UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA VETERINÁRIA

"ADAPTAÇÃO RESPIRATÓRIA NEONATAL: AVALIAÇÃO CLÍNICA, HEMOGASOMÉTRICA E DO ESTRESSE OXIDATIVO DE BEZERROS RECÉM-NASCIDOS PROVENIENTES DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL, FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* E CLONAGEM ANIMAL"

GABRIELA NASCIMENTO DANTAS

Botucatu / SP
Maio de 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA VETERINÁRIA

"ADAPTAÇÃO RESPIRATÓRIA NEONATAL: AVALIAÇÃO CLÍNICA, HEMOGASOMÉTRICA E DO ESTRESSE OXIDATIVO DE BEZERROS RECÉM-NASCIDOS PROVENIENTES DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL, FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* E CLONAGEM ANIMAL"

GABRIELA NASCIMENTO DANTAS

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para a obtenção de título de Doutorado.

Orientador: *Professor Adjunto Roberto Calderon Gonçalves (FMVZ/UNESP).*

Coorientador: *Professor Titular Fernando José Benesi (FMVZ/USP).*

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Dantas, Gabriela Nascimento.
Adaptação respiratória neonatal : avaliação clínica, hemogasométrica e do estresse oxidativo de bezerros recém-nascidos provenientes de inseminação artificial, fertilização *In vitro* e clonagem animal / Gabriela Nascimento Dantas. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: Roberto Calderon Gonçalves
Coorientador: Fernando José Benesi
Capes: 50501062

1. Neonatologia veterinária. 2. Bovino. 3. Testes funcionais dos pulmões. 4. Glutationa. 5. Clonagem. 6. Gasometria.

Palavras-chave: Bovinos; Função respiratória; Neonatologia veterinária.

Gabriela Nascimento Dantas

"Adaptação respiratória neonatal: avaliação clínica, hemogasométrica e do estresse oxidativo de bezerros recém-nascidos provenientes de Inseminação Artificial, Fertilização *In Vitro* e Clonagem Animal"

COMISSÃO EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Roberto Calderon Gonçalves

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária – FMVZ/UNESP – Botucatu-SP.

_____

Prof^{a}. Dr^{a}. Maria Lúcia Gomes Lourenço

Membro

Departamento de Clínica Veterinária – FMVZ/UNESP – Botucatu-SP.

_____

Prof^{a}. Dr^{a}. Débora Cristina Damasceno

Membro

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – FMB/UNESP - Botucatu-SP.

_____

Prof. Dr. Francisco Leydson Formiga Feitosa

Membro

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal – FMVA/UNESP - Araçatuba-SP.

_____

Prof. Dr. Júlio Augusto Naylor Lisboa

Membro

Departamento de Clínicas Veterinárias – Centro de Ciências Agrárias/UEL – Londrina-PR.

Defesa de Tese: 23 de março de 2017.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por sua proteção constante em todos os momentos da minha vida. A presença Dele me enche de amor, harmonia, confiança no futuro e vontade de estar evoluindo sempre.

Aos animais, seres capazes de fazer o homem entrar em contato com seus sentimentos genuínos e analisar sua conduta perante a vida, sendo fonte eterna de conhecimento e inspiração. Agradecimento especial deve ser feito a todos os bezerros (e suas mães) que participaram desta Pesquisa, e ao Fred, meu anjinho de quatro patas.

Aos meus pais, Rogério Dantas e Leda Dantas, que estiveram ao meu lado em todas as adversidades, me ensinando, me motivando e me amparando sempre. Se não fosse por vocês eu certamente não chegaria até aqui hoje. À minha irmã Thaís Dantas que muito me auxiliou com sua amizade, atenção e carinho. À minha família, toda a gratidão. Eu amo vocês de todo o meu ser.

Ao meu noivo, Vitor Hugo dos Santos, agradeço pelo apoio e incentivo em todos os momentos nesses últimos cinco anos. Seu companheirismo me confortou e me deu coragem e ânimo para obter sucesso nessa jornada. Obrigada por estar construindo comigo essa trajetória de muita alegria, desenvolvimento e parceria. E por trazer para minha vida pessoas tão especiais: minha família do Paraná. Eu amo você!

Ao meu orientador, Professor Roberto Calderon Gonçalves, não somente pelos diversos ensinamentos e confiança depositados em mim e no meu trabalho, mas também pela amizade compartilhada durante a Residência, o Mestrado e o Doutorado.

Ao meu co-orientador, Professor Fernando José Benesi, por estar sempre disposto a me oferecer valiosos conselhos. Desde a graduação o senhor é um grande incentivador da minha busca pelo conhecimento e crescimento pessoal, e serei eternamente grata por isso.

À minha querida amiga Bianca Paola Santarosa, que encarou comigo dias intermináveis de observação de partos e colheitas de amostras nos horários mais impróprios. Não posso deixar de te agradecer

por ter estado ao meu lado desde que cheguei em Botucatu, encarando e vencendo os desafios de cada etapa juntas. Muitas vezes só tivemos uma a outra (nossa equipe de duas) e demos conta do recado!

A todos os amigos que fiz em Botucatu, que me acolheram tão bem e me proporcionaram um convívio prazeroso e troca de experiências pessoais e profissionais. Só tenho a agradecer pelos momentos felizes e aprendizados. Vida longa às grandes amizades!

À Fazenda Agrindus (Descalvado/SP), à Fazenda Chapada (Santa Rita de Caldas/MG) e à In Vitro Brasil Clonagem Animal (Mogi-Mirim/SP), os meus sinceros agradecimentos por cederem gentilmente seus animais para este estudo.

Ao Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia (LAPGO) da Faculdade de Medicina da Unesp de Botucatu e à sua equipe, em especial à Professora Débora Damasceno, pela ajuda inestimável na realização das análises do estresse oxidativo e pelas palavras sempre encorajadoras e inspiradoras. Obrigada de todo o meu coração.

Aos professores da Clínica de Grandes Animais desta Faculdade pelo conhecimento compartilhado e pelo apoio desde a época da Residência.

Aos Professores Simone Biagio Chiacchio e Yuri Karen Sinzato pelas preciosas contribuições feitas ao meu trabalho através das discussões geradas por ocasião do Exame Geral de Qualificação.

Aos Professores Maria Lúcia Lourenço, Débora Damasceno, Francisco Leydsson Feitosa e Julio Lisboa, pela disponibilidade em participar da banca de Defesa de Tese, de forma a engrandecer e aperfeiçoar meu trabalho. Obrigada por estarem presentes, junto com meu orientador, neste dia tão importante para mim.

Ao Departamento de Clínica Veterinária e à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp de Botucatu, que me receberam de portas abertas e me proporcionaram a oportunidade de grandes aprendizados e experiências. Às instituições de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela Bolsa de Estudos concedida, a qual permitiu a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....7

ABSTRACT.....9

CAPÍTULO I.....11

Introdução.....11

Revisão de Literatura.....14

CAPÍTULO II.....20

Artigo Científico: Estresse Oxidativo.....20

CAPÍTULO III.....30

Artigo Científico: Avaliação Clínica e Hemogasométrica.....30

CAPÍTULO IV.....41

Discussão e Conclusões Gerais 41

Bibliografia.....43

DANTAS, G. N. **Adaptação respiratória neonatal: avaliação clínica, hemogasométrica e do estresse oxidativo de bezerros recém-nascidos provenientes de Inseminação Artificial, Fertilização *In Vitro* e Clonagem Animal.** Botucatu, 2018. 48p. Tese. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O sucesso da adaptação neonatal ocorre com o estabelecimento da função respiratória. Fisiologicamente, o neonato passa do ambiente hipóxico uterino para a hiperoxia do ar respirado após o nascimento. Assim, são produzidos radicais livres provenientes do oxigênio que estão relacionados ao aparecimento do estresse oxidativo, condição associada com diversas enfermidades. Bezerros originados por Fertilização *In Vitro* (FIV) e Clonagem Animal (CA) podem apresentar problemas ao nascimento e, devido ao seu alto valor genético e econômico, requerem do Médico Veterinário diagnóstico precoce e terapia eficaz em caso de má-adaptação neonatal. O objetivo deste trabalho foi comparar a influência de três métodos de concepção (Inseminação Artificial - IA, FIV e CA) sobre o *status* oxidativo, função pulmonar e adaptação pós-natal de recém-nascidos da espécie bovina. Para isso, foram utilizados 20 bezerros hígidos provenientes de IA, 15 neonatos originados por FIV e 15 recém-nascidos oriundos de CA. Todos os 50 animais foram monitorados do nascimento até 48 horas de vida, com avaliações realizadas com zero, seis, 12, 24 e 48 horas de vida. Nesses momentos, foram realizados: exame físico, hemogasometria (mensuração de pH, pressões parciais de oxigênio e de gás carbônico, bicarbonato, saturação de oxigênio, dióxido de carbono total e excesso de base) e verificação dos biomarcadores do *status* oxidativo (determinação das atividades enzimáticas da Superóxido Dismutase - SOD, Catalase e Glutationa Peroxidase – GSH-Px, e das concentrações de Glutationa Total e Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico no sangue periférico por espectrofotometria). Ao nascimento também foram avaliados o Escore Apgar e medidas de comprimento de coluna e amplitude respiratória. Foi demonstrado que bezerros clonados possuem maior peroxidação lipídica causada pelo aumento da produção de radicais livres associado à diminuição

da atividade da SOD. Além disso, os neonatos FIV tiveram maior atividade das enzimas antioxidantes Catalase e GSH-Px, seja por maior produção de peróxido de hidrogênio ou por resposta enzimática mais eficiente. Os bezerros do Grupo IA mostraram maiores valores para o Grupo Tióis Reduzidos (relacionado à glutationa reduzida). Os clones apresentaram acidose pós-parto mais acentuada do que a acidose mista fisiológica esperada para neonatos, o que ficou evidente pela diminuição de HCO_3 e BE e aumento do TCO_2 quando comparado aos demais grupos. Esse distúrbio refletiu-se na diminuição do escore Apgar e no aumento das frequências cardíaca e respiratória. Desta forma, o Grupo CA apresentou pior adaptação respiratória neonatal do que os outros grupos, e, por este motivo, necessita de acompanhamento intensivo, monitoramento através da realização de exames clínico e hemogasométrico repetidos e tratamento precoce apropriado, de maneira a assegurar a saúde desses animais.

PALAVRAS-CHAVE: Neonatologia Veterinária; Bovinos; Clone; Função Respiratória; Hemogasometria; Glutationa.

DANTAS, G. N. **Neonatal respiratory adaptation: clinical, hemogasometric and oxidative stress evaluation of newborn calves conceived through Artificial Insemination, In Vitro Fertilization and Animal Cloning**. Botucatu, 2018. 48p. Tese. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The success of neonatal adaptation is directly related to the establishment of respiratory function that allows efficient gas exchange. Physiologically, the neonate abruptly passes from the hypoxic uterine environment to the hyperoxic air breathed after birth. With this, free radicals are produced from oxygen that may be related to the appearance of oxidative stress, a condition that has been associated with several diseases. Calves produced by In Vitro Fertilization (FIV) and Animal Cloning (CA) present some problems at birth, and due to their high genetic and economic value, require the Veterinarian to diagnose early and effective therapy in case of neonatal maladaptation. The objective of this study was to compare the influence of the three conception methods (Artificial Insemination - IA, FIV and CA) on oxidative status, postnatal adaptation and lung function of newborns of the bovine species. For this, 20 healthy calves from IA (Control Group), 15 neonates originated by FIV and 15 newborns from CA were used. All 50 animals were monitored from birth to 48 hours of life, with evaluations performed at 0, 6, 12, 24 and 48 hours of life. At these moments, physical examination, hemogasometry (pH measurement, partial pressures of oxygen and carbon dioxide, bicarbonate, oxygen saturation, total carbon dioxide and base excess) were carried out and verification of biomarkers of oxidative status (determination of activities enzymes of Superoxide Dismutase - SOD, Catalase and Glutathione Peroxidase – GSH-Px, and Total Glutathione and Thiobarbituric Acid Substances in peripheral blood by colorimetric method). At birth, Apgar score and measurements of column length and respiratory amplitude were also performed. As results, it was obtained that cloned calves have higher production of free radicals by lipid peroxidation and that this factor was associated with a lower amount of SOD in this group. In addition, FIV neonates obtained higher concentrations of antioxidant enzymes with respect to

Catalase and GSH-Px, either by higher production of hydrogen peroxide or by more efficient enzymatic response. Control Group calves showed higher values for reduced glutathione. In addition, the clones presented a more pronounced postpartum acidosis than the expected physiological acidosis expected for neonates, especially with regard to the metabolic component, which was evidenced by the changes in HCO_3, TCO_2 and BE when compared to the other groups. This disorder may have reflected Apgar score and heart and respiratory rates. Intensive follow-up of these infants is suggested for early diagnosis of respiratory maladaptation and correct treatment.

KEY WORDS: Veterinary Neonatology; Cattle; Clone; Respiratory Function; Hemogasometry; Glutathione.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial: o Brasil possui o segundo maior rebanho do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças (MAPA, 2014). Este rebanho proporciona o desenvolvimento de dois segmentos geradores de riquezas para o país: as cadeias produtivas da carne e do leite, grandes responsáveis por criação de empregos, geração de renda e fornecimento de alimentos para a população.

Devido a esse cenário, o uso de biotecnologias que resultam em maior eficiência produtiva e reprodutiva dos bovinos tem sido crescente e alcançam bons resultados para o produtor e para a economia do país, com desempenho cada vez mais expressivo na pecuária nacional (VIEIRA, 2012). Neste contexto, a Inseminação Artificial (IA) e a Fertilização *In Vitro* (FIV) são biotécnicas muito utilizadas. Na última década, também tem sido utilizada com crescente sucesso a Clonagem Animal (CA), que tem como objetivo multiplicar de maneira idêntica indivíduos reconhecidos por seu patrimônio genético (PARANACE et al., 2007). Porém, quanto mais elaboradas as biotecnologias, maior o custo relacionado à produção destes animais.

Assim, bezerros oriundos de FIV e CA possuem alto valor agregado e, considerando este panorama atual, é responsabilidade do médico veterinário saber detectar precocemente neonatos de risco, avaliando-os criticamente de maneira a propor terapia rápida e eficaz. 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., 2006). Entre as enfermidades mais comuns, destacam-se as alterações respiratórias que se instalam logo após o parto nos neonatos clonados, fazendo com que estes apresentem asfixia com hipóxia decorrente, sendo estas importantes causas de óbito (JUNIOR et al., 2011).

