

**unesp**  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**GUILHERME GONÇALVES FABRETTI SANTOS**

**MORBIMORTALIDADE DE BEZERROS CLONES DURANTE O**  
**PRIMEIRO MÊS DE VIDA**

**ARAÇATUBA – SP**

**2019**

# **GUILHERME GONÇALVES FABRETTI SANTOS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

Orientador: Prof. Dr. Francisco Leydson Formiga Feitosa

ARAÇATUBA – SP

2019

S237m Santos, Guilherme Gonçalves Fabretti  
Morbimortalidade de bezerros clones durante o  
primeiro mês de vida / Guilherme Gonçalves Fabretti  
Santos. -- Araçatuba, 2019  
96 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista  
(Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba  
Orientador: Prof. Dr. Francisco Leydson Formiga  
Feitosa

1. Bovinos. 2. Clonagem. 3. Fertilização in vitro. 4.  
Recém-nascidos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca  
da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo  
autor(a).

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: MORBIMORTABILIDADE DE BEZERROS CLONES DURANTE O PRIMEIRO MÊS DE VIDA

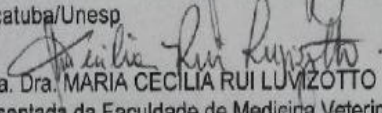
AUTOR: GUILHERME GONÇALVES FABRETTI SANTOS

ORIENTADOR: FRANCISCO LEYDSON FORMIGA FEITOSA

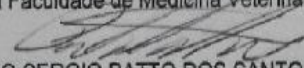
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. FRANCISCO LEYDSON FORMIGA FEITOSA

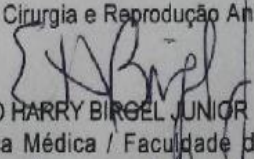
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

  
Profa. Dra. MARIA CECÍLIA RUI LUMIZOTTO

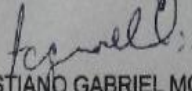
Aposentada da Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

  
Prof. Dr. PAULO SERGIO PATTO DOS SANTOS

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

  
Prof. Associado EDUARDO HARRY BIRGEL JUNIOR

Departamento de Clínica Médica / Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP - Pirassununga/SP

  
Prof. Dr. FERNANDO CHRISTIANO GABRIEL MORELLI

Curso de Medicina Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina / FEA

Araçatuba, 18 de outubro de 2019.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo dom da vida. Por todos os dias mostrar o sentido real de vivermos.

Aos meus pais Eduardo e Lúcia e minha irmã Raquel por me apoiarem.

À minha esposa Renata, exemplo de pessoa e profissional.

Ao meu Mestre e amigo professor Francisco Leydson F. Feitosa por todos os seus ensinamentos, principalmente na semiologia veterinária.

À Prof. Dra Maria Cecília Rui Luvizotto pelos seus conselhos, dedicação e auxílio na interpretação das análises anatomopatológicas.

A todos da empresa Fertvitro por ceder os animais para esta pesquisa em especial Prof. Dr. Halim Atique Neto e a Prof. Tabata Salum Atique.

Ao hospital veterinário “Dr. Halim Atique” por ceder a estrutura para a realização desta pesquisa, em especial aos funcionários Cabeça, Junião, Ricardinho e Rafael. Aos professores e Amigos Bruno Cholfe, Igor Paiola, João Morelli Júnior, Letícia Zoccolaro, Juliana Giantomassi e Suelen Gonzalez.

Ao laboratório veterinário TecnolabVet por auxiliar na realização das análises laboratoriais

Ao serviço de patologia da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, pela disponibilização das instalações e equipamentos para a realização dessa pesquisa.

Aos meus colegas da FMVA Jefferson Alcindo, Breno Martins, Luis Gustavo Narciso e Maurício Deschk

Ao centro universitário de Rio Preto (UNIRP) e a Universidade Paulista (UNIP/Bauru) por disponibilizarem tempo e demonstrarem confiança no trabalho técnico e teórico desenvolvido

À Universidade Estadual de Londrina e a todos os mestres que fizeram parte da minha formação.

Vosmecê agora me faça a boa obra de querer me ensinar o que  
é mesmo que é: *fasmisgerado... faz-megerado...  
falmisgeraldo...familhas-gerado...?*

(João Guimarães Rosa – “Famigerado” Primeiras estórias)

SANTOS, G.G.F. **Morbimortalidade de bezerros clones durante o primeiro mês de vida.** 2019. 96f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba. Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

## RESUMO

A transferência nuclear de células somáticas de animais de produção é realizada há mais de 20 anos. No que concerne aos bovinos, uma série de anormalidades tem sido observada, tanto do ponto de vista metabólico como fisiológico. O objetivo deste trabalho foi avaliar os índices de morbimortalidade de bezerros da raça Nelore clonados durante o primeiro mês de vida. Desta forma, foram avaliadas as características clínico-laboratoriais, bem como as principais alterações anatomopatológicas em bezerros da raça Nelore oriundos de transferência nuclear de células somáticas (TNCS)-clonagem, comparando-os com animais desta mesma raça, frutos de fertilização *in vitro* (FIV). Para tanto, os animais foram alocados em dois grupos, a saber: Grupo I (GI) - 10 animais frutos de TNCS; e, Grupo II (GII) - 10 animais oriundos de FIV. Nos respectivos bezerros, todos obtidos por cesariana, foram realizadas as avaliações físicas, bem como coleta de amostras de sangue nos momentos 0 (ao nascimento), 2, 4, 6 e 12 horas de vida a fim de avaliar os resultados de hemograma, análises bioquímicas e proteinograma sérico, comparando-os entre os grupos e momentos avaliados. Nos animais que vieram a óbito foi realizada a necropsia para investigar a “possível” causa *mortis*. A mortalidade atingiu 90% dos animais do GI e 20% do GII, durante as primeiras 48 horas de vida. Ao exame físico observou-se que 50% dos bezerros do GI e 10% do GII apresentavam peso excessivo ao nascimento. Ademais, 30% dos animais do GI eram possuidores de deformidades nos membros. O escore de APGAR indicou animais com baixa e moderada vitalidade, perfazendo 80% e 60% dos bezerros do GI e GII, respectivamente. Em adição, notou-se que a baixa pontuação apresentou correlação negativa com a concentração plasmática de lactato, não apresentando, no entanto, analogia significativa com a presença de mecônio ao nascimento em cada grupo individualmente. Essa característica, no GI, esteve envolvida com alterações da frequência respiratória, em virtude da inalação deste. Nesse aspecto, constatou-se uma hiperlactemia em ambos grupos sendo superior no GI a partir da segunda hora de vida persistindo elevada, mesmo após a oxigenioterapia. As alterações laboratoriais no GI incluíram anemia ao longo do período experimental, de origem hemolítica, aumento da creatinina e

hipercalcemia. No GII observou-se anemia ferropriva ao fim do período experimental, leucocitose por neutrofilia, hiperinsulinemia e hipoglicemia. O proteinograma sérico denotou diferenças significativas nos valores de IgG a partir das seis horas de vida, sendo superior nos animais do GII. Ao exame anatomopatológico constatou-se atelectasia, edema e enfisema pulmonar bem como visceromegalia acometendo o fígado. Malformações cardíacas e renais também foram denotadas, além de distúrbios de natureza circulatória nos órgãos do trato gastrointestinal. Conclui-se que os animais oriundos da TNCS apresentam alterações fisiológicas, metabólicas e anatomopatológicas, ocasionando, em grande parte, maior taxa de óbitos durante o período perinatal.

Palavras chave: Bovinos. Clonagem. Fertilização *in vitro*. Recém-nascidos.



SANTOS, G.G.F. **Morbimortality of cloned calves during the first month of life.** 2019. 96f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba. Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

### **ABSTRACT**

Over past 20 years, the production animal species have been successfully cloned from somatic cell lines including cattle. In this specie metabolic and physiological complications have been seen. The aim of this study was to evaluate morbidity-mortality of Nelore cloned calves during the first 30 days of life. For this clinical, laboratorial and pathological disturbances of Nelore cloned calves derived from somatic cell nuclear transfer (SCNT) was took over and compare them with animals from the same breed from *in vitro* fertilization (IVF). For this, two groups were formed. Group I (GI): Ten calves derived from SCNT and group II (GII): Ten calves derived from IVF. In both groups delivered by cesarean section, the physical and blood collection for laboratorial assessments was carried out at birth, 2, 4, 6 and 12 hours after delivered to evaluate clinical, hematological, biochemistry and serum proteinogram compared then between the groups and the moments. Necropsy was performed in every animal that died to identify the possible *causa mortis*. The mortality rate was 90% in GI and 20% in GII during the first 48 hours. Based on physical examination 50% of the GI animals and 10% of the GII animals had overweight at birth. Limb flexural deformity was noted in 30% of calves in GI. At birth 80% and 60% of the calves in GI and GII, respectively had low and moderate APGAR score index. It was noted that the low score was negative correlated with plasma lactate concentration with no relation with meconium-stained at birth in the individual groups. The meconium-stained, in GI was involved with alterations in respiratory rates probably due meconium aspiration. This situation may took to hyperlactemia in both groups but with higher concentrations in GI from 2 hours after birth persisting even oxygen supplementation. Laboratory abnormalities in GI included anemia hemolytic in origin that persists along the experimental period, increased creatinine and hyperlactemia. In GII the anemia was due iron deficiencies only at the final of the experimental period, stress leukogram, hyperinsulinemia and hypoglycemia. The serum proteinogram showed significantly differences in IgG values at six hours with high values in GII. The necropsy finds identified pulmonary atelectasis,

edema and emphysema as well as liver visceromegaly. Renal and heart abnormalities and circulatory alterations in gastrointestinal organs were noted too. In conclusion cloned calves showed physiological, metabolic and pathological abnormalities leading the high mortality rates during the perinatal period

**Key words:** Cattle. Cloning. *In vitro* fertilization. Newborn.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Média (x), desvio-padrão (S), mínimo (Min) e máximo (Max) dos valores de peso, em quilogramas (Kg), de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII), imediatamente após o parto. ....	28
Tabela 2- Porcentagem (%) e grau de vitalidade, por meio do escore APGAR, de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII). ....	31
Tabela 3- Média (x) e desvio-padrão (S) dos valores de frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e temperatura retal (TR) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	32
Tabela 4- Porcentagem (%) da coloração de mucosa ocular de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	35
Tabela 5- Mediana (Md), mínimo (min) e máximo (máx), em minutos, para a adoção do decúbito esternal e reflexo de sucção em bezerros oriundos de técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII). ....	36
Tabela 6- Média (x) e desvio-padrão (S) dos valores de eritrócitos, hemoglobina, volume globular, volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e plaquetas de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	37
Tabela 7- Média (x) e desvio-padrão (S) dos valores de leucócitos e neutrófilos de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII). ....	41
Tabela 8- Mediana (Md), mínimo (min) e máximo (máx) dos valores de Linfócitos, monócitos e relação neutrófilo/linfócito (N/L) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	43
Tabela 9- Média (x) e desvio-padrão (S) dos valores de proteína total e albumina de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII). ....	45
Tabela 10-Média (x) e desvio-padrão (S) dos valores de creatinina e ureia de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII). ....	47
Tabela 11-Média (x) e desvio-padrão (S) da razão ureia/creatinina de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII). ....	49

Tabela 12-Mediana (Md), mínimo (min) e máximo (máx) dos valores aspartato aminotransferase (AST) e gama Glutamiltransferase (GGT) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	50
Tabela 13- Média ( $x$ ) e desvio-padrão (S) dos valores de bilirrubina total e indireta de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	52
Tabela 14- Média ( $x$ ) e desvio-padrão (S) dos valores de triglicerídeos e colesterol bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e bezerros oriundos de fertilização <i>in vitro</i> (GII). ....	54
Tabela 15- Média ( $x$ ) e desvio-padrão (S) dos valores de cálcio, fósforo, cloreto, magnésio, ferro e cálcio Ionizado de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	56
Tabela 16- Média ( $x$ ) e desvio-padrão (S) da relação cálcio/fósforo de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	60
Tabela 17- Mediana (Md), mínimo (min) e máximo (máx) dos valores de lactato de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	61
Tabela 18- Mediana (Md), mínimo (min) e máximo (máx) dos valores de glicose de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	62
Tabela 19- Média ( $x$ ) e desvio-padrão (S) dos valores de Imunoglobulina A (IgA), ceruloplasmina, transferrina, albumina e $\alpha$ -1 glicoproteína ácida de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	64
Tabela 20-Mediana (Md), mínimo (min) e máximo (máx) dos valores de imunoglobulina G (IgG) e haptoglobina (Hp) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	68
Tabela 21- Mediana (Md), mínimo (min) e máximo (máx) dos valores de Insulina de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e bezerros oriundos de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	69

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Representação gráfica da média do peso ao nascimento, em quilogramas (Kg), de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII), imediatamente após o parto. ....	28
Gráfico 2– Representação gráfica dos valores médios de frequência respiratória de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII). ....	33
Gráfico 3– Representação gráfica dos valores médios de frequência cardíaca de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII) ....	33
Gráfico 4– Representação gráfica dos valores médios de temperatura retal de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII). ....	34
Gráfico 5– Representação gráfica dos valores médios de eritrócitos ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ ) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII). ....	38
Gráfico 6– Representação gráfica dos valores médios de hemoglobina (g/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII). ....	38
Gráfico 7– Representação gráfica dos valores médios de hematócrito (%) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII). ....	39
Gráfico 8– Representação gráfica dos valores médios de volume corpuscular médio (VCM – $\mu^3$ ) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII). ....	39
Gráfico 9– Representação gráfica dos valores médios da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM– g/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII). ....	40
Gráfico 10– Representação gráfica dos valores médios de leucócitos totais ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ ) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII). ....	41

Gráfico 11– Representação gráfica dos valores médios dos neutrófilos ( $\mu\text{L}$ ) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	42
Gráfico 12– Representação gráfica dos valores medianos dos linfócitos ( $\mu\text{L}$ ) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	44
Gráfico 13– Representação gráfica dos valores medianos dos monócitos ( $\mu\text{L}$ ) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	44
Gráfico 14– Representação gráfica dos valores médios de proteína total os (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII). ....	46
Gráfico 15– Representação gráfica dos valores médios de albumina (g/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	46
Gráfico 16– Representação gráfica dos valores médios de creatinina (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	48
Gráfico 17– Representação gráfica dos valores médios de ureia (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII)....	48
Gráfico 18– Representação gráfica dos valores medianos de aspartato aminotransferase (AST) (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	50
Gráfico 19– Representação gráfica dos valores medianos de Gama glutamil transferase (GGT) (U/L) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII). ....	51
Gráfico 20– Representação gráfica dos valores médios de bilirrubina total (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	52
Gráfico 21– Representação gráfica dos valores médios de bilirrubina indireta (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII). ....	53

Gráfico 22–	Representação gráfica dos valores médios de triglicerídeos (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	54
Gráfico 23–	Representação gráfica dos valores médios de colesterol (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	55
Gráfico 24–	Representação gráfica dos valores médios de cálcio (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII)....	57
Gráfico 25–	Representação gráfica dos valores médios de fósforo (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII)....	57
Gráfico 26–	Representação gráfica dos valores médios de cloreto (mEq/L) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII)....	58
Gráfico 27–	Representação gráfica dos valores médios de magnésio (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	58
Gráfico 28–	Representação gráfica dos valores médios de ferro ( $\mu\text{g/dL}$ ) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII)....	59
Gráfico 29–	Representação gráfica dos valores médios de cálcio ionizado (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	59
Gráfico 30–	Representação gráfica dos valores medianos de lactato (mmol/L) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	61
Gráfico 31–	Representação gráfica dos valores medianos de glicose (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	63
Gráfico 32–	Representação gráfica dos valores médios de imunoglobulina A (IgA) (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII). ....	65
Gráfico 33–	Representação gráfica dos valores médios de ceruloplasmina (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	65

Gráfico 34– Representação gráfica dos valores médios de transferrina (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	66
Gráfico 35– Representação gráfica dos valores médios de albumina (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	66
Gráfico 36– Representação gráfica dos valores médios de $\alpha$ 1-glicoproteína ácida (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII) .....	67
Gráfico 37–Mediana (Md), mínimo (min) e máximo (máx) dos valores de imunoglobulina G (IgG) e haptoglobina (Hp) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	68
Gráfico 38– Representação gráfica dos valores medianos de haptoglobina (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII). .....	69
Gráfico 39– Representação gráfica dos valores medianos de insulina ( $\mu$ u/mL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização <i>in vitro</i> (GII).....	70



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Malformação dos membros pélvicos identificada pelo desvio angular (Varus). .....	30
Figura 2– Flacidez tendínea dos membros pélvicos ao nascimento e durante as quatro horas de sobrevivência (Seta). .....	30
Figura 3– Flacidez tendínea dos membros pélvicos ao nascimento e durante as quatro horas de sobrevivência (Seta). .....	30
Figura 4– Protrusão da língua, característica de macroglossia (Seta). .....	30
Figura 5– Efusão torácica serosanguinolenta discreta. Atelectasia pulmonar e palidez das vísceras .....	72
Figura 6– Hipertrofia cardíaca congênita .....	72
Figura 7– Coração dilatado e com aspecto globoso .....	72
Figura 8– Atelectasia bilateral dos lobos pulmonares caudais. ....	72
Figura 9– Presença de áreas com edema e congestão pulmonar .....	72
Figura 10– Corte histológico de pulmão. Presença de mecônio no interior de bronquíolo de e alvéolos (seta). .....	72
Figura 11– Parênquima hepático de coloração amarelada (ocre). .....	74
Figura 12– Hepatomegalia, note os bordos do órgão arredondados. ....	74
Figura 13– Ao corte, córtex renal com coloração castanho escura e medula renal com coloração avermelhada. ....	74
Figura 14– Corte histológico de rim. Deposição de pigmento biliar nas células tubulares em quantidade acentuada (seta). .....	74
Figura 15– Presença de cistos renais no rim esquerdo. ....	74
Figura 16– Rim ao corte. Presença de cistos renais interno nos rins direito e esquerdo (seta). .....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- $\alpha$  – alfa
- $\beta$  – beta
- $\bar{x}$  – média
- % – por cento
- $\pm$  – mais ou menos
- °C – graus Celcius
- $\mu\text{L}$  – microlitro
- $\mu\text{g}$  – micrograma
- $\mu^3$  – microcúbico
- AST – aspartato aminotransferase
- BWS – Síndrome de Beckwith–Wiedemann
- CHGM – concentração de hemoglobina globular média
- dL – decilitro
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- EDTA – ácido etilenodiamino tetracético
- FC – frequência cardíaca
- FR – frequência respiratória
- FTIP – falha na transferência de imunidade passiva
- FIV – fertilização *in vitro*
- g – gramas
- G – força gravitacional
- GGT – gama glutamiltransferase
- GI – grupo I
- GII – grupo II
- h – hora
- Hp – haptoglobina
- IgA – Imunoglobulina A

- IgG – Imunoglobulina G
- IGF II – Fator de crescimento semelhante à insulina
- Kg – quilograma
- mmol – milimol
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- min – minutos
- mL– mililitros
- mm<sup>3</sup> – milímetros cúbicos
- N° – número
- nm – nanômetros
- pg– picoGramas
- PFA – proteínas de fase aguda
- PIV – produção *in vitro*
- S– desvio padrão
- SDS–PAGE– eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
- SGBS – síndrome de Simpson–Golabi–Behmel
- TNCS – transferência nuclear de células somáticas
- TR – temperatura retal
- U/L – unidades por litro
- VCM – volume globular médio

# Sumário

1.INTRODUÇÃO .....	19
2.REVISÃO DE LITERATURA .....	20
2.2 Objetivos gerais.....	22
2.3 Objetivos específicos.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 Manejo dos animais e grupos experimentais .....	23
3.2 Indução do parto, cesariana e cuidados com os recém-nascidos .....	23
3.3 Período experimental: avaliação física, coleta das amostras de sangue e necropsia .....	25
3.3.1 Hemograma.....	26
3.3.2 Análises bioquímicas.....	26
3.3.3 Análises hormonais .....	27
3.3.4 Fracionamento eletroforético .....	27
3.4 Análise estatística .....	27
4.RESULTADOS .....	28
4.1 Exame físico.....	28
4.2 Hematologia .....	36
4.3 Parâmetros bioquímicos.....	45
4.3.1 Avaliação Proteica.....	45
4.3.2 Avaliação da função renal .....	47
4.3.3 Avaliação da função hepática.....	49
4.3.4 Avaliação dos lipídeos.....	53
4.3.5 Minerais e eletrólitos .....	55
4.3.6 Avaliação do lactato .....	60
4.3.7 Avaliação da glicose.....	62
4.4 Fracionamento eletroforético das proteínas do soro sanguíneo.....	63
4.5 Avaliação hormonal .....	69
4.6 Achados de necropsia .....	70
5.DISSCUSSÃO .....	75
6.CONCLUSÕES .....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	86

## 1.INTRODUÇÃO

A palavra clone é utilizada para designar um conjunto de indivíduos que possuem a mesma característica genética. O termo é de etimologia grega, derivada da palavra “Klon”, que significa broto de vegetal. Sabe-se que a clonagem é amplamente utilizada pela agricultura a fim de espalhar espécies de plantas, sendo, o eucalipto, um exemplo clássico que utiliza esta técnica (ZATZ, 2004, MEIRELLES et al., 2010).

Nos mamíferos o primeiro relato de clonagem foi em um ovino que ficou mundialmente conhecido como a ovelha “Dolly”. Utilizando a técnica de transferência nuclear de células somáticas (TNCS) este foi produzido com sucesso e nasceu no dia 5 de julho de 1997 (WILMUT et al., 1997). A partir de então, uma série de experimentos bem-sucedidos foram realizados em outras espécies animais, como equinos, caninos, felinos e bovinos. Nos animais de produção, seu intuito visa replicar animais de excelência no que diz respeito a alta produtividade ou características fenotípicas desejáveis para um determinado rebanho (EDWARDS, 2003). A clonagem comercial de bovinos ganhou mais espaço no Brasil, quando em 2009, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), autorizou o registro de animais clonados em suas respectivas associações de classe (BRASIL, 2012).

No entanto, uma série de dificuldades, tanto à nível nacional como internacional, têm sido verificadas em gestações como nos recém-nascidos frutos desta biotecnologia (GARRY et al., 1996; CHAVATTE-PALMER et al., 2002; MEIRELLES et al., 2010). Apesar de inúmeras tentativas de êxito no procedimento de clonagem, ainda existe elevado índice de óbito antes dos seis meses de gestação (CHAVATTE-PALMER et al., 2004). Com relação aos recém-nascidos, segundo Hill et al. (1999) e Panarace (2007), a mortalidade está em torno de 12,5 a 42%. Pesquisas no Brasil têm identificado índices de perda pós-natal por volta de 50%, especialmente entre 24 e 48 horas de vida, provavelmente em virtude de distúrbios de adaptação neonatal (KOMNINO, 2008; POGLIANI, 2010; BIRGEL JÚNIOR et al., 2011a).

Esta elevada taxa de mortalidade pré e perinatal de bezerros foi também demonstrada em animais concebidos pelas técnicas de produção *in vitro* (PIV) (HASLER et al., 1995; SCHMIDT et al., 1996), da transferência nuclear de células embrionárias (WILSON et al., 1995) e da clonagem a partir de células somáticas

(BATCHELDER et al., 2007). É possível que estas biotécnicas causem alterações morfológicas, na expressão gênica e/ou no metabolismo dos embriões, fetos, placentas e recém-nascidos produzidos (FARIN; PIEDRAHITA; FARIN, 2006). Com o passar do tempo a PIV teve sua eficácia aprimorada, reduzindo tais alterações (YOUNG et al., 1998; HORTA, 1999; FARIN; PIEDRAHITA; FARIN, 2006; CHAVATTE–PALMER et al., 2012). No entanto, a elevada mortalidade embrionária bem como a alta incidência de alterações nos produtos oriundos da TNCS é ainda caracterizada por complicações morfológicas tais como elevado peso ao nascimento, alterações musculoesqueléticas e anormalidades metabólicas (CHAVATTE–PALMER et al., 2012; BRISVILLE et al., 2013).

A despeito destas considerações, as gestações bem como os conceptos frutos destas inovações biotecnológicas, constituem um desafio para a Medicina Veterinária (FACTEAU; PALMER; WILKINS, 2005). Estudos apontam alterações fisiológicas em bezerros produzidos por FIV e TNCS durante o final da gestação, no período perinatal e neonatal, sendo associadas a alterações clínico–laboratoriais (KRUIP; DEN DAAS, 1997; SINCLAIR; BROADBENT; DOLMAN, 1995; MILES et al., 2004; BIRGEL JÚNIOR et al., 2011a).

## **2.REVISÃO DE LITERATURA**

Sabe-se que a manipulação e o cultivo de embriões bovinos estão associados a uma série de anormalidades gestacionais, nos embriões e fetos (EVERTS et al., 2008; CHAVATTE PALMER et al., 2012). Assim, o insucesso na produção destes animais é considerável. A clonagem de animais a partir de embriões reconstruídos com núcleos provenientes de células em diferentes estágios de diferenciação tem sido responsável pelo aparecimento de diversas anomalias diagnosticadas durante a gestação e após o nascimento (MEIRELLES et al., 2010). A placentação anômala é uma das principais causas destes problemas causando elevada mortalidade fetal no terço inicial de gestação. As principais causas desta mortalidade podem estar relacionadas a alterações maternas e fetais, tais como hidroalantóide e desenvolvimento anormal do concepto (CHAVATTE–PALMER et al., 2012). Entre as anormalidades cita-se o elevado peso vivo associado a uma série de anormalidades metabólicas, alterações musculoesqueléticas e nos órgãos internos, o que contribui para uma dificuldade na adaptação à vida extrauterina (YOUNG et al., 1998;

CHAVATTE–PALMER et al., 2004; HILL, 2014). Este conjunto de anormalidades intitula-se “Síndrome do bezerro anormal” (FARIN; PIEDRAHITA; FARIN, 2006).

A origem destes distúrbios de crescimento e malformações parece ser a placenta, que manifesta variação na expressão de conjuntos gênicos específicos. Alguns destes genes podem regular o suprimento de nutrientes para o feto predispondo o seu crescimento exagerado (EVERTS et al., 2008). Acredita-se que a reprogramação epigenética incompleta do núcleo da célula doadora seja responsável por alterações genéticas do tecido placentário responsável por estes distúrbios (CHAVATTE–PALMER et al., 2012).

Assim como os animais produzidos por meio de manipulação embrionária, bebês frutos de reprodução assistida também apresentam, de forma mais frequente, alterações no desenvolvimento, como a Síndrome de Beckwith–Wiedemann (BWS) ou a Síndrome de Simpson–Golabi–Behmel (SGBS). Tanto a SGBS como a BWS geram o aparecimento de macrossomia, defeitos na parede abdominal, displasia renal, visceromegalias, defeitos musculoesqueléticos e anomalias cardíacas semelhantes aos observados em bezerros clonados. Estas duas síndromes têm diferentes fatores desencadeantes. A primeira é devido a expressão anormal de gene para IGF II responsável pelo crescimento, enquanto a segunda ocorre por mutação no gene GPC3, responsável pela divisão celular e crescimento (CANO–GAUCI et al. 1999; RHIND et al. 2003; WEKSBERG et al. 2010).

