies for (farm) animals. **Reprod Domest Anim.** v. 47(4), p. 264–73, 2012.

YAMAZAKI, W. **Estudo do “Genomic Imprinting” na placenta de clones bovinos.** 2006. 94 p. Tese de Doutorado - Universidade Estadual Paulista Julio De Mesquita Filho, Jaboticabal, 2006.

CAPÍTULO 2 - BIOCHEMICAL CHANGES IN BLOOD AND ALLANTOIC FLUID DURING THE END OF THE PREGNANCY OF CLONED EMBRYOS BY SCNT IN NELLORE COWS.

ABSTRACT

The female reproductive tract of mammals undergoes intense remodeling of tissues layers and structures with dramatic morphophysiological changes during cyclicity and pregnancy. During pregnancy, changes in the uterus-placenta-fetus complex are modulated by the presence of the conceptus, and then, these changes could determine pregnancy success. Many pathological changes in the uterus-placenta-fetus complex throughout the pregnancy of bovine embryos cloned by SCNT have been described, and they were the foundation for the central hypothesis of this study that gestational changes in complicated pregnancies can be predicted or detected earlier by biochemical assays and/or portable gasometric analyzes in maternal blood and/or in the allantois fluid. Twenty-two healthy multiparous pregnant Nellore cows (*Bos taurus indicus*) were used for blood and allantoic fluid collection every fortnight starting on 150 days of gestation until natural-birth or abortion. Data of each cow was normalized for day of birth or abortion (Day 0). Three fortnights before these events were used for all analyses. A comprehensive description of reference values for various biochemical and blood gas parameters using serum and total blood samples, and a few blood gas parameters in allantoic fluid of naturally-produced (control; n = 6) and SCNT clone (clone; n = 16) pregnancies in Nellore cows is the most important result of this study. Also, these parameters were studied in pregnant cows experiencing natural-birth (control, n = 3, and clone, n = 8) and abortion (control, n = 3, and clone, n = 8). The only studied parameter able to be used as a predictor of abortion was the cholesterol for pregnancies of clones. Cholesterol levels were elevated two and three fortnights before abortion in these pregnant cows. The circulating levels of potassium, phosphor, calcium, glucose, and urea presented distinct levels between pregnancies of fetus naturally-produced and by SCNT, indicating a different metabolism between these two pregnant groups. Unfortunately, allantois fluid samples were not able to be analyzed by the biochemistry assays due to sample lecture problems. Only pH, pO₂ and pCO₂

parameters presents adequate data results when analyzed by the portable gasometric equipment.

KEYWORDS: Allantois; SCNT; Pregnant Cows; Biochemistry; Hemogasometry.

2.1. INTRODUCTION

In 1997, the dogma that differentiated somatic cells were unable to reacquire totipotency generating a new individual was broken with the announcement of the birth of the first clone by SCNT, the sheep “Dolly” (WILMUT et al., 1997). Currently, the use of this technique in basic and applied research has provided important scientific discoveries, but much more can be done to improving its efficiency (CAMPBELL et al., 2007).

The birth rate of live calves after ET from SCNT cloned embryos is around 7 to 10%. (WELLS et al., 1999; MERIGHE, 2007) In vitro production of blastocysts has been a critical phase (EDWARDS et al., 2003; MELLO et al., 2003; WELLS et al., 2004). After ET, significant economic losses associated with fetal losses are also present. Four critical periods are identified after ET. The first period occurs until Day 30, and the survival rate after ET is around 30% (MERIGHE, 2007). These losses may be related to inefficient embryo signaling for maternal recognition of pregnancy, embryo failure to stimulate uterine remodeling and immunological aspects. The second critical period occurs between Days 30 and 60 of pregnancy. Approximately 40% of the conceptuses that survive to Day 30 will die in this short period (MERIGHE, 2007) where hypoplastic placentas with rudimentary cotyledons are observed (STICE et al., 1996; HILL et al., 2000; EDWARDS et al., 2003). The third critical period occurs during the second trimester of pregnancy. Around 50% of pregnancies are lost between Days 60 and 180 (MERIGHE, 2007). Placentas usually appear normal, but the number of cotyledons is reduced, and the fetus and placental layers may appear edematous and thick. The fourth or last critical period corresponds to the last trimester of pregnancy. Around 25% of pregnancies that reach Day 180 will be lost before the expected day of delivery (MERIGHE, 2007). Hydroallantois, hypertrophy of the cotyledons, edema of the intercotyledonary area and anasarca in the fetus are the most common pathologies observed in this period, among others.

The last trimester of pregnancy is characterized by intense fetal growth and a parallel increase in transplacental exchange of nutrients, gases, and excretions (REYNOLDS et al., 1986; REYNOLDS et al., 2006). Fructose levels in the allantois and amniotic sacs were elevated on Days 90 and 180 in pregnancies from in vitro produced embryos compared to in vivo produced embryos indicating increased placental fructogenic activity in the in vitro pregnancies (BERTOLINI et al., 2004). Pregnancies from SCNT clones that survive during early and mid-gestation are often complicated during the last trimester. “Large Offspring” syndrome, hydroallantois and placentomegaly are frequently found pathologies. Constant et al. (2006) showed evidence that this finding is more related to the “large placenta” syndrome and not to the “large offspring” syndrome. In this study, cows pregnant with SCNT were slaughtered on Days 180 and 280 of gestation and the macroscopic findings showed placental overgrowth preceding fetal overgrowth, with the fetus not being in a compensatory way the placental growth stimulating factor. In another work, the structure and microvascular architecture of the placenta were studied in 19 clone pregnancies that reached term (MIGLINO et al., 2007). Edema in the umbilical cord and fetal membranes were common. In addition, extensive areas of the chorioallantois did not present placentomas. In caruncles, the crypts were dilated and often had more villi than just the primary villi. These data suggest a placental compensation to supply the nutritional demands of the fetus during the last trimester of pregnancy by hypertrophy of the placentomes together with an increased number of villi. The fetus begins its intense growth phase in the last trimester and the uteroplacental complex is severely challenged to meet the demands of gas and nutrient exchange. It should be highlighted that bovine cloning by SCNT is associated with pregnancy abnormalities that can culminate in gestational prolongation, abortions, anomalies, decreased or absent signs of delivery and lower newborn survival. Commonly, these failures are related to placental changes (VASCONCELOS, 2016). However, the problems observed in clones are not restricted only to placental dysfunctions, but also to cardiocirculatory, respiratory, hepatic, joint, renal, immunological, and even multisystem dysfunctions in the fetus (GUIMARÃES et al., 2012).

Based on the above, it is believed that gestational changes in the uterus-placenta-fetus complex, in complicated pregnancies, can be predicted or detected earlier by biochemical and hemogasometric analyzes in maternal blood and/or in the

allantois fluid. Pregnancies of bovine clones by SCNT usually present gestational problems and could be useful for the detection of the best diagnostic marker. This work aimed to describe the bovine pregnancies of embryos cloned by SCNT and produced in vivo, focusing on biochemical and hemogasometric alterations of the allantois fluid and maternal blood. The results of this project may be useful to develop a gestational health research protocol applied not only to bovine species, but also to other mammalian species.

2.2. MATERIAL AND METHODS

2.2.1. Animals

Twenty-two healthy multiparous and pregnant Nellore cows (*Bos taurus indicus*) from the farm of the University of Sao Paulo – Campus of Pirassununga were used for this study starting on 150 days of gestation until delivery or abortion. The pregnancies of clones by SCNT and normal by IA (control) were produced for other studies in our laboratory. All cows had been examined by rectal palpation and ultrasonography before the experiments and did not present reproductive tract abnormalities. They were kept on *Panicum maximum* (Mombaça variety) pastures with ad libitum access to traced-mineral salt and water.

All experimental procedures were performed in accordance with the rules established by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) - Ministry of Science and Technology and were approved by the Ethics Committee for Animal Use and Experimentation (CEUA; protocol numbers: 2210140815 and 7715150216) of the School of Animal Science and Food Engineering (FZEA) from the University of São Paulo (USP).

2.2.2. Production of cloned embryos by somatic cell nuclear transfer (SCNT) and transfer to recipient cows.

Ovaries from slaughterhouse cows were used to obtain oocytes. Ovarian follicles with a diameter of 3 to 8 mm were aspirated. The recovered cumulus oocyte (COC) complexes, with more than four layers of cumulus cells and homogeneous

cytoplasm, were selected for in vitro maturation (IVM), according to a previously described technique (SANGALLI et al., 2012).

All in vitro procedures were performed at 38.8°C, maximum air humidity and 5% CO₂. Skin fibroblasts from Nellore cows (*Bos indicus*) were used as nucleus donor cells. Donor cells were maintained in a 0.5% fetal bovine serum solution for 72 h prior to micromanipulation to synchronize the cell cycle phase to G1/G0. IVM, oocyte enucleation, embryo reconstruction, and embryo activation were performed following the previously described cloning laboratory routine (SANGALLI et al., 2012).

Embryos were maintained in microdroplets with 100 µL of SOFaa medium supplemented with 5 mg.mL⁻¹ of BSA without fatty acids, and 2.5% (v/v) of FBS overlaid with mineral oil. Groups of 20 embryos were kept in the same medium for 7 days until the blastocyst stage (SANGALLI et al., 2012). Seven-day developmental blastocysts derived from SCNT cloning were then individualized, packaged in 0.25 mL straws, and transferred to bovine recipients seven days post-ovulation by the non-surgical embryo transfer procedure.

2.2.3. Synchronization of estrus and ovulation induction for fixed-time embryo transfer (FTET) and fixed-time artificial insemination (IATF).

Embryo recipients and cows for IA were submitted to the estrus and ovulation synchronization protocol at a fixed time, according to the protocol detailed below. Those who did not respond to the protocol, who were not diagnosed as pregnant or had embryonic/fetal loss were reused in subsequent synchronization protocols. The protocol consisted of the insertion of an intravaginal implant of progesterone (1.0 g of P4; Sincrogest; Ourofino Saúde Animal) and an intramuscular injection of estradiol benzoate (2 mg IM; Sincrodiol; Ourofino Saúde Animal) at the beginning of the protocol (day 0). Eight days later, the intravaginal progesterone implant was removed and a dose of prostaglandin F₂α (PGF₂α) analogue was administered intramuscularly (500 µg of cloprostenol sodium; Sincrocio; Ourofino Saúde Animal).