Não apenas os recém-nascidos de grande importância econômica merecem atenção neste aspecto, mas também os originados de técnicas de concepção mais difundidas e comuns (como IA e monta natural), pois as

primeiras horas de vida são cruciais no estabelecimento de adaptação pós-natal bem sucedida, e qualquer alteração nesse período requer diagnóstico precoce para que se evite mortalidade e consequentes prejuízos para o criador.

Dessa forma, parâmetros que auxiliem o Médico Veterinário a reconhecer animais com falha na adaptação pós-natal facilitam o correto diagnóstico e tratamento dos recém-nascidos. Entretanto, a Neonatologia Veterinária, principalmente no que se refere à espécie bovina, ainda caminha a passos lentos (FEITOSA e BENESI, 2014), necessitando de mais pesquisas que estabeleçam padrões importantes para a avaliação clínica. Considerando que a adaptação pós-natal depende diretamente da função pulmonar e do correto estabelecimento das trocas gasosas (GONÇALVES e FEITOSA, 2014), pode-se dizer que recursos de monitoramento dessa função com parâmetros bem estabelecidos podem ser extremamente úteis na prevenção da mortalidade neonatal.

Recentemente, alguns estudos têm sugerido o envolvimento dos radicais livres, causadores de condição denominada estresse oxidativo, nos principais distúrbios que acometem os neonatos, já que estes se encontram inicialmente em ambiente uterino fisiologicamente hipóxico e, drasticamente após seu nascimento, passam a ser submetidos à hiperoxia (MUTINATI et al., 2014). O oxigênio é essencial para a oxidação de compostos orgânicos e produção de energia para o metabolismo celular (COMHAIR e ERZURUM, 2002). Porém uma pequena fração do oxigênio consumido (2 a 5%) é reduzida, produzindo substâncias químicas altamente reativas, denominadas espécies reativas do oxigênio (ERO), que podem provocar lesão tecidual e, em altas concentrações, danificar organelas celulares, ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas, com consequências deletérias para o organismo (VALKO et al., 2007).

O impacto do aumento na produção das ERO no interior do trato respiratório é particularmente importante (KINNULA et al., 1995). Em razão da grande área de superfície e do suprimento sanguíneo, o pulmão é o único órgão que está constantemente exposto a altas tensões de oxigênio. Além disso, as células do epitélio respiratório são as primeiras a entrar em contato com o oxigênio inalado durante a respiração, favorecendo a formação de agentes oxidantes no local, o que torna o trato respiratório ainda mais vulnerável aos danos oxidativos provocados pelas ERO (RAHMAN et al.,

2006). Esse fator é ainda mais importante quando se trata de recém-nascidos, devido à súbita mudança de teor de oxigênio no ambiente, início e adaptação da função respiratória e ineficiência dos mecanismos antioxidantes. Assim, o possível estresse oxidativo que se instala no neonato nestas condições se refletirá em seu *status* oxidativo sistêmico (MUTINATI et al., 2014). Existem evidências de que as ERO podem estar direta ou indiretamente associadas a doenças. No entanto, pesquisas na área veterinária acerca do envolvimento das ERO em afecções dos neonatos ainda são escassas (DEATON et al., 2004).

Diante do que foi exposto fica evidente a importância de conhecer melhor os mecanismos envolvidos no estresse oxidativo durante a adaptação pós-natal nos neonatos e sua relação com o estabelecimento da função pulmonar. Assim, será possível estudar os parâmetros para recém-nascidos hígidos e, posteriormente, verificar se produtos concebidos por FIV e CA apresentam alterações, necessitando de maior intervenção veterinária. Monitorar os efeitos do estresse oxidativo nessas condições também contribuirá para maior entendimento da evolução da adaptação respiratória pós-natal na espécie bovina. Vale destacar, ainda, a possibilidade de se estudar marcadores biológicos que poderão contribuir para avaliar melhor os efeitos dos procedimentos terapêuticos e estabelecer prognósticos mais precisos, de maneira a manter o neonato em boas condições de vitalidade e evitar perdas desnecessárias de animais.

Futuramente, após a realização de mais estudos, será possível o desenvolvimento de testes rápidos e simples na rotina clínica veterinária que associem mensurações do estresse oxidativo com as enfermidades dos animais neonatos, o que contribuirá para a modernização dos diagnósticos e acompanhamento dos recém-nascidos na Neonatologia Veterinária.

Com base na relevância dos aspectos levantados e em função da necessidade de maiores esclarecimentos sobre o assunto em questão, o presente trabalho foi delineado com o propósito de se comparar a influência de três métodos de concepção (IA, FIV e CA) sobre o estresse oxidativo, adaptação pós-natal e função pulmonar de recém-nascidos da espécie bovina. Para isso, pretende-se alcançar os seguintes objetivos:

- Estudar o *status* oxidativo sistêmico de bezerros recém-nascidos hígidos provenientes de técnica de Inseminação Artificial, logo após o nascimento, e durante as primeiras 48 horas de vida, de maneira a estabelecer um padrão para neonatos da espécie bovina;

- Comparar esse padrão de *status* encontrado ao de neonatos bovinos originários de Fertilização *In Vitro*, para verificar se existe diferença no estado redox ligado ao tipo de concepção;

- Avaliar o status oxidativo sistêmico de bezerros recém-nascidos oriundos da técnica de Clonagem Animal logo após o nascimento e durante as primeiras 48 horas de vida, para verificar os principais problemas ligados à função pulmonar deste tipo de animal no período neonatal e sua influência no *status* oxidativo;

- Analisar a função pulmonar desses três grupos de neonatos (IA, FIV e Clone) por meio da hemogasometria;

REVISÃO DE LITERATURA

Maturidade pulmonar, adaptação pós-natal e avaliação da função respiratória

Nas diversas espécies de mamíferos, o desenvolvimento dos pulmões é um fenômeno complexo e contínuo, o qual engloba a maturação e o crescimento pulmonar, com início precoce durante a gestação e conclusão somente na vida extrauterina (FEITOSA e BENESI, 2014). Grande parte dos avanços ocorridos com relação à assistência neonatal veterinária nas últimas décadas relaciona-se com a função respiratória, visto que a capacidade funcional pulmonar é imprescindível para a adaptação e sobrevivência do neonato, devendo-se ressaltar que os problemas respiratórios são as principais causas de mortalidade no período perinatal (MEE, 2008; BLEUL, 2009).

Os testes de função pulmonar têm ampla aplicação prática, pois podem quantificar, através do estudo de determinados parâmetros, as anormalidades do trato respiratório (MOTA e QUEIROZ, 2010). Os gases presentes no sangue são resultado direto dos processos envolvidos na respiração (PICCIONE et al., 2006). Assim, ao avaliar a dinâmica destes gases, pode-se estudar a função

respiratória. Para tal finalidade, utiliza-se a gasometria, que é o exame que permite analisar os gases sanguíneos e o equilíbrio ácido-básico de forma rápida e prática.

O exame hemogasométrico mensura a pressão parcial de oxigênio (PO_2), do dióxido de carbono (PCO_2) e o potencial hidrogeniônico (pH) sanguíneos, o bicarbonato plasmático (HCO_3^-), o dióxido de carbono total no plasma (TCO_2), a saturação do oxigênio (SO_2) e o excesso de bases (BE) (GOUVÊA, 2009). Há alguns anos, a realização deste exame, principalmente em grandes animais, era complicada devido à indisponibilidade de equipamento especializado, além do alto custo (ORTOLANI, 2003). Atualmente, os aparelhos portáteis de hemogasometria estão disponíveis no mercado e têm como principal vantagem a possibilidade de avaliação das amostras imediatamente após a colheita, minimizando os efeitos da oxidação *in vitro*. Cabe ressaltar que já foi demonstrada a eficácia do hemogasômetro portátil na determinação das principais variáveis gasométricas em bovinos, equinos e ovinos (PEIRÓ et al., 2010).

O exame hemogasométrico pode ser realizado a partir de amostras de sangue venoso ou arterial (MOTA e QUEIROZ, 2010). A colheita seriada de sangue para hemogasometria permite pesquisar, por exemplo, a eficiência da oxigenação do pulmão do recém-nascido, o que está diretamente relacionado com a maturidade pulmonar e adaptação da função respiratória do indivíduo. Um quadro de acidose respiratória pode se instalar caso as trocas gasosas não ocorram em grau adequado no neonato. A acidose respiratória acontece como resultado da redução da ventilação pulmonar com retenção de ácido carbônico e consequente aumento da PCO_2 e redução do pH (GOUVÊA, 2009). Essa condição induz o aumento compensatório da concentração de HCO_3^- e a elevação da concentração de TCO_2 no sangue periférico (FERRO et al., 2002). Assim, fica clara a utilidade do uso da hemogasometria como recurso para monitoramento da função respiratória.

Estresse oxidativo: princípios e sua importância na Neonatologia

As ERO são derivadas do metabolismo do oxigênio molecular, e representadas principalmente pelo radical superóxido (O_2^-), o peróxido de

hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^-). Embora a cadeia de transporte de elétrons seja reconhecidamente o principal sítio de produção de ERO, outras diferentes fontes podem produzir estes agentes oxidantes, como, por exemplo, as células fagocíticas, os peroxissomas e as enzimas do sistema citocromo P450 (BUONOCORE et al., 2010).

Em condições normais, o balanço entre os antioxidantes e as ERO é suficiente para garantir o bom funcionamento do organismo. Entretanto, um aumento nos agentes oxidantes, a deficiência no sistema antioxidante ou a associação das duas condições pode destruir este equilíbrio. Este estado de desequilíbrio é conhecido como estresse oxidativo, condição em que as ERO podem provocar lesões teciduais, danificando organelas celulares, ácidos nucléicos, lipídeos, carboidratos e proteínas (BURTON e JAUNIAUX, 2011), além de estar associado a diversas enfermidades nos animais domésticos (SILVA e GONÇALVES, 2010; SILVA et al., 2012).

De todas as ações deletérias associadas ao estresse oxidativo, a oxidação das membranas celulares talvez seja a que tenha maior impacto. As ERO quando geradas próximas de membranas celulares podem provocar a oxidação dos ácidos graxos, evento conhecido como peroxidação lipídica, levando à inativação de receptores, perda da fluidez e aumento da permeabilidade das membranas, com liberação de nutrientes e substâncias tóxicas à célula (como o malonaldeído) no espaço extracelular, lesionando tecidos adjacentes (SORDILLO e AITKEN, 2009; MUTINATI et al., 2013).

A produção de ERO durante o metabolismo do oxigênio exige o desenvolvimento de defesas antioxidantes para remover os intermediários reativos do oxigênio antes que eles causem danos, mantendo a homeostase entre a produção e a eliminação de ERO (SORDILLO e AITKEN, 2009).

De modo geral, os agentes antioxidantes podem ser enzimáticos e não-enzimáticos. Os enzimáticos constituem a primeira linha de defesa endógena no combate às ERO, e incluem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutationa peroxidase (GSH-Px) e a glutationa redutase (GSH-Rd). Entre os antioxidantes não-enzimáticos podemos destacar as vitaminas E e C, a glutationa (GSH), carotenos, ácido úrico e proteínas quelantes de metais de transição (BURTON e JAUNIAUX, 2011).

Em se tratando de Neonatologia, é atualmente aceito que o estresse oxidativo é importante catalizador de doenças nos recém-nascidos, e várias condições fisiológicas e ambientais fazem o neonato sofrer seus efeitos negativos, com impacto direto sobre sua vitalidade (MUTINATI et al., 2014). Isto porque a rápida passagem do meio intrauterino para o extrauterino com exposição drástica ao oxigênio ambiental (que aumenta de 20 mmHg do ambiente uterino para 100 mmHg de pressão parcial no ar ambiental, segundo Gitto et al., 2009), requer adaptação pulmonar e sistêmica eficaz para que o animal obtenha sucesso em sua condição pós-natal (MUTINATI et al., 2013). Assim, a primeira respiração gera grandes quantidades de ERO, e se não houver adequada ação do sistema antioxidante, ocorrerá instalação do estresse oxidativo. Como fator agravante da situação, tem sido reportado que os neonatos têm sistema antioxidante imaturo quando comparado aos adultos (SAUGSTAD, 2005).

Como consequência da geração das ERO, tem-se maior depleção do já deficiente sistema antioxidante, danos ao endotélio e epitélio dos alvéolos pulmonares, e alteração na estrutura dos capilares, com prejuízos sobre seu metabolismo celular (GITTO et al., 2009). As ERO também estão relacionadas com morte neuronal em neonatos humanos (BERGER e GARNIER, 2000). Outra questão importante é que a mobilização do tecido adiposo marrom, utilizado como fonte de energia em animais recém-nascidos, gera grande consumo de oxigênio, com consequente produção de radicais livres (HATFIELD et al., 2000).

Na Medicina Veterinária, várias enfermidades são descritas como consequência de danos hipóxicos ou hiperóxicos em bezerros, potros, cães, cordeiros e leitões, tais como: disfunções cardiovasculares e pulmonares, acidose, alterações funcionais e anatômicas do trato digestório e falha da transferência de imunidade passiva (SCHUIJT, 1990; BELLOWS e LAMMOGLIA, 2000; KIRSCHVINK et al., 2002; LOMBARD et al., 2007; KIZIL e YUCE, 2009; REY-SANTANO et al., 2011; GUZELBEKTES et al., 2012; LIU et al., 2012; MUTINATI et al., 2013).

No entanto, ainda são necessárias mais pesquisas na área veterinária acerca do envolvimento das ERO em afecções dos neonatos (DEATON et al.,

2004), de forma que seja possível compreender o papel do estresse oxidativo no estabelecimento da adaptação respiratória pós-natal.

Fertilização *In Vitro* e Clonagem Animal

O uso de embriões bovinos concebidos por FIV aumentou o potencial reprodutivo de vacas geneticamente superiores, possibilitando a produção em larga escala de indivíduos provenientes da mesma mãe. Nesta técnica de reprodução assistida, a fecundação é realizada em ambiente laboratorial, o que permite o uso de gametas altamente selecionados, de maneira a obter embriões de boa qualidade que serão transferidos, posteriormente, para o útero de uma vaca receptora. Porém, efeitos deletérios têm sido associados à técnica, tais como: crescimento fetal anormal, peso aumentado do bezerro ao nascimento, alta taxa de abortamentos, nascimento de animais prematuros, e altas taxas de mortalidade neonatal (PIMENTA-OLIVEIRA et al., 2011).

