

## Clinical disorders observed during the first 30 days of life of cloned Zebu calf

Eduardo Harry Birgel Junior<sup>1</sup>, Flávio Vieira Meirelles<sup>1</sup>, Eliza Rossi Komninou<sup>2</sup>, Mariana Tikuma Nunes<sup>2</sup>, Fábio Celidonio Pogliani<sup>2</sup>, Paulo Fantinato Neto<sup>2</sup>, Melina Marie Yasuoka<sup>2</sup>, José Rodrigo V. Pimentel<sup>1</sup>, Flávia Saldanha Kubrusly<sup>3</sup> & Maria Angélica Miglino<sup>2</sup>

### ABSTRACT

**Background:** The advent of animal cloning from embryos reconstructed with nuclei from cells at different stages of differentiation has been responsible for the appearance of several anomalies in calves, with some alterations diagnosed during pregnancy and others after the birth of cloned animals. Despite efforts over the past five years, the rate of mortality after the birth of cloned calves is still high, at about 50%. Below is reported the research experience gained at the University of São Paulo in the period from 2005 to 2010, related to the birth of cloned calves from Nellore.

**Review:** Research showed that cloned calves present cardiopulmonary disorders characterized by tachycardia with episodes of arrhythmia with bradycardia, increase in the 1<sup>st</sup> heart sound, presence or absence of heart murmurs in the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> heart sound associated with dyspnea, breathing harsh and crackling dry, moist and crackling. During the first days of life of cloned calves that died, ultrasound examination demonstrated the presence of concentric hypertrophy congenital cardiac and turbulent flow at the foramen of botal towards the right heart to left heart, indicating reversal of blood flow to the pattern observed in fetal life. As a result, mixture of arterial and venous blood occurs, compromising the ability of oxygen to the blood of cloned calves. The occurrence of macrosomia was observed in 20.9% of Nellore calves. It is believed that this syndrome is associated with disorders of carbohydrate metabolism in the placenta and/or fetus, leading to fetal gigantism, which mimicks excessive fetal growth seen in pregnant women with diabetes. We observed the occurrence of moderate to severe normocytic and normochromic anemia, with the anemia gradually appearing from 12 h of life onwards, reaching its maximum intensity at the end of the first week, to start a gradual recovery to normal values from the 15<sup>th</sup> day of life. The anemia observed in cloned calves was ferropriva, as such animals showed a significant decrease in serum iron levels associated with decreased transferrin saturation index (STI). Umbilical anomalies occurred in most clones. There was an increase in the thickness of the umbilical cord, which hindered its spontaneous rupture at birth. The umbilical arteries did not undergo retraction into the abdominal cavity, leaving them exposed in the remnant of the umbilical cord. In the first three days after birth, strong pulse of these arteries was noted in umbilical cord, making it necessary to use clamps on the arteries in order to prevent bleeding. There were also intra-abdominal hematomas involving the arteries and the urachus. Between 15 and 20 days of life, it was observed the occurrence of alopecia in about 75.0% of the calves, whose origin may be related to disturbances in the synthesis and absorption of vitamins, since the supplementation of calves with ADE vitamin complex decreased symptoms.

**Conclusion:** The results confirm the occurrence of serious cardiopulmonary disorders characterized by tachycardia, hyperphosesis, presence of heart murmurs in the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> heart sounds, episodes of arrhythmia and bradycardia associated with dyspnea, rales, and coarse breath. As a result of the non-closure of the foramen of Botal and the Ductus Arteriosus, arterial and venous blood a mix, compromising the oxygen carrying capacity in the blood of cloned calves. There was also the occurrence of macrosomia, hypoglycemia, hypothermia, abnormal umbilical structures, anemia and alopecia.

**Keywords:** Cloned calf, somatic cell nucleartransfer (SCNT), bovine, disease, cardiopulmonary disorders.

**Descritores:** bezerros clonados, transferência nuclear de células somáticas (TNSC), bovinos, doença, distúrbios cardiopulmonares.

<sup>1</sup>Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo (USP), Campus da USP – Pirassununga, SP, Brazil. <sup>2</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP. <sup>3</sup>Centro de Biotecnologia - Instituto Butantan, São Paulo, SP. CORRESPONDENCE: E.H. Birgel Junior [ehbirgel@usp.br - TEL: + 55 (19) 3565-4000]. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Campus da Universidade de São Paulo (USP), Av. Duque de Caxias Norte n. 225. CEP 13635-900 Pirassununga, SP, Brazil.