Ovulation induction was performed by administering estradiol benzoate (2 mg; Sincrodiol; Ourofino Saúde Animal) on day 9, and the occurrence of ovulation was confirmed after 42 hours by transrectal ultrasound. ET was performed seven days

after ovulation, and the embryo was transferred into the uterine horn ipsilateral to the corpus luteum (CL). Cows for the control group were artificially inseminated on day 10 using the same hormonal protocol described above for FTET.

2.2.4. Allantoic fluid and blood samples collection

Recipient cows were weakly examined transrectally by ultrasound in B- and Doppler modes using the MyLab 70 Vet Gold equipment (Esaote Healthcare, Italy) equipped with a transrectal linear multifrequency transducer for use in large animals (LV513; 10-5 MHz; Esaote Healthcare, Italy) or with a sectorial curvilinear multifrequency transducer (CA431; 7-1 MHz; Esaote Healthcare, Italy) for transabdominal scanning. The exams were used to monitoring the pregnancies statuses during this study.

From day 150 of pregnancy until term or abortion, allantoic fluid samples were collected fortnightly from pregnant cows. To obtain the fluid, an *in vivo* collection methodology was used, which consisted of aspiration of the fluid in the allantois sac guided by ultrasound, using a transabdominal paramammary technique as previously described (CALLAN et al., 2002). The transabdominal route was used due to the advanced gestational period and the anatomical location of the allantois sac during the respective gestational period.

The pregnant cows were restrained in a cattle chute. The right paramammary abdominal region was scanned using an ultrasound (MyLab 70 Vet Gold; Esaote Healthcare, Italy) equipped with a sectorial curvilinear multifrequency transducer (CA431; 7-1 MHz; Esaote Healthcare, Italy) to visualize the uterus, fetus, placenta, and its parts. The best abdominal location to puncture the aspiration needle was identified avoiding puncturing any important adjacent structures. The average distance to be covered by the aspiration needle between the abdominal wall and the allantoic fluid was approximately 2.5 cm.

After to locate the ideal abdominal puncture site, the area was shaved, and antisepsis was performed using a regular preoperative antiseptic solution followed by 70% alcohol washing. Sedation or systemic anesthesia were not necessary to perform the procedure. However, a local infiltrative anesthesia using 2% lidocaine was performed (approximately 2,5-5 mL). Regular 20G hypodermic needles (6 cm of

length) were used for the ultrasound guided punctures. Aspiration was performed manually using a 20 mL hypodermic syringe and the volume of collected fluid was between 10 to 20 mL. After the end of the fluid collection, samples were stored in sterile cryotubes and immediately frozen at -80 °C for further biochemical analysis. The gasometric analyzes were performed immediately after the collections, using a portable blood gasometer device (i-Stat, Abbott®) as described below.

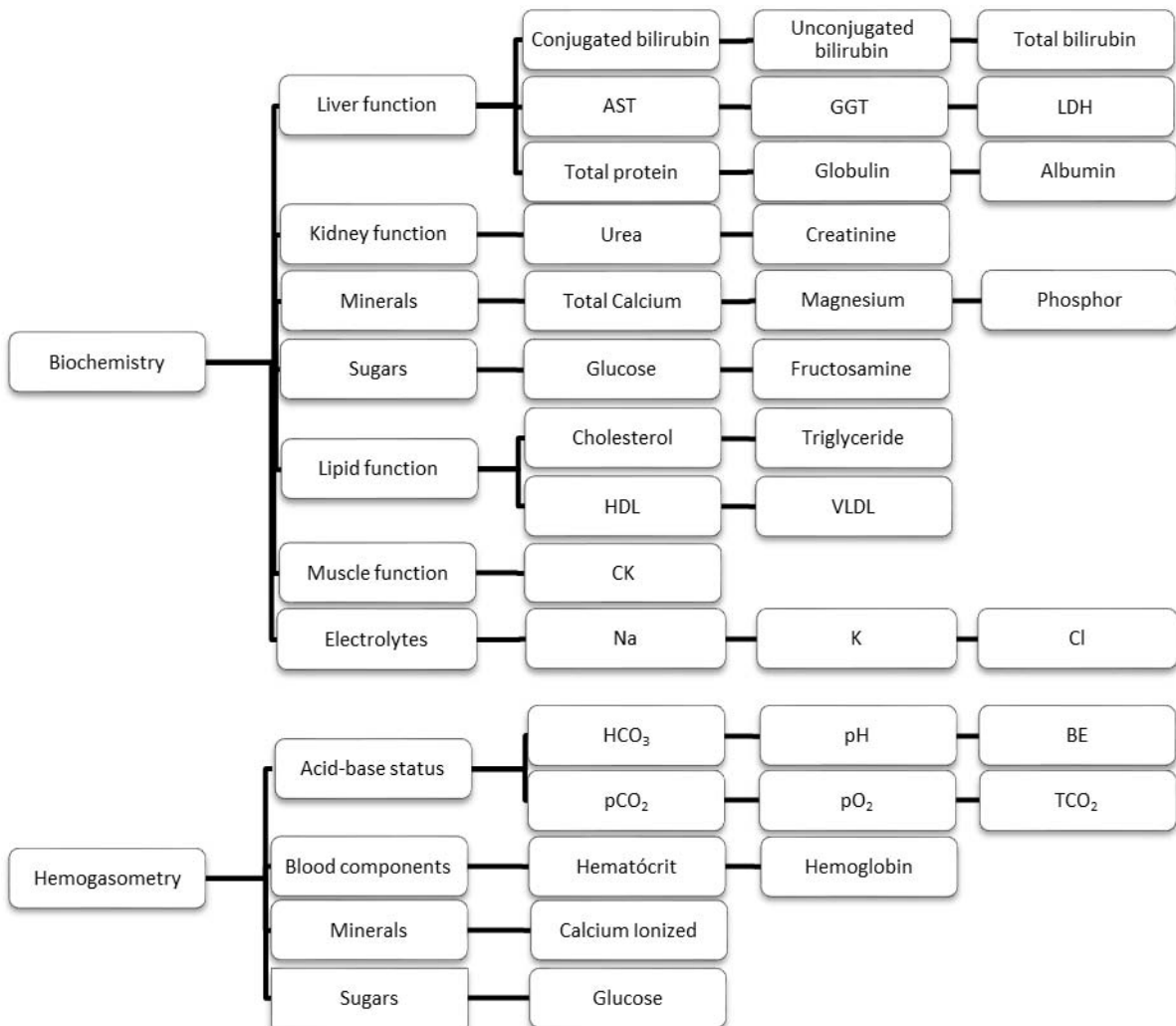
Blood samples were collected by jugular venous puncture with a 30x18 needle in a vacutainer system (15 mL vacuolized tubes) and centrifuged for 10 minutes in 13500 G for plasma isolation by pipetting. The blood plasma samples were frozen at -20 oC for further biochemistry analysis. For gasometric analysis, collections were performed by jugular venous puncture using a 30x18 needle coupled to a heparinized syringe to prevent blood clotting. Due to the difficulty in obtaining arterial blood in adult Nellore cattle in routine handling, venous blood was collected. Maternal venous blood gases analysis was performed immediately after collection.

2.2.5. Biochemical and portable hemogasometric analysis

All biochemical analyzes (Fig. 1) from allantoid fluid and maternal serum were performed using the Mindray BS-120® automatic biochemical analyzer (Mindray do Brazil, Sao Paulo, SP) in the clinical pathology laboratory of the Veterinary Hospital of the School of Animal Sciences and Food Engineer - FZEA – University of Sao Paulo - USP, Campus of Pirassununga, using the following LabTest® reagents: enzymatic sodium SD (124), enzymatic potassium (152), magnesium (50-200), total proteins (99-250), liquiform triglycerides (87-2/100), liquiform UV urea (104-4/50), sensiprot (36/200), liquiform LDH (86-2/30), liquiform chlorides (115), albumin (19/250), CNPG amylase (25-60), AST/GOT liquiform (109-4/30), bili-D liquiform (93-1/ 104), bili-T liquiform (94-1/104), calcium liquiform (90-2/30), CK NAC liquiform (117-2/30), HDL cholesterol(13), liquiform cholesterol (76-2/100), creatinine K (96-300), fructosamine (97-6/15), liquiform UV phosphorus (12-200), liquiform GAMA GT (105-2/30), liquiform glucose (133-1/ 5000). All the assays had been previously standardized by this laboratory for bovine species.

Blood gases analyzes (Fig.1) were performed on maternal venous blood and allantoic fluid using a portable human blood gases meter (i-Stat, Abbott®; i-STAT CG8+ cartridge).

Figure 1. List of end-points evaluated by laboratory biochemical analyzer and by portable blood gasometer using serum, blood, and allantois samples from pregnant cows. The evaluated end-points are presented based on their biological functions.



Fonte: Própria autoria

2.2.6. Data analysis

Twenty-two pregnant recipient's cows with gestational age from 150 days of gestation until parturition or abortion were selected for this study. Sixteen cows were pregnant of SCNT cloned embryos (clone group), and six pregnant of embryos naturally produced by AI (control group). Eight cows from clone group and three from control group gave birth to live calves and eight and three cows, respectively from these two groups, aborted. For data analyses four subgroups were also used as follow: clone-birth, clone-abortion, control-birth, and control-abortion.

Sample collections occurred fortnightly after day 150 of pregnancy until term or abortion. For analyses, the sequential data from each cow were first normalized to the day of delivery or abortion and, retrospectively, data of all cows were rearranged fortnightly for calculation of group and subgroups statistical descriptive values. Some of the cows from the abortion subgroups had a very short gestational period for data collection (Figure 2). Then, due to the restricted experimental number for statistical analyses, data only from the last three fortnights prior to abortion or birth were used. All end-points are shown as mean \pm SEM by groups and/or subgroups.

Firstly, each end-point mean for each group/subgroup in each fortnight was compared with the literature reference normal range values and these data are shown indicating its level as bellow, normal, or above to the respective reference value. Nonstatistical analyses were performed when the data of all groups or subgroups in all fortnights felt in the same level. When differences were observed among the data levels between groups/subgroups and/or among fortnights, a more detailed statistical analysis was performed as described below.