Já a clonagem animal, realizada através da transferência nuclear, é uma tecnologia reprodutiva usada para produzir indivíduos idênticos, os chamados clones. Porém, a efetividade desta técnica é limitada, sendo sua eficiência de apenas 4%, ou seja, da totalidade dos embriões reconstruídos produzidos, apenas 4% resultam em animais nascidos saudáveis (PARANACE et al., 2007).

Outro dado descrito é a alta taxa de mortalidade neonatal em bezerros clonados, que vai de 12,5% até 42%, e que os principais problemas relatados nos recém-nascidos são o alto peso ao nascimento, malformações do sistema esquelético e muscular, anormalidades metabólicas e dificuldades respiratórias, sendo estas últimas as mais relevantes (BRISVILLE et al., 2011). Porém, tanto no caso da FIV como na CA, o desenvolvimento tecnológico tem proporcionado taxas de sucesso progressivamente maiores com o passar do tempo e a evolução das pesquisas na área.

Animais clonados apresentam variação no período gestacional, visto que, por razões ainda não muito bem estabelecidas, não sinalizam o momento do parto, o que faz a gestação ser mais longa, até que ocorra intervenção do médico veterinário por meio da realização de indução do parto que culmina com a cesárea na grande maioria dos nascimentos de bezerros clonados

(PARANACE et al., 2007). Pesquisadores tem estudado o efeito do parto normal e da cesariana sobre os recém-nascidos humanos e animais, além de verificar a influência da idade gestacional, porém os resultados ainda são controversos (ROGERS et al., 1998; YACOOBI et al., 1999; GEORGESON et al., 2002; GITTO et al., 2009; MUTINATI et al. 2014).

Diante do exposto, seguem dois artigos relacionados ao assunto abordado até o momento: função respiratória dos neonatos bovinos concebidos por IA, FIV e Clonagem Animal e o impacto dos diferentes tipos de concepção no estresse oxidativo e na hemogasometria desses animais.

CAPITULO II

ARTIGO CIENTÍFICO: a ser submetido ao periódico Pesquisa Veterinária Brasileira (normas disponíveis em: http://www.pvb.com.br/)

Estado redox de bezerros neonatos: comparação entre Inseminação Artificial, Fertilização *in vitro* e Clonagem Animal

Gabriela N. Dantas, Bianca P. Santarosa, Yuri K. Sinzato,
Débora C. Damasceno, Fernando J. Benesi, Roberto C. Gonçalves

RESUMO.- O estresse oxidativo é resultado do excesso de produção de "Espécies Reativas do Oxigênio" ou da falha do sistema antioxidante. Neonatos apresentam tendência a essa condição pois são submetidos a altas tensões de oxigênio no início da respiração pulmonar após o parto e porque apresentam mecanismos antioxidantes ainda em desenvolvimento. Bezerros provenientes de Fertilização *in vitro* (FIV) ou Clonagem Animal (CA) apresentam taxas de mortalidade elevada, com alta incidência de problemas respiratórios, o que poderia ser explicado pela ação deletéria do estresse oxidativo nas vias aéreas. Para confirmar tal hipótese, foram estudados três grupos de bezerros: IA (n=20, concebidos por Inseminação Artificial), FIV (n=15, originados por Fertilização *in vitro*) e Clones (n=15 bezerros clonados). Todos os animais tiveram partos acompanhados e amostras de sangue venoso foram colhidas no momento do nascimento, com seis, 12, 24 e 48 horas de vida. As amostras foram processadas em hemolisados e congeladas a -80^{o}C até as dosagens dos biomarcadores do estresse oxidativo (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico, enzimas Superóxido Dismutase, Catalase e Glutationa Peroxidade e Grupo Tióis Reduzidos). Os bezerros clonados tiveram maior produção de EROs por peroxidação lipídica, o que refletiu em maiores dosagens de TBARS. Este fator foi associado à menor quantidade de SOD nesse grupo. Animais originados por FIV apresentaram maiores atividades de enzimas antioxidantes no que se refere à Catalase e à GSH-Px, seja por maior produção de peróxido de hidrogênio ou por resposta enzimática mais eficiente desses neonatos. Bezerros do Grupo IA mostraram maiores valores para Grupo Tióis Reduzidos. Esses fatores associados podem indicar maior estresse oxidativo em bezerros FIV e Clones, porém os animais FIV conseguiram responder de forma mais eficiente a essa condição. De forma geral, todos os animais atingiram valores semelhantes dos biomarcadores nos momentos finais de avaliação, indicando possível amadurecimento do sistema antioxidante desses neonatos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: bovinos, neonatologia, biomarcadores, TBARS, SOD, Catalase, GSH-Px, Tióis.

INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo é consequência do desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes (Celi, 2011). Os agentes oxidantes, conhecidos como "Espécies Reativas do Oxigênio" (EROs), são gerados a partir do metabolismo

fisiológico do oxigênio e em caso de produção em excesso das EROs ou falha do sistema antioxidante podem gerar destruição de membranas biológicas, como ocorre na peroxidação lipídica, e aparecimento de enfermidades (Ferreira & Matsubara, 1997).

Alguns estudos mostraram que neonatos bovinos possuem maior concentração de radicais livres no sangue (Gaál et al. 2006), assim como recém-nascidos humanos quando comparados a adultos (Saugstad 2003). Isso pode ser relacionado à respiração pulmonar, iniciada após o nascimento, que aumenta o contato com o oxigênio, proveniente do gás inspirado, e leva a hiperoxia e produção de EROs em maior quantidade. Este fator, associado a mecanismos antioxidantes deficientes característicos dos neonatos (Ochoa et al. 2003) pode explicar a maior predisposição ao estresse oxidativo nesta categoria animal. Com relação ao trato respiratório, as EROs podem causar destruição direta de pneumócitos do tipo I e células endoteliais, diminuição de complacência pulmonar, potencialização da resposta inflamatória, extravasamento de fluido proteico no interior dos alvéolos, com inativação do surfactante e, por fim, prejuízo no sistema ciliar das vias respiratórias (Silva & Gonçalves 2010).

Bezerros originados por Fertilização *in vitro* (FIV) e Clonagem Animal (CA) possuem alto valor econômico e genético, porém ainda apresentam elevadas taxas de mortalidade neonatal, principalmente associadas a problemas respiratórios (Paranace et al. 2007, Pimenta-Oliveira et al. 2011). A partir disso, e diante da escassez de literatura sobre o assunto, cogitou-se a hipótese de que os animais provenientes das biotécnicas reprodutivas de FIV e CA poderiam estar predispostos a maiores níveis de estresse oxidativo do que os bezerros concebidos por técnicas mais simples e rotineiras, como a Inseminação Artificial (IA). Sendo este o caso, a inserção de terapias antioxidantes poderiam auxiliar na manutenção da vida e saúde desses bezerros. Biomarcadores importantes do estresse oxidativo são: as "Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico" (TBARS), as enzimas antioxidantes [catalase, superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GSH-Px)] e o grupo tióis reduzidos, no qual a glutationa reduzida (GSH) é o principal componente. A função e a importância desses marcadores serão descritas a seguir.

Os lipídios, principalmente os poli-insaturados, são muito suscetíveis à oxidação e aos danos provocados pelas EROs, processo conhecido como peroxidação lipídica, que leva à perda da seletividade na troca iônica e à liberação do conteúdo dos lisossomos, assim como à formação de produtos citotóxicos que causam morte celular (Damasceno et al. 2002). O processo de lipoperoxidação leva à formação do malondialdeído (MDA), que reage com o ácido tiobarbitúrico e produz pigmentos de cor rosa que podem ser medidos por espectrofotometria e são chamados de "Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico" (Janero 1990). Assim, o TBARS é um biomarcador da peroxidação lipídica.

A SOD é uma metaloenzima que protege as células aeróbicas contra a ação do O_2-, o radical superóxido, não muito reativo, mas que tem a capacidade de produzir EROs mais citotóxicas que ele próprio (Olszewer 1995). Assim, esta enzima atua catalisando a reação de dismutação deste radical em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. No sistema respiratório, a SOD está presente no epitélio de brônquios e alvéolos, nos fibroblastos, nos macrófagos alveolares, nas arteríolas e nas células dos capilares pulmonares (Rahman et al. 2006).

A ação da SOD produz peróxido de hidrogênio, uma ERO extremamente prejudicial por possuir meia-vida longa, ser capaz de atravessar camadas lipídicas

e reagir com metais de transição, hemoproteínas, induzir alterações cromossômicas, oxidar compostos sulfidrilas e participar da Reação de Fenton que produz o radical OH^-, agente da lipoperoxidação (Olszewer 1995, Ferreira & Matsubara, 1997). Assim, o H_2O_2 formado precisa ser metabolizado, e essa ação é realizada por duas enzimas: a Catalase e a Glutationa Peroxidase (GSH-Px).

A Catalase decompõe o H_2O_2 em água e oxigênio (Damasceno et al. 2002), sendo mais eficiente quando as concentrações do peróxido se tornam altas. Ela se concentra no trato respiratório inferior, no interior dos macrófagos alveolares, pneumócitos tipo II e células Clara (Kinnula 2005). Conforme citado anteriormente, a GSH-Px atua de forma complementar à Catalase na remoção do peróxido de hidrogênio. Além disso, faz parte do ciclo redutor da glutationa, que é o principal mecanismo de remoção dos lipoperóxidos (Kinnula 2005). A ação desta enzima ocorre utilizando a glutationa reduzida (GSH) como substrato e doadora de elétrons para as reações de inativação das EROs, o que a transforma em glutationa oxidada (GSSH). Uma vez oxidada, a GSSH é reduzida a GSH novamente pela ação da enzima Glutationa Redutase, às custas de NADPH proveniente da via das pentoses (Damasceno et al. 2002), uma via alternativa da oxidação da glicose-6-fosfato que leva à produção de ribose-5-fosfato, gás carbônico e o NADPH. A GSH-Px e a GSH se encontram, no trato respiratório, no citoplasma e nas mitocôndrias do epitélio das vias aéreas e nos macrófagos alveolares e pode-se dizer que a glutationa reduzida é responsável, principalmente, pela proteção contra a oxidação de proteínas (Rahman et al. 2006).

Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar os biomarcadores do estresse oxidativo em bezerros neonatos comparando os animais concebidos por IA, FIV e CA, para verificar possíveis alterações no *status* oxidativo desses animais.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais. Foram utilizados 20 bezerros concebidos por Inseminação Artificial (Grupo IA, todos machos), 15 bezerros originados por Fertilização *in vitro* (Grupo FIV - 11 machos e 4 fêmeas) e 15 bezerros clones (Grupo CA – 10 fêmeas e 5 machos). Os animais do Grupo IA foram obtidos em propriedade localizada em Descalvado-SP, os do Grupo FIV de fazenda em Santa Rita de Caldas-MG e os bezerros clones foram provenientes de empresa comercial situada em Mogi-Mirim-SP. Os neonatos dos Grupos IA e FIV eram da raça Holandesa Preta e Branca (HPB) e nasceram por parto vaginal, e o Grupo CA foi composto por cinco animais da raça HPB, cinco da raça Gir e cinco da raça Nelore, nascidos por meio de cesárea. Os partos foram acompanhados e ocorreram em baias ou piquetes maternidade. Os animais foram avaliados quanto a sua higidez e maturidade e foram excluídos dos grupos os que apresentaram alterações de saúde graves ou necessitaram de tratamento. Todas as vacas eram submetidas a regime de manejo semi-intensivo, com alimentação no cocho composta por silagem de milho, acesso ao pasto, sal mineral para bovinos, água *ad libitum* e manteve-se a ração concentrada utilizada em cada uma das três propriedades. Utilizaram-se vacas com escore corporal entre três e quatro e excluíram-se os animais doentes. Após o nascimento, o bezerro foi separado da mãe e aleitado em mamadeira, recebendo colostro nas primeiras 48 horas de vida. O experimento foi realizado no período de julho de 2015 a dezembro de 2016. Este Projeto de Pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética

no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus de Botucatu, sob o protocolo 197/2014.

Obtenção das amostras. Todos os bezerros foram acompanhados do nascimento até 48 horas de vida. Foram colhidas amostras de sangue venoso por meio de punção da veia jugular com auxílio de sistema de colheita a vácuo, constituído por agulha 25X8mm (21G) acoplada a tubo siliconizado contendo heparina sódica. Os momentos de colheita foram: ao nascimento, seis, 12, 24 e 48 horas após o nascimento. As amostras foram mantidas em isopor contendo gelo triturado até seu processamento, que ocorreu em até uma hora pós-colheita. Para esse processamento (realizado de acordo com metodologia descrita por Silva et al. 2012), os tubos foram inicialmente centrifugados (Centrífuga 5804E, Eppendorf, Hamburg, Germany) a 185xG por dez minutos a 4ºC. Foi retirado o sobrenadante e as hemácias restantes foram lavadas com solução tampão salina-fosfato (PBS) (Solução tampão salina-fosfato, Ceaquim, Botucatu, São Paulo, Brasil) a 4ºC e centrifugadas a 1575xG durante um minuto. Essa lavagem foi repetida três vezes. A cada repetição do procedimento, retirou-se o sobrenadante por aspiração com micropipeta. As amostras foram acondicionadas, em duplicata, em tubos tipo Eppendorf identificados, com capacidade de 1 ou 2mL, da seguinte forma: às hemácias lavadas (100µl) foram adicionados 1900µl de água ultrapura, homogeneizando-se por inversão para obtenção do hemolisado utilizado para determinação dos biomarcadores TBARS e Grupo Tióis Reduzidos. Para a determinação da atividade enzimática de GSH-Px, da Catalase e da SOD, 50µl de hemácias lavadas foram acrescentados a 950µL de solução estabilizadora (2,7mM EDTA e 0,7mM 2-mercaptoetanol) (Solução tampão salina-fosfato, Ceaquim, Botucatu, São Paulo, Brasil). As amostras do hemolisado foram congeladas em botijão de nitrogênio de transporte (-196ºC) e posteriormente armazenadas a -80ºC até serem analisadas.