## I. INTRODUÇÃO

### II. DISTÚRBIOS PLACENTÁRIOS E OCORRÊNCIA DA HIPÓXIA INTRA-UTERINA

### III. DISTÚRBIOS DA ADAPTAÇÃO NEONATAL DO BEZERRO CLONADO

### IV. DISTÚRBIOS CARDIOPULMONARES NOS BEZERROS CLONADOS

### V. MACROSSOMIA/SÍNDROME DO BEZERRO GRANDE

### VI. OCORRÊNCIA DE ANEMIA

### VII. ANOMALIAS NAS ESTRUTURAS UMBILICAIS, DEFORMIDADES FLEXURAIS E ALOPECIA

### VIII. CONCLUSÕES

#### I. INTRODUÇÃO

O advento da clonagem de animais a partir de embriões reconstruídos com núcleos provenientes de células em diferentes estágios de diferenciação tem sido responsável pelo aparecimento de diversas anomalias nos bezerros, sendo algumas alterações diagnosticadas durante a gestação e outras após o nascimento de animais clonados [29].

Uma grande mortalidade pré e peri-natal de bezerros foram demonstradas como resultado da produção *in vitro* [18,39], da transferência nuclear de células embrionárias [7,26,44] e da clonagem a partir de células somáticas [2,10,23,29].

Farin *et al.* [14] propôs sistema de classificação das alterações observadas durante a gestação de clones apresentado a seguir:

TIPO 1- Desenvolvimento anormal com morte do embrião ou do concepto (reabsorção embrionária) antes da organogênese completa (até aproximadamente 42 dias de gestação).

TIPO 2 - Desenvolvimento anormal de membranas placentárias e do feto; com morte fetal e abortamento entre a fase de completa diferenciação de órgãos e o término da gestação (de 42 a 280 dias de gestação).

TIPO 3 - A gestação chega ao termo, o feto e/ou a placenta possuem severas anormalidades de desenvolvimento e não há evidência de resposta compensatória do feto ou placenta. A saúde dos neonatos está severamente comprometida, com alterações clínicas, de parâmetros hematológicos e bioquímicos; a morte ocorre entre a hora do parto ou durante o período neonatal.

TIPO 4 - A gestação chega ao termo e tanto o feto quanto a placenta possuem alterações modera-

das; entretanto ocorrem compensações feto-placentárias e adaptações que fazem com que o animal sobreviva apesar dos distúrbios genéticos e fisiológicos. Os neonatos podem ter tamanho normal ou serem maiores do que a média da raça, podendo ter alterações clínicas e de parâmetros hematológicos e bioquímicos.

Apesar dos esforços realizados nos últimos cinco anos, a taxa de mortalidade pós-nascimento dos bezerros clonados é ainda grande, cerca de 50%, tornando necessários estudos mais aprofundados em neonatologia dos bovinos. O objetivo desses estudos deve ser esclarecer a patogenia e desenvolver tratamentos eficientes para essas enfermidades, sendo fundamental o desenvolvimento de metodologia de diagnóstico que permita uma melhor avaliação das alterações observadas no sistema cardiopulmonar dos bezerros clonados, bem como o estabelecimento de valores de referência que possam ser utilizados na interpretação dos resultados obtidos. A seguir será relatada a experiência acumulada em pesquisas realizadas na Universidade de São Paulo, no período de 2005 a 2010, relacionadas ao nascimento de bezerros clonados da raça Nelore.

#### II. DISTÚRBIOS PLACENTÁRIOS E OCORRÊNCIA DA HIPÓXIA

Apesar dos relatos sobre perdas fetais precoces durante a clonagem devido a alterações no ambiente uterino materno, falhas na interação materno-fetal ou a anormalidade do embrião [2,20] aceita-se, atualmente, que o desenvolvimento e sobrevivência fetal, durante a gestação de clones, dependem da morfologia apropriada e desenvolvimento funcional da placenta. Estudos indicam que a causa dessas perdas está associada a um desenvolvimento anormal da placenta, possivelmente devido ao crescimento inapropriado da membrana alantóide em decorrência da falta de vascularização nos estágios iniciais do desenvolvimento [43]. Distúrbios na expressão da VEGF – fator responsável pela permeabilidade vascular e neo-vascularização da placenta foram descritos em placentas de clones [8]. Estruturalmente existe desorganização das “árvores vilosas” fetais, presença de mais de uma artéria-tronco por vilo, ramificação vascular deficiente e dilatações anormais das criptas endometriais [32]. Durante a gestação as seguintes disfunções placentárias foram relatadas: diminuição do número de placentônios, presença de