Data were visually evaluated for quality before any analysis. End-points with poor quality was not used and discarded. Poor quality refers to an end-point containing a large amount of data values smaller or higher than the assay sensitivity, to large variability of the data among samples, or to the assay inability to read the samples. For serum and total blood samples, the end-points HDL (biochemistry assay) and BE (portable hemogasometry) were not used due to poor quality. For allantois samples, all the biochemistry end-points and almost the totality of the portable hemogasometry end-points were not used. Then, for allantois samples, only the end-points pH, pO₂, and pCO₂ presented good data quality for analysis.

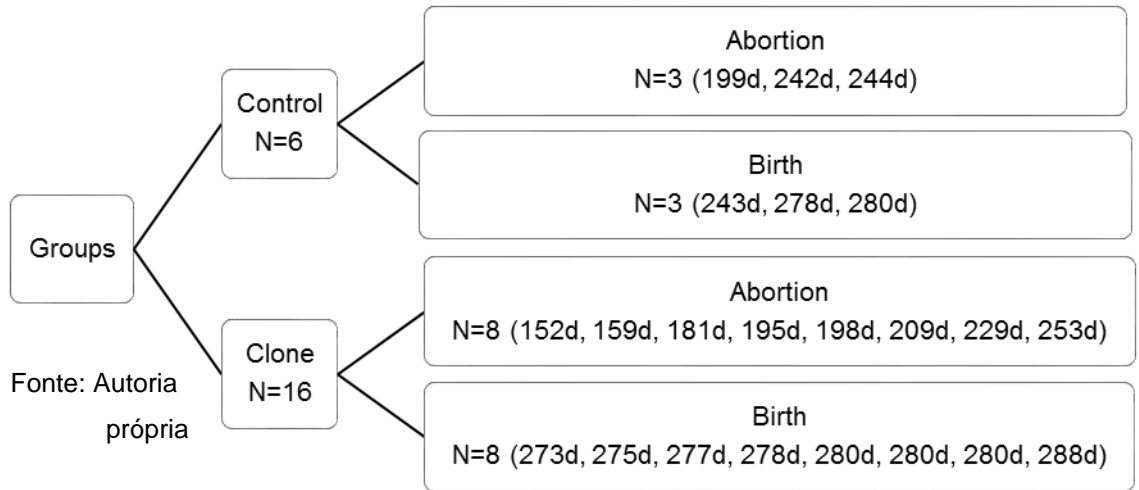
2.2.7. Statistical analysis

Data were examined for normality with the Kolmogorov-Smirnov test. When the normality test was significant ($P < 0.05$), data were transformed to natural logarithms. Comparisons between clone and control groups on fortnights -3, -2 and -1 analyzed for main effects of group (between clone and control) or subgroup (among clone-birth, clone-abortion, control-birth, and control-abortion) and fortnight, and the interaction of group or subgroup and fortnight. The mixed procedure of SAS® (version 9.4; SAS® Institute, Inc., Cary, NC, USA) was used with a repeated statement to account for autocorrelation between sequential measurements. Data were analyzed by the potential differences in the Glimmix procedure of SAS® to determine the main effects and the interaction. When a main effect or interaction was significant, Tukey's HSD test was used for comparisons between groups or among subgroups within a fortnight and between fortnights within a group or subgroup. A probability of $P \leq 0.05$ indicated a significant difference, and probabilities between $P > 0.05$ and $P \leq 0.1$ indicated a difference approaching significance. Data are presented as the mean \pm SEM.

2.3. RESULTS

From the 22 studied cows, eight from clone group and three from control group gave birth to live calves and eight and three cows, respectively from these two groups, had aborted. The gestational date of each event is shown on Fig. 2. Three cows from clone group aborted in the end of the second gestation third and five during the last third. All the three abortions from control group occurred during the last gestational third. All the three natural birth from control group occurred prematurely, especially the one on day 199 of gestation. However, all calves have born healthy and survived. Births from clone group have occurred at expected gestational date.

Figure 2. Experimental number of the experimental groups and gestational date of each cow when the events birth or abortion had occurred.



Fonte: Própria aatoria

The normalized data for each end-point obtained by biochemistry and hemogasometry assays from serum or total blood of the recipients are presented on tables 1 to 4. Data were organized by the three fortnights prior birth or abortion for each experimental subgroup (birth and abortion of control and clone groups). Based on the literature reference values for normal cows, indication of the end point data levels as low, normal, and high were also presented.

The mean values of sodium and chloride (Table 1), albumin, conjugated bilirubin, total bilirubin, and γ -glutamyl transferase (Table 2), creatinine (Table 3), and pH, bicarbonate, total CO₂ (Table 04) were normal for all subgroups during the three studied fortnights. Nonstatistical analyses were done in addition to the descriptive approach.

Potassium values were low during the three fortnights for the clone subgroups. However, one fortnight before birth and abortion, values were low for all subgroups. During the second fortnight, potassium was normal for control-birth subgroup and low for the other three subgroups, and normal for the control subgroups and low for the clone groups during the third fortnight (Table 1). These data indicated a temporal decrease of potassium levels in the normal pregnancies and low values for clone group during the three studied fortnights. When the potassium data were statistically analyzed during all the experimental period by group and by subgroups (Figure 3), a

tendency for lower values in the clone group compared to the control group ($P = 0.0759$) and significant lower values for the subgroup clone-abortion compared to the others ($P = 0.0759$) were found. Effect of fortnight or interaction was not significant ($P > 0.1$).

The phosphor values were normal for birth subgroups and low for abortion subgroups at fortnight -1. At fortnight -2, values were normal for control subgroups and low for the clone subgroups. At fortnight -3, the values were high for the subgroup control-abortion and low for the other three subgroups (Table 1). A more detailed analysis of phosphor data is shown on figure 3. Like the potassium data, a tendency of significance ($P = 0.0783$) was found for lower values for the clone group when compared to control group during the three fortnights. When the subgroups were compared, effect of subgroup was detected ($P = 0.0232$) and phosphor value was high in the control-abortion subgroup compared with the other subgroups ($P < 0.05$). No effects of fortnight or interaction was found ($P > 0.1$).

The magnesium value was high on subgroup clone-abortion during the fortnight -1 and normal for the other subgroups. At fortnight -2 it was normal for the control subgroups a high for the clone subgroups. During the fortnight -3 it was normal for the control-birth subgroup and high for all other subgroups (Table 1). The data indicate a temporal decrease of the elevated values to normality. When the data was analyzed during the experimental period by groups and by subgroups (Figure 3), none of the group (subgroups), fortnight and interaction effects were found ($P > 0.1$).

The total calcium values were normal on subgroup clone-birth at the fortnights -1 and -2. For all the other subgroups during the fortnights -1 and -2 and for all subgroups during fortnight -3 the total calcium values presented low (Table 1). When the ionized calcium was evaluated, the values were low for all subgroups during the three studied fortnights (Table 1). A more detailed analysis was done for the total calcium (Figure 3). It was found a group effect ($P = 0.0277$) and tendency to interaction ($P = 0.0738$) when the data was analyzed by group during the experimental period. Values of total calcium were statistically higher in clone group during the fortnights -1 and -2 ($P < 0.05$). When the data was analyzed by subgroups, effect of group was detected ($P = 0.0239$) and values of total calcium were higher in subgroup clone-birth during the fortnight -1 compared to the other subgroups ($P < 0.05$).

Table 1. Mean \pm SEM of electrolytes and minerals end-points analyzed by biochemistry assays and portable hemogasometry respectively from blood serum and total blood of pregnant cows during the three fortnights before natural birth or abortion. Group control refers to pregnancies by IA (N=6; 3 births and 3 abortions) and group clone refers to pregnancies by ET of SCNT embryos (N=16; 8 births and 8 abortions).

End Point	Group	Event	Fortnights previously to birth or abortion									
			3 ^a			2 ^a			1 ^a			
			Low	Normal	High	Low	Normal	High	Low	Normal	High	
Electrolytes (biochemistry)	Sodium ¹ 132 a 152 mmol/L	Control	Birth		141,00 \pm 0,58			142,00 \pm 1,15			143,00 \pm 1,53	
			Abortion		143,00 \pm 1,00			141,50 \pm 1,50			142,33 \pm 1,33	
		Clone	Birth		141,50 \pm 0,57			140,29 \pm 0,52			140,33 \pm 0,33	
			Abortion		141,00 \pm 1,22			140,2 \pm 0,97			141,00 \pm 0,93	
	Potassium ¹ 3,9 a 5,8 mmol/L	Control	Birth		3,93 \pm 0,18			4,03 \pm 0,03			3,87 \pm 0,27	
			Abortion		4,03 \pm 0,32		3,65 \pm 0,05			3,80 \pm 0,12		
		Clone	Birth	3,86 \pm 0,12			3,84 \pm 0,07			3,70 \pm 0,20		
			Abortion	3,65 \pm 0,09			3,20 \pm 0,19			3,48 \pm 0,16		
	Chloride ¹ 97 a 111 mmol/L	Control	Birth		103,61 \pm 0,68			103,79 \pm 0,55			104,31 \pm 0,49	
			Abortion		101,93 \pm 0,82			101,19 \pm 1,66			104,08 \pm 0,94	
		Clone	Birth		105,30 \pm 0,78			104,58 \pm 0,91			103,32 \pm 0,99	
			Abortion		104,82 \pm 0,73			102,28 \pm 3,28			103,06 \pm 1,23	
Minerals (biochemistry)	Phosphor ¹ 5,6 a 6,5 mg/dL	Control	Birth	5,38 \pm 0,69			6,19 \pm 0,74			6,48 \pm 0,57		
			Abortion			7,33 \pm 0,57			5,56 \pm 1,29			
		Clone	Birth	4,95 \pm 0,25			5,50 \pm 0,46			5,76 \pm 0,44		
			Abortion	5,41 \pm 0,51			5,00 \pm 0,46			5,40 \pm 0,45		
	Magnesium ¹ 1,8 a 2,3 mg/dL	Control	Birth		2,18 \pm 0,16			2,16 \pm 0,44			1,91 \pm 0,12	
			Abortion			2,41 \pm 0,10			2,09 \pm 0,07		2,21 \pm 0,18	
		Clone	Birth			2,38 \pm 0,10			2,31 \pm 0,05		2,27 \pm 0,07	
			Abortion			2,46 \pm 0,20			2,40 \pm 0,19		2,45 \pm 0,16	
	Total Calcium ² 9,7 a 12,4 mg/dL	Control	Birth	9,19 \pm 0,50			8,75 \pm 0,50			8,68 \pm 0,44		
			Abortion	9,05 \pm 0,20			8,85 \pm 0,07			8,78 \pm 0,37		
		Clone	Birth	9,41 \pm 0,26				10,37 \pm 0,30			10,12 \pm 0,11	
			Abortion	9,19 \pm 0,34			9,68 \pm 0,39			8,94 \pm 0,36		
Minerals (venous hemogasometry)	Calcium Ionized ² 4,8 a 6,2 mg/dL	Control	Birth	1,11 \pm 0,06			1,07 \pm 0,04			1,14 \pm 0,02		
			Abortion	1,16 \pm 0,04			1,16 \pm 0,03			1,06 \pm 0,04		
		Clone	Birth	1,68 \pm 0,46			1,19 \pm 0,02			1,22 \pm 0,03		
			Abortion	4,64 \pm 3,48			3,23 \pm 2,09			2,52 \pm 1,34		

Range references for normal values: ¹Kaneko et al. (2008); ²Radostits et al. (2000).