Produtos químicos e aparelhos utilizados na dosagem dos biomarcadores do estresse oxidativo. Todas as soluções foram preparadas usando escala analítica. A água ultrapura foi obtida do aparelho GEHAKA® Master System. As soluções: Hidroperóxido de t-butilo (solução aquosa a 70%), Cloreto de cálcio ($CaCl_2$ - ACS), ácido 5,5-Dithiobis (ácido 2-nitro-benzóico) (DTNB – pureza ≥ 98%), ácido etilenodiamina-tetracético (EDTA – pureza ≥ 99%), Glutationa Redutase (GSH-Rd_100-300 unidades/mg de proteína), L-Glutationa Reduzida (GSH - pureza 98%), Peróxido de hidrogênio (H_2O_2 - ACS), Cloreto de magnésio ($MgCl_2$ - ACS), 2-mercaptoetanol (Pureza ≥99%), β-nicotinamida adenina dinucleótido 2'-fosfato em hidrato de sal tetrassódico (NADPH - pureza ≥93%), peroxidase (25.000 unidades), Vermelho de Fenol, Solução de PBS (NaCl_0.138M, KCl_0.0027M, pH 7,4); Cianeto de potássio (pureza ≥ 97%), Ferrocianeto de potássio (pureza ≥ 99%), Hidróxido de sódio (NaOH - pureza ≥97%), Monohidrato monobásico fosfato de sódio (NaH2PO4.H2O ACS), Ácido de ácido 5-sulfosalicílico (pureza ≥95%), ácido 2-tiobarbitúrico (TBA - pureza ≥98%) e TRIS (pureza ≥99,9%) foram adquiridas da Sigma-Aldrich®; o ácido clorídrico (HCl - A.C.S.) e o ácido pirogálico (pureza ≥ 99,9%) foram adquiridos no Synth®; o Álcool etílico (A.C.S.), trihidrato de fosfato de hidrogênio di-potássio (K2HPO4 - pureza ≥99%) e bicarbonato de sódio (NaHCO3 - pureza ≥99,5%) foram adquiridos da Merck; a D-Glucose Anidra (Dextrose - A.C.S.), Cloreto de Potássio (KCl - A.C.S.) e Cloreto de Sódio (NaCl - A.C.S.) foram adquiridos da Vetec®; o di-hidrogenofosfato de potássio (KH2PO4 - A.C.S.) e fosfato de sódio Dibásico (Na2HPO4 - A.C.S.) foram

adquiridos da Dinâmica®. As determinações fotométricas foram realizadas com a leitura de microplacas Power Wave XS pelo software Biotek® e Gen5. As concentrações e as leituras cinéticas das reações foram realizadas sob temperatura controlada de 25°C. O agitador IKA® MS 3 Digital para microplaca e banho de água Quimis® foram utilizados durante os ensaios. As análises foram realizadas nos aparelhos pertencentes ao LAPGO (Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia) da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP seguindo a metodologia desenvolvida no próprio laboratório.

Hemoglobina. As concentrações de hemoglobina (Hb) foram utilizadas para a padronização dos biomarcadores de estresse oxidativo (TBARS, SOD, GSH-Px e Grupo Tióis) em eritrócitos lavados de acordo com o diluente utilizado (água ultrapura ou solução estabilizadora). Para a quantificação da hemoglobina, foram adicionados 200µL (no branco) ou 197,5µL de solução de Drabkin mais 2,5µL de eritrócitos lavados em cada poço. A microplaca foi agitada (750 rpm) durante 1 min para homogeneização seguida de 10 minutos de repouso. A absorbância foi medida em comprimento de onda de 546nm. Os resultados foram expressos em gramas (g) de hemoglobina por decilitro (dL).

TBARS. Para a quantificação do TBARS, 500µL de eritrócitos lavados (amostas em água purificada/Mili-Q) foram adicionados ao tubo de ensaio contendo 500µL de ácido sulfossalicílico a 3,0%, centrifugados a 18.000xG durante 3 min e repousados durante 15 min a 25ºC. Em seguida, foram diluídos 500µL da água ultrapura (no branco) ou do sobrenadante (amostras) em 500µL de solução de TBA 0,67%. A mistura foi aquecida a 80°C durante 30 min. Após o aquecimento, as amostras foram colocadas em gelo durante 10 minutos para a reação de parada. Em seguida, 300µL foram pipetados em microplaca. A absorbância foi medida em comprimento de onda de 535nm. Os resultados foram expressos em nM de malonaldeído (MDA) por mg de hemoglobina (nM/mgHb)

Catalase. A atividade da enzima catalase foi determinada nas amostras de hemácias lavadas (em solução estabilizadora) através da cinética do decaimento do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), mensurada pela diferença entre a absorbância inicial e final (delta) por minuto. O ensaio foi feito em espectofotômetro (Shimadzu UV-1800) com controle de temperatura usando cubetas de quartzo com volume de 1,5mL. Para isso, foi preparada solução de fosfato de sódio monobásico monohidratado 0,1M e solução de H_2O_2 1M. O aparelho foi zerado com 5µL de amostra mais 1000µL (q.s.p.) do tampão fosfato 0,1M. Após esse procedimento, a solução de H_2O_2 1M foi pipetada para início da reação em volume equivalente à concentração final 0,2M na cubeta. A cinética da absorbância foi realizada em 240nm a 25ºC por 120 segundos. Os resultados foram calculados a partir da fórmula preconizada por Noble & Gibson (1970) e expressos em mM/min/mg de Hb.

Grupo Tióis Reduzidos. Para a quantificação de tióis reduzidos em eritrócitos lavados (amostras em água ultrapura), foram adicionados em cada poço 200µL (branco) ou 195µL de solução TRIS 0,1 M/EDTA 0,5 mM mais 1,0µL de eritrócitos lavados e 4,0µL de solução DTNB. Em seguida, a microplaca foi agitada (750rpm) por 1 minuto e a absorbância foi medida em comprimento de onda de 412nm. Os resultados foram expressos em mM/mg de Hb.

SOD. Para a atividade da SOD, foram adicionados em cada poço 125µL de solução de TRIS 1M/EDTA 5mM mais 5µL de água destilada (no branco) ou eritrócitos lavados (amostras em água purificada). Depois, foram adicionados 10µL

de solução de pirogalol em cada poço (30 segundos para pipetagem da solução em todas as microplacas). A microplaca foi agitada (500 rpm) durante 20 min. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 420 nm. Os resultados foram expressos em U/mg de Hb.

GSH-Px. Para a medição da atividade GSH-Px foram adicionados em poços 100µL de TRIS 50 mM e solução EDTA 5mM pH 7,6 (25ºC) mais 0,5µL de eritrócitos lavados (amostras em solução estabilizadora). Em seguida, foram adicionados 50µL de solução MIX (GSH 9 mM, GSH-Rd 4,55 UI/mL e NADPH 1,82 mM) em cada poço. A partir daí, foram adicionados 20µL de solução de hidroperóxido de t-butil em cada poço. Imediatamente a cinética foi ativada e realizada durante 5 minutos com intervalos de 1 minuto a 25°C no leitor de microplacas com filtro de 340nm. Os deltas de absorbância foram calculados e os resultados foram expressos como mM de GSH-Px por minuto por mg de Hb (mM/min/mg de Hb).

Análise Estatística. Para as médias da Catalase, do Grupo Tióis, da SOD e da GSH-Px foi realizada análise de medidas repetidas no tempo (One Way Repeated Measures Anova) para comparação dos momentos de avaliação dentro de cada grupo individualmente. Também em cada momento foi realizada análise de variância para comparação dos grupos em estudo (P<0,05). Quando houve significância (P<0,05) foi realizado o Teste Tukey para comparação das médias (P<0,05). Para a análise das medianas obtidas das dosagens do TBARS foi realizado o Teste de Friedman (Friedman Repeated Measures) para comparação dos momentos de avaliação dentro de cada grupo individualmente. Quando houve significância (P<0,05) foi realizado o Teste Tukey para comparação das medianas (P<0,05). Também em cada momento foi realizado o Teste de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos em estudo (P<0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas dosagens dos biomarcadores do estresse oxidativo dos bezerros dos diferentes grupos estão apresentados nos Quadros numerados de 1 a 5 a seguir.

Quadro 1. Medianas, primeiros e terceiros quartis das dosagens das Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) nos grupos de bezerros provenientes de Inseminação Artificial (IA), Fertilização *in vitro* (FIV) e Clonagem Animal (CA), nos diferentes momentos de avaliação (0, 6, 12, 24 e 48 horas pós-nascimento).

Momentos	**TBARS (nM/mg de Hb)**			**P**
	IA	**FIV**	**CA**	
M0	52,7 [43,5 – 65,2] aB	7,1 [4,9 – 13,2] bC	79,9 [66,8 – 91,8] bcA	**<0,001**
M6	40,1 [32,7 – 59,5] aB	4,3 [2,0 – 10,2] bC	71,8 [65,2 – 85,0] abA	**<0,001**
M12	51,0 [41,8 – 72,9] aB	13,2 [9,6 – 14,8] bC	154,6 [59,8 – 260,6] aA	**<0,001**
M24	53,1 [41,2 – 68,4] aAB	39,3 [35,1 – 46,8] aB	59,9 [48,5 – 71,1] bcA	**0,007**
M48	43,5 [34,5 – 73,1] aA	57,9 [54,3 – 60,8] aA	43,9 [40,4 – 55,2] cA	**0,113**
P	**0,548**	**<0,001**	**<0,001**	

*Medianas seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Quadro 2. Médias e desvios-padrão das atividades da Catalase nos grupos de bezerros provenientes de Inseminação Artificial (IA), Fertilização in vitro (FIV) e Clones, nos diferentes momentos de avaliação (0, 6, 12, 24 e 48 horas pós-nascimento).

Momentos	Catalase (mM/min/mg de Hb)			P
	IA	FIV	CA	
M0	133,6 ± 30,0 abAB	158,5 ± 42,6 abA	107,8 ± 50,2 aB	**0,006**
M6	111,0 ± 37,3 bB	173,7 ± 32,8 abA	105,6 ± 45,1 aB	**<0,001**
M12	146,3 ± 38,7 aAB	177,1 ± 37,4 aA	127,0 ± 54,6 aB	**0,010**
M24	146,2 ± 20,2 aA	144,2 ± 41,9 bA	125,5 ± 64,7 aA	**0,351**
M48	122,9 ± 19,8 abA	111,7 ± 19,3 cA	126,5 ± 59,6 aA	**0,507**
P	**0,002**	**<0,001**	**0,646**	

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Quadro 3. Médias e desvios-padrão das dosagens do Grupo Tióis Reduzidos nos grupos de bezerros provenientes de Inseminação Artificial (IA), Fertilização in vitro (FIV) e Clones, nos diferentes momentos de avaliação (0, 6, 12, 24 e 48 horas pós-nascimento).

Momentos	Grupo Tióis Reduzidos (mM/mg de Hb)			P
	IA	FIV	CA	
M0	4,6 ± 0,7 bA	3,8 ± 0,4 bB	3,6 ± 0,8 aB	**<0,001**
M6	5,0 ± 0,6 abA	4,5 ± 0,3 aB	3,4 ± 0,7 aC	**<0,001**
M12	5,3 ± 0,5 aA	4,6 ± 0,5 aB	3,6 ± 0,6 aC	**<0,001**
M24	5,3 ± 0,9 abA	3,1 ± 0,4 cB	3,4 ± 0,6 aB	**<0,001**
M48	5,1 ± 0,8 abA	3,8 ± 0,8 bB	3,4 ± 0,5 aB	**<0,001**
P	**0,029**	**<0,001**	**0,480**	

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Quadro 4. Médias e desvios-padrão das atividades da Superóxido Dismutase (SOD) nos grupos de bezerros provenientes de Inseminação Artificial (IA), Fertilização in vitro (FIV) e Clones, nos diferentes momentos de avaliação (0, 6, 12, 24 e 48 horas pós-nascimento).

Momentos	SOD (U/mg de Hb)			P
	IA	FIV	CA	
M0	51,5 ± 4,5 aA	53,2 ± 5,9 aA	43,6 ± 4,3 abB	**<0,001**
M6	49,8 ± 8,6 aA	52,0 ± 2,6 aA	41,2 ± 3,4 abB	**<0,001**
M12	47,5 ± 6,4 aAB	52,2 ± 4,2 aA	42,2 ± 8,6 abB	**<0,001**
M24	47,1 ± 12,0 aA	53,7 ± 3,4 aA	39,8 ± 4,7 bB	**<0,001**
M48	49,2 ± 6,8 aA	44,9 ± 2,9 bA	48,5 ± 10,3 aA	**0,196**
P	**0,402**	**<0,001**	**0,003**	

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Quadro 5. Médias e desvios-padrão das atividades da Glutationa peroxidase (GSH-Px) nos grupos de bezerros provenientes de Inseminação Artificial (IA), Fertilização in vitro (FIV) e Clones, nos diferentes momentos de avaliação (0, 6, 12, 24 e 48 horas pós-nascimento).

Momentos	GSH-Px (mM/min/mg de Hb)			P
	IA	FIV	CA	
M0	3,03 ± 0,36 aC	4,07 ± 0,64 aA	3,54 ± 0,77 aB	**<0,001**
M6	2,97 ± 0,62 aB	4,13 ± 0,79 aA	3,46 ± 0,73 aB	**<0,001**
M12	2,81 ± 0,72 abB	4,06 ± 1,30 aA	3,82 ± 0,64 aA	**<0,001**
M24	2,85 ± 0,90 abB	3,30 ± 0,72 bAB	3,79 ± 1,02 aA	**0,013**
M48	2,43 ± 0,56 bC	3,15 ± 0,53 bB	4,06 ± 0,97 aA	**<0,001**
P	**0,022**	**<0,001**	**0,309**	

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Observando o comportamento do biomarcador TBARS, o que mais se destaca é o fato de que o Grupo CA teve maiores valores nas dosagens e que essa

diferença com relação aos outros grupos desaparece no momento 48 horas, quando os três grupos passam a apresentar valores semelhantes. Isso pode ter ocorrido por excesso de lipoperoxidação (Janero 1990; Damasceno et al. 2002) nos bezerros clonados nas primeiras horas de vida, o que foi compensado no momento 48 horas provavelmente pela melhora nos mecanismos antioxidantes desses animais. Para o estudo do sistema antioxidante, foram dosados os valores de SOD, Catalase, Grupo Tióis Reduzidos e GSH-Px.

A SOD, primeira linha de defesa do sistema antioxidante (Olszewer 1995; Ferreira & Matsubara, 1997), teve comportamento inverso ao TBARS, ou seja, o Grupo CA demonstrou concentrações menores do que os outros dois grupos e permaneceu a ausência de diferença no momento 48 horas, o que seria compatível com uma situação de estresse oxidativo até pelo menos 24 horas de vida do neonato clone, quando se utiliza TBARS e SOD como biomarcadores e se compara a bezerros do Grupo IA e FIV. Porém outros marcadores do sistema antioxidante (Catalase, GSH-Px e glutationa reduzida) precisam ser considerados.