Chavatte–Palmer et al. (2002) encontraram maiores valores plasmáticos de IGF II em animais clonados em comparação com controles, podendo ser, este, responsável pelo aparecimento de macrossomia nestes animais. Cano–gauci et al. (1999) estudando camundongos deficientes em GPC3 comprovaram que os animais apresentaram crescimento excessivo, maior taxa de morte perinatal, rins císticos ou displásicos e desenvolvimento pulmonar anormal, indicando que alterações neste gene podem causar disfunções nos animais semelhantes às observadas em humanos.

Diante deste cenário, inúmeros trabalhos foram e vêm sendo realizados objetivando um protocolo de atendimento nestes recém-nascidos (FACTEAU; PALMER; WILKINS, 2005; BIRGEL JÚNIOR et al., 2011b, MEIRELLES et al., 2010). Os avanços na terapêutica concluíram que os primeiros cuidados devem ser mais

intensos do que em um recém-nascido oriundo de monta natural (MEIRELLES et al., 2010). Segundo Nagy (2009), a maioria das mortes dos recém-nascidos ocorre durante as primeiras horas de vida. No caso dos animais clonados a incidência de mortalidade no período perinatal pode alcançar 50% dos animais. A dificuldade de adaptação neonatal a vida extrauterina reflete quadros de letargia, prostração e diminuição do reflexo de sucção. Afora isso, os bezerros muito grandes apresentam quadros de hipoglicemia e/ou dificuldade na termorregulação associados a distúrbios hormonais (CHAVATTE-PALMER et al., 2002; BIRGEL JÚNIOR et al., 2011b)

Apesar dos esforços no primo-atendimento, o elevado peso ao nascimento e alterações patológicas em alguns órgãos, quando presentes, comprometem a viabilidade destes animais após o nascimento (FACTEAU; PALMER; WILKINS, 2005; SANTOS, 2008; BIRGEL JÚNIOR et al., 2011b). No entanto, outras alterações parecem ser comuns entre animais e o avanço nas práticas de cuidado inicial pode diminuir a taxa de mortalidade. Muitos estudos apontam os distúrbios cardiorrespiratórios como os principais agravantes na adaptação neonatal (GARRY et al., 1996; HILL et al., 1999; MEIRELLES et al., 2010; BIRGEL JÚNIOR et al., 2011a). Estes, por sua vez, desencadeiam quadros de taquicardia e aumento da pressão da artéria pulmonar. Além disso, o não fechamento do forame oval compromete a oxigenação sanguínea destes animais (BIRGEL JÚNIOR et al., 2011b).

A utilização do escore APGAR no pós-parto imediato é de extrema importância para o diagnóstico de asfixia neonatal. Esta situação tem sido relacionada às gestações de animais clonados devido a placentação anômala, o que resulta em menor aporte de oxigênio para o feto levando à eliminação e inalação do mecônio ainda no ambiente uterino, induzindo, assim, a distúrbios pulmonares (BENESI, 1993; POULSEN; Mc GUIRK, 2009).

## **2.1 Objetivos gerais**

Avaliar os principais distúrbios clínico-laboratoriais e anatomopatológicos que levam os bezerros oriundos da TNCS a óbito



## 2.2 Objetivos específicos

Determinar, avaliar e comparar o escore APGAR e os parâmetros vitais de bezerros oriundos de TNCS e FIV

Determinar, avaliar e comparar os parâmetros hematológicos, bioquímicos e proteinograma sérico de bezerros oriundos de TNCS e FIV

Descrever as principais alterações micro e macroscópicas dos diversos órgãos dos animais oriundos de TNCS e FIV.

## 3.MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Manejo dos animais e grupos experimentais

O estudo foi conduzido no Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique” localizado na cidade de São José do Rio Preto, no Estado de São Paulo, durante o período de 2014 a 2017. Foram acompanhadas as gestações de 31 vacas receptoras mestiças (*bos taurus x bos indicus*) para a obtenção de animais da raça nelore. Destas, 21 estavam prenhes de bezerros clonados a partir de núcleo celulares oriundos de fibroblastos da pele, sendo estes originados de quatro animais diferentes. Deste total, 11 vacas abortaram a partir do sexto mês de gestação. Outras 10 receptoras estavam gestantes de bezerros oriundos da técnica de fertilização *in vitro* (FIV). A partir dos animais que mantiveram suas gestações, foram constituídos dois grupos experimentais, a saber: Grupo Clone (GI): 10 animais oriundos da TNCS e Grupo FIV (G II): 10 animais oriundos de FIV.

As receptoras do GI foram admitidas no Hospital Veterinário já com o diagnóstico de gestação confirmada com aproximadamente 6 meses de duração. As receptoras do GII foram avaliadas por exame ultrassonográfico (DP 2200 Vet Mindray) transretal a partir dos 30 a 60 dias, após a transferência dos embriões oriundos de fertilização *in vitro*, para a confirmação da gestação. Os animais foram mantidos em piquetes e alimentados com silagem de milho e feno, duas vezes por dia. Havia disponibilidade de sal mineral e água *ad libitum*. O estudo foi aprovado pelos Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA – Protocolo N°2014–01354).

### 3.2 Indução do parto, cesariana e cuidados com os recém-nascidos

Todos os bezerros foram concebidos por meio da técnica de cesariana pela fossa paralombar esquerda com as receptoras em estação no tronco de contenção,

segundo os conceitos de Turner e Mcilwraith (2002). Para tanto, realizou-se bloqueio paravertebral proximal nos ramos nervosos das vértebras T13, L1 e L2, utilizando-se cloridrato de lidocaína (Xylestesin® 2%, Cristália), no volume de 5 mL em cada ponto dorsal e ventral aos processos transversos.

Estabeleceu-se padrão para a indução do parto segundo os conceitos de Meirelles et al. (2010). Assim sendo, os animais prenhes dos bezerros do GI foram induzidos com 8 mg de triancinolona acetona (Retardoesteóide®, Hertape calier) com, aproximadamente, 285 dias de gestação, e 20 mg de dexametasona (Azium®, Merck Sharp & Dohme), 24 horas antes da cirurgia. As vacas gestantes dos bezerros do GII foram induzidas com 20 mg de dexametasona (Azium®, Merck Sharp & Dohme), 24 horas antes da cesariana. Após a incisão do útero e exteriorização do bezerro, os vasos umbilicais eram obliterados temporariamente, com emasculador estéril. Após seccioná-los, os bezerros eram colocados de cabeça para baixo por, não mais que 30 segundos, para a retirada do conteúdo amniótico que, possivelmente, haviam inalado ou deglutido.

Posteriormente, foram alocados em uma mesa onde se avaliou a vitalidade através do escore APGAR modificado, segundo Feitosa e Benesi (2014). O exame foi realizado imediatamente após o nascimento e aos cinco minutos de vida. Aqueles animais que estavam tingidos de mecônio foram lavados com água morna e soluções à base de detergente neutro a fim de se retirar as sujidades da superfície corpórea. Posteriormente, os recém-nascidos foram massageados e secados com toalhas, principalmente na região torácica, para auxiliar na expectoração de possíveis resíduos de secreções ainda presentes no trato respiratório ou digestório. Tais procedimentos foram feitos da mesma forma em todos os animais avaliados, a fim de se evitar, ao máximo, alterações nos parâmetros clínicos e laboratoriais entre os grupos. Após estes procedimentos, os animais foram alocados em uma sala específica, onde foram pesados, submetidos ao exame físico bem como às coletas de amostras sanguíneas. Nestes casos, animais que não apresentassem melhora no escore APGAR após a segunda avaliação eram submetidos a oxigenioterapia, por meio de cateter nasal, com fluxo de 5 a 7L /minuto de O<sub>2</sub>

A colostragem foi realizada de forma artificial, em ambos grupos. Os bezerros que apresentavam reflexo de sucção recebiam o colostro por meio de mamadeiras. Os animais que não possuíam o referido reflexo, foram alimentados com colostro por meio de sonda esofágica, recebendo o equivalente a 5% do peso vivo nas primeiras

cinco horas de nascidos, e o restante (5%), ao longo das primeiras 24 horas após o nascimento. Todo o colostro utilizado era proveniente de estoque (banco de colostro), mantido a  $-18^{\circ}\text{C}$  no hospital veterinário. Antes do congelamento, estes eram testados por meio de colostrômetro (Colostrometro®, Biogenics, Mapleton, OR), sendo acondicionados no banco de colostro somente os que se enquadravam dentro das concentrações adequadas de imunoglobulinas (80–140 mg/mL). Além do reflexo de sucção, o intervalo de tempo para a adoção do decúbito esternal foram avaliados.

Os animais que receberam o colostro por sonda esofágica tiveram os teores de glicose avaliados por meio de glicosímetro portátil (AccuChek Active®, Roche) a partir deste momento, recebendo 10 mL de glicose a 50% sempre que os valores se encontravam abaixo de 50 mg/dL.

### **3.3 Período experimental: avaliação física, coleta das amostras de sangue e necropsia**

A fim de obter uma padronização do período experimental, houve por bem, analisar as amostras referentes a um período médio de vida destes animais, que foi de 12 horas. Sendo assim, todas as coletas e avaliações foram realizadas imediatamente após o parto (zero hora), às 2, 4, 6 e 12 horas após o nascimento.

No que concerne à avaliação física e à coleta de material sanguíneo, ambas foram realizadas durante o período previamente citado, interrompendo-se, somente, em decorrência do óbito dos animais avaliados. A avaliação física foi realizada de acordo com Feitosa e Benesi (2014). Os parâmetros físicos avaliados, foram: frequências cardíaca e respiratória, coloração de mucosas e temperatura retal. Todos os dados foram anotados em fichas individuais.

As amostras de sangue foram coletadas dos bezerros recém-nascidos nos mesmos momentos acima descritos. Após antissepsia local, realizou-se punção da veia jugular, usando o sistema a vácuo e agulhas para múltiplas coletas (25 x 8 mm) acopladas, utilizando-se três diferentes tipos de tubos para suas respectivas finalidades, a saber: Vacutainer® com anticoagulante ácido etilenodiamino tetracético (EDTA), para a coleta de amostras de 5 mL destinadas à realização do hemograma; Vacutainer® com anticoagulante fluoreto de sódio, para a coleta de amostras de 5 mL destinadas à mensuração dos teores plasmáticos de glicose, lactato e hormonais; e tubos Vacutainer® siliconizados sem anticoagulante, para coleta de amostras de 10

mL para análises bioquímicas e mensuração das proteínas de fase aguda do soro sanguíneo. Após a coleta, as amostras eram levadas ao laboratório sob refrigeração onde as destinadas ao hemograma eram imediatamente analisadas. As demais amostras permaneceram em repouso. As alíquotas para a obtenção do soro, após a retração do coágulo, foram centrifugadas a 1000 G, durante 10 minutos em centrífuga comum. Após a centrifugação o soro foi alíquotado em microtubos com capacidade de 1,5 mL e congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para a posterior mensuração dos constituintes séricos supracitados. Aquelas coletadas em tubos contendo fluoreto foram imediatamente centrifugadas e o plasma foi destinado ao mesmo procedimento de congelamento como citado anteriormente.

Os animais que vieram a óbito foram necropsiados no serviço de patologia do hospital veterinário, e colhido material para exame histopatológico. Todas as alterações macroscópicas foram registradas em fichas individuais, para posterior análise e discussão, na tentativa de determinar as causas dos óbitos dos animais.

### **3.3.1 Hemograma**

As amostras de sangue dos diferentes momentos foram submetidas às contagens de hemácias, leucócitos, plaquetas e teor de hemoglobina, em aparelho semi-automático Urit 3000 Plus (Guilin Biotest Medical Electronic Co., Ltd.). O volume globular foi obtido em microtubos de 50  $\mu\text{L}$  submetidos à centrifugação a 13.000 x g, durante 5 minutos. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada a partir da contagem de 100 células em esfregaço sanguíneo corado com o corante de Rosenfeld modificado, por meio de microscopia óptica. Os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) eram calculados com base em fórmulas matemáticas, também recomendadas por Thrall (2007). Além disto, as alterações morfológicas dos eritrócitos relacionadas ao tamanho, forma e coloração também foram avaliadas.

### **3.3.2 Análises bioquímicas**

As determinações bioquímicas séricas de creatinina, ureia, bilirrubina total e indireta, proteína total, albumina, gama glutamiltransferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST), triglicerídeos, colesterol, cálcio total, cloro, magnésio, cloretos, fósforo, ferro, bem como os teores plasmáticos de glicose e lactato, foram procedidas utilizando-se kits comerciais (Bioclin Ltda®), em analisador bioquímico

automatizado Prietest touch (Robonik ®). Adicionalmente, foram determinados os teores de cálcio ionizado em analisador de íons pelo método do íon seletivo (Electrolyte Analyser, Roche Diagnostics®)

### **3.3.3 Análises hormonais**

A dosagem dos teores plasmáticos de insulina foi realizada utilizando kits comerciais (Porcine Insulin RIA), em aparelho automatic gamma conter (PerkinElmer®), pelo método de radioimunoensaio.

### **3.3.4 Fracionamento eletroforético**

Para o fracionamento proteico em SDS–PAGE foi usada a técnica proposta por Laemmli (1970). Após o fracionamento o gel foi corado por aproximadamente duas horas em solução de Coomassie blue 0,2% e, posteriormente, colocado em solução de ácido acético 0,1% e álcool metílico 0,25% para retirar o excesso do corante, até que as frações proteicas fossem nítidas. O gel foi conservado em solução de ácido acético a 7%. As frações foram mensuradas por meio de um densitômetro computadorizado Shimadzu CS9301). Como referência foi utilizada uma solução marcadora (Sigma, St Louis, MO, USA) com diferentes pesos moleculares de amplo e estreito espectro, além das proteínas purificadas ceruloplasmina,  $\alpha_1$  –antitripsina, haptoglobina, IgG bovina e transferrina

## **3.4 Análise estatística**

Os resultados obtidos foram testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro–Wilk e homogeneidade de variâncias. Para as variáveis que apresentaram distribuição normal foi realizada a análise de variância com medidas repetidas (ANOVA) para comparar momentos e interação entre grupos e momentos, e o teste de Tukey para comparação de médias. Para variáveis sem distribuição normal utilizou–se o teste de Mann–Whitney para comparar os grupos em cada momento. O teste t não pareado foi realizado para comparar o peso entre os dois grupos. Variáveis categóricas tais como a coloração de mucosas e escore APGAR foram submetidas ao teste exato de Fisher em cada momento. Empregou–se o teste de correlação de Spearman entre as variáveis APGAR e lactato, APGAR e mecônio, lactato e peso vivo, lactato e mecônio, glicose e peso vivo, e insulina e peso vivo. A correlação de Pearson foi procedida entre as variáveis triglicérides e peso vivo, colesterol e peso vivo e APGAR e peso vivo. O nível de significância adotado foi de 5%. As análises

estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa SAS (Statistical Analysis System) (ZAR, 1999).

## 4.RESULTADOS

### 4.1 Exame físico

No que tange ao peso após o nascimento, foi considerado com macrossomia todo bezerro com peso acima de 45 Kg, de acordo com pesquisa realizada por Meirelles et al. (2010). A média do peso vivo dos animais clonados foi de  $43,03 \pm 14,72$  kg. Desta forma, constatou-se que 50% dos animais clonados (5/10) apresentavam peso vivo superior à média da raça. Para o GII esta foi de  $37,72 \pm 6,34$  kg. Neste grupo, somente 10% dos bezerros (1/10) possuíam peso vivo superior à média da raça.

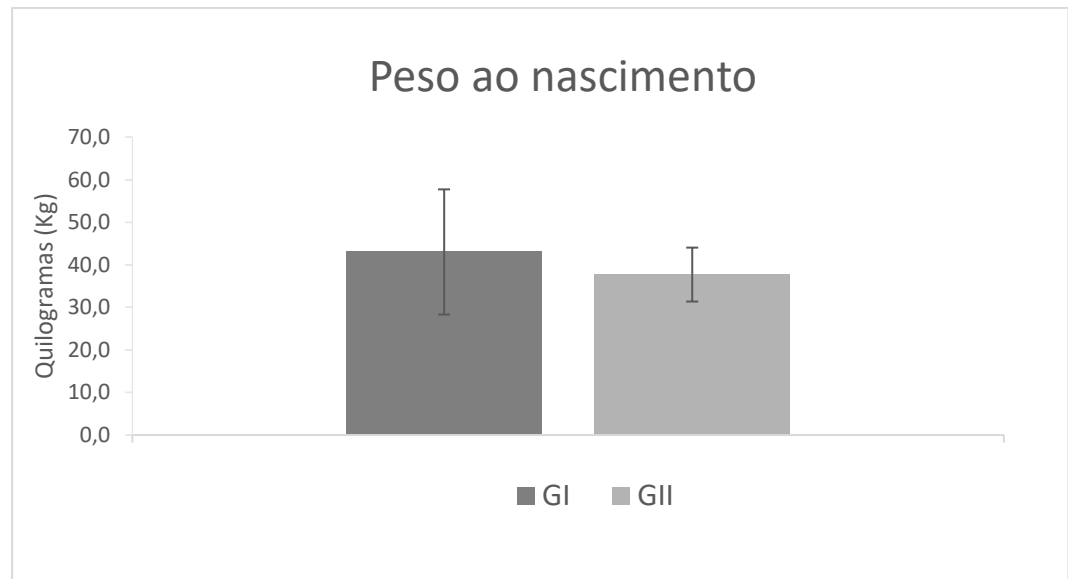
Dos 5 bezerros do GI com peso excessivo, somente um veio a óbito durante o período experimental. Outros três animais morreram até as 48 horas de vida, enquanto um sobreviveu. Em contrapartida o único bezerro do GII com esta característica sobreviveu. Assim sendo, a taxa de mortalidade dos bezerros macrossômicos do GI foi de 80% (4/5). Apesar da discrepância de peso ao nascimento, não foi evidenciada diferença estatística entre os grupos (Tabela 1 e Gráfico 1).

**Tabela 1– Média ( $\bar{x}$ ), desvio-padrão (S), mínimo (Min) e máximo (Max) dos valores de peso, em quilogramas (Kg), de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII), imediatamente após o parto.**

Variável	Momento	Grupo I		Grupo II	
		( $\bar{x} \pm S$ )	Min – Máx	( $\bar{x} \pm S$ )	Min – Máx
<b>Peso (Kg)</b>	M <sub>0</sub>	43,03±14,72 A	26,10–71,0	37,72±6,34 A	28,0–48,5

<sup>A</sup> Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste t ( $p < 0,05$ ).  
Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 1 – Representação gráfica da média do peso ao nascimento, em quilogramas (Kg), de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII), imediatamente após o parto.**



Fonte: Elaborado pelo autor

Ao exame externo, 50% (5/10) dos bezerros do GI apresentaram alterações anatômicas significativas. Destes, 30% (3/10) possuíam deformações do aparelho locomotor, sendo dois macrossômicos. Um deles, pesando 46,2 kg, apresentou deformidades angulares (Varus) e flacidez tendínea, ambas, bilateralmente, nos membros pélvicos (figura 1 e 2). Outros dois bezerros, oriundos do mesmo doador celular e pesando 34,1 Kg e 71,2 Kg, respectivamente, apresentaram deformidades flexurais da articulação interfalangeana distal nos membros torácicos, bilateralmente (Figura 3), e o outro somente no membro torácico esquerdo. Ressalta-se, ainda, que suas receptoras desenvolveram hidroalantóide no terço final da gestação.

Ademais, à inspeção dos neonatos, foi identificado em 20% (2/10) dos animais, protrusão da língua, permitindo afirmar que se tratava de macroglossia ao nascimento (Figura 4). Para o GII, não foram denotadas alterações anatômicas ao exame externo.



**Figura 1– Malformação dos membros pélvicos identificada pelo desvio angular (Varus).**

**Figura 2– Flacidez tendínea dos membros pélvicos ao nascimento e durante as quatro horas de sobrevivência.**

**Figura 3– Flacidez tendínea dos membros pélvicos ao nascimento e durante as quatro horas de sobrevivência (Seta).**

**Figura 4– Protrusão da língua, característica de macroglossia (Seta).**



A comparação do escore APGAR entre os grupos não demonstrou diferença significativa ( $p>0,05$ ) no pós-parto imediato. Neste período, os escores baixa e moderada vitalidade foram os mais comuns entre os grupos avaliados, representando 80% dos animais do GI que demonstraram baixa (20%) e moderada (60%) vitalidade, e 70% dos animais do GII apresentaram baixa (10%) e moderada (60%) vitalidade (Tabela 2). Passados os primeiros cinco minutos, 80% dos animais do GII possuíam escore APGAR dentro da faixa de normalidade. O mesmo ocorreu em 40% dos animais do GI, não apresentando, contudo, diferença entre si ( $p>0,05$ ). No GI, o peso vivo não demonstrou correlação significativa com o escore APGAR ao nascimento ( $r=0,086$ ;  $p=0,409$ ). Situação similar foi evidenciada nos animais do GII ( $r=0,355$ ;  $p=0,069$ ).

Ao nascimento foi denotado animais tingidos de mecônio, perfazendo 60% (6/10) dos animais do GI e 20% (2/10) dos animais do GII. A correlação do escore APGAR com o mecônio não se mostrou significativa no GI ( $r=-0,516$ ;  $p=0,133$ ) e nem no GII ( $r=0,133$ ;  $p=0,707$ ).

**Tabela 2 – Porcentagem (%) e grau de vitalidade, por meio do escore APGAR, de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**

MOMENTO	APGAR	G I		G II		P <sup>(1)</sup>
		n	%	n	%	
M <sub>0</sub>	Baixa(0–3)	2	20,0	1	10,0	1,0000
	Moderada (4–6)	6	60,0	6	60,0	
	Normal(7–8)	2	20,0	3	30,0	
M <sub>5</sub>	Baixa(0–3)	1	10,0	1	10,0	0,1409
	Moderada (4–6)	5	50,0	1	10,0	
	Normal(7–8)	4	40,0	8	80,0	

(1) teste exato de Fisher

Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados referentes à frequência respiratória (FR), frequência cardíaca (FC) e temperatura retal em graus Celsius (TR) estão expressos na tabela 3 e gráficos 2 a 4. No que concerne à FR, os valores referentes ao GI denotaram diferença significativa entre o momento do nascimento e o último período experimental, enquanto que no GII a FR se manteve constante durante todo o período de avaliação. Ademais, os momentos 2, 4 e 12 horas apresentaram diferenças significativas entre os grupos com valores maiores no GI. A FC se manteve constante em ambos grupos ao longo de todo o período experimental não diferindo entre eles nem entre os

momentos. A respeito da TR, os dois grupos apresentaram uma diminuição dos valores logo após o parto, no entanto com normalização dos valores já o momento 2 horas para o GI e 6 horas para o GII.