Fonte: Própria autoria

Aspartate aminotransferase (AST) was normal for subgroup clone-birth and low to other subgroups at fortnight -1, normal for subgroup control-birth and low for the others at fortnight -2, and low for all subgroups at fortnight -3 (Table 2). The data indicates low AST values compared to the reference values during the gestational studied period. Values of unconjugated bilirubin, globulin, and Lactate dehydrogenase were high compared to the reference values for all subgroups during all the experiment period (Table 2).

Total protein values were normal for all subgroups compared to the reference values at fortnights -1 and -3. At fortnight -2, the values were normal for control-abortion and clone-birth subgroups and low and high respectively for control-birth clone-abortion subgroups (Table 2). The data indicates small variation of the values compared to the reference values at fortnight -2.

Table 2. Mean \pm SEM of liver function end-points analyzed by biochemistry assays and portable hemogasometry respectively from blood serum and total blood of pregnant cows during the three fortnights before natural birth or abortion. Group control refers to pregnancies by IA (N=6; 3 births and 3 abortions) and group clone refers to pregnancies by ET of SCNT embryos (N=16; 8 births and 8 abortions).

End Point	Group	Event	Fortnights previously to birth or abortion								
			3 ^a			2 ^a			1 ^a		
			Low	Normal	High	Low	Normal	High	Low	Normal	High
Albumin ¹ 3,03 a 3,55 g/dL	Control	Birth		3,00 \pm 0,04			3,13 \pm 0,08			3,20 \pm 0,04	
		Abortion		3,25 \pm 0,10			3,25 \pm 0,07			3,11 \pm 0,24	
	Clone	Birth		3,20 \pm 0,10			3,20 \pm 0,08			3,27 \pm 0,09	
		Abortion		3,30 \pm 0,12			3,37 \pm 0,15			3,22 \pm 0,10	
	Aspartate aminotransferase AST ¹ 78 a 132 U/L	Control	Birth	57,83 \pm 3,42			80,17 \pm 10,35			63,17 \pm 2,32	
			Abortion	61,50 \pm 7,75		55,83 \pm 1,48			77,33 \pm 18,67		
Clone		Birth	72 \pm 13,25		73,13 \pm 6,69			86,10 \pm 6,76			
		Abortion	77,40 \pm 5,61		69,50 \pm 2,01			75,13 \pm 4,84			
Conjugated bilirubin ¹ 0,04 a 0,44 mg/dL	Control	Birth		0,08 \pm 0,01			0,08 \pm 0,01			0,08 \pm 0,00	
		Abortion		0,06 \pm 0,00			0,09 \pm 0,03			0,14 \pm 0,03	
	Clone	Birth		0,11 \pm 0,02			0,10 \pm 0,01			0,10 \pm 0,01	
		Abortion		0,06 \pm 0,01			0,08 \pm 0,02			0,10 \pm 0,03	
Unconjugated bilirubin ¹ 0,03 mg/dL	Control	Birth			0,08 \pm 0,01			0,08 \pm 0,02			0,07 \pm 0,03
		Abortion			0,07 \pm 0,01			0,09 \pm 0,01			0,09 \pm 0,05
	Clone	Birth			0,05 \pm 0,03			0,07 \pm 0,01			0,06 \pm 0,01
		Abortion			0,04 \pm 0,01			0,09 \pm 0,04			0,09 \pm 0,02
Total bilirubin ¹ 0,01 a 0,5 mg/dL	Control	Birth		0,15 \pm 0,02			0,16 \pm 0,03			0,15 \pm 0,03	
		Abortion		0,14 \pm 0,01			0,18 \pm 0,03			0,24 \pm 0,05	
	Clone	Birth		0,16 \pm 0,04			0,18 \pm 0,02			0,17 \pm 0,02	
		Abortion		0,10 \pm 0,01			0,17 \pm 0,05			0,19 \pm 0,03	
γ -Glutamyl transferase (GGT) ¹ 6,1 a 17,4 U/L	Control	Birth		17,67 \pm 2,89			17,17 \pm 3,66			16 \pm 3,12	
		Abortion		12,67 \pm 0,44			15,67 \pm 0,67			13,67 \pm 3,18	
	Clone	Birth		10,00 \pm 2,27			13,13 \pm 1,39			11,60 \pm 1,18	
		Abortion		16,10 \pm 0,68			15,42 \pm 0,69			14,88 \pm 1,68	
Globulin ¹ 3,0 a 3,48 g/dL	Control	Birth			3,69 \pm 0,29			3,58 \pm 0,24			3,56 \pm 0,38
		Abortion			3,88 \pm 0,19			3,98 \pm 0,20			3,79 \pm 0,08
	Clone	Birth			3,96 \pm 0,24			3,98 \pm 0,16			3,86 \pm 0,24
		Abortion			4,11 \pm 0,43			4,19 \pm 0,30			3,90 \pm 0,31
Total protein ¹ 6,74 a 7,46 g/dL	Control	Birth		6,78 \pm 0,34		6,70 \pm 0,30			6,76 \pm 0,36		
		Abortion		7,13 \pm 0,13			7,23 \pm 0,14			6,90 \pm 0,31	
	Clone	Birth		7,17 \pm 0,17			7,18 \pm 0,12			7,14 \pm 0,21	
		Abortion		7,42 \pm 0,37			7,56 \pm 0,29			7,11 \pm 0,32	
Lactate dehydrogenase ¹ (LDH) 692 a 1445 U/L	Control	Birth			2020,17 \pm 19,06			2382,5 \pm 247,31			2212,83 \pm 202,67
		Abortion			2229,33 \pm 200,20			2034,50 \pm 149,52			2189,33 \pm 284,73
	Clone	Birth			2224,50 \pm 154,59			2019,31 \pm 46,14			2462,50 \pm 69,26
		Abortion			2396,80 \pm 178,81			2140,33 \pm 217,35			2434,06 \pm 245,83

Range references for normal values: ¹Kaneko et al. (2008).

Fonte: Própria autoria

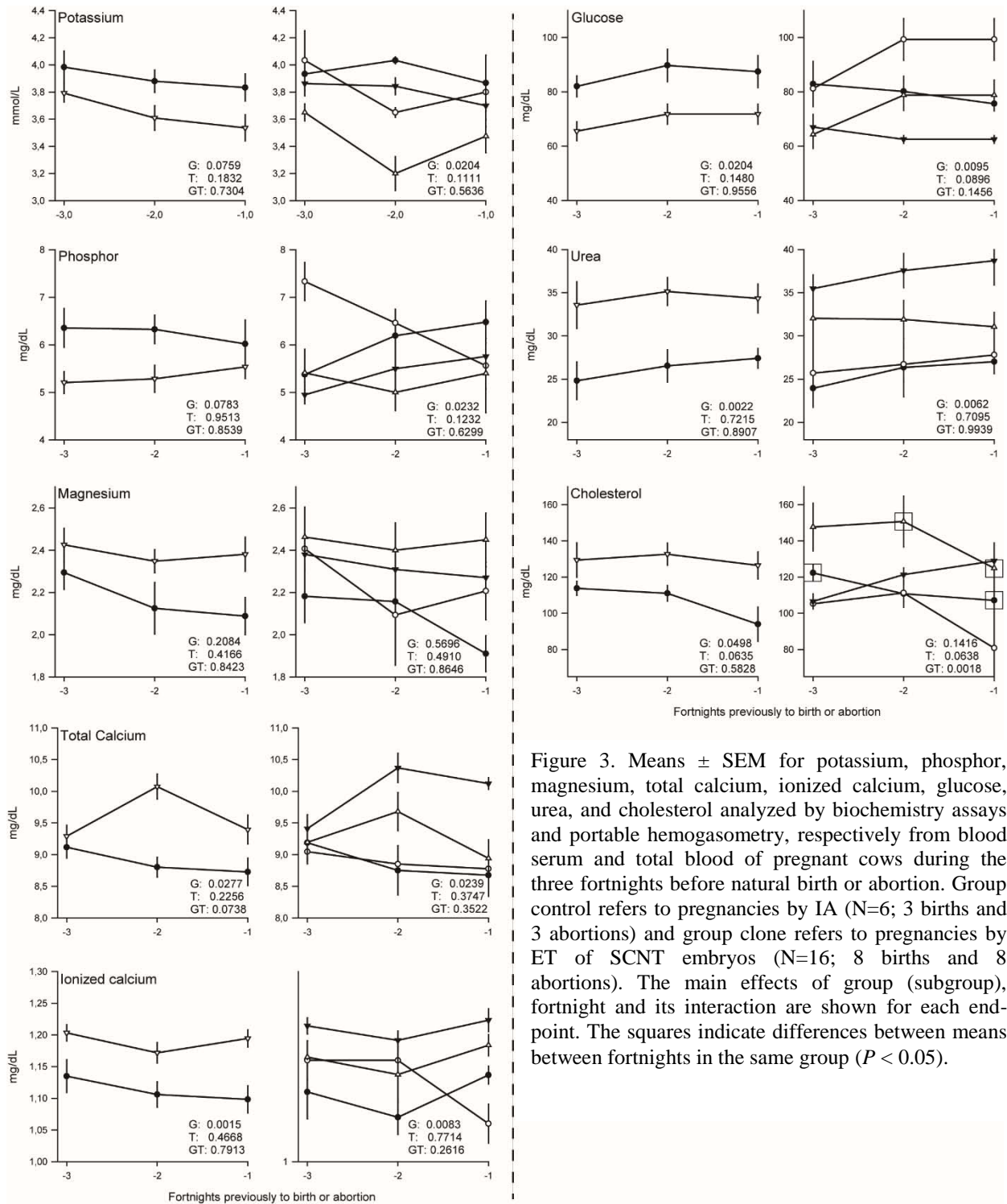


Figure 3. Means \pm SEM for potassium, phosphor, magnesium, total calcium, ionized calcium, glucose, urea, and cholesterol analyzed by biochemistry assays and portable hemogasometry, respectively from blood serum and total blood of pregnant cows during the three fortnights before natural birth or abortion. Group control refers to pregnancies by IA (N=6; 3 births and 3 abortions) and group clone refers to pregnancies by ET of SCNT embryos (N=16; 8 births and 8 abortions). The main effects of group (subgroup), fortnight and its interaction are shown for each end-point. The squares indicate differences between means between fortnights in the same group ($P < 0.05$).