Os animais FIV mostraram maiores concentrações da Catalase nos primeiros momentos experimentais, igualando-se aos demais grupos nas colheitas de 24 e 48 horas. O comportamento da enzima GSH-Px entre os grupos foi variável, houve diferença estatística entre os grupos em todos os momentos, mas, no geral, o Grupo FIV teve maiores valores de GSH-Px até 24 horas. Por fim, as concentrações do Grupo Tióis Reduzidos (principalmente composto pela glutationa reduzida) mostraram diferenças entre o Grupo IA e o FIV, sendo maior no IA, e o Grupo CA apresentando valores estatisticamente iguais aos FIV ou menores. Assim, o Grupo IA apresentou maior reserva de Grupo Tióis Reduzidos, e o Grupo CA menor, na maioria dos momentos analisados. Isso associado ao fato do Grupo FIV, em geral, ter maiores dosagens dessas duas enzimas (Catalase e GSH-Px) pode significar maior produção de peróxido de hidrogênio (Damasceno et al. 2002), por exemplo, devido a maior produção de EROs (quando comparado ao Grupo IA) e/ou maior eficiência de seu sistema antioxidante em removê-los (quando comparado ao Grupo CA). A hipótese levantada seria a de que tanto os animais FIV como os clones apresentam maior produção de EROs quando comparados ao Grupo IA, mas o Grupo FIV foi mais eficiente em removê-los quando comparado aos bezerros clonados.

Sintetizando e focando no comportamento geral dos biomarcadores dentro de cada grupo, pode-se chegar a observações importantes. Iniciando com o grupo CA, notou-se diminuição da atividade da SOD, o que gerou maior ocorrência de peroxidação lipídica (observado pelas maiores concentrações do TBARS nos momentos iniciais). Associada a essa condição, ocorreu menor atividade da catalase durante o período de análise e aumento da atividade da GSH-Px a partir das 12 horas e, devido ao fato de essas duas enzimas atuarem de forma complementar no metabolismo do peróxido de hidrogênio, a peroxidação lipídica no grupo CA foi reduzida nos momentos 24 e 48 horas (provavelmente devido à ação da GSH-Px a partir das 12 horas) e, por isso, não houve diferença estatística entre os grupo no TBARS obtido no último momento de avaliação. Já o grupo FIV apresentou níveis adequados de atividade de SOD, associado aos altos valores nas atividades das enzimas Catalase e GSH-Px. A hipótese que justificaria esse fato seria a de que os bezerros do grupo FIV apresentaram lipoperoxidação aumentada desde o nascimento, mas ela foi controlada devido às elevadas atividades de catalase e GSH-Px. Além disso, os bezerros FIV, por terem sido submetidos a partos

vaginais auxiliados (devido ao manejo adotado na propriedade), mais rápidos, foram submetidos à menor depleção da reserva antioxidante. Tanto os bezerros FIV como os clones apresentaram menores dosagens de glutationa reduzida, relacionada à oxidação de proteínas (Kinnula 2005).

Nesse sentido, instituir terapias antioxidantes nos grupos de bezerros de risco teria provável efeito benéfico quanto à diminuição das alterações respiratórias e da mortalidade nesses animais. Por exemplo, suplementação de zinco, cobre e manganês poderia contribuir para o aumento da atividade da SOD no grupo CA, já que se trata de uma metaloenzima composta por esses metais (Olszewer 1995), assim como dieta rica em compostos sulfridrilas poderia ter efeito benéfico para bezerros clones e FIV que apresentaram baixos estoques de glutationa.

Porém outros fatores devem ser considerados, pois, em ruminantes, a atividade dos biomarcadores do estresse oxidativo pode ser influenciada por nutrição e sazonalidade (Di Trana et al. 2006). Além disso, são necessários mais estudos para confirmar o efeito deletério do estresse oxidativo nesses animais, já que as principais diferenças entre grupos cessaram no final da avaliação dos animais (24 ou 48 horas), podendo indicar chegada ao equilíbrio do *status* oxidativo nesses neonatos. Outro fator a ser considerado seria que os bezerros clones doentes que necessitaram de tratamento foram excluídos do grupo experimental, assim como não entraram na análise os dados dos animais que vieram a óbito antes das 48 horas de estudo. Assim, esses animais em específico poderiam apresentar alterações mais marcantes no que se refere ao estresse oxidativo, o que levaria a maior taxa de enfermidades e mortalidade nesses animais.

CONCLUSÕES

A partir do exposto, pode-se concluir que os bezerros clonados, ao nascimento, mostraram menor quantidade de SOD e maior produção de EROs por peroxidação lipídica, o que refletiu em maiores dosagens de TBARS. Animais originados por FIV tiveram maiores atividades de enzimas antioxidantes no que se refere à Catalase e à GSH-Px, seja por maior produção de peróxido de hidrogênio ou por resposta enzimática mais eficiente desses neonatos. Bezerros do Grupo IA mostraram maiores valores para o Grupo Tióis Reduzidos (glutationa reduzida). Esses fatores associados podem indicar maior estresse oxidativo em bezerros FIV e Clones, porém os animais FIV conseguiram responder de forma mais eficiente a essa condição. De forma geral, todos os animais atingiram concentrações semelhantes dos biomarcadores nos momentos finais de avaliação, indicando possível amadurecimento do sistema antioxidante desses neonatos às 48 horas de vida.

REFERÊNCIAS

CELI, P. Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2011; 33(2): 233–240.

DAMASCENO, D.C. et al. Radicais livres, estresse oxidativo e diabete. *Diabetes Clínica*, v.5, n.5, p.355-361, 2002.

DI TRANA, A., CELI, P., CLAPS, S., FEDELE, V., RUBINO, R. The effect of hot season and nutrition on the oxidative status and metabolic profile in dairy goats during mid lactation. *Anim Sci*. 2006, 82, 717–722.

FERREIRA, A.L.A., MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil* 1997; 43(1): 61-8.

GAÁL, T. et al. 2006. Free radicals, lipid peroxidation and the antioxidant system in the blood of cows and newborn calves around calving. *Comparative Biochemistry and Physiology,* Part B 143 (2006) 391–396.

JANERO, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.* 1990, 9, 515–540.

KINNULA, V.L. Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway disease. *Thorax*, v.60, p.693-700, 2005.

NOBLE R.W. & GIBSON Q.H. The reaction of ferrous horseradish peroxidase with hydrogen peroxide. *J Biol Chem*. 1970 May 10;245(9):2409-13.

OCHOA, J.J., RAMIREZ-TORTOSA, M.C., QUILES, J.L., PALOMINO, N., ROBLES, R., MATAIX, J., HUERTAS, J.R., 2003. Oxidative stress in erythrocytes from premature and full-term infants during their first 72 h of life. *Free Radic*. Res. 37, 317–322.

OLSZEWER, E. *Radicais livres em medicina*. São Paulo: BYK, 1995. 204p.

PANARACE, M. et al. How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. *Theriogenology*. v. 67, p. 142-151, 2007.

PIMENTA-OLIVEIRA, A. et al. Morbidity-mortality and performance evaluation of Brahman calves from in vitro embryo production. *BMC Veterinary Research*. v. 7:79. 2011.

RAHMAN, I. et al. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. European *Journal of Pharmacology*, v.533, n.1-3, p.222-239, 2006.

SAUGSTAD, O.D. Oxidative stress in the newborn. A 30-year perspective. *Biol Neonate*. v. 88, p. 228–236. 2003.

SILVA, AA. & GONÇALVES, R.C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.40, n.4, p.994-1002, abr, 2010.

CAPÍTULO III

ARTIGO CIENTÍFICO: a ser submetido ao periódico Pesquisa Veterinária Brasileira (normas disponíveis em: http://www.pvb.com.br/)

Análise Clínica e Hemogasométrica de bezerros concebidos por Inseminação Artificial, Fertilização *in vitro* e Clonagem Animal

Gabriela N. Dantas, Bianca P. Santarosa, Ricardo A. Micai,
Perla D. Fleury, Fernando J. Benesi, Roberto C. Gonçalves

RESUMO.- Para que ocorra adaptação extra-uterina bem sucedida é necessário que o neonato consiga estabelecer suas funções respiratórias de maneira eficaz, garantindo oxigenação eficiente e boa vitalidade. Distúrbios respiratórios são os maiores causadores de óbito durante o período neonatal em bovinos, e essa mortalidade é ainda mais expressiva quando se trata de bezerros originados por Fertilização *in vitro* (FIV) ou Clonagem Animal (CA). A hemogasometria mostra-se como excelente recurso para avaliar alterações do equilíbrio ácido-básico, e quando associada ao exame clínico do neonato, fornece subsídios para diagnóstico acurado e tratamento precoce da má-adaptação neonatal. O objetivo deste trabalho foi estudar recém-nascidos bovinos originados por Inseminação Artificial (IA) e compará-los a bezerros concebidos por FIV e CA, no que se refere a hemogasometria e exame clínico. Para isso, foram utilizados 20 bezerros IA, 15 bezerros FIV e 15 bezerros clonados que foram avaliados imediatamente após o parto e com seis, 12, 24 e 48 horas de vida. Em todos os momentos experimentais foram coletadas amostras de sangue venoso para hemogasometria e foi realizado o exame clínico, e na avaliação pós-parto ainda foram utilizados escore Apgar e mensurações de comprimento de coluna e amplitude respiratória. Os animais FIV não demonstraram alterações, demonstrando comportamento semelhante ao dos bezerros do Grupo IA. Os bezerros provenientes de Clonagem Animal apresentaram acidose pós-parto mais acentuada do que a acidose mista fisiológica esperada para neonatos, o que ficou evidente pela diminuição dos valores de HCO_3 e BE e pelo aumento de TCO_2 quando comparados aos demais grupos. Esse distúrbio pode ter refletido em valores médios menores de escore Apgar e no aumento das frequências cardíaca e respiratória. Sugere-se acompanhamento intensivo desses neonatos, com monitoramento por meio do exame clínico e hemogasométrico, para diagnóstico precoce dessa condição e tratamento baseado em oxigenioterapia e reposição de bicarbonato.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: bovinos, neonatologia, escore Apgar, comprimento de coluna, amplitude respiratória, hemogasometria.

INTRODUÇÃO

Grande parte dos avanços ocorridos na assistência neonatal veterinária nas últimas décadas relaciona-se com a função respiratória, visto que a capacidade funcional pulmonar é imprescindível para a adaptação e sobrevivência do neonato

na vida extra-uterina, sendo que os problemas respiratórios destacam-se como as principais causas de mortalidade perinatal na espécie bovina (Mee 2008, Bleul 2009). Animais advindos de técnicas como Fertilização *in vitro* (FIV) e Clonagem Animal (CA) são acometidos por problemas respiratórios com maior frequência, assim como neonatos prematuros. Birgel Junior et al. (2011) citaram que bezerros oriundos da técnica de CA apresentam grande incidência de quadros de asfixia neonatal que levam esses animais a óbito. Assim, torna-se fator crucial na sobrevivência desses recém-nascidos correta adaptação respiratória, que resultará em oxigenação eficiente e boa vitalidade.

Para avaliar esse processo, a hemogasometria traz informações muito úteis sobre o equilíbrio ácido-básico: pH, pressão parcial de oxigênio (PO_2), pressão parcial de dióxido de carbono (PCO_2), dióxido de carbono total (TCO_2), concentração de bicarbonato (HCO_3), excesso de bases (BE) e a saturação de oxigênio (SO_2), fornecendo subsídios para o diagnóstico e o prognóstico de várias enfermidades dos bovinos (Sucupira & Ortolani 2003). No caso dos neonatos, após a ruptura do cordão umbilical e durante a transição da oxigenação placentária para a pulmonar, é notada acidose respiratória e metabólica transitória discreta, por causa da glicólise anaeróbia em tecidos pouco perfundidos (Vaala & House 2006). Esta condição é acentuada pela capacidade respiratória diminuída do neonato, caracterizada por hipoventilação, que não garante remoção eficiente do dióxido de carbono (CO2), aumentando a produção de ácido carbônico e, consequentemente, diminuindo o pH sanguíneo (Benesi 1993; Piccione et al. 2006). Para combater os desequilíbrios ácido-básico o organismo, no geral, utiliza os seguintes mecanismos: tamponamento químico pelo bicarbonato, ajuste na ventilação e excreção de íons pelos rins. Os sistemas tampão e respiratório atuam dentro de poucos minutos, mas os rins respondem lentamente ao excesso de ácido ou de base (Houpt 2006).

O sangue venoso é rotineiramente utilizado para a realização do exame hemogasométrico por ser de mais fácil colheita do que o arterial, e por oferecer resultados confiáveis nos casos de acidose metabólica (Dibartola 1992). Sucupira & Ortolani (2003) encontraram alta correlação nos valores de pH, bicarbonato e excesso de base (BE) entre sangue venoso e arterial de bovinos, indicando que o sangue venoso pode refletir precisamente o equilíbrio ácido-básico.

Além da hemogasometria, o exame clínico é fundamental para a avaliação do neonato (Feitosa & Benesi 2014). O escore Apgar avalia movimentação de cabeça após o parto, reflexos, tipo de respiração e coloração de mucosas para identificar recém-nascidos com alteração de vitalidade (Born 1981). Além disso, parâmetros vitais como frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR) e temperatura retal (TR) devem ser aferidos (Feitosa & Benesi 2014). A medida de amplitude respiratória, que reflete a expansão da caixa torácica, pode fornecer informações úteis sobre a complacência pulmonar e a capacidade do bezerro em ventilar de maneira eficaz. Além disso, o tamanho do neonato pode facilitar ou dificultar o trabalho de parto, além de dar indícios sobre a maturidade fetal, tornando a medida de comprimento de coluna outro recurso complementar à avaliação neonatal (Dantas 2015).