placentônios gigantes, presença de microcotiledones acessórios com diâmetro menor do que 1,0 cm, extensas áreas na membrana corioalantóide desprovidas de placentônios, edema das membranas placentárias, aumento na espessura do cordão umbilical e formação de hidroalantóide [9,23,26,32]. A insuficiência placentária culmina na ocorrência de perdas fetais durante a fase gestacional, alterações congênitas nos neonatos, complicações peri e pós natais, sofrimento fetal crônico e agudo e alta taxa de mortalidade neonatal. Em consequência a esse sofrimento fetal/ hipóxia intra-uterina, nota-se com frequência o tingimento dos fetos por mecônio [4,5]. Nunes [33] observou hipóxia/ sofrimento fetal em 55,5% (5/9) dos animais clonados estudados, sendo que Batchelder *et al.* [2] correlacionaram a ocorrência de bezerros clonados tingidos de mecônio com a maior incidência de mortalidade nas primeiras horas de vida.

Apesar da avaliação da vitalidade fetal por meio da cardiotocografia, já serem utilizados há muito tempo na medicina, como método de rotina, verifica-se que na veterinária o seu uso ainda é limitado, havendo poucas pesquisas sobre o tema [12,19,21,22]. Esse exame possibilita a avaliação do bem estar fetal e/ou avaliação da vitalidade fetal e é extremamente importante no seguimento das gestações de alto risco, principalmente nas que cursam com insuficiência placentária [17], sendo o seu principal objetivo a detecção precoce da hipoxemia fetal.

Ao avaliar as características que compõem a cardiotocografia (linha de base, variabilidade, presença de acelerações transitórias e desacelerações), separadamente, Nunes [33] constatou que os clones tingidos de mecônio e que morreram nas primeiras horas de vida apresentavam com mais frequência bradicardia e o número de acelerações transitórias era significativamente menor do que o observado nos grupos que não estavam em sofrimento fetal. A presença de bradicardia fetal é sinal de sofrimento fetal em ruminantes [12], enquanto a presença de acelerações transitórias é um dos mais importantes indicadores de bem-estar fetal para humano [28,31] e ruminantes [21,22]. Nunes [33] relacionou o menor número de acelerações transitórias da frequência cardíaca, observadas no grupo de clones que morreram nas primeiras 36 horas de vida, à diminuição do bem

estar fetal decorrente da má oxigenação do feto.

Segundo Nunes [33] os fetos do grupo de clones mortos tiveram uma maior ocorrência de momentos de hipoatividade e inatividade fetal do que os fetos do grupo de clones vivos e fetos do grupo controle. A estimulação dos fetos hipoativos por meio de beliscamento das extremidades, durante exame de palpação retal, evidenciou que os fetos do grupo de clone mortos foram classificados com maior frequência como não reativos do que os fetos do grupo controle.

Os resultados obtidos na Dissertação de Mestrado de Nunes [33] são compatíveis com a ocorrência de sofrimento fetal/ hipóxia intra-uterina, de grau variável nos últimos 90 dias de gestação. A gravidade da hipóxia intra-uterina explicaria a evolução do quadro clínico dos bezerros:

- hipóxia intra-uterina grave nos clones tingidos de mecônio com índice APGAR menor do que 3 ao nascimento e morte nas primeiras 36 h de vida decorrentes a alterações cardiopulmonares incompatíveis com a vida extra uterina;

- hipóxia intra-uterina de pequena intensidade ou oxigenação intra-uterina normal nos clones que apresentaram índice APGAR entre 7 e 8 ao nascimento e que sobreviveram.