Fonte: Autoria própria

The mean values of triglyceride, VLDL, and fructosamine (Table 3) were high for all subgroups during the three studied fortnights. Nonstatistical analyses were done in addition to the descriptive approach.

Glucose was evaluated by two different assays, by a biochemistry kit and by venous hemogasometry. Values of glucose by biochemistry kit were high for control subgroups during all experimental period and high for the clone abortion subgroup at fortnight -1. For all other subgroups values, the glucose was normal (Table 3). When the glucose was evaluated by hemogasometry, at fortnight -1 the subgroup normal-birth present normal values and the others high values. At fortnight -2, glucose of both subgroups of birth was normal and of both abortion subgroups was high. At fortnight -3, glucose of both control subgroups was high and from both clone subgroups was normal (Table 3). Due the high variability of the values on data obtained by hemogasometry, only the biochemistry glucose data was more detailed analyzed (Figure 3). When the glucose data was statistically compared by groups (subgroups) during the experimental period, effect of group was found ($P = 0.0204$) and values of the control group were higher than in clone group ($P < 0.05$). When the subgroups were compared, effect of group ($P = 0.0095$) and a tendency of fortnight effect ($P = 0.0896$) were found. At fortnights -1 and -2 the glucose values were higher in subgroup control-abortion compared to subgroup clone-birth ($P < 0.05$).

For O₂ values, only the subgroup control-birth presented high value at fortnight -2 compared to the reference value range (Table 4). However, if the variability (SEM) found for this be considered, the value can feel in the normal reference range. In the other hand, data of hematocrit and hemoglobin presented high in most of the subgroups (Table 4) and the mean values into the normal reference range presented higher variability and can feel into to the high range values. Then, nonstatistical analyses were done in addition to this descriptive approach.

For allantois data, most of the biochemistry and hemogasometry end-points were not used due to the poor data quality. Only the end-points pH, pO₂ and pCO₂ were analyzed for group/subgroups and fortnights comparisons (Table 5). Effects of group (or subgroups), fortnights, and interaction were not found for any of these end-points ($P > 0.1$).

Table 3. Mean \pm SEM of kidney, muscle, lipid function, and other end-points analyzed by biochemistry assays and portable hemogasometry respectively from blood serum and total blood of pregnant cows during the three fortnights before natural birth or abortion. Group control refers to pregnancies by IA (N=6; 3 births and 3 abortions) and group clone refers to pregnancies by ET of SCNT embryos (N=16; 8 births and 8 abortions).

End Point	Group	Event	Fortnights previously to birth or abortion										
			3 ^a			2 ^a			1 ^a				
			Low	Normal	High	Low	Normal	High	Low	Normal	High		
Kidney function (biochemistry)	Urea ¹ 20 a 30 mg/dL	Control	Birth		23,93 \pm 288			26,35 \pm 4,41			27,02 \pm 1,86		
			Abortion		25,70 \pm 5,69			26,72 \pm 2,69			27,80 \pm 2,71		
		Clone	Birth			35,48 \pm 2,16			37,25 \pm 2,87			38,71 \pm 3,61	
	Abortion				32,04 \pm 6,19			31,91 \pm 3,09			31,06 \pm 2,32		
	Creatinine ¹ 1,0 a 2,0 mg/dL	Control	Birth		1,72 \pm 0,19			1,58 \pm 0,20			1,74 \pm 0,18		
			Abortion		1,76 \pm 0,16			1,83 \pm 0,28			1,93 \pm 0,25		
Clone		Birth		1,70 \pm 0,07			1,57 \pm 0,17			1,79 \pm 0,15			
		Abortion		1,57 \pm 0,07			1,80 \pm 0,18			1,92 \pm 0,25			
Muscle function (biochemistry)	CK ² 35 a 280 U/L	Control	Birth		127,17 \pm 32,77			74,33 \pm 17,96		313,00 \pm 141,02		150 \pm 55,47	
			Abortion		100,00 \pm 13,33			146,56 \pm 16,47			55,00 \pm 0,00		
		Clone	Birth		122,88 \pm 31,47			145,50 \pm 27,73			188,10 \pm 38,32		
	Abortion			273,2 \pm 63,26						155,13 \pm 24,84			
	Lipid function (biochemistry)	Cholesterol ¹ 80 a 120 mg/dL	Control	Birth			122,30 \pm 5,68			110,80 \pm 9,81			107,12 \pm 8,09
				Abortion		105,27 \pm 1,96			111,27 \pm 7,00			107,45 \pm 11,75	
Clone			Birth		106,60 \pm 4,91					121,35 \pm 4,67		128,93 \pm 3,51	
		Abortion			147,65 \pm 17,13				150,71 \pm 19,46		124,94 \pm 16,44		
Triglyceride ¹ 0 a 14 mg/dL		Control	Birth			33,03 \pm 2,35			35,33 \pm 4,27			31,32 \pm 3,74	
			Abortion		36,12 \pm 4,42			32,38 \pm 1,98			30,20 \pm 10,31		
	Clone	Birth		33,05 \pm 1,30			34,66 \pm 3,49			30,64 \pm 1,81			
		Abortion		35,99 \pm 1,45			42,10 \pm 5,98			33,19 \pm 4,74			
VLDL ³ 0 a 2,8 mg/dL	Control	Birth			6,67 \pm 0,44			7,17 \pm 0,93			6,33 \pm 0,83		
		Abortion			7,17 \pm 0,88			6,50 \pm 0,58			6,33 \pm 2,03		
	Clone	Birth		6,50 \pm 0,29			7,25 \pm 0,69			6,00 \pm 0,35			
		Abortion		7,10 \pm 0,40			7,75 \pm 1,03			6,69 \pm 0,89			
Other components (biochemistry)	Fructosamine ⁴ 213,4 a 265 μ mol/L	Control	Birth			443,77 \pm 28,43			455,70 \pm 22,48			456,85 \pm 29,12	
			Abortion			501,45 \pm 5,89			481,27 \pm 13,98			520,20 \pm 31,91	
		Clone	Birth		459,63 \pm 25,50			416,39 \pm 16,18			405,53 \pm 15,94		
	Abortion			456,12 \pm 22,27			445,24 \pm 17,61			470,30 \pm 21,30			
	Glucose ¹ 45 a 75 mg/dL	Control	Birth				82,87 \pm 10,92			80,13 \pm 7,25		75,60 \pm 3,59	
			Abortion			81,17 \pm 3,70			88,80 \pm 6,86		99,28 \pm 10,98		
Clone		Birth		67,00 \pm 6,61			72,23 \pm 5,38			62,50 \pm 2,05			
		Abortion		64,28 \pm 7,46			74,51 \pm 4,76			78,74 \pm 7,20			
Other components (venous hemogasometry)	Control	Birth			92,67 \pm 23,31			75,00 \pm 6,03			72,33 \pm 6,69		
		Abortion			96,33 \pm 16,97			76,50 \pm 9,50			83,67 \pm 7,97		
	Clone	Birth		65,50 \pm 3,39			64,57 \pm 2,88			76,00 \pm 2,65			
		Abortion		62,75 \pm 2,78				83,20 \pm 14,25			76,25 \pm 5,81		

Range references for normal values: ¹Kaneko et al. (2008); ²Radostits et al. (2000); ³Poncheki (2019); ⁴Jensen et al. (1993).

Fonte: Própria autoria

Table 4. Mean \pm SEM of acid-base status and blood components end-points analyzed by biochemistry assays and portable hemogasometry respectively from blood serum and total blood of pregnant cows during the three fortnights before natural birth or abortion. Group control refers to pregnancies by IA (N=6; 3 births and 3 abortions) and group clone refers to pregnancies by ET of SCNT embryos (N=16; 8 births and 8 abortions).