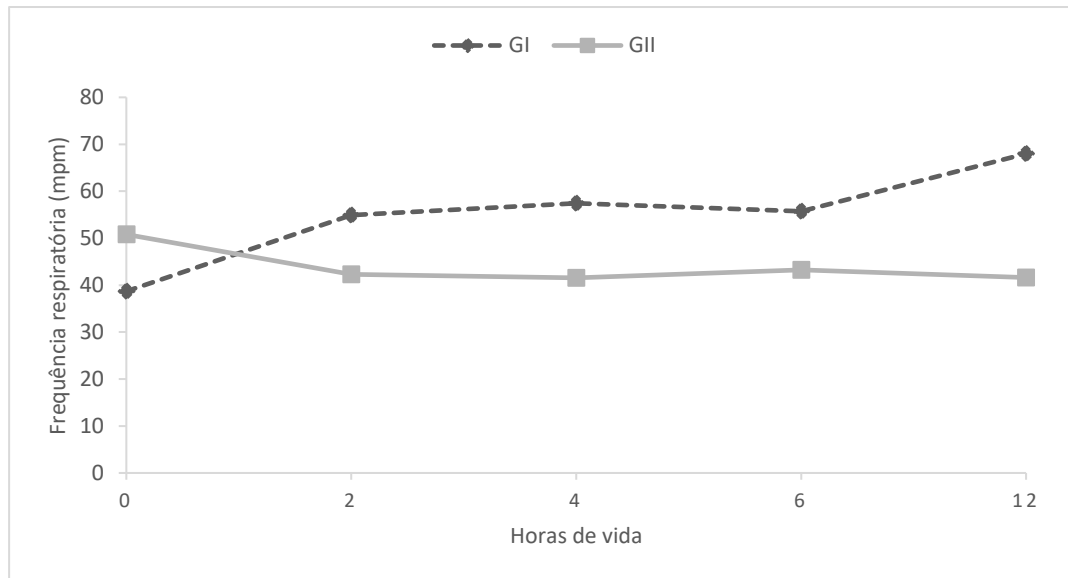
**Tabela 3– Média ( $\bar{x}$ ) e desvio-padrão (S) dos valores de frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e temperatura retal (TR) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**

Variável	Momento	Grupo ( $\bar{x} \pm S$ )			
		n	I	n	II
FR (mpm)	M <sub>0</sub>	10	39±22 b	10	51±11
	M <sub>2</sub>	9	55±6 Aab	10	42±10 B
	M <sub>4</sub>	7	57±15 Aab	10	42±7 B
	M <sub>6</sub>	7	56±15, ab	8	43±14
	M <sub>12</sub>	7	68±16 Aa	8	42±4 B
FC (bpm)	M <sub>0</sub>	10	99±37	10	127±44
	M <sub>2</sub>	9	132±24	10	137±25
	M <sub>4</sub>	7	140±22	10	137±24
	M <sub>6</sub>	7	143±40	8	127±21
	M <sub>12</sub>	7	141±32	8	136±19
TR (C°)	M <sub>0</sub>	10	39,22±0,65 a	10	38,84±0,78 a
	M <sub>2</sub>	9	37,23±0,87 b	10	37,74±1,10 b
	M <sub>4</sub>	7	37,87±1,00 b	10	37,88±0,80 b
	M <sub>6</sub>	7	38,17±1,16 b	8	38,16±0,70 ab
	M <sub>12</sub>	7	38,03±1,10 b	8	38,01±0,58 ab

<sup>Aa</sup> Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

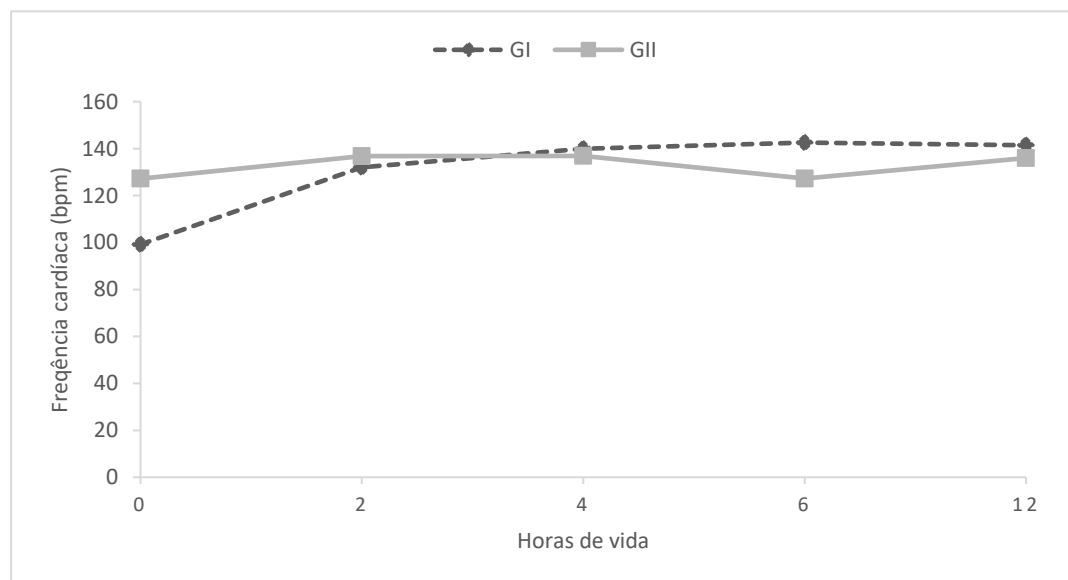
Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 2– Representação gráfica dos valores médios de frequência respiratória de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**



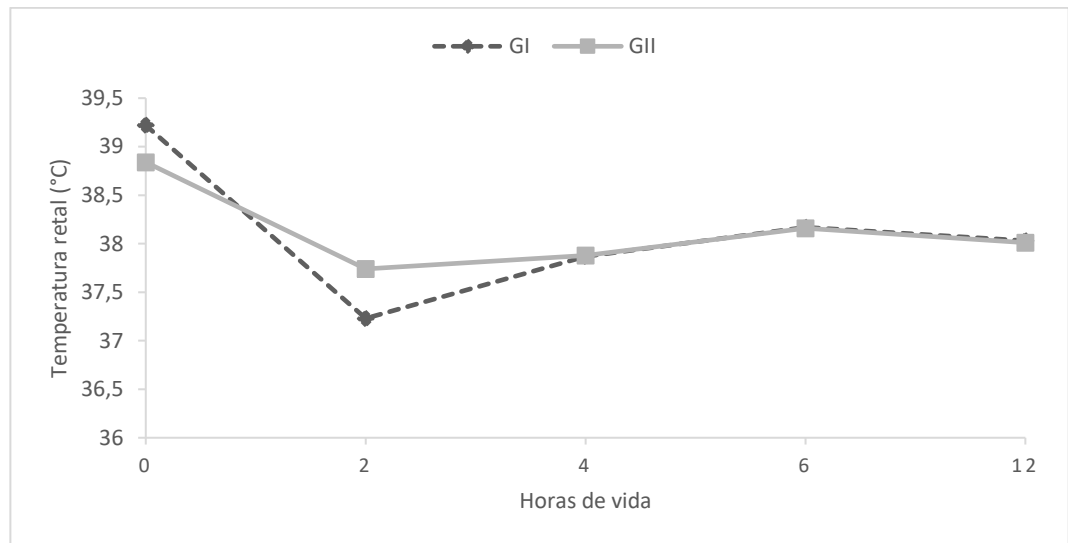
Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 3– Representação gráfica dos valores médios de frequência cardíaca de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII)**



Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 4– Representação gráfica dos valores médios de temperatura retal de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**



Fonte: Elaborado pelo autor

A avaliação das mucosas encontra-se descrita na tabela 4. Durante o exame físico, as colorações rósea e pálida eram as mais evidenciadas, sendo que as colorações ictérica e cianótica foram observadas em um animal do GI e em outro do GII, respectivamente. Foram constatadas diferenças significativas entre os grupos com relação à coloração logo após o parto ( $p < 0,05$ ). Ao nascimento, 80% dos animais do GI apresentavam mucosas pálidas, enquanto tal coloração só foi evidenciada em 20% dos animais do GII. O GII apresentou a maior concentração de animais com coloração de mucosa rósea, parâmetro este considerado como sendo de normalidade. Entretanto, com a evolução das horas após o nascimento, a coloração rósea das mucosas passou a ser a mais presente em ambos grupos.

**Tabela 4– Porcentagem (%) da coloração de mucosa ocular de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**

Momento	Coloração de mucosa	GRUPO I		GRUPO II		P <sup>(1)</sup>
		n	%	n	%	
M <sub>0</sub>	Pálida	8	80,0	2	20,0	0,0230
	Rósea	2	20,0	7	70,0	
	Cianótica	–	–	1	10,0	
M <sub>2</sub>	Pálida	4	44,4	4	40,0	1,0000
	Rósea	5	55,6	6	60,0	
M <sub>4</sub>	Pálida	2	28,6	1	11,1	0,5500
	Rósea	5	71,4	8	88,9	
M <sub>6</sub>	Pálida	2	28,6	1	12,5	0,5692
	Rósea	5	71,4	7	87,5	
M <sub>12</sub>	Pálida	2	28,6	–	–	0,0769
	Rósea	4	57,1	8	100,0	
	Ictérica	1	14,3	–	–	

(1) Teste exato de Fisher

Fonte: Elaborado pelo autor

Os intervalos para a adoção do reflexo de sucção e decúbito esternal estão dispostos na tabela 5. Observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos para tais parâmetros. No GI dois animais morreram antes de apresentar o reflexo de sucção e adotar o decúbito esternal. Desta forma, não receberam o colostro. Um animal apresentou fraco reflexo de sucção após 2 horas de vida vindo a óbito em seguida, não ingerindo, também, o colostro. Portanto, 70% dos animais do GI (7/10) receberam o colostro. O reflexo de sucção foi manifestado por 71,4% (5/7) destes animais. Em quatro animais o reflexo era fraco. Nestes e nos outros dois que não o manifestaram, receberam o colostro via sonda esofágica, perfazendo 85,7% (6/7). Somente um animal ingeriu o colostro espontaneamente via mamadeira. O decúbito esternal foi adotado por 80% (8/10) dos animais do GI sendo que 50% (4/8) não conseguiam manter a cabeça estendida.

Todos os bezerros do GII apresentaram o reflexo de sucção, embora quatro deles demoraram mais que o estipulado pela literatura (HOUSE; GUNN, 2014). Ressalta-se ainda que, neste grupo, apenas um animal não se manteve em decúbito esternal, vindo a óbito com 2 horas de vida. Portanto, 17 dos 20 animais avaliados receberam o colostro, sendo dez animais do GII e sete animais do GI, sendo que os animais do GI que apresentavam reflexo de sucção demoraram mais que o período considerado fisiológico. Além disto, todos os animais avaliados demoraram mais que

o período considerado fisiológico para a espécie para adotar o decúbito esternal (HOUSE; GUNN, 2014).

**Tabela 5– Mediana (Md), mínimo (min) e máximo (máx), em minutos, para a adoção do decúbito esternal e reflexo de sucção em bezerros oriundos de técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**

Posicionamento	Momento	I			II		
		n	Md	Min – Máx	n	Md	Min – Máx
Nascimento–esternal (min)	M <sub>0</sub>	8	50A	20,0–720,0	9	14A	8,0–402,0
Nascimento–reflexo sucção (min)	M <sub>0</sub>	6	18,5A	2,0–118,0	10	17,5A	2,0–290,0

<sup>A</sup> Medianas seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Mann–Whitney ( $p < 0,05$ )

Fonte: Elaborado pelo autor

## 4.2 Hematologia

Os resultados referentes ao eritrograma estão expostos na tabela 6 e gráficos 5 a 9. Todos os bezerros do GI apresentaram anemia desde o nascimento até o final do período experimental. Nestes, os valores médios de hemoglobina se mantiveram abaixo da referência para recém–nascidos, 10g/dL (HOUSE; GUNN, 2014). Situação não observada no GII onde os valores médios desta variável diminuíram com o passar do tempo, atingindo teores abaixo da referência às 12 horas de vida (gráfico 6).

Os valores médios dos índices hematimétricos absolutos VCM e CHCM, não demonstraram diferenças significativas entre os grupos nem entre os momentos, mantendo–se dentro dos parâmetros de referência durante o período de avaliação. (gráficos 8 e 9). Desta forma, a anemia, quando presente, se caracterizou como normocítica e normocrômica.

No que concerne à contagem de eritrócitos, os valores médios apresentaram aumento gradual nas primeiras 6 horas de vida para o GI, enquanto o GII apresentou uma diminuição, do nascimento até o fim do período experimental. Padrão similar ocorreu com o volume globular no GII até o final das avaliações, enquanto essa variável para o GI apresentou um aumento logo após o parto. No entanto, apesar da diferente progressão de valores entre os grupos, não houve diferença significativa entre eles durante o período estudado.

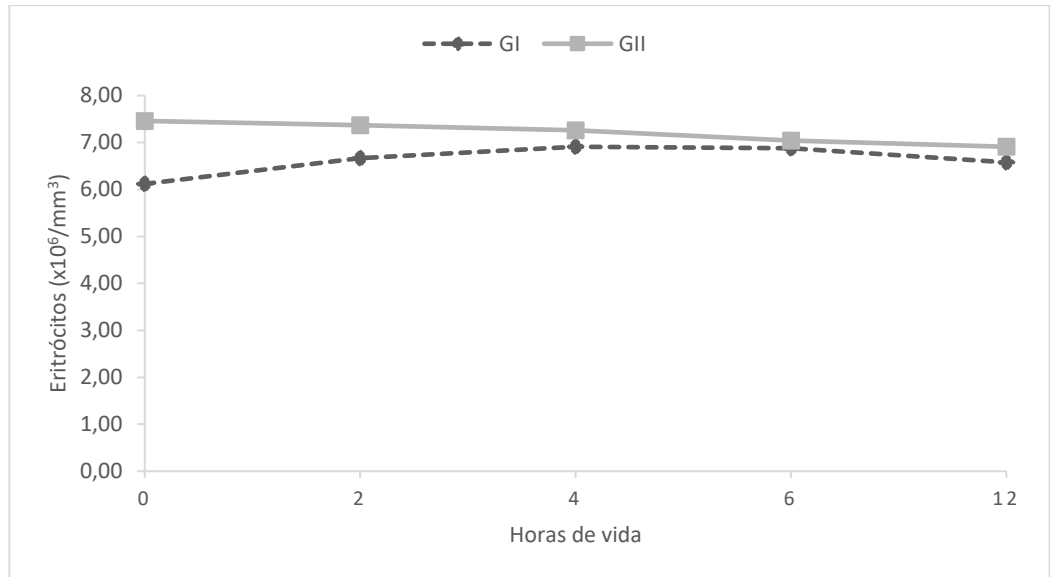
**Tabela 6– Média ( $\bar{x}$ ) e desvio-padrão (S) dos valores de eritrócitos, hemoglobina, volume globular, volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e plaquetas de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**

Variável	Momento	Grupo ( $\bar{x} \pm S$ )			
		n	I	N	II
Eritrócitos ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	M <sub>0</sub>	10	6,12 $\pm$ 1,82 b	10	7,46 $\pm$ 1,66 a
	M <sub>2</sub>	9	6,67 $\pm$ 1,92 ab	10	7,37 $\pm$ 1,84 ab
	M <sub>4</sub>	7	6,91 $\pm$ 1,86 a	10	7,26 $\pm$ 1,80 ab
	M <sub>6</sub>	7	6,88 $\pm$ 1,92 a	8	7,04 $\pm$ 2,15 ab
	M <sub>12</sub>	7	6,58 $\pm$ 2,02 ab	8	6,91 $\pm$ 2,06 b
Hemoglobina (g/dL)	M <sub>0</sub>	10	8,17 $\pm$ 2,69 b	10	10,78 $\pm$ 2,49 a
	M <sub>2</sub>	9	8,76 $\pm$ 2,74 ab	10	10,60 $\pm$ 2,36 a
	M <sub>4</sub>	7	9,41 $\pm$ 2,58 a	10	10,65 $\pm$ 2,23 a
	M <sub>6</sub>	7	9,43 $\pm$ 2,63 a	8	10,15 $\pm$ 2,63 ab
	M <sub>12</sub>	7	9,10 $\pm$ 2,98 ab	8	9,81 $\pm$ 2,56b
Volume Globular (%)	M <sub>0</sub>	10	26,63 $\pm$ 8,55 b	10	33,88 $\pm$ 6,60 a
	M <sub>2</sub>	9	29,10 $\pm$ 9,62 ab	10	33,81 $\pm$ 7,29 a
	M <sub>4</sub>	7	31,20 $\pm$ 8,55 a	10	33,50 $\pm$ 7,02 ab
	M <sub>6</sub>	7	31,04 $\pm$ 8,82 a	8	31,99 $\pm$ 7,99 ab
	M <sub>12</sub>	7	29,87 $\pm$ 8,60 ab	8	31,49 $\pm$ 7,42 b
VCM ( $\mu^3$ )	M <sub>0</sub>	10	43,65 $\pm$ 5,39	10	45,76 $\pm$ 3,75
	M <sub>2</sub>	9	43,43 $\pm$ 5,38	10	46,33 $\pm$ 3,55
	M <sub>4</sub>	7	45,19 $\pm$ 3,42	10	46,54 $\pm$ 4,04
	M <sub>6</sub>	7	45,03 $\pm$ 3,79	8	46,09 $\pm$ 4,08
	M <sub>12</sub>	7	45,17 $\pm$ 4,33	8	42,97 $\pm$ 7,73
CHCM (g/dL)	M <sub>0</sub>	10	30,61 $\pm$ 1,62	10	31,60 $\pm$ 1,95
	M <sub>2</sub>	9	30,26 $\pm$ 1,63	10	30,65 $\pm$ 2,25
	M <sub>4</sub>	7	30,17 $\pm$ 1,72	10	30,67 $\pm$ 3,55
	M <sub>6</sub>	7	30,43 $\pm$ 1,45	8	31,71 $\pm$ 2,43
	M <sub>12</sub>	7	30,16 $\pm$ 0,96	8	31,02 $\pm$ 2,07

<sup>Aa</sup> Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

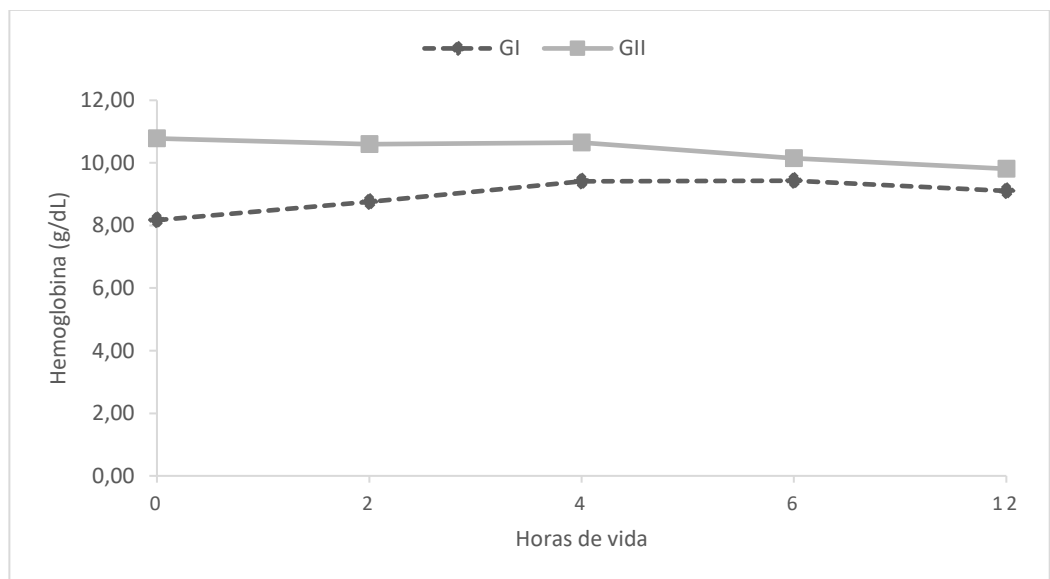
Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 5–** Representação gráfica dos valores médios de eritrócitos ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ ) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).



Fonte: Elaborado pelo autor

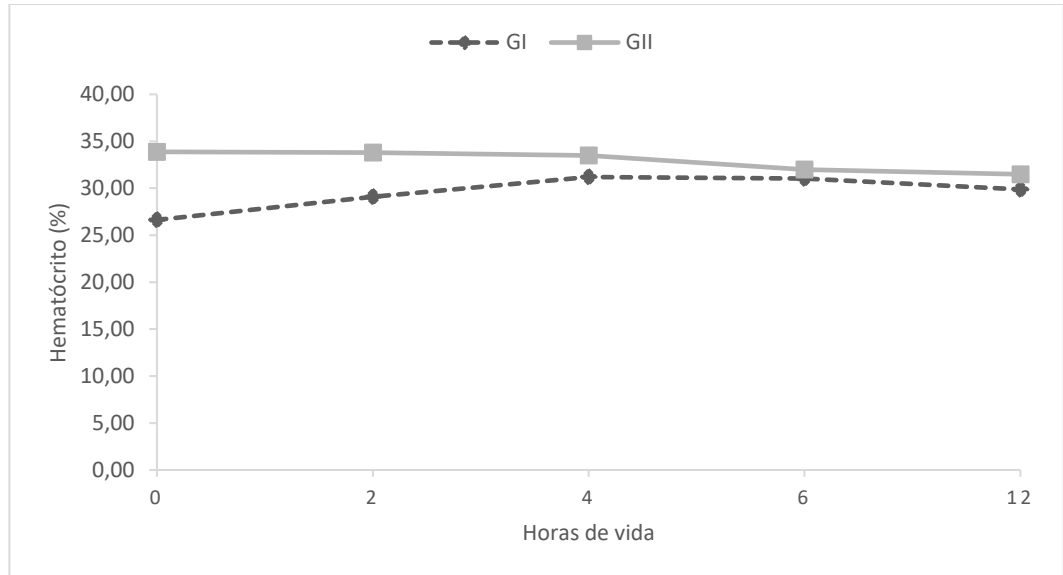
**Gráfico 6–** Representação gráfica dos valores médios de hemoglobina (g/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).



Fonte: Elaborado pelo autor

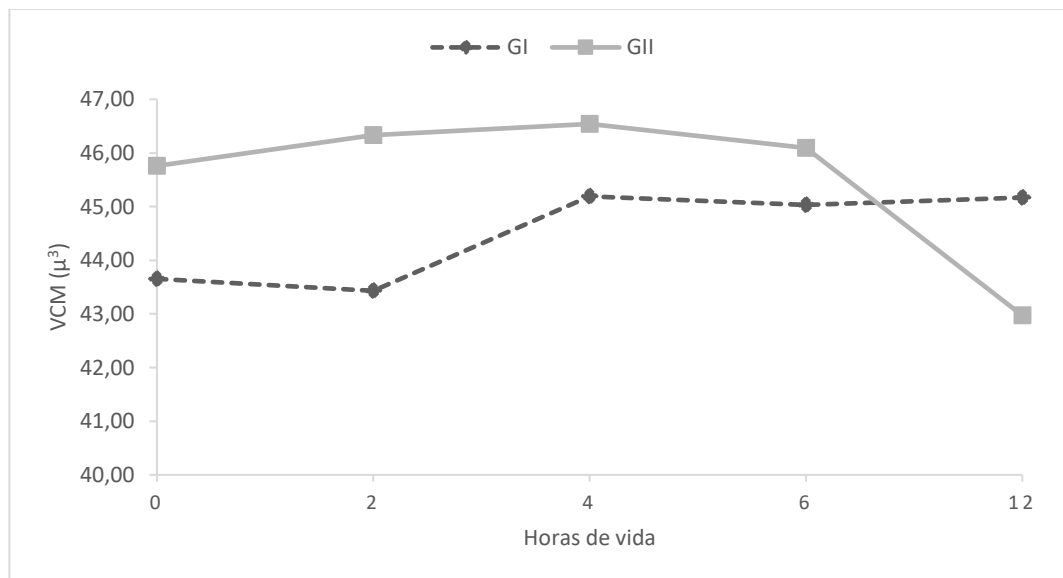


**Gráfico 7– Representação gráfica dos valores médios de hematócrito (%) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**



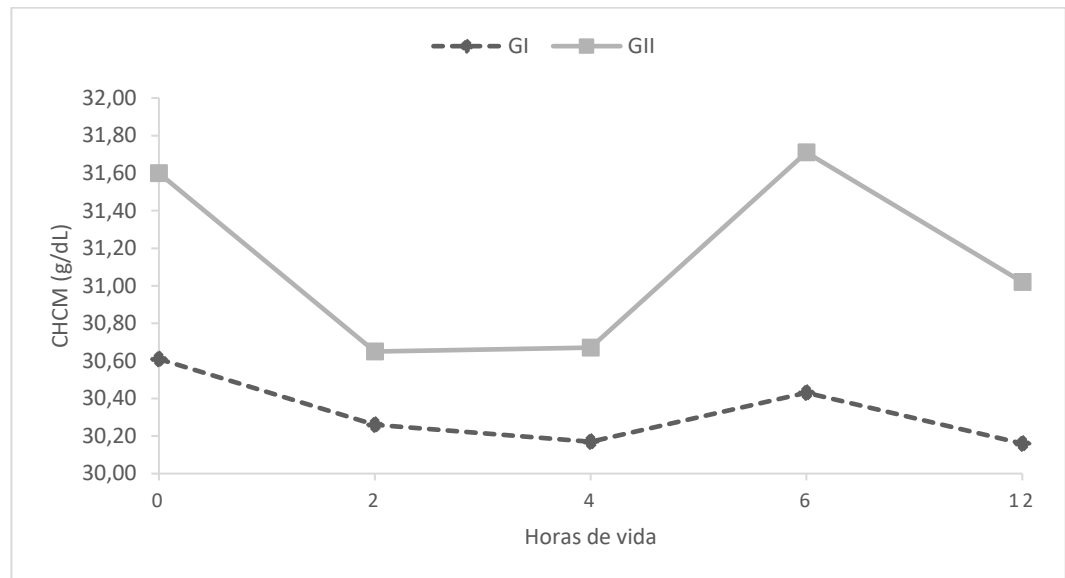
Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 8– Representação gráfica dos valores médios de volume corpuscular médio (VCM –  $\mu^3$ ) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**



Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 9– Representação gráfica dos valores médios da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM– g/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**



Fonte: Elaborado pelo autor

O número de leucócitos totais não diferiu estatisticamente no GI ao longo do tempo (Tabela 7, Gráfico 10). No entanto, os animais do GII apresentaram maiores valores médios, imediatamente após o parto, que diminuíram no momento subsequente. Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos nos diferentes momentos avaliados.

A contagem diferencial dos leucócitos evidenciou maior proporção de neutrófilos segmentados, no pós-parto imediato, em relação às demais células brancas, sendo estes responsáveis por 51,05% e 80,6% dos glóbulos brancos do GI e GII (Tabela 7 e 8, Gráfico 11 a 13), respectivamente. No GII os valores médios foram superiores após o nascimento decrescendo no momento experimental subsequente. Para o GI tal variável apresentou aumento nos valores avaliados com diferença significativa no final do período experimental.

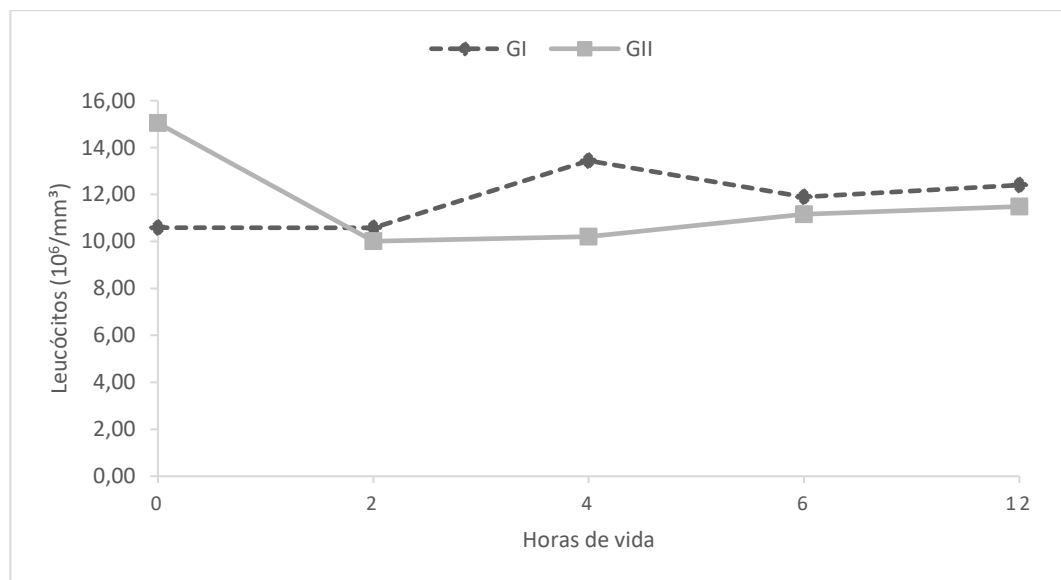
Tabela 7– Média ( $\bar{x}$ ) e desvio-padrão (S) dos valores de leucócitos e neutrófilos de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).

Variável	Momento	Grupo ( $\bar{x} \pm S$ )			
		n	I	n	II
Leucócitos ( $10^6/\text{mm}^3$ )	M <sub>0</sub>	10	10,59±4,37a	10	15,04±2,93 a
	M <sub>2</sub>	9	10,58±3,54a	10	10,01±7,35 b
	M <sub>4</sub>	7	13,44±4,53a	10	10,20±3,33 ab
	M <sub>6</sub>	7	11,89±6,24a	8	11,16±2,46 ab
	M <sub>12</sub>	7	12,40±8,29a	8	11,49±2,19 ab
Neutrófilos ( $\mu\text{L}$ )	M <sub>0</sub>	10	5407,80±4588,0 Bb	10	12427,90±2866,29 Aa
	M <sub>2</sub>	9	5984,44±4807,52 ab	10	7966,20±5370,88 b
	M <sub>4</sub>	7	9031,14±5336,10 ab	10	8301,38±2520,83 b
	M <sub>6</sub>	7	8802,57±6339,65 ab	8	9062,25±2393,84 ab
	M <sub>12</sub>	7	9542,43±7810,27 a	8	9018,75±3015,90 ab

<sup>Aa</sup> Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

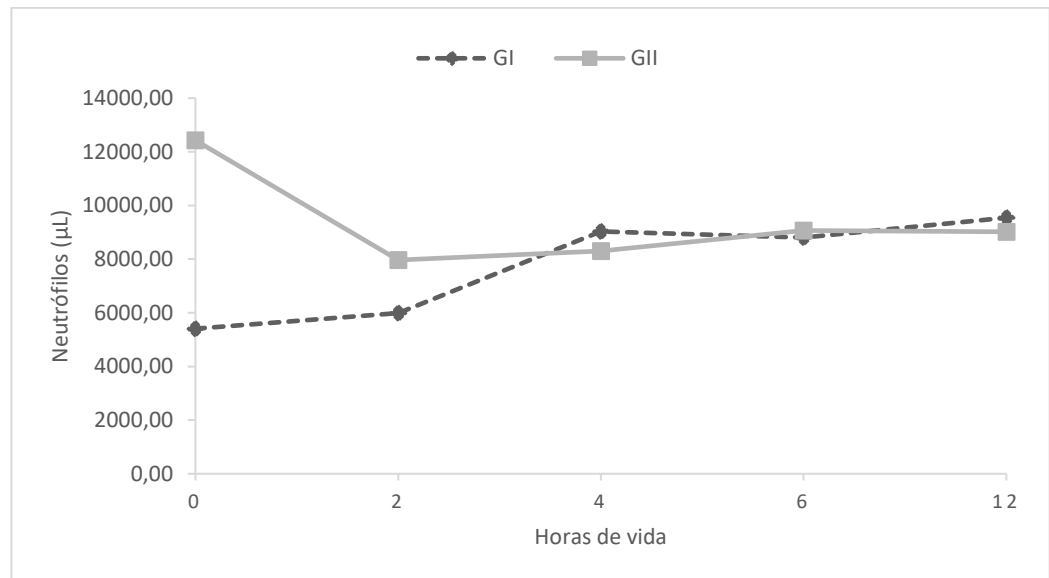
Fonte: Elaborado pelo autor

Gráfico 10– Representação gráfica dos valores médios de leucócitos totais ( $\times 10^6 / \text{mm}^3$ ) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).



Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 11– Representação gráfica dos valores médios dos neutrófilos ( $\mu\text{L}$ ) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**



Fonte: Elaborado pelo autor

Depois dos neutrófilos, os linfócitos foram as células brancas mais comumente observadas na contagem diferencial dos leucócitos (Tabela 8, Gráfico 12). Os valores medianos de linfócitos, imediatamente após o parto, foram superiores no GI, sendo este mesmo padrão evidenciado no segundo momento experimental. Entretanto, em ambos os grupos, não foi denotada diferença entre os valores com o passar do tempo, mantendo-se constantes ao longo da avaliação. As concentrações de monócitos não diferiram entre os grupos nem entre momentos.

A relação neutrófilo/linfócito (N/L), que reflete a ação do cortisol durante o parto, foi calculada ao longo do estudo, sendo os valores medianos desta relação superior no GII, imediatamente após o parto e no momento subsequente (Tabela 8).

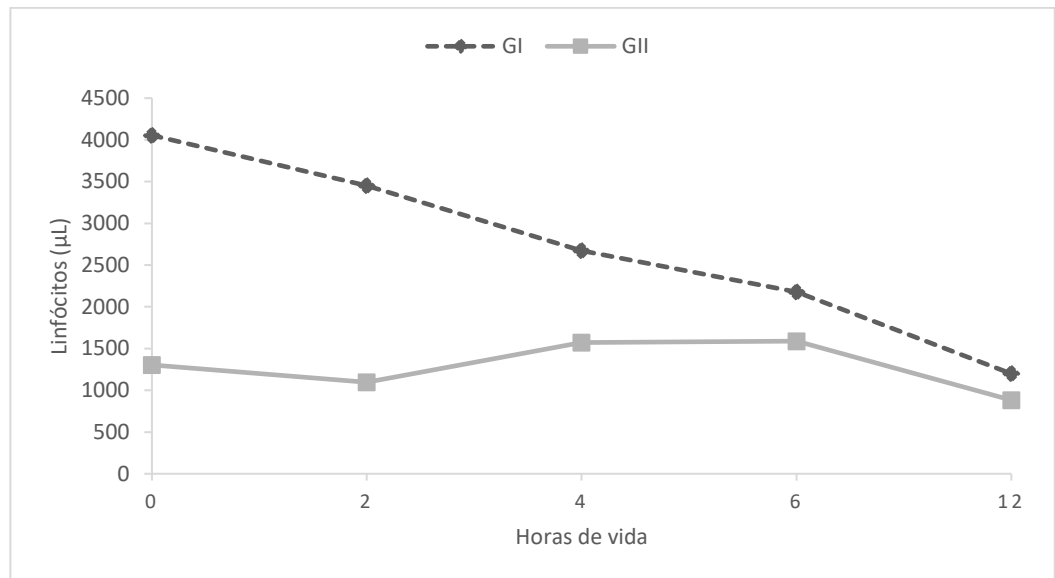
**Tabela 8– Mediana (Md), mínimo (min) e máximo (máx) dos valores de Linfócitos, monócitos e relação neutrófilo/linfócito (N/L) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**

Variável	Momento	Grupo					
		I			II		
		n	Md	Min – Máx	n	Md	Min – Máx
Linfócitos ( $\mu$ L)	M <sub>0</sub>	10	4055 A	2752,0–8568,0	10	1304,5 B	564,0–2755,0
	M <sub>2</sub>	9	3450 A	1344,0–8760,0	10	1096 B	570,0–6831,0
	M <sub>4</sub>	7	2673	1236,0–6578,0	10	1573,5	456,0–7680,0
	M <sub>6</sub>	7	2178	620,0–4810,0	8	1589	660,0–3072,0
	M <sub>12</sub>	7	1199	525,0–3080,0	8	882,5	137,0–3885,0
Monócitos ( $\mu$ L)	M <sub>0</sub>	10	661,5	67–1920	10	510	0–1872
	M <sub>2</sub>	9	400	192–840	10	146	0–1485
	M <sub>4</sub>	7	549	0–1760,0	10	207	0–1056
	M <sub>6</sub>	7	166	0–1950	8	208	0–1452
	M <sub>12</sub>	7	218	18–3178	8	386	0–1008
N/L	M <sub>0</sub>	10	0,6 B	0,29–4,9	10	8,4 A	4,0–23,0
	M <sub>2</sub>	9	1,2 B	0,33–10,9	10	4,4 A	0,8–14,8
	M <sub>4</sub>	7	3,7	0,2–7	10	4,4	1–23,3
	M <sub>6</sub>	7	4,1	0–22,5	8	6	2,6–16,8
	M <sub>12</sub>	7	7	0,4–26,7	8	10,8	0,8–91

<sup>A</sup> Medianas seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Mann–Whitney ( $p < 0,05$ )

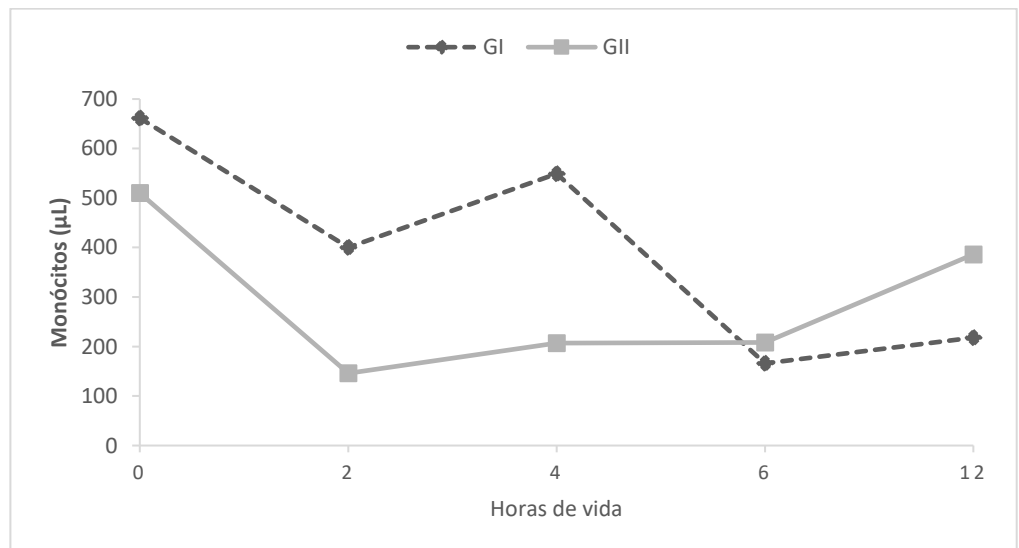
Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 12–** Representação gráfica dos valores medianos dos linfócitos ( $\mu\text{L}$ ) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).



Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 13–** Representação gráfica dos valores medianos dos monócitos ( $\mu\text{L}$ ) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).



Fonte: Elaborado pelo autor

### 4.3 Parâmetros bioquímicos

#### 4.3.1 Avaliação Proteica

Os valores de proteína total e albumina estão expressos na tabela 9 e gráfico 14 e 15. Os valores médios de proteína total foram menores em ambos grupos, imediatamente após o parto e atingiram os maiores valores observados na pesquisa às 12 horas de avaliação. Além disso, não demonstraram diferenças entre os grupos avaliados em nenhum momento do experimento. No que tange à albumina, o GI apresentou um aumento nos valores séricos às 4 horas de avaliação. Entretanto, os valores desta fração proteica foram maiores no GI às 6 e 12 horas quando comparados ao GII. A albumina representou mais de 50% do valor de proteína total em todo o período experimental para o GI, fato neste observado somente até as 4 horas para o GII.

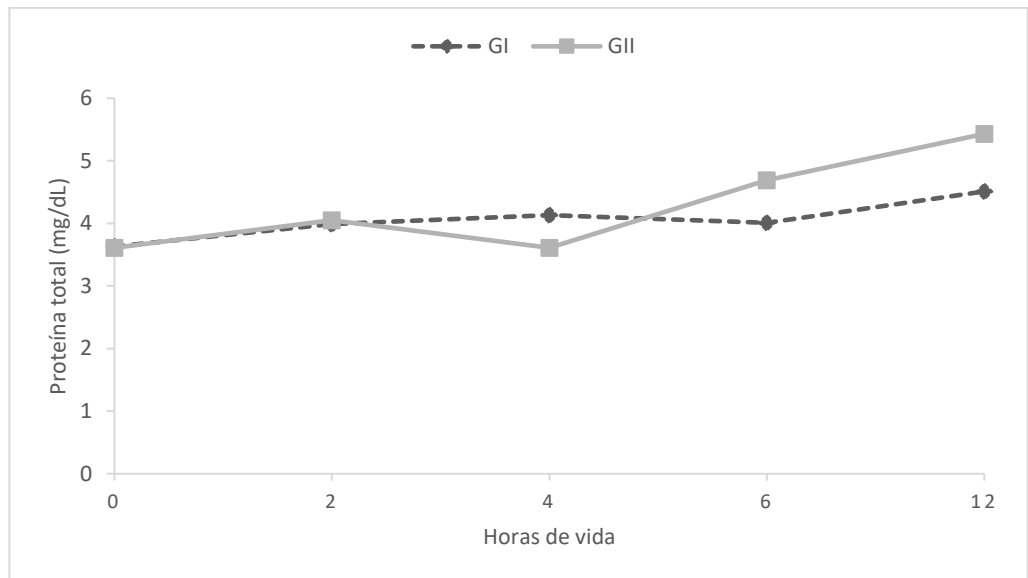
**Tabela 9– Média ( $\bar{x}$ ) e desvio-padrão (S) dos valores de proteína total e albumina de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**

Variável	Momento	Grupo ( $\bar{x} \pm S$ )			
		n	I	n	II
Proteína total (g/dL)	M <sub>0</sub>	10	3,63±0,65 b	10	3,61±0,53 c
	M <sub>2</sub>	9	3,99±0,67 b	10	4,05±0,87 bc
	M <sub>4</sub>	7	4,13±0,32 ab	10	3,61±0,77 c
	M <sub>6</sub>	7	4,01±0,43 ab	8	4,69±0,63 ab
	M <sub>12</sub>	7	4,51±0,61 a	8	5,43±1,08 a
Albumina (g/dL)	M <sub>0</sub>	10	2,38± 0,37 b	10	2,18± 0,45 ab
	M <sub>2</sub>	9	2,57± 0,30 ab	10	2,44± 0,81 a
	M <sub>4</sub>	7	2,60± 0,14 a	10	2,09± 0,69 ab
	M <sub>6</sub>	7	2,70± 0,20 Aa	8	2,20± 0,35 Ba
	M <sub>12</sub>	7	2,56± 0,16 Aab	8	1,64± 0,50 Bb

<sup>Aa</sup> Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

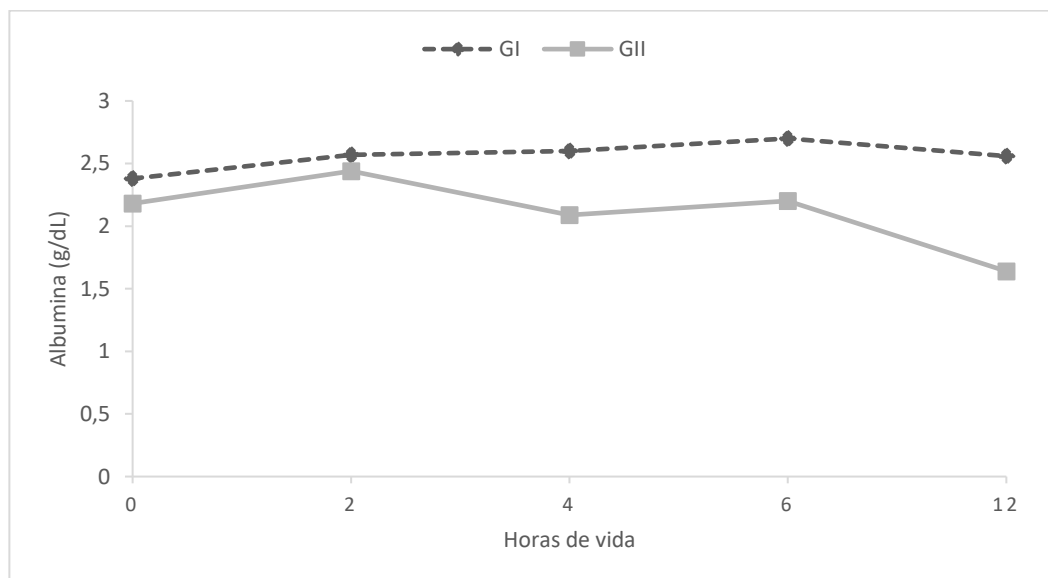
Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 14–** Representação gráfica dos valores médios de proteína total os (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).



Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 15–** Representação gráfica dos valores médios de albumina (g/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).



Fonte: Elaborado pelo autor



### 4.3.2 Avaliação da função renal

Foram avaliados os parâmetros de função renal (creatinina e ureia), bem como razão entre elas. Para a creatinina, não foram denotadas diferenças significativas entre os grupos estudados; no entanto, em ambos os grupos, os valores médios foram maiores logo após o parto. No que tange a ureia o GI apresentou a mesma característica, sofrendo decréscimo nos valores médios com o passar do tempo. Já para o GII, os valores permaneceram imutáveis ao longo do período experimental (Tabela 10 e Gráfico 16 e 17).

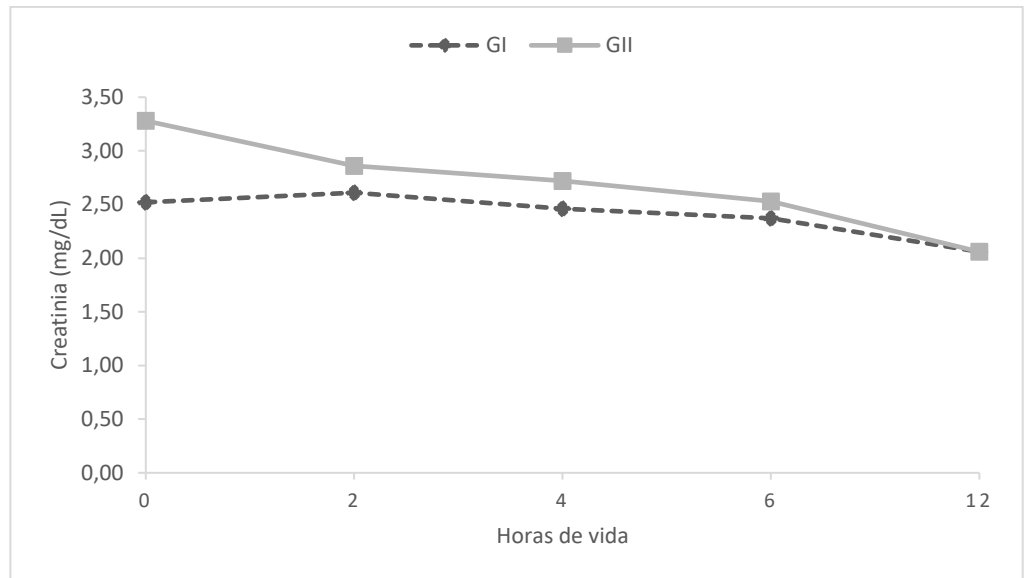
**Tabela 10– Média ( $\bar{x}$ ) e desvio–padrão (S) dos valores de creatinina e ureia de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**

Variável	Momento	Grupo ( $\bar{x} \pm S$ )			
		n	I	n	II
Creatinina (mg/dL)	M <sub>0</sub>	10	2,52± 0,87 a	10	3,28 ± 0,94 a
	M <sub>2</sub>	9	2,61± 0,72 a	10	2,86 ±0,92 ab
	M <sub>4</sub>	7	2,46± 0,81 ab	10	2,72± 0,55 b
	M <sub>6</sub>	7	2,37± 0,49 ab	8	2,53±0,55 bc
	M <sub>12</sub>	7	2,06± 0,61 b	8	2,06±0,34 bc
Uréia (mg/dL)	M <sub>0</sub>	10	33,69± 9,80 a	10	28,56 ± 7,33
	M <sub>2</sub>	9	33,59± 10,53 a	10	27,01 ±7,38
	M <sub>4</sub>	7	31,53± 7,65 ab	10	26,16± 7,38
	M <sub>6</sub>	7	29,72± 7,91 ab	8	27,77±6,67
	M <sub>12</sub>	7	26,54± 9,89 b	8	26,41±7,67

<sup>Aa</sup> Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

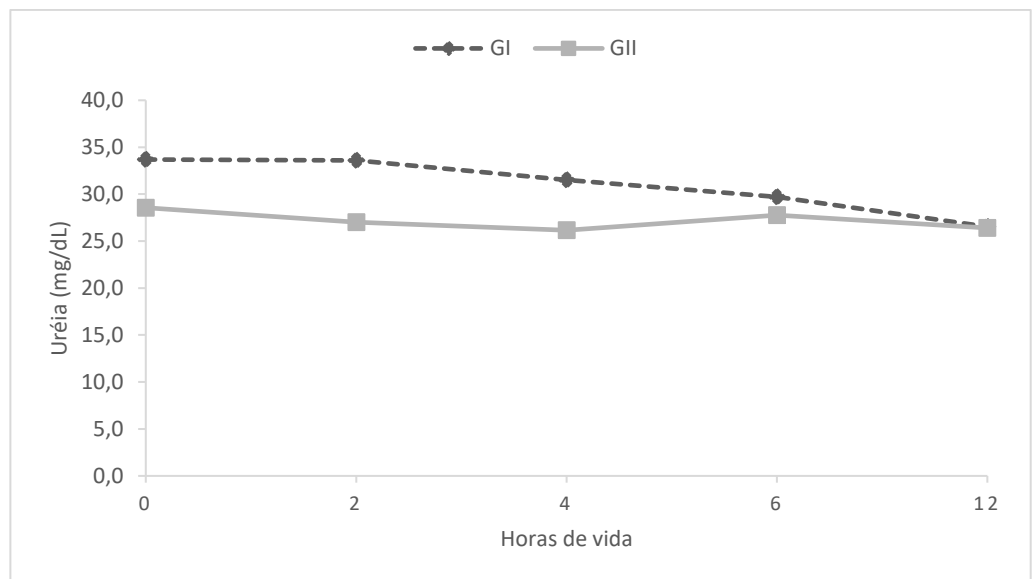
Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 16–** Representação gráfica dos valores médios de creatinina (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).



Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 17–** Representação gráfica dos valores médios de ureia (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).



Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados da razão ureia/creatinina, apresentados na tabela 11, evidenciaram diferença significativa entre os grupos logo após o parto, ocorrendo elevação dos valores médios para o GII, ao longo do estudo.

**Tabela 11– Média ( $\bar{x}$ ) e desvio-padrão (S) da razão ureia/creatinina de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**

Variável	Momento	Grupo ( $\bar{x} \pm S$ )			
		n	I	n	II
Ureia/Creatinina	M <sub>0</sub>	10	14,54±5,28 A	10	9,48±3,98 Bc
	M <sub>2</sub>	9	13,89±5,56	10	10,46±4,71 bc
	M <sub>4</sub>	7	13,96±4,69	10	9,95±3,28 bc
	M <sub>6</sub>	7	12,96±3,86	8	11,45±3,90 ab
	M <sub>12</sub>	7	13,32±4,12	8	13,11±4,43 a

<sup>Aa</sup> Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.3.3 Avaliação da função hepática

Os resultados dos valores das enzimas hepáticas estão expressos na tabela 12 e gráfico 18 e 19. As análises da AST e GGT diferiram somente entre os grupos avaliados. A primeira demonstrou valores medianos superiores para o GI nos momentos 4 e 6 horas quando comparados aos do GII. A segunda apresentou diferenças significativas entre os grupos sendo os valores medianos superiores para o GII nos momentos 0, 4, 6 e 12 horas.

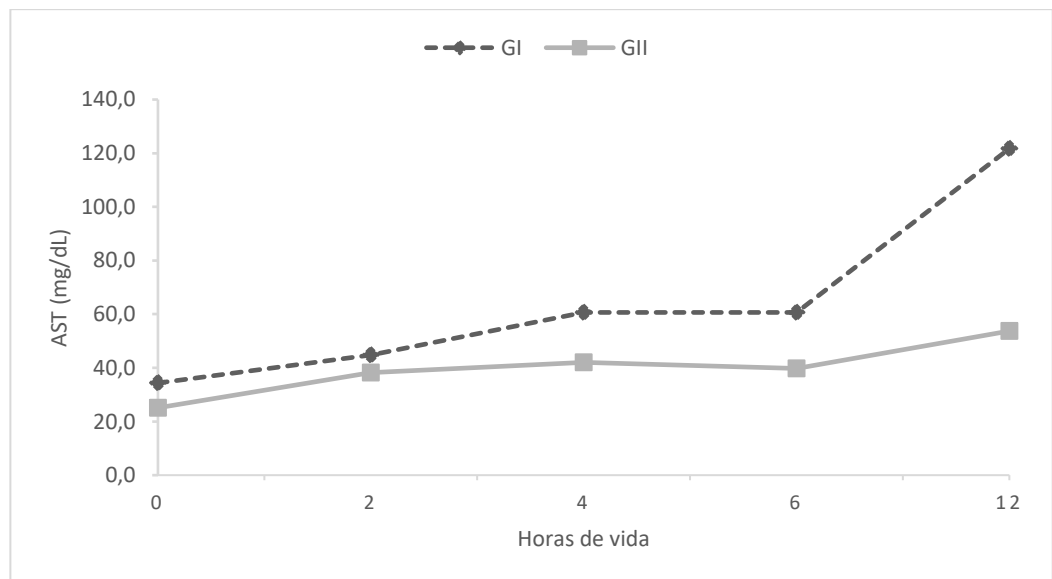
**Tabela 12– Mediana (Md), mínimo (min) e máximo (máx) dos valores aspartato aminotransferase (AST) e gama Glutamiltransferase (GGT) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**

Variável	Momento	Grupo					
		I			II		
		n	Md	Mín-Máx	n	Md	Min – Máx
AST (U/L)	M <sub>0</sub>	10	34,35	22,2–101,2	10	25,1	16,13–155
	M <sub>2</sub>	9	44,81	16,8–117,6	10	38,25	20,31–83,36
	M <sub>4</sub>	7	60,60 A	46,1–109,5	10	42 B	17,55–77,71
	M <sub>6</sub>	7	60,60 A	51,06–113,1	8	39,75 B	28,30–58,07
	M <sub>12</sub>	7	121,70	48–233,8	8	53,72	42,90–97,20
GGT (U/L)	M <sub>0</sub>	10	14,48 B	5,32–26,7	10	24,28 A	21,01–30,85
	M <sub>2</sub>	9	20,51	14,38–47,7	10	27,12	15,9–357,3
	M <sub>4</sub>	7	18,1 B	14,1–51,6	10	72,67 A	22,22–1270,2
	M <sub>6</sub>	7	34,7 B	17,4–96,1	8	909,7 A	16,7–6381,3
	M <sub>12</sub>	7	95 B	20,4–852,0	8	2352,3 A	240,4–8019,3

<sup>A</sup> Medianas seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Mann–Whitney ( $p < 0,05$ ).

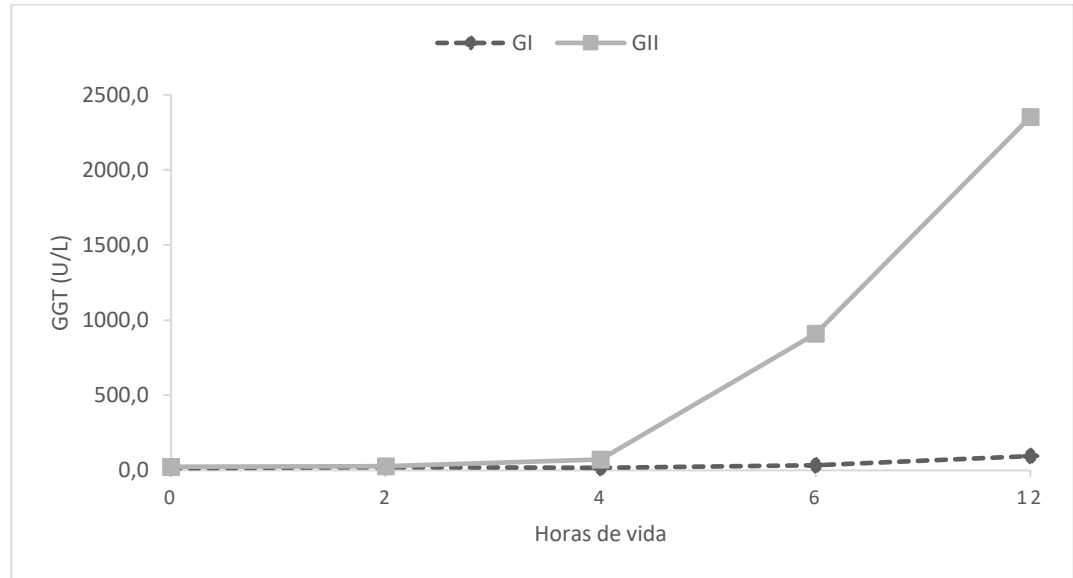
Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 18– Representação gráfica dos valores medianos de aspartato aminotransferase (AST) (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**



Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 19– Representação gráfica dos valores medianos de Gama glutamil transferase (GGT) (U/L) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**



Fonte: Elaborado pelo autor

Os valores de bilirrubina total e indireta estão expostos na tabela 13 e gráfico 20 e 21. Os teores séricos da bilirrubina total foram superiores no GI imediatamente após o parto e no momento subsequente, mantendo concentrações médias similares entre os grupos e os momentos até o final do período experimental. Já a fração indireta se mostrou superior desde o nascimento até o momento 6 horas no GI. Apesar da diferença observada entre os grupos, os valores não apresentaram mudanças entre os períodos de avaliação até o término do período experimental.