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi estudar bezerros concebidos por Inseminação Artificial (IA), técnica mais simples e rotineira, no que se refere à hemogasometria e exame clínico, e compará-los a neonatos concebidos por FIV e CA, de forma a avaliar se esses últimos são mais predispostos a alterações de equilíbrio ácido-básico, o que se traduziria por pior adaptação

respiratória neonatal e necessidade de intervenção terapêutica por parte do clínico, de maneira a assegurar a saúde desses animais e diminuir as elevadas taxas de mortalidade nessas categorias de neonatos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais. Foram utilizados um total de 50 neonatos, sendo 20 bezerros concebidos por Inseminação Artificial (Grupo IA, todos machos), 15 bezerros originados por Fertilização *in vitro* (Grupo FIV - 11 fêmeas e 4 machos) e 15 bezerros clones (Grupo CA - 10 fêmeas e 5 machos). Os animais do Grupo IA foram obtidos em propriedade localizada em Descalvado-SP, os do Grupo FIV de fazenda em Santa Rita de Caldas-MG e os bezerros clones foram provenientes de empresa comercial situada em Mogi-Mirim-SP. Os neonatos dos Grupos IA e FIV eram da raça Holandesa Preta e Branca (HPB) e nasceram por parto vaginal, e o Grupo CA era composto por cinco animais da raça HPB, cinco da raça Gir e cinco da raça Nelore, nascidos por meio de cesárea. Os partos foram acompanhados e ocorreram em baias ou piquetes maternidade. Os animais foram avaliados quanto a sua higidez e maturidade, sendo excluídos dos grupos aqueles que apresentaram alterações de saúde graves ou necessitaram de tratamento. Todas as vacas foram submetidas a regime semi-intensivo, com alimentação no cocho composta por silagem de milho, acesso ao pasto, sal mineral para bovinos, água *ad libitum,* além de ração concentrada utilizada em cada uma das propriedades. Utilizaram-se vacas com escore corporal entre três e quatro (Feitosa e Benesi, 2014) e excluíram-se os bezerros doentes. Após o nascimento, os bezerros foram separados da mãe e aleitados em mamadeira, recebendo colostro até as primeiras 48 horas de vida. O experimento foi realizado no período de julho de 2015 a dezembro de 2016. Este Projeto de Pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus de Botucatu, sob o protocolo 197/2014.

Avaliação Clínica e Hemogasométrica. Todos os bezerros foram acompanhados do nascimento até 48 horas de vida. No primeiro minuto pós-nascimento (p.n.) do neonato foi avaliado o Escore Apgar em escala modificada por Born (1981). Nesses primeiros momentos p.n. também foram mensurados, com auxílio de fita métrica: o comprimento de coluna, desde a articulação atlanto-occipital até a primeira vértebra coccígea e a amplitude torácica, que refletia a expansão da caixa torácica do neonato, medidas efetuadas com o animal ainda em decúbito, sendo obtido o perímetro torácico na altura da décima terceira costela, ao final da inspiração, ou seja, momento de sua expansão máxima. Foram ainda avaliados, dentro dos primeiros cinco minutos de vida do neonato, as frequências cardíaca e respiratória, e temperatura retal, conforme métodos semiológicos preconizados por Feitosa e Benesi (2014). Esse exame físico foi repetido em todos os momentos experimentais, a saber: ao nascimento, seis, 12, 24 e 48 horas p.n., nos quais também ocorreu colheita de amostra de sangue venoso para hemogasometria por punctura da veia jugular do neonato utilizando-se agulha 30X10 acoplada a seringa de 1mL previamente heparinizada. A amostra para avaliação hemogasométrica foi processada logo após a coleta em aparelho portátil analisador de pH, eletrólitos e gases sanguíneos (I-STAT®, Abbott Laboratories, Illinois, EUA). Foram utilizados cartuchos CG7+ (I-STAT®, Abbott Laboratories, Illinois, EUA) para mensuração de pH, Pressões Parciais de Oxigênio e Dióxido de

Carbono (PO_2 e PCO_2), Saturação de Oxigênio (SO_2), Bicarbonato (HCO_3), Total de Dióxido de Carbono (TCO_2) e Excesso de Bases (BE), com correção de temperatura.

Análise Estatística. Foi realizada análise de medidas repetidas no tempo (One Way Repeated Measures Anova) para comparação dos momentos de avaliação dentro de cada grupo individualmente. Também em cada momento foi realizada análise de variância para comparação dos grupos em estudo (P<0,05). Quando houve significância (P<0,05) foi realizado o Teste Tukey para comparação das médias (P<0,05). Apenas nos dados do BE, que não apresentaram distribuição gaussiana, optou-se pela análise não-paramétrica. Foi realizado o Teste de Friedman (Friedman Repeated Measures) para comparação dos momentos de avaliação dentro de cada grupo individualmente. Quando houve significância (P<0,05) foi realizado o Teste Tukey para comparação das medianas (P<0,05). Também em cada momento foi realizado o Teste de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos em estudo (P<0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na avaliação clínica e na hemogasometria dos bezerros dos diferentes grupos estão apresentados nos Quadros numerados de 1 a 11 a seguir.

Quadro 1. Médias e desvios-padrão obtidos para Escore Apgar, Amplitude Respiratória (AR) e Comprimento de Coluna (CC) dos grupos de bezerros provenientes de Inseminação Artificial (IA), Fertilização *in vitro* (FIV) e clones (CA) ao nascimento (Momento 0 horas).

Grupos	**Momento 0 horas**		
	Apgar	**AR (cm)**	**CC (cm)**
IA	7,9 ± 0,3 a	73,2 ± 5,5 b	88,0 ± 8,0 a
FIV	7,7 ± 0,4 a	81,7 ± 3,6 a	92,4 ± 4,9 a
CA	7,3 ± 0,6 b	82,1 ± 1,9 a	91,1 ± 3,7 a
P	**0,001**	**<0,001**	**0,099**

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Quadro 2. Médias e desvios-padrão obtidos para Frequência Cardíaca (FC) nos grupos de bezerros provenientes de Inseminação Artificial (IA), Fertilização *in vitro* (FIV) e clones (CA), nos diferentes momentos de avaliação (0, 6, 12, 24 e 48 horas pós-nascimento).

Momentos	**FC (bpm)**			**P**
	IA	**FIV**	**CA**	
M0	152,6 ± 35,2 aA	151,0 ± 22,0 aA	140,0 ± 13,0 abA	**0,377**
M6	152,0 ± 29,8 aA	135,2 ± 11,1 aAB	129,7 ± 14,9 bB	**0,009**
M12	145,1 ± 20,0 abA	132,4 ± 31,2 aA	149,0 ± 17,0 aA	**0,129**
M24	133,8 ± 27,2 cA	134,5 ± 14,5 aA	142,0 ± 8,6 abA	**0,428**
M48	133,8 ± 19,6cB	133,9 ± 16,2 aB	149,0 ± 17,2 aA	**0,031**
P	**0,020**	**0,108**	**<0,001**	

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Quadro 3. Médias e desvios-padrão obtidos para Frequência Respiratória (FR) nos grupos de bezerros provenientes de Inseminação Artificial (IA), Fertilização *in vitro* (FIV) e clones (CA), nos diferentes momentos de avaliação (0, 6, 12, 24 e 48 horas pós-nascimento).

Momentos	FR (mpm)			P
	IA	FIV	CA	
M0	58,4 ± 14,8 aB	57,0 ± 10,0 abB	73,0 ± 11,7 aA	**0,001**
M6	50,6 ± 15,3 aB	47,1 ± 11,1 bB	62,0 ± 9,5 abA	**0,005**
M12	59,4 ± 14,4 aA	49,7 ± 10,7 bA	57,7 ± 14,4 bA	**0,097**
M24	58,6 ± 19,2 aA	58,4 ± 20,8 abA	56,7 ± 10,3 bA	**0,947**
M48	57,6 ± 15,5 aB	64,5 ± 19,4 aAB	67,30 ± 7,6 aA	**0,016**
P	**0,141**	**0,007**	**<0,001**	

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Quadro 4. Médias e desvios-padrão obtidos para Temperatura Retal (TR) nos grupos de bezerros provenientes de Inseminação Artificial (IA), Fertilização *in vitro* (FIV) e clones (CA), nos diferentes momentos de avaliação (0, 6, 12, 24 e 48 horas pós-nascimento).

Momentos	TR (ºC)			P
	IA	FIV	CA	
M0	38,2 ± 1,2 aA	38,9 ± 0,5 abA	38,8 ± 0,8 aA	**0,063**
M6	37,8 ± 0,6 aB	38,6 ± 0,2 bA	38,4 ± 0,7 abA	**<0,001**
M12	38,2 ± 0,7 aB	38,6 ± 0,4 bA	38,2 ± 0,4 bAB	**0,036**
M24	38,3 ± 0,5 aA	38,7 ± 0,3 bA	38,5 ± 0,6 abA	**0,111**
M48	38,4 ± 0,8 aB	39,1 ± 0,5 aA	38,8 ± 0,5 aAB	**0,006**
P	**0,123**	**0,005**	**0,013**	

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Quadro 5. Médias e desvios-padrão obtidos para pH sanguíneo venoso (pH) nos grupos de bezerros provenientes de Inseminação Artificial (IA), Fertilização *in vitro* (FIV) e clones (CA), nos diferentes momentos de avaliação (0, 6, 12, 24 e 48 horas pós-nascimento).

Momentos	pH			P
	IA	FIV	CA	
M0	7,18 ± 0,12 cA	7,20 ± 0,08 cA	7,20 ± 0,06 cA	**0,684**
M6	7,27 ± 0,07 bA	7,31 ± 0,05 bA	7,28 ± 0,04 abA	**0,131**
M12	7,30 ± 0,07 abAB	7,34 ± 0,02 abA	7,26 ± 0,07 bB	**0,002**
M24	7,34 ± 0,06 abB	7,40 ± 0,06 aA	7,28 ± 0,09 abB	**<0,001**
M48	7,35 ± 0,06 aA	7,39 ± 0,03 aA	7,34 ± 0,08 aA	**0,061**
P	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Quadro 6. Médias e desvios-padrão obtidos para Pressão Parcial de Dióxido de Carbono (PCO_2) nos grupos de bezerros provenientes de Inseminação Artificial (IA), Fertilização *in vitro* (FIV) e clones (CA), nos diferentes momentos de avaliação (0, 6, 12, 24 e 48 horas pós-nascimento).

Momentos	PCO_2 (mmHg)			P
	IA	FIV	CA	
M0	62,3 ± 9,9 aA	60,6 ± 6,2 aA	60,6 ± 8,3 aA	**0,785**
M6	53,5 ± 10,4 bA	53,5 ± 6,2 bA	52,2 ± 5,7 bA	**0,880**
M12	53,3 ± 10,8 bA	51,7 ± 5,2 bcA	50,0 ± 5,6 bcA	**0,499**
M24	51,0 ± 7,9 bA	46,3 ± 5,8 dA	49,4 ± 12,1 bcA	**0,304**
M48	53,3 ± 8,0 bA	47,8 ± 3,5 cdB	46,1 ± 5,7 cB	**0,003**
P	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Quadro 7. Médias e desvios-padrão obtidos para Pressão Parcial de Oxigênio (PO_2) nos grupos de bezerros provenientes de Inseminação Artificial (IA), Fertilização *in vitro* (FIV) e clones (CA), nos diferentes momentos de avaliação (0, 6, 12, 24 e 48 horas pós-nascimento).

Momentos	PO_2 (mmHg)			P
	IA	FIV	CA	
M0	23,95 ± 6,28 aA	23,07 ± 3,26 bA	21,60 ± 2,69 aA	**0,336**
M6	23,65 ± 4,65 aA	22,33 ± 3,90 bA	21,47 ± 4,02 aA	**0,319**
M12	23,70 ± 4,54 aA	22,93 ± 3,60 bA	22,73 ± 5,39 aA	**0,801**
M24	25,15 ± 5,20 aA	24,87 ± 5,08 abA	22,47 ± 6,77 aA	**0,349**
M48	23,35 ± 4,20 aB	28,13 ±5,90 aA	21,33 ± 3,44 aB	**<0,001**
P	**0,645**	**0,004**	**0,799**	

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Quadro 8. Medianas, primeiros e terceiros percentis obtidos para Excesso de Bases (BE) nos grupos de bezerros provenientes de Inseminação Artificial (IA), Fertilização *in vitro* (FIV) e clones (CA), nos diferentes momentos de avaliação (0, 6, 12, 24 e 48 horas pós-nascimento).

Momentos	BE (mmol/L)			P
	IA	FIV	CA	
M0	-5,0 [-9,0 – -1,5] cA	-3,0 [-5,0 – -1,0] bA	-6,0 [-6,8 – -1,8] aA	**0,466**
M6	-3,0 [-4,0 – 0,0] cA	-1,0 [-2,0 – 4,5] abA	-3,0 [-4,8 – -1,0] aA	**0,053**
M12	0,0 [-2,5 – 1,5] bcAB	2,0 [0,0 – 2,0] aA	-5,0 [-6,0 – 0,0] aB	**<0,001**
M24	2,0 [0,0 – 4,0] abA	4,0 [3,0 – 4,8] aA	-5,0 [-6,5 – -2,0 aB	**<0,001**
M48	3,5 [2,0 – 7,0] aA	4,0 [2,0 – 6,0] aA	-2,0 [-4,8 – 4,0] aB	**0,004**
P	**<0,001**	**<0,001**	**0,240**	

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Quadro 9. Médias e desvios-padrão obtidos para Bicarbonato (HCO_3) nos grupos de bezerros provenientes de Inseminação Artificial (IA), Fertilização *in vitro* (FIV) e clones (CA), nos diferentes momentos de avaliação (0, 6, 12, 24 e 48 horas pós-nascimento).

Momentos	HCO_3 (mmol/L)			P
	IA	FIV	CA	
M0	22,9 ± 4,5 cA	23,6 ± 3,9 bA	22,9 ± 2,9 aA	**0,845**
M6	24,4 ± 2,8 bcAB	26,6 ± 3,6 aA	23,9 ± 2,3 aB	**0,033**
M12	25,5 ± 2,7 bA	27,7 ± 3,3 aA	22,4 ± 3,7 aB	**<0,001**
M24	26,7 ± 3,2 abA	28,0 ± 1,5 aA	22,6 ± 2,6 aB	**<0,001**
M48	29,0 ± 3,4 aA	28,4 ± 1,8 aA	24,4 ± 3,3 aB	**<0,001**
P	**<0,001**	**<0,001**	**0,235**	

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Quadro 10. Médias e desvios-padrão obtidos para Total de Dióxido de Carbono (TCO_2) nos grupos de bezerros provenientes de Inseminação Artificial (IA), Fertilização *in vitro* (FIV) e clones (CA), nos diferentes momentos de avaliação (0, 6, 12, 24 e 48 horas pós-nascimento).