End Point	Group	Event	Fortnights previously to birth or abortion										
			3 ^a			2 ^a			1 ^a				
			Low	Normal	High	Low	Normal	High	Low	Normal	High		
Acid-base status (venous hemogasometry)	pH ¹ 7,31 a 7,53	Control	Birth		7,43 \pm 0,03			7,31 \pm 0,16			7,48 \pm 0,02		
			Abortion		7,45 \pm 0,04			7,44 \pm 0,01			7,31 \pm 0,16		
		Clone	Birth		7,46 \pm 0,01			7,44 \pm 0,01			7,46 \pm 0,03		
			Abortion		7,48 \pm 0,02			7,49 \pm 0,02			7,45 \pm 0,02		
		Bicarbonate ¹ 20 a 28 mmol/L	Control	Birth		26,77 \pm 1,04			25,03 \pm 0,75			27,13 \pm 0,92	
				Abortion		27,40 \pm 1,10			22,40 \pm 0,70			27,03 \pm 0,52	
	Clone		Birth		25,46 \pm 1,18			24,47 \pm 0,76			25,83 \pm 1,96		
			Abortion		25,60 \pm 1,20			26,60 \pm 1,29			23,68 \pm 1,05		
	pO ₂ ² 30 a 40 mmHg	Control	Birth		30,00 \pm 2,65				40,67 \pm 10,73		30,33 \pm 4,18		
			Abortion		32,33 \pm 1,20			37,50 \pm 7,50		30,33 \pm 0,33			
		Clone	Birth		31,63 \pm 1,68			31,71 \pm 1,36		32,67 \pm 1,86			
			Abortion		32,25 \pm 1,31			31,20 \pm 2,03		33,88 \pm 0,93			
	pCO ₂ ¹ 35 a 44 mmHg	Control	Birth		37,87 \pm 1,43			35,20 \pm 2,77			36,77 \pm 2,66		
			Abortion		37,73 \pm 1,50		32,90 \pm 0,10			37,60 \pm 1,08			
		Clone	Birth		35,43 \pm 0,97			36,11 \pm 1,42		36,47 \pm 2,66			
			Abortion		34,68 \pm 0,23			34,92 \pm 1,69		34,23 \pm 1,70			
	Total carbon dioxide ¹ 21,2 a 32,2 mmol/L	Control	Birth		28,00 \pm 1,00			26,00 \pm 0,58			28,00 \pm 1,15		
			Abortion		29,33 \pm 0,88			23,50 \pm 0,50		28,33 \pm 0,88			
Clone		Birth		24,38 \pm 2,82			25,00 \pm 0,73		21,33 \pm 6,49				
		Abortion		26,75 \pm 1,18			27,40 \pm 1,33		24,63 \pm 1,12				
Blood components (venous hemogasometry)	Hematócrit ³ 21 a 30%	Control	Birth			33,67 \pm 3,28			32,67 \pm 3,18		30,67 \pm 4,41		
			Abortion			37,67 \pm 2,19			36,00 \pm 0,00		37,67 \pm 0,88		
		Clone	Birth			31,50 \pm 1,70			30,07 \pm 1,45		28,67 \pm 1,20		
	Abortion			24,30 \pm 7,38			33,92 \pm 5,71		31,86 \pm 3,30				
	Hemoglobín ³ 8 a 12 g/dL	Control	Birth		11,27 \pm 0,91			11,03 \pm 1,13			10,47 \pm 1,50		
			Abortion			12,80 \pm 0,75			12,20 \pm 0,00		12,70 \pm 0,25		
Clone		Birth		10,71 \pm 0,57			9,82 \pm 0,29		9,73 \pm 0,39				
	Abortion			12,10 \pm 0,41			13,08 \pm 0,56		11,83 \pm 0,57				

Range references for normal values: ¹Kaneko et al. (2008); ²Grünberg et al. (2011); ³Weiss e Wardrop (2010).

Fonte: Própria autoria

Table 5. Mean \pm SEM of acid-base status end-points analyzed by portable hemogasometry from allantois fluid of pregnant cows during the three fortnights before natural birth or abortion. Group control refers to pregnancies by IA (N=6; 3 births and 3 abortions) and group clone refers to pregnancies by ET of SCNT embryos (N=16; 8 births and 8 abortions).

End Point	Group	Fortnights previously to birth or abortion			Event	Fortnights previously to birth or abortion				
		3 ^a	2 ^a	1 ^a		3 ^a	2 ^a	1 ^a		
Acid-base status and gasometry	pH	Control	6,76 \pm 0,08	6,99 \pm 0,13	6,99 \pm 0,18	Birth	6,75 \pm 0,02	6,77 \pm 0,10	7,00 \pm 0,19	
		Clone	7,24 \pm 0,11	7,19 \pm 0,09	7,11 \pm 0,10	Abortion	6,77 \pm 0,10	7,21 \pm 0,09	6,98 \pm 0,13	
	pO ₂	Control	35,67 \pm 1,50	34,00 \pm 1,43	53,75 \pm 8,81	Birth	6,79 \pm 0,13	6,72 \pm 0,08	6,85 \pm 0,14	
		Clone	20,73 \pm 1,85	31,40 \pm 1,85	57,83 \pm 2,06	Abortion	7,06 \pm 0,14	7,06 \pm 0,10	7,16 \pm 0,10	
	pCO ₂	Control				Birth	57,67 \pm 6,33	61,00 \pm 1,00	55,00 \pm 17,09	
						Abortion	70,00 \pm 0,00	62,00 \pm 0,00	50,00 \pm 0,00	
		Clone					Birth	74,86 \pm 5,72	74,42 \pm 6,20	57,86 \pm 5,70
							Abortion	54,50 \pm 2,87	52,75 \pm 3,20	58,14 \pm 2,86

Fonte: Própria autoria

2.4. DISCUSSION

Abortion in half of the studied pregnancies in both groups, especially in control group, and the preterm births from cows in control group were two unexpected occurrences during this study. The cows were weekly examined by transabdominal ultrasonography and any clinical disturbance was detected in the uterus-placenta-fetus complex before these events. Also, the calves survived, and did not present any health problem. Many infectious and noninfectious causes have been implicated with abortion or preterm birth in cows (MEE, 2020). Even effects of lunar cycle and weather conditions on preterm calving have been studied and stressful weather conditions were associated with preterm birth in cows (SASAKI et al., 2019). Abortion and preterm birth have also been reported after brucellosis vaccination (FLUEGEL DOUGHERTY et al., 2013). In this study, the stress resulting from animal handling and of the abdominal punctures to collect allantois fluid could be implicated with the abortion events. However, as described, any clinical disturbance in uterus-placenta-fetus complex was detected. Also, the stress could be implicated in the cases of preterm birth. Nonetheless, all cows experienced the same kind of handling and sample collection procedures, and preterm birth had occurred only in three cows from control group, and none cow of the clone group. Unfortunately, this fact keeps unclear the causes of these events in this study.

Another unexpected find of this study was the inability of the biochemistry assays and the portable gasometrical equipment to evaluate the majority of the end-points using allantois samples. As previously described, data only of the end-points pH, pO_2 and pCO_2 from allantois samples presented good quality for the analyses. In the other hand, data from almost the end-points for serum and total blood samples, except for HDL (biochemistry assay) and BE (portable hemogasometry), had presented decent quality and were analyzed. Poor quality referred to an end-point containing a large amount of data values smaller or higher than the assay sensitivity, to large variability of the data among samples, or to the assay inability to read the samples. Samples presenting values smaller or higher than the assay sensitivity can be managed by concentration or dilution of the sample, respectively. However, all the problematic data of this study presented samples with a combination of these problems as some values into the assay sensitivity range with values too small or too high, or even in some cases, samples with no assay lecture, all in the same

experimental sample group. This fact made any kind of sample adjustment impossible before the analyses. The causes for this tremendous variability among these problematic allantois samples are not explainable.

The electrolytes sodium and chloride, albumin, conjugated bilirubin, total bilirubin, γ -Glutamyl transferase, creatinine, pH, bicarbonate, and total CO₂ fell into the range of the previously cited literature reference values during the experimental period. Even when the data was evaluated by the experimental subgroups, those parameters were normal. These findings indicated a very stable homeostatic control of these parameters and none effect of the reproductive statuses of the cow or previous health changes that resulted in normal birth or abortion.

In the other hand, triglyceride, VLDL, and fructosamine were high for all subgroups during the three studied fortnights. Triglycerides are lipids generated by the esterification of non-esterified fatty acids (NEFA's) to the alcoholic compound glycerol. Its main functions are thermal and electrical insulation, and acts as an energy reserve (OLIVEIRA, 2015). Pogliani & Birgel Junior reported that physiological changes in triglyceride levels are closely related to the events of pregnancy, parturition, and lactation. They found that calved animals have lower levels of triglycerides when compared to animals that were pregnant. VLDL are very low-density lipoproteins. Its secretion into plasma is the main method by which hepatocytes export triacylglycerol, which is the main lipid component of VLDL (PONCHEKI, 2019). Fructosamine are stable ketoamides composed of glucose molecules joined to protein molecules through glycation (ARMBRUSTER, 1987). In humans, the amount of fructosamine in the serum is increased in case of diabetes mellitus due to the high concentration of sugar in the blood (ARMBRUSTER, 1987). According to REUSCH et al. (1993) the measurement of fructosamine is not influenced by short-term fluctuations in blood sugars, a fact that can occur in stressful situations at the time of harvest, for example. Thus, fructosamine reflect the average blood sugar concentration in the last two to three weeks before harvest (ARMBRUSTER, 1987). MEGAHED; HIEW; CONSTABLE; (2018) used plasma fructosamine measurement as a method for verifying and quantifying hypoglycemia and/or negative energy balance in females in the early lactation period. However, the authors concluded that this is not an adequate quantification method, since it has a weak association with the plasma concentration of beta-hydroxybutyrate and, also, with the mean concentration of non-esterified fatty acids (NEFA). Jensen et al. (1993)

reported that it is possible to measure fructosamine in bovine serum samples and this may be indicative of subclinical ketosis in dairy cows. The fact that these parameters were elevated in all cows in our study and without distinction between subgroups confirms that an energy imbalance is present at the end of pregnancy (REYNOLDS et al., 1986; REYNOLDS et al, 2006). Interesting, it should be noted that this condition of energy imbalance is also present in cows that aborted and did not reach the phase of greater energy demand, which is the last gestational months. The elevated fructosamine in the cows of this experiment could be also due a long-term high circulating glucose level before birth or abortion, mainly in the control group.

In this study, glucose levels were higher in control group/subgroups compared to clone group/subgroups, which presented values into the normal range, in almost the time-points. Even the normal levels in the clone group are close to the higher values in the normal range. Those long-term glucose high values of glucose could be the cause of the high fructosamine levels also found in this study. The glucose used by ruminants is derived from the synthesis of volatile fatty acids, which is metabolized at the hepatic level. It is the main energy supplement for the fetus throughout pregnancy, and its transport is facilitated through the placenta (HAFEZ E HAFEZ, 2004). Ruminants depend on hepatic gluconeogenesis and hepatic glucose synthesis during late pregnancy and early lactation is increased to meet uterine and/or mammary demands (BELL E BAUMAN, 1997). To deliver glucose to the fetus, trophoblast cells lining the placental villi promote facilitated diffusion of glucose across the placental membrane. However, the blood glucose level of the fetus remains 20 to 30% below the level observed in the maternal blood (GUYTON E HALL, 1997).