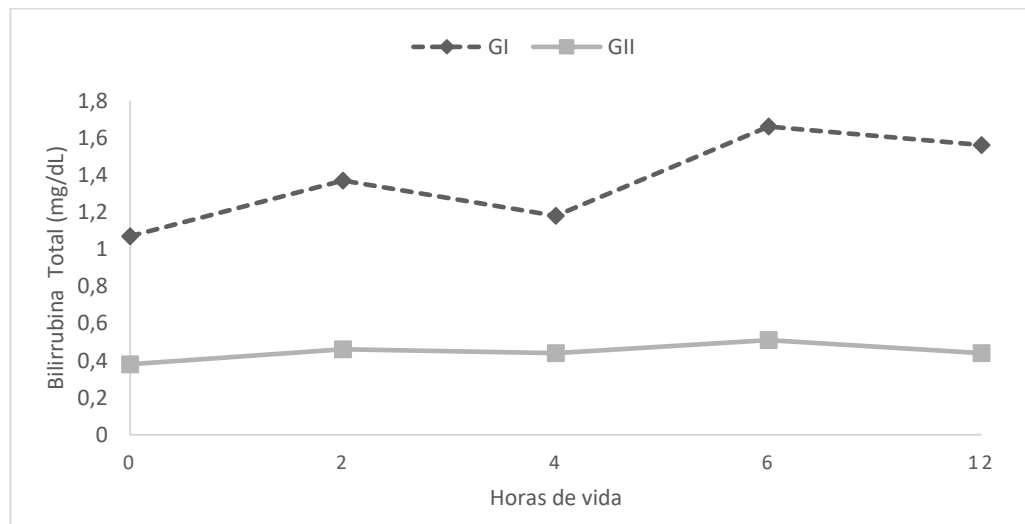
**Tabela 13– Média ( $\bar{x}$ ) e desvio-padrão (S) dos valores de bilirrubina total e indireta de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**

Variável	Momento	Grupo ( $\bar{x} \pm S$ )			
		n	I	N	II
Bilirrubina total (mg/dL)	M <sub>0</sub>	10	1,07±0,76 A	10	0,38±0,16 B
	M <sub>2</sub>	9	1,37±0,66 A	10	0,46±0,19 B
	M <sub>4</sub>	7	1,18±0,83	10	0,44±0,21
	M <sub>6</sub>	7	1,66±0,97	8	0,51±0,23
	M <sub>12</sub>	7	1,56±1,30	8	0,44±0,23
Bilirrubina indireta (mg/dL)	M <sub>0</sub>	10	0,64±0,49 A	10	0,15±0,13B
	M <sub>2</sub>	9	1,23±1,03 A	10	0,27±0,17 B
	M <sub>4</sub>	7	1,26±1,13 A	10	0,23±0,21 B
	M <sub>6</sub>	7	1,40±0,97A	8	0,26±0,25 B
	M <sub>12</sub>	7	1,32±1,07	8	0,16±0,11

<sup>A</sup> Medianas seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Mann–Whitney ( $p < 0,05$ )

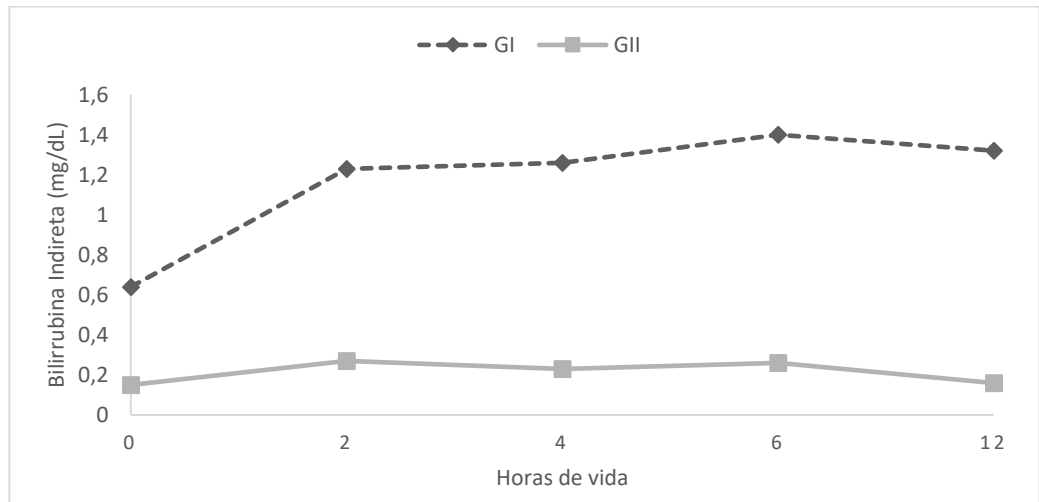
Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 20– Representação gráfica dos valores médios de bilirrubina total (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**



Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 21– Representação gráfica dos valores médios de bilirrubina indireta (mg/dL) de bezerras oriundas da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**



Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.3.4 Avaliação dos lipídeos

A análise dos resultados na tabela 14 mostra que os valores médios de triglicerídeos foram superiores no GI ao nascimento e às 6 horas de vida. No GI os valores mais baixos foram registrados ao nascimento, apresentando elevação com o passar do tempo. Contrariamente, os triglicerídeos aumentaram, no GII, após as duas primeiras horas de vida, sofrendo decréscimo no momento 6 horas (Gráfico 22 e 23).

Para o colesterol, o GI demonstrou valores médios superiores ao GII desde o nascimento até o período 6 horas. Nestes, os valores de lipídio foram os menores ao parto aumentando no momento subsequente, se mantendo constantes no restante do período experimental. O mesmo não ocorreu no GII onde os valores permaneceram constantes desde o nascimento até o fim do período de avaliação. No entanto, do nascimento até 6 horas de vida, os valores médios foram superiores para o GI.

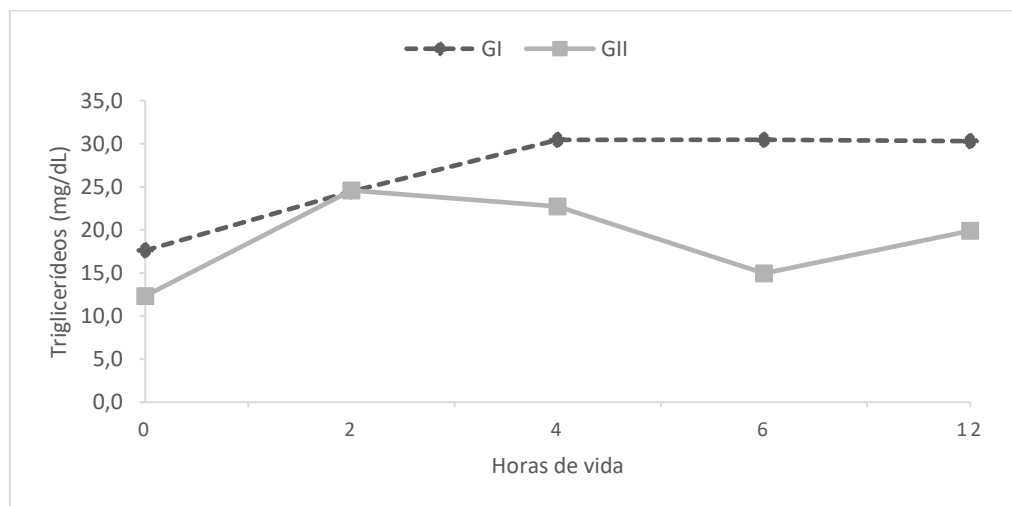
**Tabela 14– Média ( $\bar{x}$ ) e desvio-padrão (S) dos valores de triglicerídeos e colesterol bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e bezerros oriundos de fertilização *in vitro* (GII).**

Variável	Momento	Grupo ( $\bar{x} \pm S$ )			
		n	I	n	II
Triglicerídeos (mg/dL)	M <sub>0</sub>	10	17,61± 5,46 Ab	10	12,33± 3,70 Bc
	M <sub>2</sub>	9	24,46± 9,17 ab	10	24,58± 12,96 a
	M <sub>4</sub>	7	30,44± 12 a	10	22,72± 10,88 ab
	M <sub>6</sub>	7	30,46± 15,42 Aa	8	14,95± 5,57 Bbc
	M <sub>12</sub>	7	30,29± 16,87 a	8	19,91± 6,52 abc
Colesterol (mg/dL)	M <sub>0</sub>	10	28,17±14,18 Ab	10	16,78±8,38 B
	M <sub>2</sub>	9	35,85±20,93 Aa	10	19,59±7,67 B
	M <sub>4</sub>	7	39,05±19,68 Aa	10	16,48±9,09 B
	M <sub>6</sub>	7	38,10±19,07 Aa	8	20,09±8,25 B
	M <sub>12</sub>	7	38,54±18,64 a	8	20,69±14,10

<sup>Aa</sup> Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaborado pelo autor

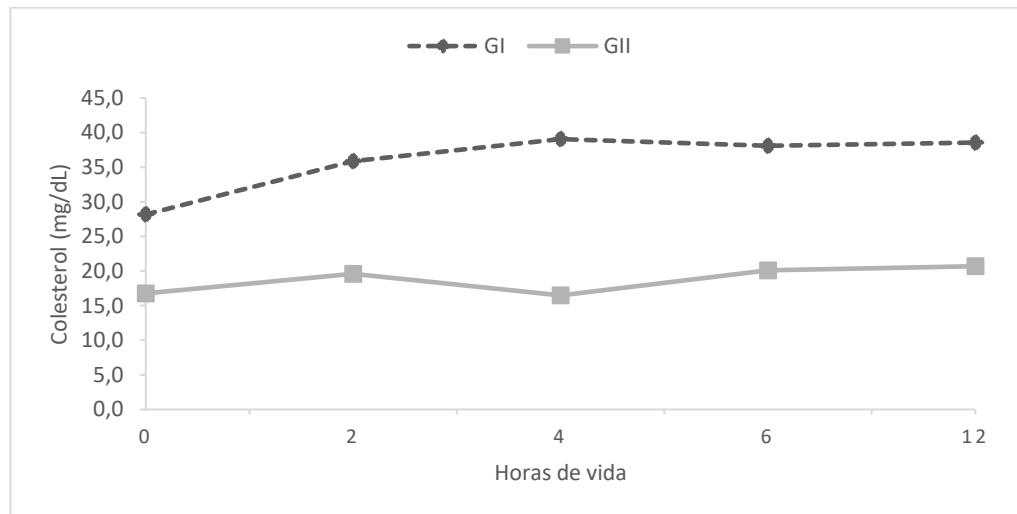
**Gráfico 22– Representação gráfica dos valores médios de triglicerídeos (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**



Fonte: Elaborado pelo autor



**Gráfico 23–** Representação gráfica dos valores médios de colesterol (mg/dL) de bezerras oriundas da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).



Fonte: Elaborado pelo autor

Os valores de triglicerídeos não apresentaram correlação com o peso dos animais ao nascimento nem na avaliação dos 20 animais em conjunto ( $r=0,037$ ;  $p=0,87$ ), nem nos grupos individualmente GI ( $r= 0,021$ ;  $p=0,686$ ) e GII ( $r=0,001$ ;  $p=0,917$ ). O mesmo ocorreu com os valores de colesterol na avaliação global ( $r=0,038$ ;  $p=0,794$ ), somente no GI ( $r= 0,095$ ;  $p=0,389$ ) e GII ( $r=0,223$ ;  $p=0,531$ ).

#### 4.3.5 Minerais e eletrólitos

Os resultados dos minerais avaliados no presente estudo estão demonstrados na tabela 15. Não foi observada diferença significativa entre os momentos de avaliação para ambos os grupos, com exceção do ferro no GII com os maiores valores médios ao nascimento, atingindo os menores teores às 6 horas de vida. Porém, somente o fósforo não apresentou diferença significativa entre os grupos avaliados para os diferentes momentos. Os valores médios de cálcio, cloreto, magnésio e o cálcio ionizado apresentaram diferença significativa entre os grupos a partir do nascimento, fato este observado para o ferro a partir das 4 horas de vida até o fim do período experimental.

Os valores séricos de cálcio ionizado, em ambos grupos, e de cálcio para o GI, estiveram superiores à referência para a espécie (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008). Tal fato também foi evidenciado para o magnésio. Os resultados séricos de

ferro no GII estiveram abaixo da referência para a espécie durante todo o período experimental. Já os teores de cloreto estiveram superiores à referência para a espécie no GI e inferiores no GII em todos os momentos avaliados (Gráficos 24 a 29).

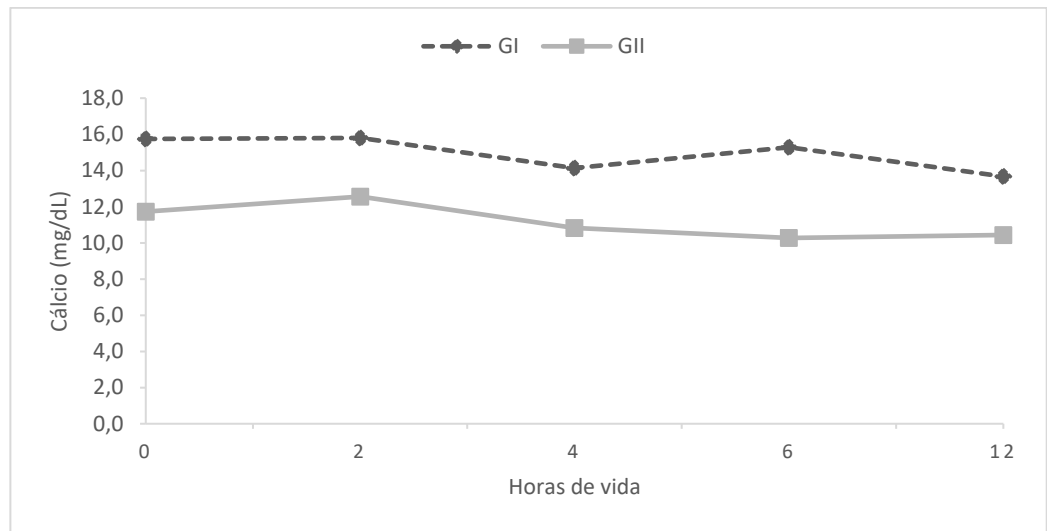
**Tabela 15– Média ( $\bar{x}$ ) e desvio-padrão (S) dos valores de cálcio, fósforo, cloreto, magnésio, ferro e cálcio ionizado de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**

Variável	Momento	Grupo ( $\bar{x} \pm S$ )			
		n	I	n	II
Cálcio (mg/dL)	M <sub>0</sub>	10	15,74±3,09 A	10	11,73±2,62 B
	M <sub>2</sub>	9	15,8±3,42 A	10	12,56±3,09 B
	M <sub>4</sub>	7	14,14±1,93 A	10	10,82±2,79 B
	M <sub>6</sub>	7	15,28±3,69 A	8	10,27±2,80 B
	M <sub>12</sub>	7	13,67±4,06	8	10,44±3,11
Fósforo (mg/dL)	M <sub>0</sub>	10	8,67±1,52	10	7,56±2,48
	M <sub>2</sub>	9	9,29±2,67	10	8,90±4,39
	M <sub>4</sub>	7	8,99±2,34	10	7,47±1,57
	M <sub>6</sub>	7	8,63±3,17	8	7,05±2,35
	M <sub>12</sub>	7	8,89±3,77	8	8,04±2,44
Cloreto (mEq/L)	M <sub>0</sub>	10	112,21±11,07 A	10	91,52±12,98 B
	M <sub>2</sub>	9	113,78±12,47 A	10	95,00±19,96 B
	M <sub>4</sub>	7	114,13±13,82	10	101,12±22,85
	M <sub>6</sub>	7	111,07±16,25 A	8	90,36±17,51 B
	M <sub>12</sub>	7	117,79±20,41	8	95,30±28,96
Magnésio (mg/dL)	M <sub>0</sub>	10	2,79±0,41 A	10	1,99±0,60 B
	M <sub>2</sub>	9	2,94±0,70 A	10	2,20±0,65 B
	M <sub>4</sub>	7	3,02±0,49 A	10	2,05±0,65 B
	M <sub>6</sub>	7	2,68±0,68	8	2,25±1,08
	M <sub>12</sub>	7	2,85±0,58	8	2,24±0,95
Ferro (µg/dL)	M <sub>0</sub>	10	64,72±33,24	10	53,71±14,53 a
	M <sub>2</sub>	9	77,10±45,35	10	52,60±16,24 a
	M <sub>4</sub>	7	79,66±43,92 A	10	43,52±15,00 Bab
	M <sub>6</sub>	7	66,83±28,88 A	8	38,56±15,73 Bb
	M <sub>12</sub>	7	80,60±44,14 A	8	33,43±19,23 Bb
Cálcio ionizado (mg/dL)	M <sub>0</sub>	10	10,64±1,95 A	10	8,18±1,76 B
	M <sub>2</sub>	9	10,39±2,04 A	10	8,42±1,86 B
	M <sub>4</sub>	7	9,30±1,32	10	7,72±2,09
	M <sub>6</sub>	7	9,96±2,40 A	8	7,02±1,98 B
	M <sub>12</sub>	7	8,93±2,56	8	7,39±2,20

<sup>Aa</sup> Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

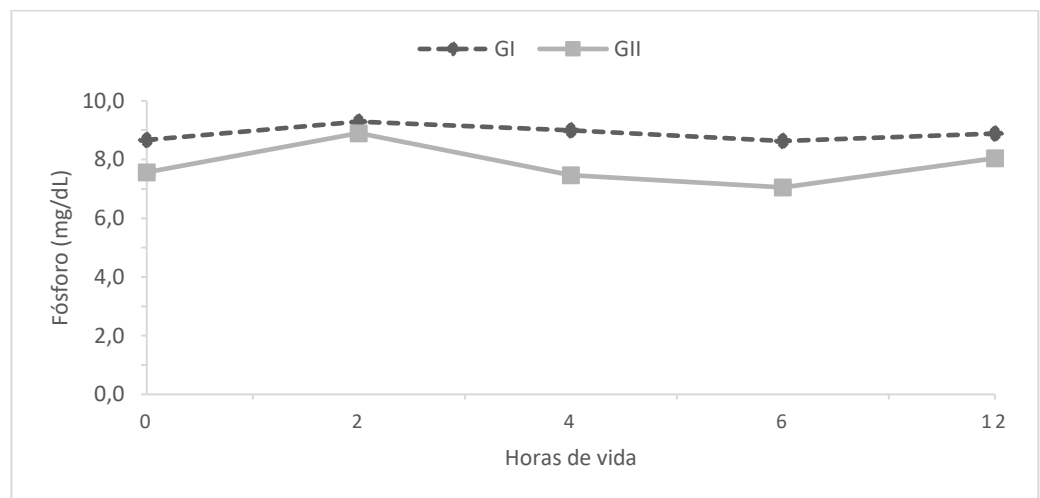
Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 24– Representação gráfica dos valores médios de cálcio (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**



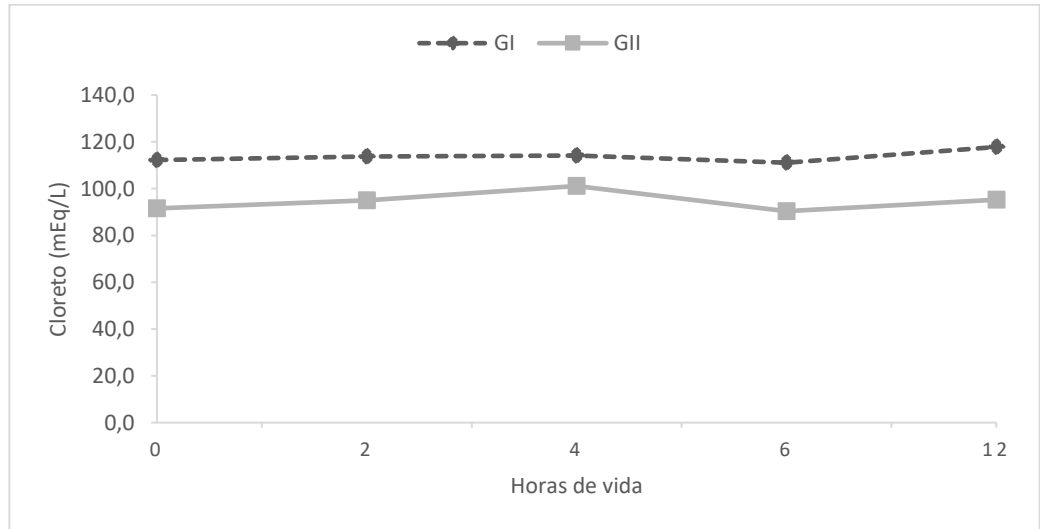
Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 25– Representação gráfica dos valores médios de fósforo (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**



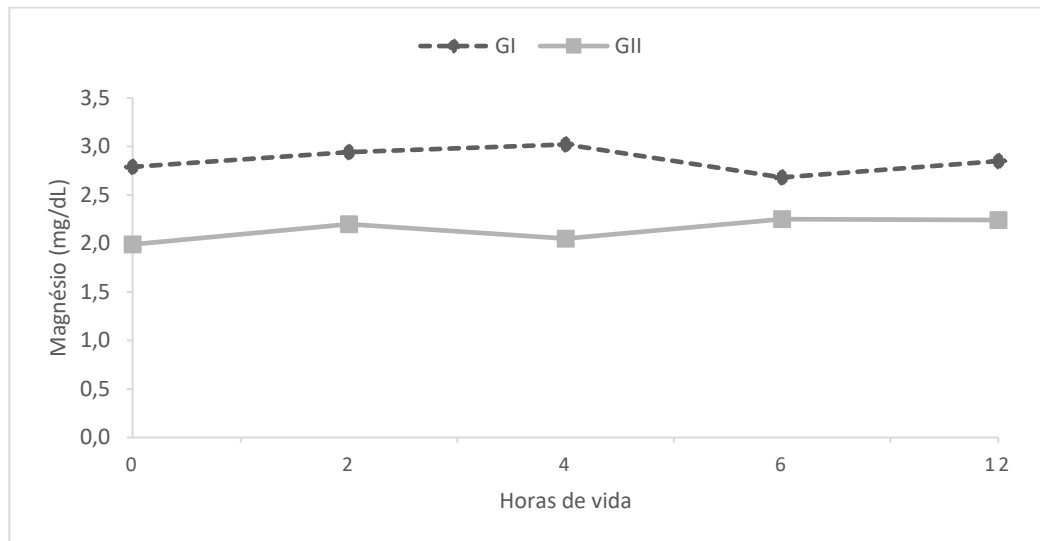
Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 26–** Representação gráfica dos valores médios de cloreto (mEq/L) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).



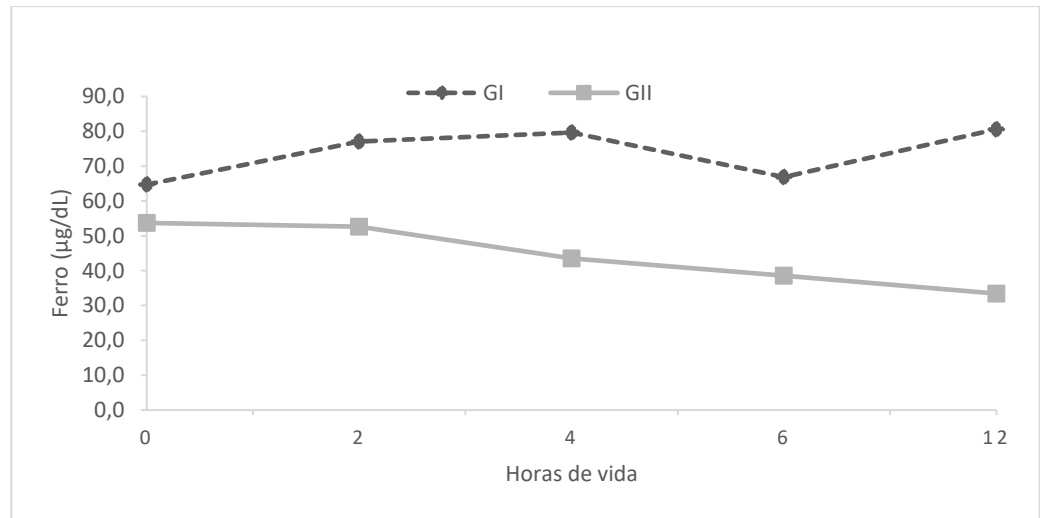
Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 27–** Representação gráfica dos valores médios de magnésio (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).



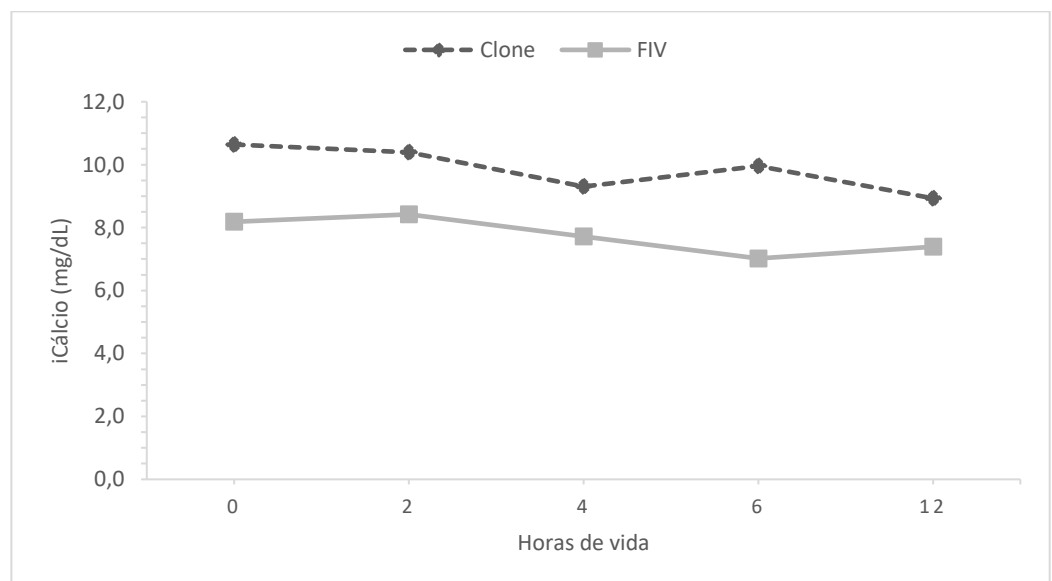
Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 28–** Representação gráfica dos valores médios de ferro ( $\mu\text{g/dL}$ ) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).



Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 29–** Representação gráfica dos valores médios de cálcio ionizado ( $\text{mg/dL}$ ) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).



Fonte: Elaborado pelo autor

A razão cálcio/fósforo foi avaliada sem apresentar diferença entre os grupos e momentos ao longo de todo o período experimental (Tabela 16).