Momentos	TCO_2 (mmol/L)			P
	IA	FIV	CA	
M0	24,4 ± 4,4 dA	25,3 ± 4,0 bA	24,5 ± 3,0 aA	**0,779**
M6	25,6 ± 3,2 cdA	28,0 ± 3,8 abA	25,4 ± 2,4 aA	**0,053**
M12	27,0 ± 2,7 bcA	28,9 ± 3,6 aA	23,7 ± 3,9 aB	**<0,001**
M24	28,0 ± 3,3 bA	29,4 ± 1,5 aA	24,2 ± 2,8 aB	**<0,001**
M48	30,5 ± 3,7 aA	29,6 ± 2,1 aA	25,6 ± 3,2 aB	**<0,001**
P	**<0,001**	**<0,001**	**0,337**	

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Quadro 11. Médias e desvios-padrão obtidos para Saturação de Oxigênio (SO_2) nos grupos de bezerros provenientes de Inseminação Artificial (IA), Fertilização *in vitro* (FIV) e clones (CA), nos diferentes momentos de avaliação (0, 6, 12, 24 e 48 horas pós-nascimento).

Momentos	SO_2 (%)			P
	IA	FIV	CA	
M0	25,8 ± 11,8 bA	24,0 ± 6,7 cA	20,7 ± 4,0 bA	**0,234**
M6	31,3 ± 10,1 abA	27,7 ± 10,1 bcA	25,5 ± 7,3 abA	**0,193**
M12	32,2 ± 12,2 abA	31,0 ± 8,8 bcA	28,4 ± 11,7 aA	**0,599**
M24	36,2 ± 12,3 aA	38,9 ± 13,9 abA	28,0 ± 11,3 abA	**0,053**
M48	33,3 ± 10,0 abB	42,9 ± 13,8 aA	27,3 ± 5,6 abB	**<0,001**
P	**0,008**	**<0,001**	**0,040**	

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

A primeira análise realizada imediatamente após o nascimento do bezerro foi a avaliação do escore Apgar para julgamento da vitalidade do animal. Todos os 50 neonatos utilizados nesse trabalho tiveram escore 7/8 ou 8/8, pontuações altas que indicam boa vitalidade ao nascimento. Isso porque bezerros apresentando graves alterações de saúde ou malformações foram excluídos do estudo por não sobreviverem até o momento 48 horas ou necessitarem de tratamento, o que comprometeria as avaliações. No entanto, deve-se destacar que o Grupo CA teve a menor média de escore Apgar, indicativo de menor vitalidade ao nascimento quando comparado aos outros dois grupos.

Não foram observadas diferenças entre o tamanho dos bezerros medidos pelo CC. Apesar da literatura apontar a macrossomia como alteração comum em animais oriundos de CA (Birgel et al. 2011), no presente estudo essa síndrome não foi identificada, talvez pelo fato do Grupo CA ter sido composto por neonatos de três raças diferentes, o que poderia diluir a variação de CC. A amplitude respiratória dos bezerros IA foi menor que a dos FIV e a dos CA. Tal fato pode estar relacionado a três situações: ou os animais do Grupo IA apresentaram menor expansão torácica com menor complacência pulmonar, o que não seria compatível com a clínica desses animais, que não apresentavam evidências de asfixia neonatal, ou os neonatos do Grupo IA simplesmente apresentavam tórax mais delgado do que os outros bezerros, que naturalmente apresentavam maiores circunferências por serem maiores, ou mesmo porque os Grupos FIV e CA apresentaram-se com maiores valores de AR por estarem demonstrando respiração mais profunda e dificultosa (hiperpnéia), na tentativa de compensar oxigenação deficiente. Esses dois últimos fatores seriam compatíveis com a tendência de bezerros clonados e originados por FIV (Pimenta-Oliveira 2011) por serem maiores do que aqueles obtidos por IA e apresentarem uma adaptação respiratória menos eficiente.

A temperatura retal não mostrou diferença entre grupos no primeiro momento de avaliação. Às 6 horas, o Grupo IA apresentou médias menores, sendo inclusive menores do que os valores de referência (Feitosa & Benesi 2014), indicando tendência à hipotermia. Este fato pode ser explicado pela inabilidade do neonato em manter sua temperatura em situações adversas, uma vez que esta fase experimental ocorreu no inverno, e em região geográfica com baixas médias de temperatura ambiental. Com o passar do tempo a temperatura normalizou e as médias dos três grupos tornaram-se semelhantes às 24 horas.

As demais funções vitais, FC e FR permaneceram, com variação, dentro dos intervalos de normalidade estabelecidos para bezerros neonatos (Lisboa et al., 2003; Gasparelli 2007). Todavia, foram notadas algumas diferenças entre os

grupos. Para a FC, os bezerros dos três grupos tiveram valores semelhantes ao nascimento, seguidos por tendência a queda, havendo pequena diferença de comportamento entre grupos no decorrer da avaliação, pois no momento 48 horas o Grupo CA atingiu média mais elevada que os demais. Merece destaque que no período neonatal, o controle neurológico do aparelho cardiovascular é parcial, pois a atividade nervosa simpática do miocárdio é incompleta, sendo a FC, por isso, bastante variável quando os animais são excitados, por exemplo, por estresse da manipulação (Feitosa & Benesi 2014). Esse fator pode explicar o aumento da FC nos clones, pois por tratar-se de empresa comercial e pelos bezerros serem de alto valor econômico, eram monitorados de forma mais intensiva do que os dos demais grupos. Além disso, o aumento da FC pode ser compensatório a uma baixa oxigenação decorrente de má-adaptação respiratória neonatal. A FR do Grupo CA também foi maior nos momentos zero, seis e 48 horas, mantendo-se em patamares mais elevados que nos outros grupos. Valores médios mais elevados de FR estão associados a capacidade incompleta da função respiratória pulmonar, tendo caráter compensatório. Altas médias de FC associadas a valores também elevados de FR levam a supor que a adaptação respiratória dos neonatos do Grupo CA foi menos eficiente (ou seja, mais demorada) e por isso, esses animais apresentaram FR elevada na tentativa de reverter a hipóxia instalada. Porém os resultados do exame hemogasométrico devem ser considerados para melhor análise dessa hipótese (Benesi, 1993).

Lisboa e colaboradores (2002) realizaram estudo que avaliou o efeito da idade sobre o equilíbrio ácido-básico de bezerras sadias no primeiro mês de vida. Para tal, utilizaram amostras de sangue venoso de 300 bezerras da raça Holandesa Preta e Branca distribuídas por diversos grupos etários. Dentre esses grupos, havia neonatos cujo sangue foi colhido em até 8 horas pós-parto (correspondente aos momentos zero e seis horas do presente trabalho), de oito a 16 horas p.n. (englobando o momento 12 horas), 16 a 24 horas p.n. (relacionando-se com o momento 24 horas), com dois dias de vida (associado ao momento 48 horas), entre outras faixas de idade. Assim, o referido trabalho será utilizado como referência para a discussão da maior parte dos valores do exame hemogasométrico.

O pH sanguíneo mostrou-se com valores semelhantes entre os grupos nos momentos 0 e 6 horas, porém quando comparados ao pH estabelecidos em outras pesquisas mostraram tendência a acidemia (Benesi, 1993). O fato pode ter ocorrido pois no trabalho de Lisboa e colaboradores (2002) os animais incluídos apresentavam maior intervalo de tempo de vida (0 a 8 horas), o que permitiria, em animais hígidos, possível compensação dessa acidemia. Deve ser destacado que o parto causa distúrbios na circulação sanguínea útero-placentária, promovendo acidose fisiológica, com valores do pH sanguíneo ao redor de 7,2 (Benesi, 1993; Ravary-Plumioën 2009), semelhante ao encontrado no presente estudo. Nos momentos 24 e 48 horas o Grupo FIV demonstrou maiores valores de pH, evidenciando mais rápida correção da acidose fisiológica, e no momento 48 horas os três grupos tiveram valores semelhantes de pH. É importante notar que todos os grupos tiveram valores crescentes de pH no decorrer do experimento, evidenciando a maturação do sistema respiratório e ação do sistema tampão no organismo do neonato, além de aumento da FR e FC compensatórias, de forma a manter sua homeostase.

A PCO_2, por sua vez, foi maior do que os valores estabelecidos em outros estudos para os três grupos nos momentos iniciais de vida, provavelmente

também pelo mesmo motivo proposto anteriormente: a faixa etária que compunha o grupo inicial de Lisboa et al. (2002) variava na idade de momento p.n. imediato até 8 horas e, por isso, os animais tiveram maior tempo para estabilizarem a respiração e compensarem a acidemia fisiológica quando comparados com valores obtidos em colheitas feitas logo após o nascimento. Não foi observada diferença entre grupos no que se refere a PCO_2, apenas no momento 48 horas esse parâmetro foi maior no Grupo IA, todavia permanecendo dentro dos limites de referência. Essa PCO_2 maior no Grupo IA associada à correção mais rápida do pH no Grupo FIV, detalhada anteriormente, podem ser explicadas pelo manejo da propriedade a que esses animais pertenciam, uma vez que os funcionários responsáveis pelos bezerros FIV auxiliavam o parto precocemente, devido ao receio de perda do bezerro, de maior valor econômico, por conta de parto laborioso. Ou seja, mesmo que o parto não se mostrasse distócico era auxiliado, o que aumentava sua rapidez e, consequentemente, as repercussões no equilíbrio ácido-básico desses animais eram mais brandas quando comparadas aos bezerros do Grupo IA. Em todos os grupos, os valores de PCO_2 foram diminuindo com a evolução do tempo de vida, demonstrando a adaptação respiratória dos neonatos.

O comportamento das variáveis HCO_3 e TCO_2 foi, de modo geral, semelhante, uma vez que o bicarbonato é usualmente determinado pela mensuração do TCO_2, representando este, ou seja, é equivalente a aproximadamente, 95% do total deste último parâmetro (Carlson & Bruss 2008): ocorreu semelhança no momento do nascimento entre os três grupos e o Grupo CA exibiu valores menores nos momentos 12, 24 e 48 horas. Além disso, as médias para esses parâmetros ficaram abaixo das taxas estabelecidas fisiologicamente até 12 horas para os Grupos IA e FIV e não atingiu os valores esperados com a compensação no Grupo CA. Desta forma, é importante notar a presença marcante do componente metabólico na determinação da acidose nos bezerros clonados quando comparado aos animais dos outros grupos de estudo. A variável BE, por sua vez, tem o valor de -1,5 como limite inferior e limite superior aproximado de 8 estabelecido para neonatos bovinos (Lisboa et al. 2002). No momento 0 horas, os três grupos de estudo apresentaram medianas menores que -1,5. Com a evolução do tempo p.n., os valores foram aumentando, alcançando a faixa de normalidade às 6 horas para os Grupos IA e FIV e de forma diversa no Grupo CA o valor abaixo do limite inferior persistiu até 48 horas p.n. Assim, mais uma vez, ficou evidente que o Grupo CA apresentou reserva alcalina deficiente e acidose mais acentuada que os demais grupos.

Com relação aos valores da SO_2 e PO_2 não foram observadas diferenças entre grupos pois, no geral, as alterações entre grupos na evolução dos momentos seriam demonstradas com maior fidelidade em amostras de sangue arterial, e os resultados no sangue venoso não permitiram esclarecimentos maiores por não poderem espelhar efetivamente as variações fisiológicas (Houpt, 2006).

CONCLUSÕES

Considerados os resultados obtidos para os parâmetros estudados, pode-se concluir que particularmente nos bezerros provenientes de Clonagem Animal verificou-se acidose pós-parto mais acentuada do que a acidose fisiológica esperada para neonatos, principalmente no que se refere ao componente metabólico, evidente pelas alterações em HCO_3, TCO_2 e BE quando comparados aos

demais grupos. Esse desequilíbrio refletiu em pontuação menor do escore Apgar e nas frequências cardíaca e respiratória maiores no Grupo CA. Os animais concebidos por FIV não demonstraram alterações, apenas aquelas fisiologicamente esperadas para animais recém-nascidos, similares às manifestadas pelos bezerros do Grupo IA. Assim, confirma-se a necessidade de um acompanhamento intensivo dos neonatos clones, para diagnóstico precoce dessa condição e tratamento adequado, já que os mesmos levaram mais de 24 horas para sair do quadro de acidose fisiológica esperada para o neonato bovino.

REFERÊNCIAS

BIRGEL JUNIOR, E.H.; MEIRELLES, F.V.; MAIORKA, P.C.; KUBRUSLY, F.S.; OLLHOFF, R.D. Medicina interna de bezerros clonados. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*. São Paulo. v.9. n.1. p.24-31. 2011.

BENESI, F.J. Síndrome da asfixia neonatal dos bezerros: importância e avaliação crítica. Arqs. Esc. Med. Vet. Da UFBA, v.16, p 38-48. 1993.

BLEUL, U. Respiratory distress syndrome in calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. v. 25, n.1, p.179-193. 2009.

BORN E. *Untersuchungen über den Einfluss der Schnittentbindung auf die Vitalität neugeborener Kälbe*r. Dissertation, Tierärztliche Hochschule, Hannover. 47p. 1981.

CARLSON G.P. & BRUSS M. 2008. Fluid, electrolyte and acid-base balance, p.529-559. In: Kaneko J.J. (Ed.), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th ed. Academic Press, San Diego.

DANTAS, G. N. *Maturidade pulmonar e fetal de bezerros da raça holandesa preta e branca recém-nascidos, a termo e hígidos: análise do líquido amniótico*. Dissertação. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Unesp (Botucatu). 67p. 2015.

DIBARTOLA S.P. 1992. Fluid Therapy in Small Animal Practice. *W.B*. Saunders, Philadelphia. 720p.
FEITOSA, F.L.F.; BENESI, F.J. . Semiologia de recém-nascidos ruminantes e equídeos. In*: Semiologia Veterinária*. 3 ed. São Paulo: ROCA, 2014, v. 1, p. 69-97

FEITOSA, F.L.F.; BENESI, F.J. *Semiologia de recém-nascidos ruminantes e equídeos. In: Semiologia Veterinária. 3 ed. São Paulo: ROCA,* v. 1, p. 69-97. 2014.

GASPARELLI, E.R.F. *Determinação da atividade sérica de enzimas hepáticas e da concentração de uréia, creatinina, cortisol, imunoglobulina G e dos valores hemogasométricos de bezerros da raça nelore oriundos de fertilização in vivo e fertilização in vitro.* Dissertação. Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária de Araçatuba. Unesp (Botucatu). 74p. 2007.

HOUPT T.R. 2006. Equilíbrio ácido-básico, p.147-160. In: Reece W.O. (Ed.), Dukes, Fisiologia dos Animais Domésticos. 12ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

LISBOA, J. N. et al. Efeito da idade sobre o equilíbrio ácido-básico de bezerras sadias no primeiro mês de vida. *Braz. J. vet. Res.anim.Sci.,São Paulo, v. 39, n. 3, p. 136-142, 2002.*

LISBOA, J. N. et al. Temperatura retal e frequências respiratória e cardíaca de bezerras sadias no primeiro mês de vida. Veterinária Notícias, Uberlândia, v. 9, n.2, 83-89, 2003.