Face as disfunções placentárias, tem-se recomendado, frequentemente, que o nascimento dos clones seja feita por meio de cesariana. Em gestações de bezerros clonados da raça Nelore tem-se optado pela realização de cesariana entre 290 a 292 dias de gestação (gestação do Nelore dura, em média 10 dias a mais do que na raça Holandesa), sendo utilizado o seguinte protocolo de indução: 8 mg de triancinolona aplicada por via intra-muscular 7 dias antes da cesariana, 20 a 25 mg de dexametasona aplicada por via intra-venosa 36 h antes da cesariana associado a 500 ug de prostaglandina F2 $\alpha$  aplicada por via intra-muscular 24 h antes da cesariana. Apesar de realizar-se a cesariana antes do início da parição ou nas primeiras horas da fase de dilatação do parto, recomendou-se o uso de relaxante uterino (50 mg de cloridrato de isoxsuprine aplicado por via intra-venosa no início da intervenção cirúrgica), pois os bezerros clonados estavam mais predispostos a asfixia neonatal precoce uma vez que as disfunções placentárias podem determinar importantes variações

de oxigenação no feto mesmo que as contrações uterinas não sejam intensas [5,30]. Após pesquisa realizada por Nunes [33], na qual foi demonstrado que nas últimas 24 h antes da cesariana havia maior ocorrência de hipoatividade fetal, tem-se recomendado que a indução seja feita sem o uso da prostaglandina F2 $\alpha$ , pois esta droga determina que o parto ocorra nas entre 24 e 28 h após o seu uso, ou seja, no momento da realização da cesariana já existiriam contrações uterinas que poderiam diminuir a oxigenação do feto.

### III. DISTÚRBIOS DA ADAPTAÇÃO NEONATAL DO BEZERRO CLONADO

Durante o processo de nascimento, no momento da separação do cordão umbilical do feto, várias funções fisiológicas anteriormente suportadas pela mãe através da placenta devem ser assumidas pelo neonato a fim de assegurar a sua sobrevivência [3]. Dentre essas funções cabe particular destaque as desempenhadas pelo sistema cardiopulmonar, pois imediatamente após o delivramento, ocorrem profundas modificações na circulação sanguínea, passando a ser dos vasos pulmonares a responsabilidade pela adequada oxigenação do sangue. Esse aumento da oxigenação sanguínea é responsável pelo fechamento do duto arterioso. Afora o aumento na oxigenação sanguínea, ao inflar seus pulmões, o neonato diminui a resistência na rede capilar pulmonar determinando o aumento do fluxo de sangue para os pulmões, aumento do volume de sangue que retorna para o átrio esquerdo e, como conseqüência, aumento da pressão no lado esquerdo do coração. A maior pressão do sangue no átrio esquerdo faz compressão sobre o forâmen oval e promove o seu fechamento impedindo a mistura de sangue arterial e venoso [35]. Falhas nessa adaptação neonatal a vida extra-uterina estão freqüentemente associadas a grandes taxas de morbidade e mortalidade em bezerros [3,40]. Verifica-se, em bezerros clonados, que essa adaptação está particularmente afetada, sendo comumente observado prostração, letargia, ausência do reflexo de sucção e eliminação do mecônio nos primeiros 15 minutos de vida. Em decorrência aos distúrbios de oxigenação nesses animais, observa-se alterações como diminuição da pO<sub>2</sub> e aumento da pCO<sub>2</sub>, circulação preferencial para órgãos vitais e glicólise anaeróbica em órgãos não vitais, aumento da lactacidemia e acidose metabólica, em qua-

dro similar ao descrito na asfixia neonatal [3].

Baseado no exame clínico, nas avaliações do APGAR, realizadas ao nascimento e aos 5 minutos de vida, nos resultados da hemogasometria e nos achados de necropsia foi possível caracterizar quatro tipos de quadro clínicos nos bezerro clonados [4,5]:

Grupo 1 - bezerros que apresentavam APGAR ruim (0 a 3 pontos), sinais de acidose na hemogasometria e morte na primeira hora de vida; durante a necropsia constatava-se que esses distúrbios estavam associados a má-formação do coração ou outros órgãos (fígado e rim), sendo essa condição incompatível com a vida;

Grupo 2 - bezerros que apresentavam APGAR ruim (0 a 3 pontos) sinais de acidose respiratória e mista na hemogasometria, sendo nesses animais diagnosticado asfixia neonatal precoce; alguns sobreviviam e outros morriam;

Grupo 3 - bezerros que apresentavam APGAR bom (7 ou 8 pontos), mamavam colostro, permaneciam em estação e a partir de 12 a 24 h após o parto desenvolviam quadro de hipóxia que culminava com a morte entre 24 e 48 h de vida;

Grupo 4 - bezerros que nasciam com APGAR bom (7 ou 8 pontos), apresentavam hemogasometria compatível com o de animal saudável e permaneceram vivos.