**Tabela 16– Média ( $\bar{x}$ ) e desvio–padrão (S) da relação cálcio/fósforo de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**

Variável	Momento	Grupo ( $\bar{x} \pm S$ )			
		n	I	n	II
Ca/P	M <sub>0</sub>	10	1,83±0,35	10	1,66±0,53
	M <sub>2</sub>	9	1,75±0,32	10	1,79±1,12
	M <sub>4</sub>	7	1,63±0,30	10	1,45±0,29
	M <sub>6</sub>	7	1,87±0,40	8	1,51±0,41
	M <sub>12</sub>	7	1,67±0,66	8	1,35±0,39

<sup>Aa</sup> Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.3.6 Avaliação do lactato

Os valores de referência para lactato em bovinos adultos é de 0,55 a 2,22 mmol/L (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008). Desta forma, todos os animais avaliados apresentaram ao longo de todo o período experimental teores plasmáticos superiores aos limites fisiológicos para a espécie. No entanto, às 2 horas os valores medianos foram significativamente maiores para o GI e se mantiveram assim até o final do período experimental, sendo que no referido momento estes eram 4 vezes superiores em comparação aos do GII (tabela 17 e gráfico 30).

Nos 20 bezerros avaliados neste experimento denotou-se correlação negativa ( $r=-0,5132$ ;  $p=0,024$ ) entre o escore de APGAR e concentrações plasmáticas de lactato, imediatamente após o parto. Correlacionando-se as variáveis supracitadas não foi constatada diferença significativa na avaliação específica de cada grupo nem no GI ( $r=-0,643$ ;  $p=0,066$ ) e GII ( $r=-0,166$ ;  $p=0,632$ ).

No tocante à correlação do peso vivo com os valores plasmáticos de lactato ao nascimento, tanto o GI ( $r=-0,510$ ;  $p=0,1618$ ), quanto o GII ( $r=-0,06$ ;  $p=0,865$ ) não apresentaram diferença significativa.

No que concerne à correlação entre os valores plasmáticos de lactato e a presença de mecônio ao nascimento também não foram denotadas diferenças significativas no GI ( $r=-0,111$ ;  $p=0,774$ ) nem no GII ( $r=-0,174$ ;  $p=0,632$ ).

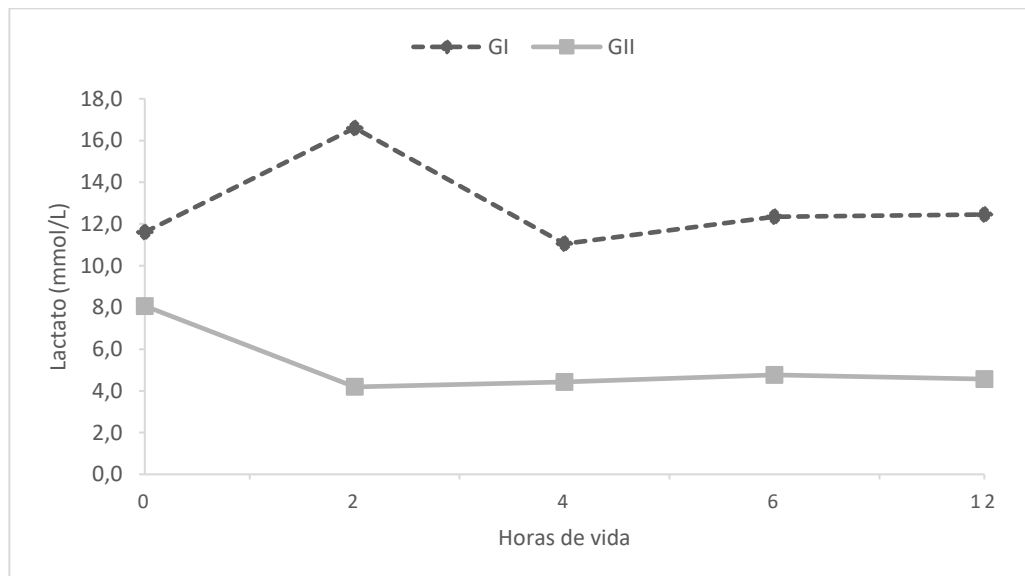
**Tabela 17– Mediana (Md), mínimo (min) e máximo (máx) dos valores de lactato de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**

Variável	Momento	Grupo					
		I			II		
		n	Md	Mín-Máx	n	Md	Min - Máx
Lactato (mmol/L)	M <sub>0</sub>	10	11,6	6–16,9	10	8,07	3,30–18,80
	M <sub>2</sub>	9	16,6 A	6–21,70	10	4,19 B	3,04–20,0
	M <sub>4</sub>	7	11,05 A	5,6–18,30	10	4,43 B	3,24–8,80
	M <sub>6</sub>	7	12,35 A	8,2–15,5	8	4,77 B	3,18–10,0
	M <sub>12</sub>	7	12,45 A	4,2–20,0	8	4,56 B	2,40–10,50

<sup>A</sup> Medianas seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney ( $p<0,05$ )

Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 30– Representação gráfica dos valores medianos de lactato (mmol/L) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**



Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.3.7 Avaliação da glicose

No que diz respeito à glicose, os resultados medianos diferiram significativamente, somente, ao nascimento, sendo estes maiores no GII (tabela 18 e gráfico 31). Os valores plasmáticos de glicose para bezerros lactentes é de 80–120mg/dL (SWENSON; REECE, 1996). Considera-se a necessidade de intervenção quando a glicemia atinge valores plasmáticos inferiores a 50mg/dL (BIRGEL JÚNIOR, 2011b). Este fato foi constatado em todos (10/10) os animais do GI e em 60% (6/10) dos animais do GII, logo após o nascimento, havendo diferença significativa entre os grupos para o referido período. Correlacionando-se o peso vivo com os valores plasmáticos de glicose ao nascimento não foi constatada diferença significativa no GI ( $r=-0,531$ ;  $p=0,113$ ), nem no GII ( $r=-0,406$ ;  $p=0,247$ ).

**Tabela 18– Mediana (Md), mínimo (min) e máximo (máx) dos valores de glicose de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**

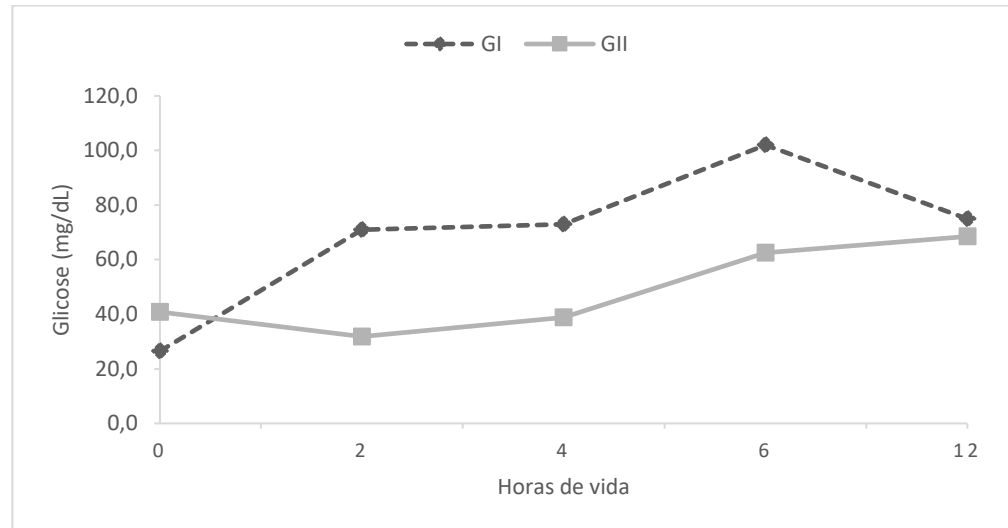
Variável	Momento	Grupo					
		I			II		
		n	Md	Min – Máx	n	Md	Min – Máx
Glicose (mg/dL)	M <sub>0</sub>	10	26,5 B	20–50	10	40,88 A	30,0–104
	M <sub>2</sub>	9	71	20–255	10	31,82	20,0–150,0
	M <sub>4</sub>	7	73	44–255	10	38,8	20,0–197,0
	M <sub>6</sub>	7	102	54–283	8	62,5	24,44–239
	M <sub>12</sub>	7	75	49–178	8	68,5	38,50–286,00

<sup>A</sup> Medianas seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Mann–Whitney ( $p<0,05$ )

Fonte: Elaborado pelo autor



**Gráfico 31– Representação gráfica dos valores medianos de glicose (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**



Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.4 Fracionamento eletroforético das proteínas do soro sanguíneo

O eletroforetograma das proteínas do soro sanguíneo permitiu a identificação de até 29 frações proteicas. Deste total, sete foram consideradas e tiveram suas concentrações mensuradas, a saber: imunoglobulina A (IgA), ceruloplasmina, transferrina, albumina, imunoglobulina G total (IgG),  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida e haptoglobina (Hp). Os valores médios e medianos, estão representados nas tabelas 19 e 20 e gráficos 32 a 38.

Em comparação aos grupos, os valores médios de IgA foram superiores no GII nos momentos 6 e 12 horas. Além disso, este grupo apresentou teores inferiores ao nascimento com aumento gradual ao longo do período experimental até às 12 horas de vida. Para o GI os valores médios foram similares ao longo de todo o período experimental.

Os resultados médios de ceruloplasmina não diferiram significativamente entre os grupos avaliados e nem entre os diferentes momentos para o GI. No entanto, o GII apresentou diferença entre os valores médios ao longo dos momentos de avaliação denotando-se serem menores logo após o nascimento. Para os teores médios de

transferrina, albumina e  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida não foi observada diferença significativa entre os grupos nem entre os momentos de avaliação.

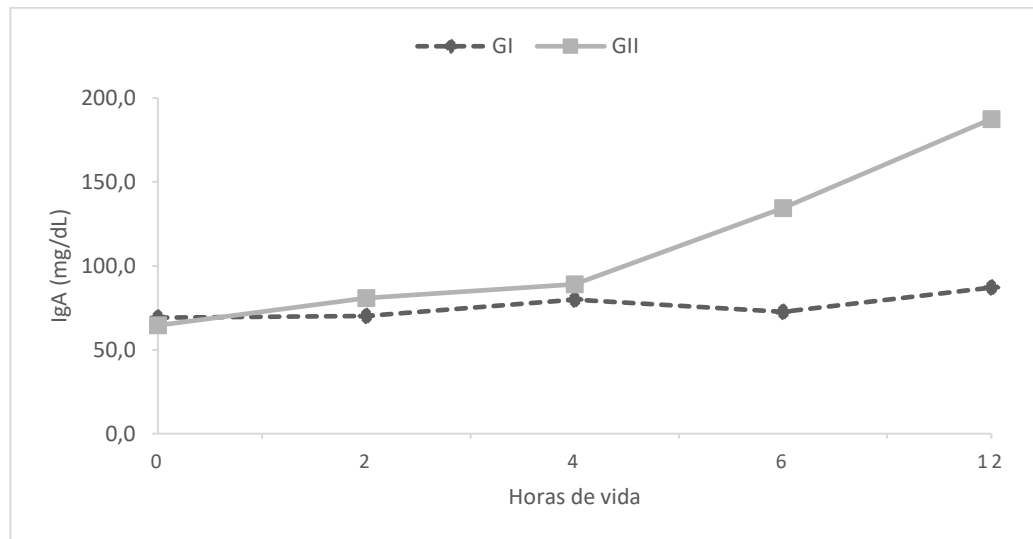
**Tabela 19– Média ( $\bar{x}$ ) e desvio-padrão (S) dos valores de Imunoglobulina A (IgA), ceruloplasmina, transferrina, albumina e  $\alpha_1$  glicoproteína ácida de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**

Variável	Momento	Grupo ( $\bar{x} \pm S$ )			
		n	I	N	II
IgA (mg/dL)	M <sub>0</sub>	10	69,17± 17,55	10	64,55± 21,46 c
	M <sub>2</sub>	9	70,17±20,46	10	80,77± 42,52 c
	M <sub>4</sub>	7	79,83± 21,92	10	88,97± 27,61 c
	M <sub>6</sub>	7	72,71± 18,14 B	8	134,48± 39,82 Ab
	M <sub>12</sub>	7	87,07±31,27 B	8	187,54± 70,70 Aa
Ceruloplasmina (mg/dL)	M <sub>0</sub>	10	18,60± 5,63	10	15,47± 2,90 b
	M <sub>2</sub>	9	19,60±5,48	10	17,90± 3,86 ab
	M <sub>4</sub>	7	20,91± 7,41	10	14,29± 5,26 b
	M <sub>6</sub>	7	20,17± 6,30	8	19,51± 4,78 ab
	M <sub>12</sub>	7	17,07±6,71	8	21,06± 4,40 a
Transferrina (mg/dL)	M <sub>0</sub>	10	206,73± 52,55	10	251,76± 61,93
	M <sub>2</sub>	9	229,02±74,14	10	251,31± 81,81
	M <sub>4</sub>	7	268,46± 49,39	10	210,02± 80,94
	M <sub>6</sub>	7	263,46± 50,38	8	229,82±52,35
	M <sub>12</sub>	7	262,59±38,22	8	222,01±70,25
Albumina (mg/dL)	M <sub>0</sub>	10	2970,47± 670,03	10	3008,74±536,27
	M <sub>2</sub>	9	3262,96±553,12	10	3348,97±774,26
	M <sub>4</sub>	7	3302,18± 265,08	10	2882,26±711,24
	M <sub>6</sub>	7	3208,66±431,19	8	3416,76±595,13
	M <sub>12</sub>	7	3297,09±432,95	8	3212,84±583,80
$\alpha_1$ - glicoproteína ácida (mg/dL)	M <sub>0</sub>	10	5,39±3,35	10	9,08±5,68
	M <sub>2</sub>	9	7,70±3,55	10	10,06±6,13
	M <sub>4</sub>	7	7,97±3,65	10	9,05±5,13
	M <sub>6</sub>	7	8,32±4,33	8	11,03±4,58
	M <sub>12</sub>	7	6,98±4,64	8	11,35±4,07

<sup>Aa</sup> Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

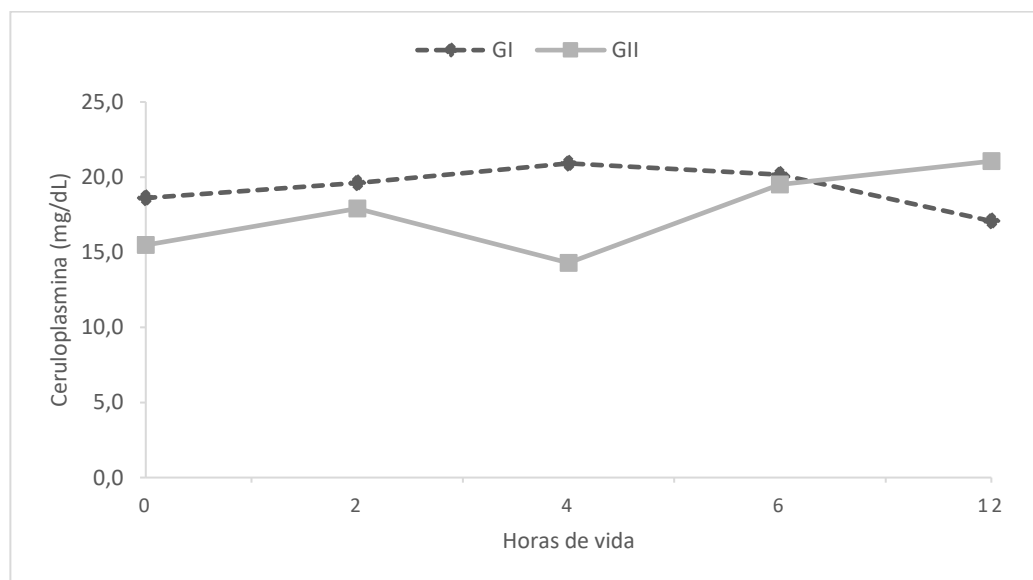
Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 32–** Representação gráfica dos valores médios de imunoglobulina A (IgA) (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).



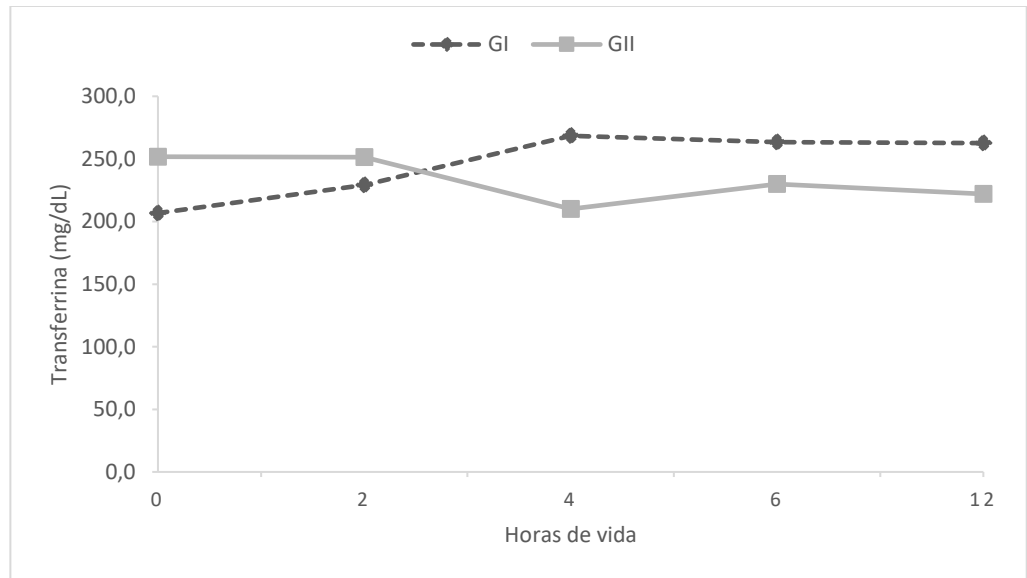
Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 33–** Representação gráfica dos valores médios de ceruloplasmina (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).



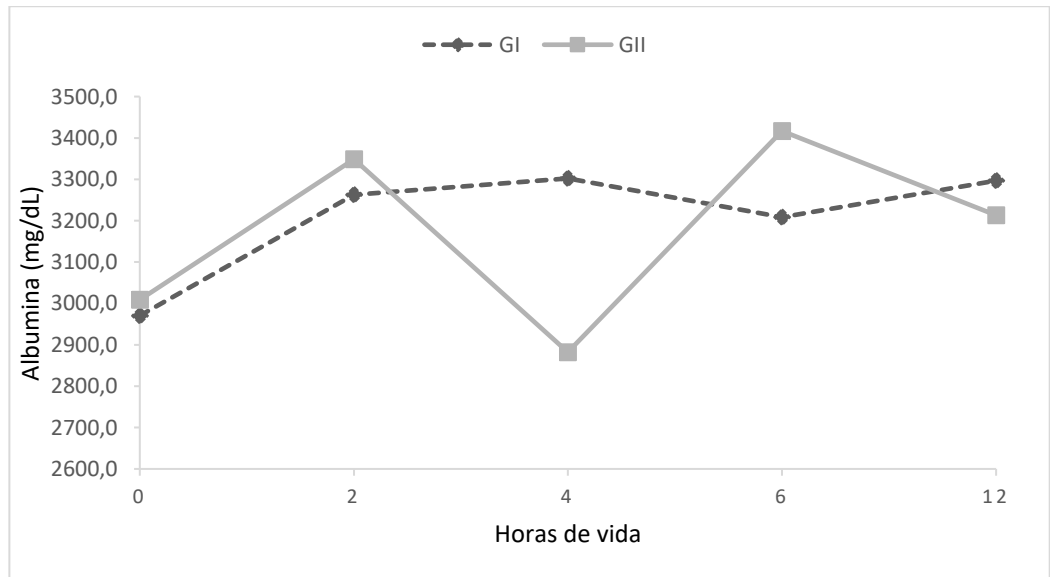
Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 34–** Representação gráfica dos valores médios de transferrina (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).



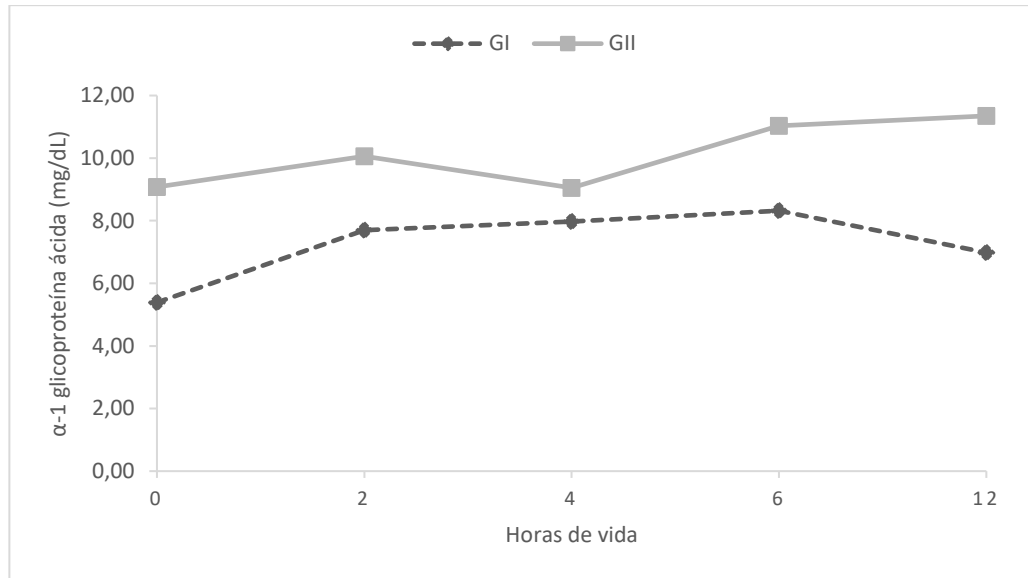
Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 35–** Representação gráfica dos valores médios de albumina (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).



Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 36– Representação gráfica dos valores médios de  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII)**



Fonte: Elaborado pelo autor

Os valores medianos de IgG se mantiveram constantes desde o nascimento até às 12 horas de vida em ambos grupos. No entanto, os valores foram maiores no GII em comparação com o GI às 6 e 12 horas de vida da mesma maneira à outra imunoglobulina avaliada neste experimento. Por outro lado, os valores medianos de Hp se mantiveram constantes entre os grupos e momentos de avaliação.

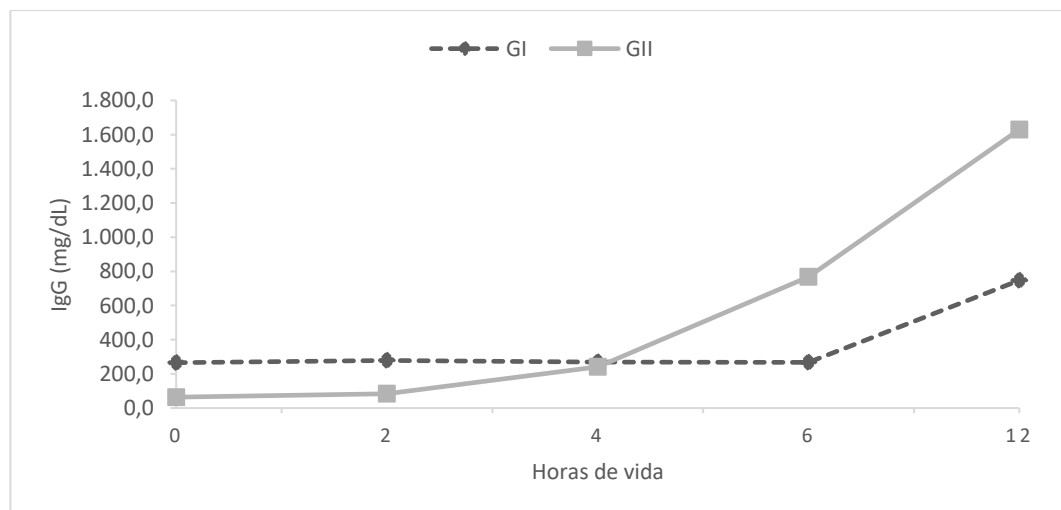
**Tabela 20– Mediana (Md), mínimo (min) e máximo (máx) dos valores de imunoglobulina G (IgG) e haptoglobina (Hp) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**

Variável	Momento	Grupo					
		I			II		
		n	Md	Min – Máx	N	Md	Min – Máx
IgG (mg/dL)	M <sub>0</sub>	10	265,55	15,15–550,89	10	63,92	33,67–605,84
	M <sub>2</sub>	9	277,84	32,34–673,90	10	83,91	35,98–595,76
	M <sub>4</sub>	7	269,86	46,62–706,92	10	241,08	38,20–724,94
	M <sub>6</sub>	7	267,57 B	51,63–674,23	8	767,82 A	69,41–1118,74
	M <sub>12</sub>	7	747,32 B	63,55–1346,90	8	1630 A	173,24–3055,92
Hp (mg/dL)	M <sub>0</sub>	10	12,26	4,22–29,45	10	10,26	5,41–20,22
	M <sub>2</sub>	9	13,09	6,76–32,84	10	12,81	5,69–22,44
	M <sub>4</sub>	7	16,08	9,58–37,71	10	9,94	4,43–27,75
	M <sub>6</sub>	7	15,98	10,54–18,35	8	16,67	8,09–26,24
	M <sub>12</sub>	7	14,36	7,59–30,19	8	21,04	6,24–66,98

<sup>A</sup> Medianas seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Mann Whitney

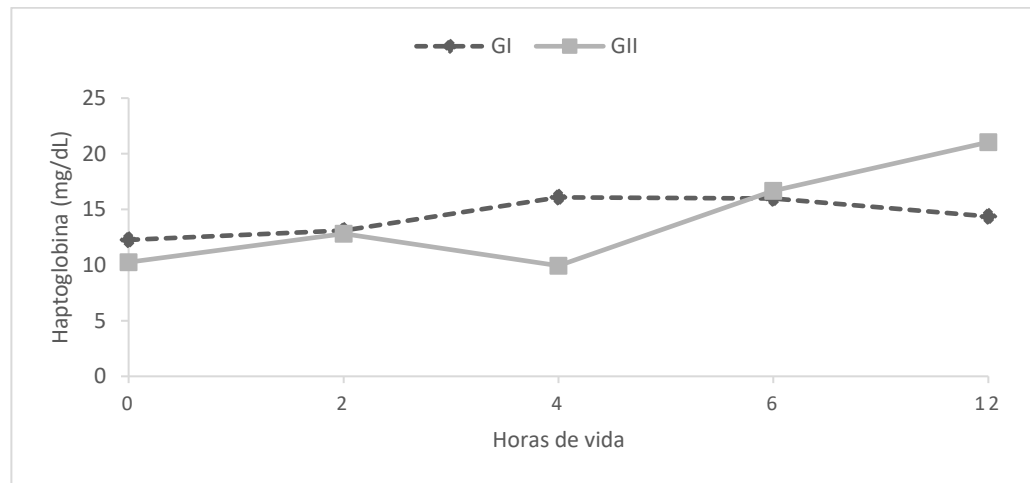
Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 37– Mediana (Md), mínimo (min) e máximo (máx) dos valores de imunoglobulina G (IgG) e haptoglobina (Hp) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**



Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 38– Representação gráfica dos valores medianos de haptoglobina (mg/dL) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).**



Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.5 Avaliação hormonal

Os valores medianos da concentração de insulina estão dispostos na tabela 21. A avaliação em três momentos distintos permitiu a constatação de maiores concentrações de medianas no GII logo após o nascimento e no momento subsequente em comparação ao GI. Entretanto, não foi observada diferença significativa nos grupos ao longo do período de avaliação. A correlação entre o peso vivo e a concentração plasmática de insulina não se mostrou significativa no GI ao nascimento ( $r=-0,078$ ;  $p=0,838$ ) nem às 2 horas de vida ( $r=-0,416$ ;  $p=0,269$ ). No entanto, para o GII houve correlação positiva e significativa entre tais variáveis ao nascimento ( $r=0,785$ ;  $p=0,0279$ ).