Cholesterol presented higher in clone group compared to control group unlike a study (TICIANI, 2018) that present results of cholesterol similar between the studied groups (IVF, IVD and NT-HMC). Also, when studied by subgroups, cholesterol was higher in the clone-abortion subgroup compared to the other subgroups at the -2 and -3 fortnights. This finding can be an indication or marker of a healthy problem in the clone pregnancies culminating with abortion. The greater supply of nutrients to the fetus could be the cause of higher cholesterol in clone group, possible due to their greater demand for nutrients. Pogliani e Birgel Junior (2007) reported in a lipidogram study that there is a great variation of reference

values for cholesterol due to factors such as sex, race, rearing system, and their respective diet, and age, puerperium and parturition are causes for its data variability.

The electrolyte potassium levels were low for clone subgroups. One fortnight before birth and abortion, values were low for all subgroups. Potassium levels decreased throughout the three fortnights in control group. The external balance of potassium is maintained through its output via urinary excretion and its input via food intake. The internal potassium balance occurs through the translocation of the cation between the intracellular fluid and the extracellular fluid (DIBARTOLA E MORAES, 2011). Changes in serum potassium concentrations are due to dysfunctions in cardiac and skeletal muscles. Urinary, renal, and post-renal diseases that lead to decreased renal excretion are causes for increased plasma potassium concentration (BOHN, 2015). The pregnant cows pregnant of SCNT embryos may experience a renal dysfunction during the three fortnights before the events birth or abortion. This observation can also be supported by the elevated levels of urea for all clone subgroups during these three fortnights.

Urea was normal for all control subgroups and high for all clone subgroups during the experimental period. Ticiani (2018) [32] reported a difference in the plasma concentration of urea in maternal and fetal blood between the PIV, IVF and SCNT groups, with higher values for urea activity in the cloned group, supporting our findings. Measurements of fetal parameters for renal activity showed differences in the values of uric acid and urea, with higher values for the clone group compared to the control, indicating a greater production of ammonia due to a possible increase in nutrient catabolism. When the urea values were compared between the subgroups, it can be observed higher values for the clone subgroup that came to term, which can be explained by the greater need for substrates for its maintenance.

The blood minerals phosphor and calcium are regulated by vitamin D metabolites, dietary factors and the hormones calcitonin and parathyroid hormone (CARLSON, 2009). The hormone calcitonin is responsible for the decrease in the serum concentration of calcium and phosphorus, while parathyroid hormone increases the concentration of calcium, it acts concomitantly by decreasing that of phosphorus. Also, vitamin D acts by increasing the concentration of calcium and phosphorus through its absorption via the gastrointestinal tract (BOHN, 2015). Unlike other animals where phosphorus excretion occurs in the kidneys, in ruminants the excretion occurs mainly via the gastrointestinal tract. This fact contributes to

hyperphosphatemia in animals with upper gastrointestinal obstruction. Another triggering factor for an increase in serum phosphorus concentration is acidosis since there is a decrease in the absorption of the electrolyte by the cell (BOHN, 2015). Cattle that have a low phosphorus diet may have hypophosphatemia, such as cows that develop parturient paresis (CARLSON, 2009). Levels of calcium were low in all subgroups during the experimental period and levels of phosphorus were low in the clone subgroups during almost the studied fortnights. It could be suggested a nutritional deficiency of these elements in diet, but all animals had ad libitum access to trace-mineral salt previously and during this study. The low calcium levels can be also related to the prepartum metabolism of the pregnant cow. According to Ortolani (2014) during the prepartum period there are two mechanisms responsible to drop calcium levels in blood. The first is related to colostrum formation, the great mobilization of nutrients for the growth of the fetus and the development of the mammary gland. The second mechanism is related to the metabolic adjustments necessary to favor fat mobilization. Goff (2014) reported that the demand for calcium increases dramatically even before calving, as calcium leaves the bloodstream and is sequestered in the mammary gland for colostrum formation.

Magnesium presented normal or elevated for all subgroups during the experimental period. However, when the data was analyzed during all experimental period none differences between group or by fortnight were found. The high-level variability among samples could be the cause of this result. Blood magnesium concentrations are regulated by parathyroid hormone similarly to what occurs with calcium ion (TRINDADE, 2006). According to Goff (2014), disturbances resulting from changes in acid-base balance have insignificant effect on the distribution of serum magnesium. It can be noted that the maintenance of normal plasma magnesium concentration is entirely dependent on dietary absorption of the mineral. González et al. (2000) state that low magnesium values result in profound consequences for ruminants, which can lead to death. Cases of hypomagnesemia are accompanied by retained placenta, tetany, hyperexcitability, ruminal disturbances, as well as a drop in milk production. Hypomagnesemia may be a consequence of excessive lipolysis due to an energy deficiency in the diet. Hypermagnesemia, on the other hand, does not result in serious disorders for the affected animals since excess magnesium tends to be eliminated via urinary

excretion. This fact indicates nonimportant clinical aspects or consequences to consider for the subgroups of this study presenting moments of hypermagnesemia.

The AST is an enzyme evaluated in liver function tests in cattle and horses as a marker of damage to hepatocytes, although muscle damage and hemolysis can also be causes of increased serum activity (KREUTZER, TURK E CASTEEL, 2008). Due to its low hepatic specificity, the increase in serum AST levels may be due not only to hepatocyte damage but also related to muscle damage (ALLISON, 2015a). In this study, AST levels were lower than the reference range in almost the studied subgroups and fortnights. These low levels do not indicate any important clinical aspect.

At the beginning of this work, big expectations were placed on the data resulting from the analysis of the allantois fluid. Unfortunately, the techniques used for measurements were not able to adequately analyze the samples and the results were not uniform. Only pH, pO₂ and pCO₂ parameters were adequate for data analysis. There are no reference values in the literature for these parameters, preventing a descriptive analysis of the normality of their levels. Although, with all the described limitations, this study provided values that can be considered standard for these parameters in pregnant Nellore cows in the end of gestation. It is noteworthy that the values obtained were not different between the experimental groups/subgroups and between the studied fortnights. The found results show a homeostatic regulation of pH during the study period, and that there was no variation in the regulation of O₂ and CO₂ gases in the allantois regardless of the type of pregnancy, clone or normal fetus, or its termination, by abortion or birth.

In conclusion, despite the problems with the analysis of the samples, this study is the first in the literature presenting a comprehensive panel of reference values for various biochemical and blood gas parameters for Nellore cows using serum and total blood samples, and from allantois fluid during the end of pregnancy. In addition, these parameters were studied prior to birth and abortion. In the literature, the available standard reference values are from studies performed with healthy non-pregnant cattle (GRÜNBERG et al., 2011; JENSEN et al., 1993; KANEKO et al., 2008; (PONCHEKI, 2019; RADOSTITS et al., 2000; WEISS E WARDROP, 2010. Unfortunately, allantois fluid samples were not able to be analyzed by the biochemistry assays and by the portable gasometric equipment, except to three parameters. The central hypothesis of this study that gestational

changes in the uterus-placenta-fetus complex, in complicated pregnancies, can be predicted or detected earlier by biochemical and hemogasometric analyzes in maternal blood and/or in the allantois fluid was partially supported. Cholesterol was only parameter that could be used as an indicator of future abortion in pregnancies of clones by SCNT. However, many parameters as potassium, phosphor, calcium, glucose, and urea presented distinct levels between pregnancies of fetus naturally-produced and by SCNT, indicating distinct metabolism between these two pregnant groups.

REFERENCES

- ALLISON, R. W. Avaliação laboratorial da função hepática. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 853-903, 2015a.
- ARMBRUSTER, D. A. Fructosamine: Structure, analysis and clinical usefulness. **Clin Chem**. v. 33, p. 2153–2163, 1987.
- BELL, A. W.; BAUMAN, D. E. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 2, n. 3, p. 265-278, 1997.
- BERTOLINI, M.; MOYER, A. L.; MASON, J. B.; BATCHELDER, C. A.; HOFFERT, K. A.; BERTOLINI, L. R.; CARNEIRO, G. F.; CARGILL, S. L.; FAMULA, T. R.; CALVERT, C. C.; SAINZ, R. D.; ANDERSON, G. B. Evidence of increased substrate availability to in vitro-derived bovine fetuses and association with accelerated conceptus growth. **Reproduction**, v.128, p. 341–354, 2004.
- BOHN, A. A. Avaliação laboratorial dos eletrólitos. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed., Rio de Janeiro: Editora Roca Ltda., p. 807-1010, 2015.
- CALLAN, R. J.; SCHNACKEL, J. A.; VAN CAMPEN, H.; MORTIMER, R. G.; CAVENDER, J. A.; WILLIAMS, E. S. Percutaneous collection of fetal fluids for detection of bovine viral diarrhoea virus infection in cattle. **J Am Vet Med Assoc**; v. 220, p. 1348-52, 2002.
- CAMPBELL, K. H. S.; FISHER, P.; CHEN, W. C.; CHOI, I.; KELLY, R. D. W.; LEE, J. XHU, J-H. Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives, **Theriogenology**, v 68(1), p. S214-S231, 2007.
- CARLSON, G. P. Clinical Chemistry Tests. In: SMITH, B. P. **Large Animals Internal Medicine**. 4 ed., St Louis: Mosby Elsevier, cap. 22, p. 375-397, 2009.
- CONSTANT, F.; GUILLOMOT, M.; HEYMAN, Y.; VIGNON, X.; LAIGRE, P.; SERVELY, J. L.; RENARD, J. P.; CHAVATTE-PALMER, P. Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. **Biol Reprod**. v. 75, p.122–130, 2006.
- DIBARTOLA, S. P.; MORAES, H. A. D. Disorders of Potassium: Hypokalemia and Hyperkalemia. In: DIBARTOLA, S. P. **Fluid, Electrolyte, And Acid-Base Disorders In Small Animal Practice** 4^a ed., Elsevier Saunders, p. 92-119, 2011.
- EDWARDS, J. L.; SCHRICK, F. N.; MCCracken, M. D.; VAN AMSTEL, S. R.; HOPKINS, F. M.; WELBORN, M. G.; DAVIES, C. J. Cloning adult farm animals: a review of the possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer. **Amer J Reprod Immunol**, v. 50, p. 113-176, 2003.