MEE, J.F. Prevalence and risk factors for distocia in dairy cattle: a review. *The Veterinary Journal*. v.176. p.93-101. 2008.

PICCIONE G., COSTA A., BERTOLUCCI C., BORRUSO M., PENNISI P. & CAOLA G. 2006. Acid-base balance modifications in the lamb and goat kids during the first week of life. Small Rumin. Res. 63:304-308.

PIMENTA-OLIVEIRA, A. et al. Morbidity-mortality and performance evaluation of Brahman calves from in vitro embryo production. *BMC Veterinary Research*. v. 7:79. 2011.

RAVARY-PLUMIOËN B. 2009. Resuscitation procedures and life support of the newborn calf. Revue Méd. Vét. 160(8/9):410-419.

SUCUPIRA M.C.A. & ORTOLANI E.L. 2003. Uso de sangue arterial e venoso no exame do equilíbrio ácido-básico de novilhos normais ou com acidose metabólica. *Ciência Rural* 33(5):863-868.

VAALA W.E. & HOUSE J.K. 2006. Adaptação, asfixia e reanimação perinatais, p.266-276. In: Smith B.P. (Ed.), Medicina Interna de Grandes Animais. 3ª ed. Manole, Barueri. 1728p.

CAPÍTULO IV

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS

O presente trabalho estudou três grupos de bezerros neonatos conforme o tipo de concepção, ou seja, provenientes de IA, FIV e CA, no decorrer de suas primeiras 48 horas de vida, período crítico na vida de todo neonato (MEE, 2008; BLEUL, 2009), quando os principais mecanismos de adaptação respiratória são estabelecidos como forma de garantir função pulmonar eficiente, com correta oxigenação do animal, que, na vida intrauterina, era totalmente dependente do organismo materno por meio da circulação útero-placentária (FEITOSA E BENESI, 2014).

O primeiro artigo apresentou dados relativos ao estresse oxidativo observado nesses animais, evidenciando como principal achado que os bezerros clonados possuíam maior produção de EROs por peroxidação lipídica, o que levou ao aumento nas dosagens de TBARS (SILVA e GONÇALVES, 2010; SILVA et al., 2012) e que este fator foi associado a menor atividade de SOD nesse grupo. Adicionalmente, os neonatos concebidos por meio da FIV tiveram maiores atividades de enzimas antioxidantes como a Catalase e a GSH-Px, decorrente de maior produção de peróxido de hidrogênio ou por uma resposta enzimática mais eficiente (MUTINATI et. al, 2014). Os bezerros do Grupo IA mostraram maiores valores para o Grupo Tióis Reduzidos (glutationa reduzida). Assim, nesse primeiro artigo evidenciou-se maior estresse oxidativo em bezerros concebidos por FIV e por Clonagem, porém os animais FIV conseguiram responder de forma mais eficiente frente a essa condição.

No segundo artigo, que versou sobre a avaliação clínica e hemogasométrica desses mesmos três grupos de animais, evidenciou-se que bezerros provenientes de CA apresentam acidose patológica pós-parto mais demorada do que a acidose mista fisiológica esperada para neonatos (BENESI, 1993), que ficou caracterizada pela diminuição significativa nos valores de HCO_3 e BE quando comparados aos valores dessas determinações nos demais grupos. Esse desequilíbrio, definido como acidose respiratória não compensada, provavelmente levou ao achado de valores menores do escore

Apgar e nos maiores de frequências cardíaca e respiratória dos clones. Os animais provenientes de FIV não demonstraram alterações, apenas aquelas fisiológicas esperadas para animais recém-nascidos, similares às manifestadas pelos bezerros do Grupo IA.

A partir do exposto e, considerando os achados evidenciados nos dois artigos, pode-se afirmar que, no geral, tanto neonatos nascidos por FIV como aqueles clonados apresentam alterações na comparação com bezerros concebidos por IA no que se refere ao estresse oxidativo, sendo essas claramente marcantes no Grupo CA, e que apenas os bezerros clonados apresentam distúrbios acentuados quando avaliados por exames clínico e hemogasométrico. Baseado nestes fatos pode-se afirmar que bezerros clonados têm adaptação respiratória prejudicada e mais tardia.

Birgel et al. (2011), em compilação sobre as alterações apresentadas até os 30 dias por neonatos bovinos clonados, descreveram que alterações placentárias nessas gestações podem culminar com pior adaptação respiratória neonatal nesses conceptos pois foi comprovado, por meio de achados cardiotocográficos, que a instalação da hipóxia se fazia no meio intra-uterino nesses casos (NUNES, 2009). Deve-se ressaltar ainda que anomalias umbilicais são frequentes nesses animais, e elas estavam presentes na maioria dos animais do Grupo CA, confirmando os achados de Birgel et al. (2011). Essa onfalopatia é caracterizada por aumento na espessura do cordão umbilical, e pode ocorrer como resposta aos distúrbios hipóxicos placentários, com o objetivo de melhorar a circulação materno-fetal para compensar a baixa oxigenação. Também foi observado que os placentomas das gestações de bezerros clonados apresentavam-se em menor número, heterogêneos e com maior tamanho, causando provável deficiência circulatória e contribuindo para pior oxigenação do feto. Essa hipóxia estaria associada ao sofrimento fetal, resultaria em acidose e estresse oxidativo mais pronunciados, compatíveis com achados do presente estudo. Além disso, nessa mesma revisão, foram enumerados distúrbios cardio-respiratórios, identificados por meio de ecocardiograma (POGLIANI, 2010), tais como comunicação inter-atrial, insuficiências valvares e hipertrofia de miocárdio, que potencialmente comprometem a oxigenação do sangue dos bezerros clonados e que só são identificados, muitas vezes, em exames *pós-mortem*, com o óbito, em geral,

ocorrendo após as 48 horas de vida. Assim, esses distúrbios da organogênese não seriam identificados no presente trabalho, mas poderiam contribuir para os achados decorrentes do estado de asfixia.

Dessa maneira, as alterações citadas contribuem para a existência da função respiratória prejudicada observada nesses animais clonados e poderiam justificar os resultados encontrados nesta pesquisa. Diante destes fatos, sugere-se realização de acompanhamento intensivo desses neonatos clonados para estabelecimento de diagnóstico precoce da má-adaptação respiratória e tratamento, baseado na oxigenioterapia e reposição de bicarbonato, e monitoramento através do exame clínico e hemogasométrico. São necessários estudos adicionais para que se avaliem os efeitos benéficos da instituição de terapia antioxidante tanto nas vacas receptoras que gestam esses animais, como nos próprios neonatos, de forma a equilibrar o estresse oxidativo que os clones apresentam, conforme foi demonstrado nesta pesquisa. De forma geral, todas as alterações identificadas nesse estudo tornaram-se mais brandos com o decorrer do tempo de vida, indicando provável evolução positiva na maturação neonatal desses recém-nascidos.

Diante do exposto, pode-se concluir que, no que tange a saúde respiratória, os animais provenientes de IA foram os que apresentaram melhor adaptação neonatal, seguidos pelos recém-nascidos concebidos por FIV. Já os bezerros clonados apresentaram maiores alterações de estresse oxidativo e de equilíbrio ácido-básico nas primeiras 48 horas de vida. Sendo assim, conforme dito anteriormente, faz-se necessário o acompanhamento intensivo desses animais nesse período inicial de vida.

BIBLIOGRAFIA

BELLOWS, R.A., LAMMOGLIA M.A. Effects of severity of dystocia on cold tolerance and serum concentrations of glucose and cortisol in neonatal beef calves. *Theriogenology.* 53, 803–813. 2000.

BENESI, F. J. Síndrome asfixia neonatal dos bezerros: importância e avaliação crítica. Arqs. Esc. Med. Vet. da UFBA, v.16, n.1, p38-48, 1993.

BERGER, R, GARNIER, J. Perinatal brain injury. *J Perinatol Med* v. 28, p. 261–285. 2000.

BLEUL, U. Respiratory distress syndrome in calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* v. 25, n.1, p.179-193. 2009.

BRISVILLE, A.C. et al. Respiratory Disease in Neonatal Cloned Calves. *J Vet Intern Med.* v. 25, p. 373–379. 2011.

BUONOCORE, G.; PERRONE, S.; TATARANNO, M.L. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. v.15, p. 186-190, 2010.

BURTON, G.J.; JAUNIAUX E. Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology.* v.25, p. 287–299, 2011.

COMHAIR, S.A.A.; ERZURUM, S.C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, v.283, p.L246-L255, 2002.

DEATON, C.M. et al. Antioxidant supplementation in horses affected by recurrent airway obstruction. *Journal of Nutrition*, v.134, p.2065S-2067S, 2004.

FEITOSA, F.L.F.; BENESI, F.J. Semiologia de recém-nascidos ruminantes e equídeos. In: *Semiologia Veterinária.* 3 ed. São Paulo: ROCA, v. 1, p. 69-97. 2014.

FERRO et. al. Arterial blood gas analysis in 53 racehorses with a diagnosis of small airway inflammatory disease (SAID). *J. Equine Vet. Sci.,* v.22, n.4, p.165-168, 2002.

GEORGESON G.D. Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via caesarean section. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. v. 103, p. 136–139. 2002.

GITTO, E. Oxidative stress in resuscitation and in ventilation of newborns. *Eur Respir J*. v. 34, p. 1461–1469. 2009

GONÇALVES, R.C.; FEITOSA, F.L.F. Semiologia do sistema respiratório de grandes animais. In: *Semiologia Veterinária.* 3 ed. São Paulo: ROCA, v. 1, p. 263-276. 2014.

GOUVÊA, L.V. *Análise hemogasométrica arterial e venosa de ovinos submetidos à transposição carotídea e indução de desequilíbrios ácido básicos.* Dissertação de Mestrado em Saúde Animal, Universidade Federal de Brasília, Brasília, 49p. 2009.

GUZELBEKTES, H. et al. Prevalence of gastroesophageal reflux disease in premature calves. *J Vet Intern Med* 26, 1051–1055. 2012.

HATFIELD, P.G. et al. Role of supplemental vitamin E in lamb survival and production: a review. *J Anim Sci* 77, 1–9. 2000.

JUNIOR, E.H.B. et al. Medicina interna de bezerros clonados. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*. São Paulo. v.9. n.1. p.24-31. 2011.

KINNULA, V.L. Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway disease. *Thorax*, v.60, p.693-700, 2005.

KIRSCHVINK, N. et al. Effect of chronic airway inflammation and exercise on pulmonary and systemic antioxidant *status* of healthy and heaves-affected horses. Eq Vet J 34, 563–571. 2002.

KIZIL, O., YUCE, A. Oxidative stress in dogs with coccidiosis. *Revue Med* 160, 495–499. 2009.

LOMBARD, J.E. Impacts of dystocia on health and survival of dairy calves. *J Dairy Sci* 90, 1751–1760. 2007.

MAPA. *Ministério da Agricultura e Pecuária: Bovinos e Bubalinos.* 2014. http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos. Acesso em 01 de novembro de 2014.

MEE, J.F. Prevalence and risk factors for distocia in dairy cattle: a review*. The Veterinary Journal.* v.176. p.93-101. 2008.

MEIRELLES, F.V. et al. Desafios para clonagem comercial - planejando o futuro. *Acta Sicientiae Veterinariaes*. v. 34, p.235-242, Supl.1. 2006.

MOTA, I.L.; QUEIROZ, R.S. Distúrbios do equilíbrio ácido básico e gasometria arterial: uma revisão crítica. *Revista Digital – Buenos Aires*, v.14, n.141, 2010.

MUTINATI, M. et al. Oxidative Stress During Pregnancy in the Sheep. *Reprod Dom Anim*. v.48, p.353–357, 2013.

MUTINATI, M. et al. Oxidative stress in neonatology: a review. *Reproduction in domestic animals.* v. 49, p.7–16. 2014.

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

ORTOLANI, E.L. Diagnóstico e tratamento de alterações ácido-básicas em ruminantes. *In: Anais Eletrônicos do Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil*, Porto Alegre, 2003.

PANARACE, M. et al. How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. *Theriogenology*. v. 67, p. 142-151, 2007.

PEIRÓ, J.R.; et al. Use of I-STAT to determine blood gas, electrolytes, and hematocrit in wholw-blood samples from cattle, horses and sheep. *Am. J. Vet. Res.* v.71, n.5, p.323-332. 2010.

PICCIONE, G. et al. Acid-base balance modifications in the lamb and goat kids during the first week of life. *Small Rumin Res.* v.63, n.3, p.304-308. 2006.

PIMENTA-OLIVEIRA, A. et al. Morbidity-mortality and performance evaluation of Brahman calves from *in vitro* embryo production. *BMC Veterinary Research.* v. 7:79. 2011.

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

RAHMAN, I. et al. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *European Journal of Pharmacology*, v.533, n.1-3, p.222-239, 2006.

REY-SANTANO, C. et al. Early cerebral hemodynamic, metabolic, and histological changes in hypoxic ischemic fetal lambs during postnatal life. *Front Neurosci.* 2011.

ROGERS M.S. et al. Lipid peroxidation in cord blood at birth: the effect of labour. *BJOG* v. 105, p. 739–744. 1998

SAUGSTAD, O.D. Oxidative stress in the newborn. A 30-year perspective. *Biol Neonate.* v. 88, p. 228–236. 2005.

SCHUIJT, G. Iatrogenic fractures of ribs and vertebrae during delivery in perinatally dying calves: 235 cases (1978–1988). *J Am Vet Med Assoc* 197, 1196–1202. 1990.

SILVA, A.A., GONÇALVES, R.C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. *Ciência Rural. v.*40, n.4, p.994-1002, 2010.

SILVA, A.A. et al. Effect of percutaneous transthoracic lung biopsy on oxidative metabolism in sheep. *Journal of the South African Veterinary Association*, v. 83, p. 1-5, 2012.

SORDILLO, L.M.; AITKEN, S.L. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.128, p.104–109, 2009.

VALKO M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.39, p.44-84, 2007.

VIEIRA, R.J. Biotécnicas aplicadas à Reprodução Bovina: generalidades. *Ciência Animal.* 22(1): 55-65, 2012 – Edição Especial. 2012.

YAACOBI N. et al. Reactive oxygen species in the process of labor. *Arch Gynecol Obstet.* v. 263, p. 23–24. 1999.