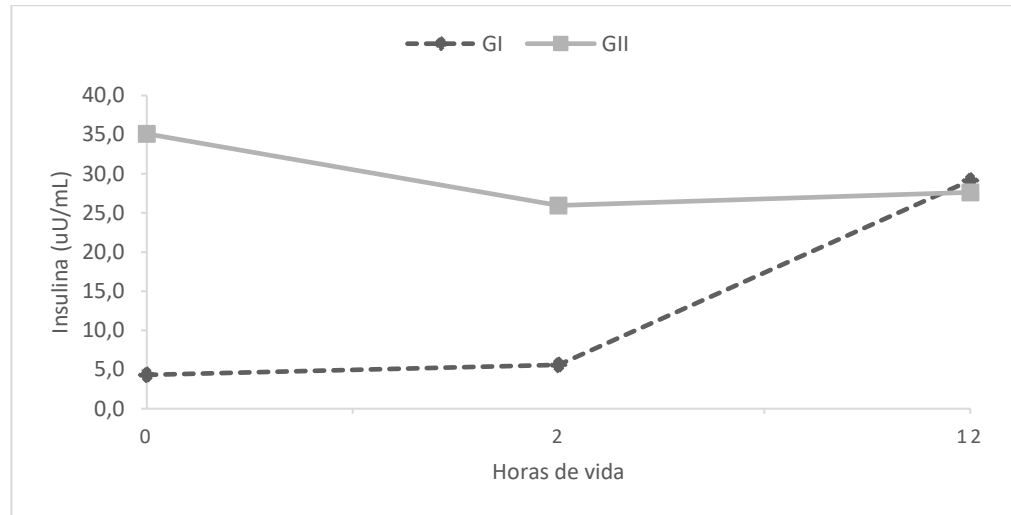
**Tabela 21– Mediana (Md), mínimo (min) e máximo (máx) dos valores de Insulina de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e bezerros oriundos de fertilização *in vitro* (GII).**

Variável	Momento	Grupo					
		I			II		
		N	Md	Min – Máx	n	Md	Min – Máx
Insulina ( $\mu\text{u/mL}$ )	$M_0$	10	4,32 B	2,21–40,13	10	35,11 A	4,05–90,61
	$M_2$	9	5,6 B	2,81–17,76	10	25,96 A	3,37–41,98
	$M_{12}$	6	29,15	16,85– 90,32	8	27,64	8,74–93,78

<sup>A</sup> Medianas seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney ( $p<0,05$ )

Fonte: Elaborado pelo autor

**Gráfico 39–** Representação gráfica dos valores medianos de insulina ( $\mu\text{u/mL}$ ) de bezerros oriundos da técnica de clonagem (GI) e de fertilização *in vitro* (GII).



Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.6 Achados de necropsia

A mortalidade atingiu 90% (9/10) dos bezerros do GI e 20% (2/10) dos bezerros do GII durante o período neonatal. Três animais do GI vieram a óbito durante o período experimental. Todos apresentaram algum tipo de distúrbio clínico–patológico durante o período em que sobreviveram. Em adição ao exame físico e complementar, foram realizados os procedimentos de necropsia, a fim de esclarecer as possíveis causas de óbito. Os principais achados macro e microscópicos observados estão dispostos como se segue.

Todos os animais oriundos de FIV que vieram a óbito, independentemente do tempo de sobrevivência, apresentaram derrame cavitário abdominal em quantidade considerável. Em um animal o aspecto era sanguinolento com volume próximo a 2 litros, havendo coágulos, o que permitiu concluir tratar-se também de hemoperitônio. No GI 33,3% (3/9) apresentaram, derrame cavitário, em um deles com característica de hemoperitônio. Um bezerro clone apresentou efusão peritoneal compatível com peritonite severa.

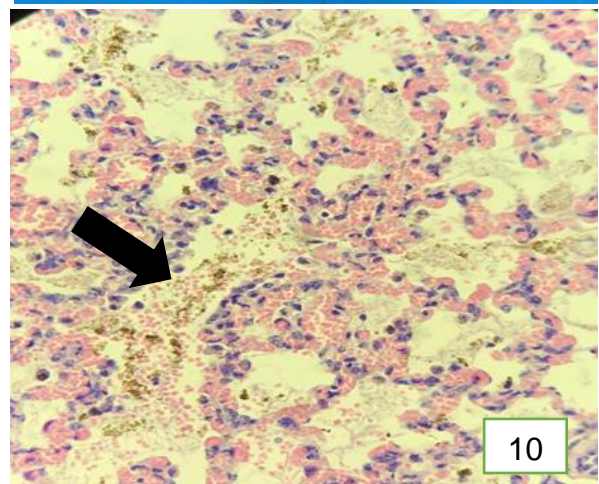
Na cavidade torácica, à semelhança da abdominal, foi observada efusão serosanguinolenta de volume discreto a moderado em 22,2% dos animais clonados



(2/9). Nos dois bezerros do GII que vieram a óbito também houve a identificação de efusão torácica com o mesmo aspecto daquela dos bezerros clonados (Figura 5). As principais alterações macroscópicas observadas nos órgãos da cavidade torácica à necropsopia acometeram os pulmões e o coração. No coração foram observadas alterações significativas em 88,9% (8/9) dos animais do GI. A hipertrofia cardíaca foi observada em 37,5% (3/8) (Figura 6). Em 50% (4/8) dos animais constatou-se cardiomegalia variável com coração aumentado de volume e de aspecto globoso (Figura 7). Destes, 37,5% (3/8) apresentaram hemorragias sob forma de petéquias e sufusões na região subepicárdica. A observação de cisto hemático na válvula tricúspide foi denotada em somente um animal. A persistência do forame oval foi denotada em todos os animais do GI e GII, uma vez que os mesmos vieram a óbito entre 2 e 48 horas de vida. A presença de líquido no saco pericárdico caracterizando hidropericárdio 33,3% (3/9) dos animais clonados.

Alterações nos pulmões e traqueia estiveram presentes em quase a totalidade dos animais necropsiados, embora cada um destes apresentasse particularidades relacionadas a localização e extensão. As patologias pulmonares acometeram 77,7% (7/9) dos animais do GI. O edema pulmonar e a atelectasia foram observadas, respectivamente, em 42,8 % (3/7) e em 28,5% (2/7), dos animais do GI em especial nos lobos pulmonares caudais, sendo estas as principais alterações macroscópicas evidenciadas (Figura 8). As modificações de natureza congestiva difusa, de intensidade variável, por vezes associadas à hemorragias multifocais estiveram presentes em 28,5 % (2/7) dos animais avaliados. O enfisema pulmonar foi denotado em somente um animal (1/7) e se apresentou com distribuição e intensidade variável. Apenas um (1/7) dos animais avaliados do GI foi detectado hemorragia da mucosa da traqueia, havendo, nos demais, conteúdo líquido espumoso quando o edema pulmonar era acentuado. As alterações macroscópicas significativas aos pulmões foram caracterizadas somente em um animal do GII (1/2), representada por edema e congestão difusa do parênquima (Figura 9).

Os dados revelaram que 66,7% (6/9) dos animais do GI necropsiados nasceram tingidos de mecônio destes, 83,3% (5/6) apresentavam atelectasia e edema pulmonar associados à presença de mecônio nos brônquios e alvéolos ao exame microscópico (figura 10).



**Figura 5– GI – Efusão torácica serosanguinolenta discreta. Atelectasia pulmonar e palidez das vísceras**

**Figura 6– GI – Hipertrofia cardíaca congênita**

**Figura 7– GI – Coração dilatado e com aspecto globoso**

**Figura 8– Atelectasia bilateral dos lobos pulmonares caudais.**

**Figura 9– GI – Presença de áreas com edema e congestão pulmonar**

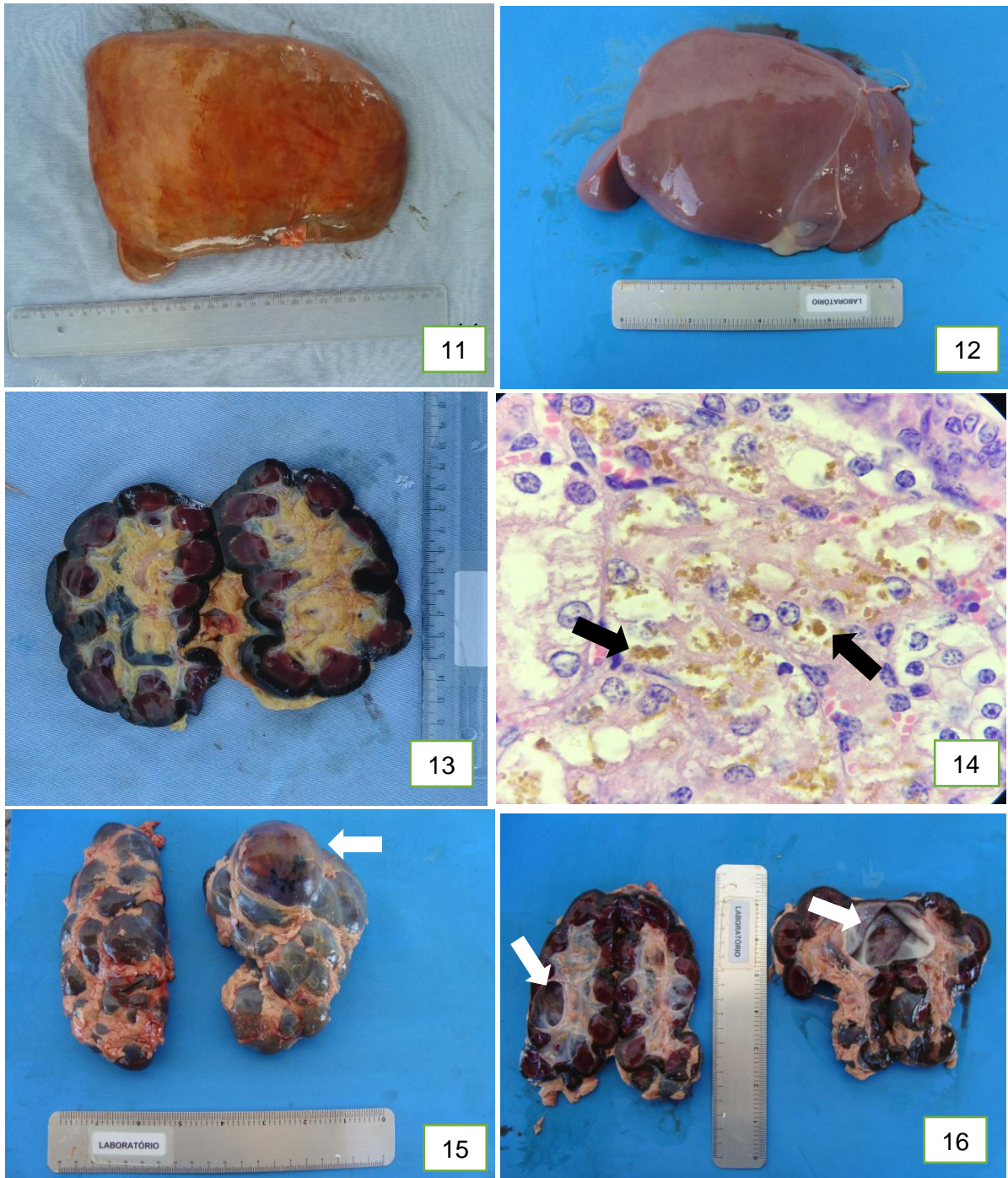
**Figura 10– GII – Corte histológico de pulmão. Presença de mecônio no interior de bronquíolo e alvéolos (seta).**

As patologias hepáticas estiveram presentes em todos os bezerros do GI e GII que vieram a óbito, apresentando-se de forma variada. Os bezerros clonados 33,3% (3/9) tinham fibrose da cápsula hepática e congestão difusa moderada a acentuada, alterando a consistência do órgão para firme à palpação. Em 22,2% (2/9) dos animais, o fígado apresentava hepatomegalia e com bordos arredondados. À inspeção foi observado que 77,8% (7/9) dos animais possuíam alteração da coloração do parênquima hepático, variando de acastanhada ao ocre e por vezes amarelada (Figura 11). A hepatomegalia foi o achado mais comum nos bezerros do GII (Figura 12).

O exame macroscópico do baço nos bezerros clonados submetidos à necropsia apresentou modificações em 44,4% (4/9). A esplenomegalia foi identificada em 50% (2/4) dos animais avaliados. Outras alterações localizadas na cápsula, como espessamento, hemorragias e sufusões foram os principais achados no órgão.

Alterações renais foram identificadas em 66,7 % (6/9) dos animais do GI necropsiados. Ao exame macroscópico, 75 % (4/6) demonstraram, ao corte, região cortical de coloração castanho-escuro e a região medular de coloração avermelhada (Figura 13), sugestivas de deposição de pigmento do metabolismo da hemoglobina associado a graus variados de congestão, como observado no exame microscópico neste órgão (Figura 14). Malformações renais, com morfologia macroscópica de hipoplasia bilateral, bem como formações císticas comprometendo toda extensão do parênquima do órgão (Figura 15), estiveram presentes em 50% (3/6) desses animais. As modificações renais foram identificadas em somente um dos dois bezerros do GII necropsiados, traduzidas por alterações de coloração da região cortical e medular semelhantes àquelas observadas nos bezerros clonados.

Mudanças nos segmentos intestinais foram evidenciadas em 44,4% (4/9) dos animais do GI necropsiados, embora cada um destes apresentasse peculiaridades distintas no que concerne à característica e localização das lesões. Em 75% (3/4) destes animais apresentavam alças do intestino delgado hiperêmicas e, por vezes, de aspecto hemorrágico com ampla distribuição na parede do órgão. Em 50 % (2/4) destes animais o ceco se apresentava distendido por gás, evidenciando congestão e hemorragia da parede na região do ápice. O intestino grosso esteve acometido em 50% (2/4) dos animais necropsiados havendo petéquias e sufusões de extensão variada na parede do órgão e hemorragia na serosa. No GII não foram denotadas alterações específicas no intestino.



**Figura 11– GI – Parênquima hepático de coloração amarelada (ocre).**

**Figura 12– GII – Hepatomegalia, note os bordos do órgão arredondados.**

**Figura 13– GI – Ao corte, córtex renal com coloração castanho escura e medula renal com coloração avermelhada.**

**Figura 14– Corte histológico de rim. Deposição de pigmento biliar nas células tubulares em quantidade acentuada (seta).**

**Figura 15– Presença de cistos renais no rim esquerdo.**

**Figura 16– Rim ao corte. Presença de cistos renais interno nos rins direito e esquerdo (seta).**

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo teve por finalidade avaliar os índices de morbimortalidade dos bezerros oriundos TNCS durante os primeiros 30 dias de vida, desafio que não foi cumprido, infelizmente, em decorrência da mortalidade de 90% dos animais durante as primeiras 48 horas de vida. Este índice foi superior às observações de Komninou (2008). Segundo este autor, a taxa de mortalidade para bezerros nelore oriundos da TNCS entre 24 e 48 horas de vida pode atingir até 47% dos recém-nascidos, devido a distúrbios da adaptação neonatal de origem metabólica e fisiológica, por exemplo.

Quadros de sofrimento perinatal têm sido relatados em animais oriundos das biotécnicas da reprodução, como fertilização *in vitro* e clonagem (POGLIANI, 2010; BIRGEL JÚNIOR, 2011a). Apesar dos esforços no atendimento imediato e cuidados intensivos realizados a fim de se diagnosticar qualquer indício de alteração nos animais utilizados no presente estudo, a mortalidade mostrou-se elevada.

À inspeção dos animais logo após o parto, além das malformações dos membros, o peso acima da média foi constatado em ambos grupos, sobretudo no GI. A placentação anômala, o tipo de célula doadora do núcleo e a incompleta reprogramação epigenética nuclear, foram, provavelmente, responsáveis por possíveis alterações congênitas e produção de bezerros excessivamente pesados (CHAVATTE-PALMER et al., 2012). Nesta pesquisa, a célula utilizada foi o fibroblasto, gerando 50% (5/10) de animais acima do peso para a raça. Os resultados aqui apresentados concordam com os achados de Kato et al. (2000) que denotaram incidência semelhante de macrossomia em de animais clonados oriundos desta mesma linhagem celular.

Segundo Garry et al. (1996) animais clonados com peso excessivo ao nascimento apresentam hiperinsulinemia. No GI 40% (4/10), os animais nasceram com valores plasmáticos de insulina superiores aos referenciados para a espécie (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008), e somente dois possuíam macrossomia. Valores plasmáticos medianos condizentes com hiperinsulinemia ocorreram às 2 horas de vida, manifestados por 50% (5/10) dos bezerros, sendo que somente dois tinham peso médio acima da referência. Estes valores, no referido período, não demonstraram correlação significativa com o peso ( $p > 0,05$ ), discordando, assim, de Garry et al. (1996). A hiperinsulinemia foi constatada em todos os bezerros do GII ao nascimento

denotando correlação positiva significativa ( $p < 0,05$ ) com o peso. No entanto, somente um animal apresentou peso excessivo ao nascimento.

A insulina começa a atuar no organismo animal ainda na vida intrauterina. Sua atividade primordial é o transporte de glicose para as células como fonte energética. Após o rompimento do cordão umbilical a transferência da glicose materna cessa abruptamente. Desta forma, espera-se, que, imediatamente após o nascimento, os valores plasmáticos deste carboidrato estejam diminuídos (GARRY et al., 1996; BIRGEL JÚNIOR et al., 2011b). Este fato foi constatado logo após o nascimento em ambos grupos. Além disto, a placenta de bezerras clonadas utiliza de 60 a 75% da glicose proveniente da circulação uterina (CHAVATTE-PALMER et al., 2012), o que pode ter contribuído para menor concentração plasmática de glicose no GI ao nascimento.

Em virtude de 85,7% (6/7) dos animais do GI terem recebido o colostro via sonda esofágica, optou-se, nestes, em avaliar a glicemia por meio de glicosímetro portátil a partir das 5 horas de vida após a colostragem (dados não apresentados). Desta forma, a concentração de glicose nestes animais estava inferior a 50mg/dL, realizando-se, portanto, a infusão de glicose por via intravenosa. É possível que tal procedimento realizado a partir de 6 horas tenha possibilitado a mensuração de valores medianos dentro da normalidade no referido grupo. Ademais, apesar de o mesmo procedimento não ter sido realizado no GII, observou-se que 6 dos 8 animais se mantiveram em hipoglicemia, mesmo após a ingestão do colostro. Esses resultados atestam que 80% dos animais avaliados (12/15) foram incapazes de manter teores plasmáticos de glicose dentro da normalidade a partir da ingestão do colostro. Uma razão plausível poderia ser a hiperinsulinemia. A elevação das concentrações plasmáticas conduz maciçamente a glicose para o interior das células diminuindo sua disponibilidade na corrente circulatória (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

A hipoglicemia ao nascimento também pode ser resultado da asfixia perinatal, devido à rápida depleção das reservas de glicogênio e instauração da glicólise anaeróbica, produzindo elevadas concentrações de lactato (ZACONETA, 2004). A hiperlactemia é condição normal nos recém-nascidos em virtude da hipóxia transitória. No entanto, com o passar das horas, ocorre adaptação do animal ao ambiente extrauterino, e normalização das concentrações plasmáticas de lactato (LISBOA et al., 2002). Em casos de hipóxia persistente, há maior produção deste,

tornando-se marcador do equilíbrio ácido-base e preditor da perspectiva de vida neonatal (BORRUTO et al., 2006). A hiperlactemia foi denotada em ambos os grupos ao longo do período experimental; contudo, as concentrações foram maiores no GI desde a segunda hora de vida até o fim do período experimental (Tabela 18), o que corrobora com Borruto et al. (2006) em virtude da elevada mortalidade neonatal neste grupo. Em contrapartida, os valores medianos constatados no GII atestam que a acidose metabólica ocorreu, porém, em menor magnitude, o que indica melhor adaptação à vida extrauterina, haja vista a baixa mortalidade dos animais deste grupo.

Segundo Everts et al. (2008) o tecido placentário das gestações de bezerros clonados tende a apresentar alterações gênicas que implicam em menor aporte de oxigênio ao feto, em especial no final do período gestacional. Ademais, tal fato contribui para quadros de sofrimento fetal ainda no ambiente uterino associado ao tingimento de mecônio observado após o nascimento. Embora as cesarianas tenham sido programadas, 60% (6/10) dos animais do GI e 20% (2/10) do GII nasceram tingidos de mecônio. Apesar de tal diferença, não foi constatada correlação significativa ( $p > 0,05$ ), em ambos grupos, com os valores plasmáticos de lactato (tabela 17).

Animais que nascem tingidos de mecônio invariavelmente aspiram esta excreta, o que impede a formação da monocamada estável de surfactante alveolar. Além disso, as alterações inerentes ao surfactante podem levar a quadros patológicos extremamente deletérios para a função respiratória do recém-nascido (HILL et al., 1999; BLEUL, 2009).

A partir da ocorrência de animais tingidos de mecônio, foi possível associá-las às alterações observadas na avaliação física dos bezerros. Clinicamente os animais do GI que aspiraram o mecônio apresentavam, logo após o nascimento, dispneia intensa associada à bradipneia, com subsequente taquipneia, persistindo durante o tempo em que estiveram vivos, diminuindo de intensidade ao longo do período de avaliação. No GII, possivelmente em virtude do pequeno número de animais que nasceram tingidos de mecônio, a FR apresentou valores superiores aos observados por Gasparelli (2007) de  $46,0 \pm 16,0$  mpm para bezerros recém-nascidos da raça Nelore, caracterizados como taquipneia.

A literatura pertinente faz referência a distúrbios respiratórios em animais gerados por TNCS, podendo atingir até 90% dos conceptos (BRISVILLE et al., 2011), índices superiores aos denotados nesta pesquisa. Segundo Hill et al. (1999), a

atelectasia poderia ser causada pela deficiência na produção de surfactante. De acordo com Lester, Vaala e House (2014) a aspiração de mecônio também pode causar essa patologia. Independente da causa os animais acometidos apresentavam quadros respiratórios graves. É importante frisar que animais com falha de produção de surfactante ou que aspiram mecônio apresentam as mesmas alterações clínicas do trato respiratório (BLEUL, 2009). Segundo Nunes (2009), há relação direta entre hipóxia/sofrimento fetal em animais que nasceram tingidos por mecônio. No GI 83,3% (5/6) dos animais apresentaram atelectasia e edema pulmonar associados à presença de mecônio nos brônquios e alvéolos, ao exame microscópico. Desta forma, parece mais sensato atribuir as alterações clínico-patológicas à aspiração de mecônio.

Segundo Santos (2008) e Birgel Júnior et al. (2011a) as alterações pulmonares podem ser específicas do funcionamento deste órgão bem como secundárias à problemas do sistema circulatório, em especial do coração. Um importante achado nos recém-nascidos é a hipertensão da artéria pulmonar que ocorre de maneira transitória (SANTOS, 2008). A hipóxia leva ao desenvolvimento de vasoconstrição desse vaso resultando em quadros de hipertensão pulmonar com diminuição do fluxo sanguíneo para os alvéolos contribuindo para a manutenção deste quadro (BLEUL, 2009). As anomalias estruturais observadas no coração durante à necropsia dos animais do GI como: hipertrofia congênita e dilatação cardíaca podem perpetuar esta alteração que ocasionalmente se agrava pela aspiração do mecônio e diminuição ou falta do surfactante pulmonar (HILL et al., 1999; SANTOS et al., 2010; BIRGEL JÚNIOR et al., 2011a). Além disso, a presença de tais anomalias pode ter contribuído, ainda na vida fetal, para quadros de deficiência circulatória culminando, assim, em sofrimento fetal e nascimento de animais tingidos de mecônio.

É possível que estas alterações respiratórias observadas juntamente com as concentrações elevadas de lactato permitam aventar a hipótese de uma possível hipóxia e acidose metabólica sofrida por estes animais, sobretudo pelos bezerros clonados. Quando estas alterações metabólico/respiratórias se prolongam, geralmente levam a quadros de letargia, reflexo de sucção fraco ou ausente, dificuldade em adotar o decúbito esternal e demora para se manterem em estação (DUFTY; SLOSS, 1977). A apatia não foi denotada ao nascimento nos animais do GII, mas 40% (4/10) demoraram para demonstrar o reflexo de sucção. Além disto, todos os animais de FIV demoraram mais que o normal (HOUSE; GUNN, 2014) para se manter em estação (tabela 3).



Os valores de triglicerídeos e de colesterol foram superiores ao nascimento nos bezerros do GI não havendo, entretanto, correlação entre os valores destes lipídeos e o peso dos animais ao nascimento ( $p>0,05$ ). Paiola (2018) comparando bezerros FIV com macrossomia, com peso padrão e animais oriundos de inseminação artificial, também não denotou diferença no padrão sérico destes lipídeos entre os animais avaliados. Em comparação à literatura, os valores de triglicerídeos e colesterol, no GI, foram similares aos observados por Marchese (2014) em bezerros clones. Para o GII, se mostraram inferiores aos observados por Paiola (2018) em bezerros FIV, ambos ao nascimento.

A avaliação do escore de APGAR após o parto é útil na predição da vitalidade neonatal (FEITOSA; BENESI, 2014). Nos 20 bezerros avaliados neste estudo, denotou-se correlação negativa entre o escore de APGAR e concentrações plasmáticas de lactato ( $p<0,05$ ), imediatamente após o parto, concluindo que animais com baixa e moderada vitalidade apresentaram quadro de acidose metabólica e possivelmente, hipóxia.

Animais que nascem com peso excessivo, por vezes, apresentam baixa vitalidade e elevada mortalidade neonatal (CHAVATTE-PAMER et al., 2012; HILL, 2014). A correlação entre o peso vivo e o escore APGAR não foi significativa no presente estudo para o GI ( $p>0,05$ ), uma vez que somente três animais com macrossomia apresentavam moderada vitalidade ao nascimento. Entretanto, todos estes vieram a óbito.