As falhas na adaptação neonatal à vida extra-uterina observada nos animais que desenvolveram quadro de hipóxia entre 12 e 24 h de vida (grupo 3) apresentam características diferentes daquelas descritas na asfixia neonatal precoce ou tardia. As altas taxas de mortalidade nos bezerros do grupo 3, bem como os distúrbios cardiopulmonares diagnosticados nesses bezerros parecem estar associadas a existência de sofrimento fetal/ hipóxia crônica durante a vida intra-uterina e não somente a sofrimento fetal durante o processo de parição e/ou a falta primária de surfactante .

### IV. DISTÚRBIOS CARDIOPULMONARES NOS BEZERROS CLONADOS

Recentemente, descreveu-se a ocorrência de hipertensão pulmonar persistente em bezerros clonados a partir da transferência nuclear de células somáticas adultas [9,41]. A hipertensão pulmonar é uma condição patológica observada em associação à existência de doenças cardíacas, sistêmicas, do

parênquima pulmonar ou da vasculatura pulmonar que determinam surgimento de disfunção do endotélio pulmonar expresso por vasoconstrição, inflamação e trombose [38]. Entre os diversos fatores que podem estar relacionados à ocorrência de hipertensão pulmonar devem ser, ainda, destacados a aspiração de mecônio durante o parto e os quadros de hipóxia persistentes observados em animais criados em altitudes elevadas [35].

Associado a essa hipertensão pulmonar, pesquisas realizadas na Universidade de São Paulo evidenciaram, em bezerros clonados, distúrbios cardiopulmonares caracterizados por taquicardia com episódios de arritmia com bradicardia, reforço de 1ª bulha, presença ou não de sopros cardíacos na 1ª e 2ª bulha associados a dispnéias, respiração rude e estertores secos, úmidos e crepitantes [4,5,34]. Em nenhum dos animais examinados foi observado sinais de insuficiência cardíaca (prova de repleção da jugular negativa, ausência pulso venoso patológico e/ou edema na entrada do peito) ou aumento da área de projeção do coração detectáveis por meio da percussão do tórax. As alterações cardiopulmonares foram confirmadas nos exames anatomopatológicos, pois encontrou-se persistência do forâmen oval (forâmen de Botal) em 46,1%, hipertrofia excêntrica de miocárdio ventricular em 15,3%, persistência do duto arterioso em 7,6%, congestão pulmonar em 23%, enfisema pulmonar, atelectasia e edema em 100 % dos bezerros necropsiados [37].

Em bezerros clonados que morreram nos primeiros dias de vida verificou-se por meio de exame ultra-sonográficos realizado nas primeiras horas de vida, aumento da espessura da parede ventricular não associada ao aumento de volume da câmara, e conclui que os bezerros apresentavam hipertrofia congênita concêntrica de miocárdio [34]. Nesses bezerros constatou-se fluxo turbulento sistólico no interior do átrio direito, indicando a existência de insuficiência da valva tricúspide, sendo essas alterações compatíveis com a ocorrência de hipertensão da artéria pulmonar. Essa hipertensão deve ser considerada como secundária a ocorrência da miocardiopatia hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo [34]. Após o nascimento o quadro de hipertensão seria agravado pela presença de dispnéia/ insuficiência respiratória e pela produção inadequada e/ou consumo do surfactante pulmonar. Afora isso as avaliações ultra-sonográficas dos bezerros clonados tem

evidenciado, nas primeiras 24 horas, fluxo turbulento no forâmen de botal no sentido do coração direito para o coração esquerdo, indicando reversão da circulação sanguínea para padrão observado na vida fetal. Em consequência desse processo ocorre mistura de sangue arterial e venoso, comprometendo a capacidade de oxigenação do sangue dos bezerros clonados [5,30]. Em amostras colhidas no 3º e 4º dia de vida, observou-se valores de PO<sub>2</sub> no sangue arterial que variaram entre 50 e 70 mmHg.