- FLUEGEL DOUGHERTY, A. M.; CORNISH, T. E.; O'TOOLE, D.; BOERGER-FIELDS, A. M.; HENDERSON, O.L.; MILLS, K. W. Abortion and premature birth in cattle following vaccination with *Brucella abortus* strain RB51. **J. Vet. Diagn. Invest.** v. 25, p. 630–635, 2013.
- GOFF, J. P. Calcium and magnesium disorders. **Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.**, v.30, p. 359-381, 2014.
- GONZÁLEZ, F. H. D; CONCEIÇÃO, T. R.; SIQUEIRA, A. J. S.; LA ROSA, V. L. Variações sanguíneas de ureia, creatinina, albumina e fósforo em bovinos de corte no Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**, v. 20, p. 59-62, 2000.
- GRÜNBERG, W.; VAN BRUGGEN, L. V.; EISENBERG, S. W. F.; WEERTS, E. A.; WOLFE, A. Complete transposition of the aorta and pulmonary artery in Belgian Blue crossbreed calf: A case report, **BMC Veterinary Research**, v. 7(22), p. 1-7, 2011.
- GUIMARÃES, C. F, MEIRELLES, M. G., OLIVEIRA, B. M. M., POGLIANI, F. C., FERNANDES, C. B. Clonagem em ruminantes: anomalias placentárias e disfunções perinatais. **Veterinária em Foco**, v. 9, n. 2, p. 100-109, 2012.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9 ed. Rio de Janeiro Guanabara Koogan, 1997, 1151 p.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**, 7 ed., São Paulo: Manole, 514 p., 2004.
- 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 firsttrimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biol Reprod.** v. 63, p. 1787-1794, 2000.
- JENSEN, L.; PETERSEN, M. B.; HOUE, H. Determination of the Fructosamine Concentration in Bovine Serum Samples. **J. Vet. Med. A.** v. 40, p. 111-117, 1993.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6th ed., Academic Press, San Diego, 2008, 916 p.
- KREUTZER, K. V.; TURK, J. R.; CASTEEL, S. W. **Clinical Biochemistry in Toxicology**. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6th ed., Academic Press, Burlington, p. 821-837, 2008.
- MEE, J. F. Investigation of bovine abortion and stillbirth/perinatal mortality - similar diagnostic challenges, different approaches. **Irish Veterinary Journal**. v. 73(20), p.1-13, 2020.
- MEGAHED, A. A.; HIEW, M. W. H.; CONSTABLE, P. D. Clinical utility of plasma fructosamine concentration as a hypoglycemic biomarker during early lactation in dairy cattle. **J Vet Intern Med**. v. 32, p. 846–852, 2018.

MEGAHED, A. A.; HIEW, M. W. H.; CONSTABLE, P. D. Clinical utility of plasma fructosamine concentration as a hypoglycemic biomarker during early lactation in dairy cattle. **J Vet Intern Med.** v. 32, p. 846–852, 2018.

MELLO, M. R.B; CAETANO, H. V. A.; MARQUES, M. G.; PADILHA, M. S.; GARCIA, J. F.; MILAZZOTTO, M. P.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A.; LIMA, A. S.; NICÁCIO, A. C.; MENDES, C. M.; OLIVEIRA, V. P.; VISINTIN, J. A. Production of a cloned calf from a fetal fibroblast cell line. **Brazilian J Med Biol Res.** v. 36, p. 1485-1489, 2003.

MERIGHE, G. K. F. **Passagem celular, sexo e transcrição X-específica interferem no desenvolvimento embrionário e fetal de bovinos produzidos por transferência nuclear.** 131 f. 2007. Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

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

OLIVEIRA, B. M. M. **Avaliação do perfil sanguíneo de vacas prenhes e vazias submetidas à IATF com sêmen avaliado por sondas fluorescentes e sua relação com hemodinâmica uterina.** 167 p. 2015. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

ORTOLANI E. Transtornos metabólicos da vaca leiteira no período de transição. **Anais do I Simpósio Nacional da Vaca Leiteira.** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014, 239 p.

POGLIANI, F. C.; BIRGEL JUNIOR, E. Valores de referência do lipidograma de bovinos da raça holandesa criados no Estado de São Paulo. **Braz J Vet Res Anim Sci,** v. 44, p. 373-383, 2007.

PONCHEKI, J. K. **Beta-hidroxibutirato e perfil de ácidos graxos do leite bovino no início da lactação: efeitos sobre produção, reprodução e sanidade.** 119 f. 2019. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos.** 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 1770 p.

REUSCH, C. E.; LIEHS, M. R.; HOYER, M.; VOCHEZER, R.; Fructosamine: A new parameter for diagnosis and metabolic control in diabetic dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine.** v. 7, p. 177–182, 1993.

REYNOLDS, L. P.; CATON, J. S.; REDMER, D. A.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; VONNAHME, K. A.; BOROWICZ, P. P.; LUTHER, J. C.; WALLACE, J. M.; WU, G.; SPENCER, T. E. Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. **J Physiol,** v. 572, p. 51–58, 2006.

REYNOLDS, L. P.; FERREL, C. L.; ROBERTSON, D. A.; FORD, S. P. Metabolism of the gravid uterus, foetus and uteroplacenta at several stages of gestation in cows. **J Agric Sci**, v.106, p. 437-444, 1986.

SANGALLI, J. R.; DE BEM, T. H. C.; PERECIN, F.; CHIARATTI, M. R.; OLIVEIRA, L. J.; ARAÚJO, R. R.; PIMENTEL, J. R. V.; SMITH, L. C.; MEIRELLES, F. V. Treatment of nuclear-donor cell or cloned zygotes with chromatin-modifying agents increases histone acetylation but does not improve full-term development of cloned cattle. **Cell Reprogram**, v. 14(3), p. 235-247, 2012.

SASAKI, Y; KITAI, N; UEMATSU, M; KITAHARA, G; OSAWA, T. Daily calving frequency and preterm calving is not associated with lunar cycle but preterm calving is associated with weather conditions in Japanese Black cows. **Plos One**. v.14(7), p. 1-10, 2019.

STICE, S. L.; STRELCHENKO, N. S.; KEEFER, C. L.; MATTHEWS, L. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. **Biol Reprod**, v. 54, p. 100-10, 1996.

TICIANI, E. **Análise de padrões homeostáticos em conceitos bovinos clones no dia 225 da gestação e associação com alterações fenotípicas fetais e placentárias**. 119 p. 2018. Tese de Doutorado - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2018.

TRINDADE, C. E. P. Magnésio e asfixia perinatal. **Revista Paulista de Pediatria**. São Paulo: v. 24, n. 1, p. 4-5, 2006.

VASCONCELOS, B. O. **Apoptose em Placentônios Bovinos de Gestações de Conceitos Naturais e de Transgênicos Clonados**. 2016. 56 p. Tese De Mestrado - Universidade Estadual Paulista Júlio De Mesquita Filho, Dracena, 2016.

WEISS, D. J.; WARDROP, J. K. (Ed.) **Schalm`s Veterinary Hematology**, 6 ed., Ames-USA: Wiley-Blacwell Publication, 2010.1206 p.

WELLS, D. N.; FORSYTH, J. T.; MCMILLAN, V.; OBACK, B. Review: The Health of Somatic Cell Cloned Cattle and Their Offspring. **Cloning and Stem Cells**, V. 6(2), p.101-110, 2004.

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

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

CAPÍTULO 3

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O principal resultado deste trabalho foi fornecer um amplo painel de valores de referência para parâmetros bioquímicos e gasométricos em vacas gestantes da raça Nelore no final da gestação.
- Diferenças entre alguns parâmetros bioquímicos e gasométricos em gestações produzidas *in vivo* e através da técnica de clonagem por SCNT foram detectadas e um aprofundamento sobre as causas destas diferenças permitirão o desenvolvimento de novos projetos de pesquisa.
- Infelizmente, algumas vacas abortaram precocemente quando do início das coletas de dados aos 150 dias gestacionais. Tal fato, inviabilizou a utilização de mais de três quinzenas pregressas à normalização dos dados para o dia do parto ou abortamento, devido ao baixo número amostral.
- A análise das amostras do fluido alantoideano resultaram em dados de baixa qualidade que não permitiram a análise da maioria dos parâmetros estudados. A variabilidade dessas amostras foi muito grande apresentando num mesmo grupo do estudo amostras com valores superiores e/ou abaixo das sensibilidades das análises, juntamente com amostras sem leitura. Este fato não permitiu correção técnica das análises laboratoriais ou a possibilidade de análise estatística devido à grande variabilidade dos dados.
- Os resultados das análises dos parâmetros cloreto, sódio, albumina, bilirrubina total, bilirrubina conjugada, γ -glutamil transferase, creatinina, creatina quinase, proteínas plasmáticas totais avaliadas no sangue materno indicaram um estado de perfeito controle homeostático em todos os animais, independentemente de sua situação gestacional. Isso também foi observado para o status ácido-base do sangue materno que apresentou um estado de equilíbrio entre pO_2 , pCO_2 , TCO_2 , pH e bicarbonato.
- O colesterol foi o único parâmetro que poderia ser usado como um possível marcador de possível ocorrência de abortamento em gestações de clones por SCNT. No entanto, o significado desta indicação deve ser aprofundado em novos projetos de pesquisa.

- Os parâmetros potássio, fósforo, cálcio, glicose e ureia apresentaram diferentes valores quando as gestações de fetos produzidos naturalmente e por SCNT foram comparadas, indicando um metabolismo distinto entre esses dois grupos gestacionais.
- A hipótese central desse estudo de que as alterações gestacionais no complexo útero-placenta-feto, em gestações complicadas, podem ser previstas ou detectadas precocemente por exames bioquímicos e as análises hemogasométricas no sangue materno e/ou no fluido alantoideano foi parcialmente suportada. Sendo assim, o presente trabalho abre perspectivas para o desenvolvimento de novos estudos que busquem a identificação de marcadores para a detecção e acompanhamento das gestações com alteradas e que possam implicar em perdas.