Aos 5 minutos de vida observou-se melhora substancial na vitalidade do GII. A mesma característica não foi observada no GI, de maneira que seis bezerros permaneceram com escores baixo (1/10) e moderado (5/10), sendo submetidos, assim, à oxigenoterapia, após os 5 minutos de vida. Destaca-se, ainda, que tal procedimento não contribuiu para melhora no quadro respiratório, uma vez que as concentrações plasmáticas de lactato permaneceram imutáveis ao longo do período experimental para este grupo (tabela 17).

Em adição, a coloração pálida das mucosas mostrou ser a mais presente no GI, sendo responsável pela elevada porcentagem de animais com vitalidade baixa e moderada ( $p<0,05$ ). Esta coloração é preditora da anemia (FEITOSA; BENESI, 2014).

A anemia foi constatada no GI ao longo de todo o período experimental, não demonstrando, porém, alterações nos teores de VCM e CHCM, indicando que a anemia era de caráter normocítica-normocrômica (Tabela 3). A literatura refere uma

série de causas de anemia nos animais recém-nascidos, a saber: aumento da hemólise e lenta reposição das células vermelhas pela medula óssea e deficiência de eritropoetina e/ou ferro (KOMNINOU, 2008; HOUSE; GUNN, 2014). Quadros de hemólise podem causar aumento dos teores séricos de bilirrubina total e indireta, como observado no GI ao longo de todo o período experimental, indicando ser esta a provável causa da anemia. Ademais, este fato foi corroborado pela observação de depósitos de pigmentos biliares nos túbulos renais na análise microscópica. Portanto, soma-se a anemia uma das causas que contribuiu para alterações respiratórias e aumento das concentrações plasmáticas de lactato observadas no GI.

Além deste fato, os teores séricos de ferro para o referido grupo se encontravam dentro dos limites fisiológicos para a espécie durante todo o estudo. Desta forma, nestes achados eliminou-se a hipótese da anemia observada no GI ser ferropriva, como apontado por outros autores (FACTEAU; PALMER; WILKINS, 2005; KOMNINOU, 2008). No entanto, as concentrações de ferro se posicionavam abaixo dos limites fisiológicos (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008) para o GII ao longo do tempo de avaliação, porém sua associação com a anemia só pôde ser evidenciada a partir das 12 horas de vida caracterizando-se como ferropriva de caráter normocítica e normocrômica. Diferentemente das informações de Komninou (2008) que avaliou a mesma situação em bezerros frutos de fertilização *in vitro* logo após o nascimento.

Referente à biodisponibilidade do ferro, a transferrina é uma proteína de fase aguda (PFA) responsável pelo seu carreamento. Em situações de deficiência neste elemento, como por exemplo na anemia ferropriva observada no GII, ocorre diminuição dos teores séricos desta proteína em um período superior a 48 horas (FUHRMAN et al., 2004). A transferrina, assim como as demais proteínas demonstradas na tabela 19, também pode ser utilizada como preditora de processos inflamatórios.

Estudos em recém-nascidos humanos demonstraram a capacidade precoce em esquematizar resposta inflamatória eficiente ainda durante o trabalho de parto (STEINBORN et al., 1999; MARCHINI et al., 2000). Nos bovinos, a Haptoglobina (Hp) é a PFA mais utilizada como preditora de processos inflamatórios agudos (ECKERSALL, 2001). À necropsia foram evidenciados achados patológicos condizentes com tais processos como, peritonite severa, abomasite ulcerativa e broncopneumonia. Nestas situações, valores séricos de Hp superiores a 35mg/dL dever-se-iam ser constatados, o que não foi evidenciado em nenhum grupo

experimental, uma vez que, geralmente, são atingidos entre 24 a 48 horas após o insulto inflamatório (ECKERSALL, 2001; JONES; ALLISON, 2007), período superior às avaliações experimentais

As PFA são formadas no fígado (ECKERSALL, 2001). Este órgão se apresentou alterado em todos os animais necropsiados tanto no GI quanto GII. As hepatopatias em bezerros clonados já foram relatadas por outros autores (CHAVATTE–PALMER et al., 2002; SANTOS, 2008; PEREIRA, 2013). O exame bioquímico das enzimas hepáticas demonstrou maiores valores séricos de AST no GI e da GGT no GII (tabela 12). Em recém-nascidos, a concentração daquela enzima varia em virtude de lesão hepática e muscular (MARCHESE, 2014). Embora as alterações hepáticas foram as mais representativas à necropsia, sobretudo no GI, o presente estudo não revela ser a mensuração da AST fidedigna para o diagnóstico de lesão hepática nos bezerros avaliados.

Acredita-se que falhas placentárias sejam responsáveis por tais alterações contribuindo para quadros de degeneração hepática (DeSOUZA et al., 2001; SANTOS, 2008), o que se suspeita ter ocorrido em virtude da coloração amarelada a acastanhada (SANTOS, 2008) estar presente em 77,8% (7/9) dos animais clonados. Entretanto, segundo Li et al. (2005), a hepatomegalia associada ou não à congestão do parênquima hepático parece estar relacionada a bezerros oriundos de TNCS utilizando o núcleo de fibroblastos, o que ocorreu neste estudo. No tocante a GGT, sua avaliação como indicador de ingestão do colostro será abordada mais adiante.

As alterações renais relativas à morfologia podem estar relacionadas ao processo de manipulação embrionária dos animais avaliados (CHAVATTE–PALMER et al., 2002; RHIND et al. 2003). A hipoplasia e os cistos renais, achados relevantes nos animais necropsiados, também foram parte das nefropatias avaliadas pelos autores supracitados. No Brasil, outros pesquisadores também enfatizaram a presença destas alterações atribuindo-as às biotecnologias reprodutivas (SANTOS, 2008; PEREIRA, 2013).

Valores séricos de creatinina acima da referência para espécie, ao nascimento (KANEKO; HARVEY; BRUSS et al., 2008), já haviam sido relatadas por outros pesquisadores tanto em bezerros clonados quanto em animais oriundos de fertilização *in vitro* (FACTEAU; PALMER; WILKINS, 2005; GASPARELLI, 2007; BRISVILLE et al., 2013; MARCHESE, 2014). No presente estudo, 18 animais ao nascimento apresentaram essa característica. Segundo Gallini et al. (2000) a

reabsorção tubular desta substância é responsável por tal alteração nos recém-nascidos. Desta forma, se torna difícil prever a presença de alterações renais, como as observadas nos bezerros do GI, por meio da mensuração desse metabólito.

As concentrações médias de cálcio no GI indicaram uma hipercalemia durante o período experimental. Quadros de hipercalemia têm sido relatados na neonatologia equina. Nesta, os recém-nascidos apresentavam quadros clínicos decorrentes da asfixia perinatal, em virtude de possíveis disfunções placentária (McFARLANE, 2014). Na literatura compulsada não foi identificada referência semelhante em bovinos recém-nascidos; no entanto, é provável que a gênese desta hipercalemia nos animais do GI possa ser a mesma referida pelos autores anteriormente citados. Nas condições descritas acima, o quadro metabólico do recém-nascido resulta em acidose. Sendo assim, o baixo pH faz com que o cálcio se desligue da albumina, aumentando as concentrações séricas de cálcio ionizado (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008). Esta observação foi identificada em ambos grupos, sendo, todavia, significativamente maior no GI.

O teor sérico de cloretos também pode ser influenciado pelo status metabólico do animal bem como pelo comprometimento da função renal. Em situações de acidose metabólica e concomitante alcalose respiratória, o que resulta da excreção reduzida de íons cloreto pelos rins, desenvolve-se a hiperclorêmia, sendo a hiperventilação um dos sinais clínicos (MORAIS, BIONDO, 2007). Tal fato foi denotado no GI que além de apresentar hiperclorêmia durante todo o período experimental também manifestou taquipneia e acidose metabólica concomitante.

Em ruminantes é possível atestar se a transferência de imunidade passiva (TIP) foi eficiente por meio da quantificação dos teores de imunoglobulina G (IgG). Embora a avaliação sérica desta imunoglobulina para a constatação do sucesso ou fracasso da transferência seja fidedigna a partir das 24 horas de vida, é possível avaliar com o passar das horas após a colostragem, se sua absorção está ocorrendo (FEITOSA, BENESI, 2014). Segundo Wittum e Perino (1995), concentrações séricas de IgG entre 800–1600mg/dL são consideradas marginais e valores séricos acima de 1600mg/dL são condizentes com transferência de imunidade passiva. Os valores médios observados nesta pesquisa para o GI à 12 horas de vida são condizentes com a primeira situação. Em contrapartida, o GI apresentou, para o mesmo momento, valores medianos inferiores às concentrações marginais, indicando possível falha de transferência de imunidade passiva (FTIP).

Como já abordado anteriormente, seis animais do GI receberam o colostro por sonda esofágica. Além disso, todos já haviam ingerido um volume equivalente a 5% do peso vivo às 5 horas de vida. Sendo assim, acreditava-se que a absorção das imunoglobulinas ocorreria sem transtornos e seria equivalente em ambos os grupos, o que não ocorreu.

Em virtude de serem, as imunoglobulinas, substâncias proteicas, a avaliação da proteína total também pode ser usada como ferramenta para atestar sua absorção (BARRINGTON; PARISH, 2001). Os teores séricos de proteína total, sofreram um aumento gradual desde o nascimento até o final do período experimental, provavelmente em virtude da absorção dos anticorpos colostrais. É importante ressaltar que de todas as frações proteicas a albumina é a mais representativa, podendo representar até 50% do total (ECKERSALL, 2008). No entanto, segundo Feitosa et al. (2001) o teor de albumina é pouco variável no neonato, e o aumento no teor de proteína total após a ingestão do colostro deve-se, quase que exclusivamente à absorção de imunoglobulinas, como corroborado anteriormente. Como o GI apresentou menores valores de anticorpos, a albumina permaneceu como a fração mais representativa das proteínas, por isso suas concentrações médias foram maiores no GI a partir das 6 horas de vida (tabela 9).

De maneira indireta, a quantificação da GGT pode ser utilizada como forma de avaliação da eficácia da transferência de imunidade passiva, pois é diretamente correlacionada com a IgG (FEITOSA; BENESI, 2014). A literatura apresenta variação de valores entre 50 a 300UI/L para a confirmação da transferência de imunidade passiva através da mensuração desta enzima (PERINO et al., 1993; FEITOSA; BENESI, 2014). Para tanto, comparados aos valores supracitados, os valores medianos observados, demonstram sucesso na TIP no GII e FTIP para o GI.

Segundo Feitosa (1999) a administração de corticosteroides nos recém-nascidos acelera a maturação das células intestinais, diminuindo ou cessando completamente a absorção das imunoglobulinas. Entretanto, a indução do parto com glicocorticoides não tem esta mesma ação. A administração deste fármaco ocorreu em ambos grupos com a finalidade de acelerar a maturação dos pneumócitos tipo II, produtores de surfactante (DeKRUIF; BENEDICTUS 1993). O corticosteroide exógeno suprime a liberação do cortisol fetal, desencadeador do parto. Sendo assim, bezerros a termo obtidos por meio de cesariana teriam baixas concentrações séricas de catecolaminas sugerindo baixo estresse (CHAN et al., 1993). Em contrapartida,

animais nascidos por parto normal tendem a apresentar aumento das células brancas, em especial dos neutrófilos, refletindo uma neutrofilia pós-parto, resultado da secreção do cortisol endógeno, marcador do estresse fetal (BATCHELDER et al., 2007).

Os valores dos leucócitos totais para o GII estiveram acima dos valores de referência (THRALL, 2007), indicando leucocitose de estresse, possivelmente em virtude da liberação do cortisol, discordando de Chan et al. (1993). Ademais, o aumento deste hormônio inibe a secreção de insulina, uma vez que estes apresentam ações antagônicas. Situação não observada no GII ao nascimento. Esta elevação no número de leucócitos totais logo após o parto foi atribuída aos neutrófilos segmentados, refletindo valores medianos da razão neutrófilo/linfócito (N/L) de 8,4 logo após o nascimento. Para o GI, a razão foi de 0,6 mostrando que o número de linfócitos foi quase a metade do número total dos leucócitos, sendo tanto a razão N/L e o número de linfócitos significativamente menor neste grupo. Tennant et al. (1974) observaram valores de razão N/L de 0,5 para bezerros entre 8 a 8,5 meses de idade gestacional obtidos por cesariana, situação similar à observada no GI do presente estudo.

## 6.CONCLUSÕES

De acordo com os resultados e metodologia empregados pode-se concluir que:

- 1) Animais que nascem com baixo escore APGAR apresentam elevadas concentrações plasmáticas de lactato ao nascimento e acidose metabólica, sendo que:
  - a) Os bezerros de fertilização *in vitro* apresentam atenuação da acidose metabólica e melhor adaptação a vida extra-uterina;
  - b) Os bezerros clonados, mesmo submetidos a oxigenioterapia, matem-se acidóticos;
- 2) A anemia que ocorre nos bezerros clonados é de origem hemolítica do tipo normocítica e normocromica;
- 3) A administração do corticosteroide exógeno não suprime a ação do cortisol nos bezerros nascidos de fertilização *in vitro* conduzindo a quadros de leucograma de estresse ao nascimento;
- 4) Os bezerros clonados apresentam hipercalcemia possivelmente em virtude de quadros de asfixia neonatal;
- 5) Os bezerros clonados e de fertilização *in vitro* não conseguem manter os valores plasmáticos de glicose dentro da normalidade, após a ingestão do colostro;
- 6) Alterações patológicas nos rins, fígado, coração e pulmões contribuem elevada mortalidade de bezerros clonados;

## REFERÊNCIAS

- BARRINGTON, G. M.; PARISH, S. M. Bovine neonatal immunology. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v.17, n.3, p.463–476.2001
- BATCHELDER C.A. et al. Perinatal physiology in cloned and normal calves: Hematologic and biochemical profiles. **Cloning and Stem Cells**. v.9, n.1, p. 83–96, 2007.
- BENESI F.J. Síndrome asfixia neonatal dos bezerros. Importância e avaliação crítica. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia**. v. 16, p.38–48, 1993
- BIRGEL JÚNIOR, E.H., et al. Clinical disorders observed during the first 30 days of life of cloned Zebu calf. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.39(Suppl 1): p. 243 – 252, 2011a.
- BIRGEL JÚNIOR, E.H. et al. Medicina interna de bezerros clonados Distúrbios clínicos observados nos primeiros 30 dias de vida. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.9, n.1, p. 24–31, 2011b.
- BLEUL, U. Respiratory distress syndrome in calves. **Veterinary Clinics of North America: Food animal practice**. v. 25, n.1, p.179–219, 2009.
- BORRUTO, F. et al. Screening of fetal distress by assessment of umbilical cord lactate. **Clinical and Experimental Obstetrics Gynecology**. v.33, n.4, p.219–222, 2006.
- BRASIL, Regulamento do serviço de registro genealógico das raças zebuínas / **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Associação Brasileira de Criadores de Zebu**, p. 30, 2012.
- BRISVILLE, A.C., et al. Respiratory disease in neonatal cloned calves. **Journal Veterinary Internal Medicine**. v. 25, n.2. p.373–379, 2011



BRISVILLE, A.C. et al. Neonatal Morbidity and Mortality of 31 Calves Derived from Somatic Cloning, **Journal Veterinary Internal Medicine**. v.27, n.5. p.1218–1227, 2013.

CANO–GAUCI, D. F. et al. Glypican–3 – deficient Mice Exhibit Developmental Overgrowth and Some of the Abnormalities Typical of Simpson–Golabi–Behmel Syndrome, **The Journal of Cell Biology**. v.146, n.1, p.255–264 1999.

CHAN, W.W. et al. Plasma catecholamines and blood chemistry in newborn calves in relation to different obstetrical procedures and to neonatal outcome. **Animal Reproduction Science**. v.34, n.1, p.43–54. 1993.

CHAVATTE–PALMER, P et al. Clinical, Hormonal, and Hematologic Characteristics of Bovine Calves Derived from Nuclei from Somatic Cells. **Biology of reproduction**, v.66, n.2 p.1596–1603. 2002.

CHAVATTE–PALMER, P. et al. Health status of cloned cattle at different ages. **Cloning and stem cells**, v.6, n.2, p.94–100. 2004.

CHAVATTE–PALMER, P. et al. Review: Placental perturbations induce the developmental abnormalities often observed in bovine somatic cell nuclear transfer. **Placenta** 33(Suppl.): p.99–104, 2012

DeKUIF, A.; BENEDICTUS, G. Perinatal mortality and the birth of weak calves. **Tijdschr. Diergeneeskd**. v.118, n. 21. p. 684–688. 1993.

DeSOUSA, P. A., KING, T., HARKNESS, L., YOUNG, L. E., WALKER, S. K., e WILMUT, I. Evaluation of Gestational Deficiencies in Cloned Sheep Fetuses and Placentae. **Biology of reproduction**, 65, 23–30. 2001.

DUFTY, J. H., SLOSS, V. Anoxia in the bovine foetus. **Australian Veterinary Journal**. v. 53, n. 6, p. 262–267, 1977.

ECKERSALL, P. D.; YOUNG, F. J.; MCCOMB, C.; HOGARTH, C. J.; SAFI, S.; WEBER, A.; McDONALD, T.; NOLAN, A. M.; FITZPATRICK, J.L. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. **Veterinary Record**, v.148, n.2, 35–41. 2001.

ECKERSALL, P.D. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. In: Kaneko, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clínical biochemistry of domestic animals**. 6 ed. San Diego: academic press, 2008. p. 117–155.

EDWARDS, J. L. et al. Cloning adult farm animals: a review of the possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.50, n.2, p.113–123. 2003.

EVERTS, R.E. et al. Aberrant gene expression patterns in placentomes is associated with phenotypically normal and abnormal cattle cloned by somatic cell nuclear transfer. **Physiology Genomics**. v.33, p. 65–77, 2008

FARIN, P. W., PIEDRAHITA, J. A.; FARIN, C. E. Errors in development of fetuses and placentas from *in vitro*-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.65, n.1, p.178–91. 2006.

FACTEAU, M. E., PALMER, J. E., WILKINS, P. A. Neonatal care of high-risk cloned and transgenic calves. **Veterinary Clinics of North America: Food animal practice**. v.21, n. 2, p. 637–653, 2005.

FEITOSA F.L.F. et al. Relação entre a concentração de imunoglobulinas colostrais e a transferência de imunidade passiva para bezerros da raça Holandesa após ingestão voluntária de colostro. **Ciência Veterinária dos Trópicos**. v.2, n.3, p.160–168, 1999.

FEITOSA F.L.F. et al. Diagnóstico de falha de transferência de imunidade passiva em bezerros através da determinação de proteína total e de suas frações eletroforéticas, imunoglobulinas G e M e da atividade da gamaglutamiltransferase no soro sanguíneo. **Ciência Rural** v.31, n.2, p.251– 255, 2001.

FEITOSA, F.L.F.; BENESI, F.J. 2014. Semiologia de recém-nascidos ruminantes e equídeos, p.69–97. In: Feitosa F.L.F. (Ed.), **Semiologia Veterinária: a arte do diagnóstico**. 3ª ed. Roca, São Paulo.

FUHRMAN, M.P.; CHARNEY,P.; MUELLER, C.M. Hepatic proteins and nutrition assessment. **Journal of the American Dietetic Association**. v.104, n.8 ,p.1258–1264, 2004

GALLINI, F.; MAGGIO, L.; ROMAGNOLI, C.; MARROCCO, G.; TORTOROLO, G. Progression of renal function in preterm neonates with gestational age < or = 32 weeks. **Pediatric Nephrology**. v. 15, n. 1–2, p. 119–124, 2000.

GARRY, F.B et al. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. **Theriogenology**, v.45, n.1, p.141–152. 1996.

GASPARELLI, E. R. F. **Determinação da atividade sérica de enzimas hepáticas e da concentração de uréia e creatinina, cortisol e imunoglobulina G e dos valores hemogasométricos de bezerros da raça Nelore oriundos de fertilização in vivo (FV) e fertilização in vitro (FIV)**. 2007. 73f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba. Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2007.

HASLER J.F., et al. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**. v.43, n.1, p. 141–152. 1995

HILL, J.R., ROUSSEL, A. J., CIBELLI, J. B., EDWARDS, J. F., HOOPER, N. L., MILLER, M. W., THOMPSON, J. A., et al. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). **Theriogenology**. v.51, n. 8, p.1451–1465. 1999.

HILL, J.R. Incidence of Abnormal Offspring from Cloning and Other Assisted Reproductive Technologies. **Annual Review of Animal Biosciences**. 2014. n.2, v.16, p.1–15, 2014

HOUSE, J.K.; GUNN, A. A. Manifestation and Management of Disease in Neonatal

Ruminants. In: SMITH, B. P. **Large animal internal medicine** 4th Ed. Mosby, St. Louis, 2014. p 333–366.

HORTA, A. E. M. Large calf syndrome associated to the transfer of *in vitro* produced embryos. **Revista Portuguesa de Zootecnia**, n. 1, p.27–41. 1999.

JONES, M. L.; ALLISON, R. W. Evaluation of the ruminant complete blood cell count. **Veterinary Clinics of North America: Food animal practice**. v. 23, n. 3 p. 377–402, 2007.

KANEKO; HARVEY; BRUSS, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5th ed. San Diego: Academic Press, 2008.

KATO, Y.; TANI, T.; TSUNODA, Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. **Journal of reproduction and fertility**. v.120, n.2, p. 231–237. 2000

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

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

LAEMLLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680–685, 1970

LESTER, G.D.; VAALA, W. E.; HOUSE, J.K. Perinatal adaptation, asphyxia and resuscitation. In: SMITH, B. P. **Large animal internal medicine** 4th Ed. Mosby, St. Louis, 2014, p.252–261.

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

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

MARCHESE, F. J. M. **Perfil bioquímico de bezerros da raça Nelore, originados por meio da técnica de transferência nuclear de célula somática (TNCS) – clonagem**. 2014. 93f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

MARCHINI, G.; BERGGREN, V.; DJILALI-MERZOUG, R.; HANSSON, L. O. The birth process initiates an acute phase reaction in the fetus–newborn infant. **Acta Paediatrica**, v. 89, p. 1082–1086, 2000.

McFARLANE, D. Endocrine and metabolic disease In: SMITH, B. P. **Large animal internal medicine** 4th Ed. Mosby, St. Louis, 2014. P.1339–1387.

MEIRELLES, F. V.; et al. Delivery of cloned offspring: experience in Zebu cattle (*Bos indicus*). **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 1, p. 88–97, 2010.

MILES, J. R. et al. Angiogenesis and morphometry of bovine placentas in late gestation from embryos produced in vivo or *in vitro*. **Biology of Reproduction**. v. 71, n. 6, p.1919–1926, 2004.

MORAIS, H.A.; BIONDO, A.W. Distúrbios relacionados ao cloro: hiper e hipocloremia. In: DiBARTOLA, S.P. **Anormalidades de fluidos, eletrólitos e equilíbrio ácido-básico na clínica de pequenos animais**. 3 ed. São Paulo: Roca, 2007

NAGY, D.W. Resuscitation and Critical Care of Neonatal Calves. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**. n.1, v.25, p. 1–11, 2009.

PANARACE, M., AGUERO, J. I., GARROTE, M., JAURENGUI, G., SEGOVIA, A., CANÉ, L., GUTIÉRREZ, J., et al. How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. **Theriogenology**. v. 67, n.1, p.142–151, 2007.

NUNES, M.T. **O uso da cardiocografia como método de diagnóstico da ocorrência de sofrimento fetal (hipóxia fetal) durante a vida intra-uterina de fetos da raça Nelore originados por meio da técnica de transferência nuclear de células somáticas adultas – Clonagem**. 2009. 103f. Dissertação (Mestrado)– Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008

PAIOLA, I. A. A. **Perfil metabólico de vacas receptoras e de bezerros da raça Nelore produzidos por fertilização *in vitro* (FIV)**. 2018. 62f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018

PEREIRA, L.S. **Aspectos Anatomopatológicos De Clones Bovinos Abortados E Neonatos**. Brasília. Universidade de Brasília (UnB). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. 90f. Dissertação de mestrado em Saúde Animal. Brasília, 2013.

PERINO, L.J.; SUTHERLAND, R.L.; WOLLEN, N.E. Serum gamma glutamyltransferase activity and protein concentration at birth and after suckling in calves with adequate and inadequate passive transfer immunoglobulin G. **American Journal of Veterinary Research**, v.54, p.56–59, 1993

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

POULSEN, K.P.; McGUIRK, S.M. Respiratory Disease of the Bovine Neonate. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. N.1, v.25, p. 121–137, 2009.

RHIND, S. M., KING, T. J., HARKNESS, L. M., BELLAMY, C., WALLACE, W., DESOUSA, P., e WILMUT, I. Cloned lambs — lessons from pathology. **Nature biotechnology**, v. 21, n. 7, p.744–745. 2003.

SANTOS, C. R. **Patologia de neonatos bovinos clonados**. 2008. 101f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008

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

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

SINCLAIR, K. D.; BROADBENT, P. J.; DOLMAN, D. F. *In vitro* produced embryos as a means of achieving pregnancy and improving productivity in beef cows. **Animal Science**. v. 60, n. 1, p. 55–64, 1995.

STEINBORN, A.; SOHN, C.; SAYEHLI, C. et al. Spontaneous labour at term is associated with fetal monocyte activation. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 117, p. 147– 152, 1999.

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

TENNANT, B.; HARROLD, D.; REINA–GUERRA, M.; KENDRICK, J.W.; LABEN, R.C. Hematology of the neonatal calf: erythrocyte and leukocyte values of normal calves. **Cornell Vet**. v.64, p.516–532.1974.

THRALL, M.A, **Hematologia e Bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. 582p.

TURNER, A.S; MCILWRAITH, C. W. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. Livraria Roca Ltda., v.1, p 305. 2002

WEKSBERG, R., SHUMAN, C., BECKWITH, J. B. Beckwith – Wiedemann syndrome. **European Journal of Human Genetics**, v.18, p.8–14. 2010.

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

WITTUM, T. E.; PERINO, L. J. Passive immune status at postpartum hour 24 and long-term health and performance of calves. **American Journal of Veterinary Research**, v.56, n.9, p.1149– 1154, 1995.

WILSON, J., WILLIAMS, J., BONDIOLI, K., LOONEY, C., WESTHUSIN, M.; MCCALLA, D. Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. **Animal Reproduction Science**, v.38, n.1–2, p.73–83. 1995.

YOUNG, L. E., SINCLAIR, K. D., e WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Journals of Reproduction and Fertility**, 3, p.155–163. 1998.

ZACONETA, C. A. M. Asfixia perinatal. In: Margotto, P. R. **Assistência ao recém-nascido de risco**. Brasília: Pórfiro p. 383–391. 2004.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 4. ed. New Jersey: Prentice–Hall, 1999. 663 p.

ZATZ, M. Clonagem, células tronco e Bancos de cordão umbilical. **Ciência e Cultura**. V.3, p.22–26, 2004