No grupo de bezerros clonados que sobreviveram observou-se que o fechamento funcional do forâmen oval em bezerros nelore demorava de 7 a 10 dias nos clones enquanto nos animais controle esse fechamento ocorria entre 4 e 7 dias [34]. Afora isso, foram encontradas alterações que permitem supor que o coração dos clones durante o primeiro mês de vida passa por processo de crescente sobrecarga, com aumento de débito cardíaco que determinaria na evolução clínica dos casos uma hipertrofia excêntrica do miocárdio e dilatação do átrio direito. Adaptações orgânicas as disfunções cardíacas como a dilatação do átrio direito seriam compatíveis com a existência de hipertensão da artéria pulmonar [1], sendo esta alteração no grupo dos clones vivos indicativa de aumento da pressão da artéria pulmonar.

Para o tratamento da hipóxia recomenda-se a oxigenioterapia, fornecido por meio de cateter intranasal no volume de 5 litros de O<sub>2</sub> por minuto durante a primeira semana de vida do bezerro [5,30]. A oxigenioterapia deve ser instituída imediatamente após o nascimento. Além do benefício direto na redução dos efeitos relacionados à hipóxia como glicólise anaeróbica, aumento da lactacidemia e acidose metabólica [3], a oxigenioterapia seria importante estímulo para fechamento do duto arterioso, melhorando a condição geral do bezerro. O fechamento funcional do canal arterial no recém-nascido humano a termo ocorre com 12 a 15 h de vida, sendo o aumento da elevação da PO<sub>2</sub> no sangue arterial considerado importante fator para a constrição do duto arterioso [27]. Após a instituição de oxigenioterapia adequada nos bezerros clonados e a sua manutenção nos primeiros sete dias de vida, a incidência de sopros cardíacos de 1ª e 2ª bulha, relacionados a persistência do duto arterioso, foram menos frequentemente por nós diagnosticados.

Apesar do distúrbio cardiopulmonar do clone não ser primariamente associado deficiência de

surfactante decorrente da imaturidade pulmonar, existe a possibilidade de ocorrer consumo do surfactante ou produção inadequada durante a vida neonatal. A administração de 300 a 1000 mg surfactante por via intra-traqueal, nas primeiras horas de vida, utilizando uma agulha de 26 G determinou um significativo aumento da  $PO_2$  do sangue arterial. Seis h após a aplicação do surfactante observou-se nos animais tratados  $PO_2$  do sangue arterial igual a  $127 \pm 11.06$  mmHg e nos animais não tratados valores iguais a  $57.2 \pm 5.77$  mmHg. Entretanto, não foi observado qualquer efeito da administração de surfactante nos valores da  $PO_2$  do sangue arterial quando o início do tratamento ocorreu com mais de 24 h de vida [30]. Atualmente, temos preconizado que sejam aplicados doses de 400 mg de surfactante a cada 15 min na primeira hora de vida. A seguir aplica-se 400 mg de surfactante nos seguintes momentos: 2, 4, 6, 12 e 24 h de vida.

O aumento resistência na rede capilar pulmonar determinada pela hipertensão da artéria pulmonar [13,24] impede a expansão pulmonar adequada e estão associadas às alterações respiratórias descritas nos clones [5,37]. O uso de drogas vasoativas inibidoras das fosfodiesterases poderia apresentar efeitos benéficos. Drogas inibidoras das fosfodiesterases como o sildenafil prolongam a ação da guanosina monofosfato cíclica (cGMP), o principal mediador da vasodilatação [6]. A inibição da degradação da cGMP pode ser particularmente eficaz na vasodilatação das artérias pulmonares, sendo descrito que o sildenafil diminui a pressão da artéria pulmonar, dependendo da dose usada [42]. Em nossa experiência, o uso do sildenafil, nas primeiras 24 h de vida, com aplicação da medicação por via oral a cada 8 h na dose de 20 a 25 mg aumentou a sobrevivência dos bezerros clonados tratados e observou-se, por meio de exame ecocardiográfico, que após o seu uso ocorria reversão de padrão de circulação fetal em decorrência a diminuição da pressão do lado direito do coração (Birgel Junior *et al.*, dados não publicados). Dados preliminares obtidos em bezerro Nelore prematuro que recebeu nas primeiras 12 h de vida com 20 mg de sildenafil por via oral, indicam que os inibidores da fosfodiesterases determinam significativa redução dos valores da pressão média da artéria pulmonar (de 60 mmHg para 40 mmHg), sendo esses efeitos notados a partir de

15 min da aplicação do medicamento (Birgel Junior *et al.*, dados não publicados).

Para o tratamento das bradicardias e arritmias observadas nos bezerros clonados temos recomendado o uso de sulfato de atropina, na dose 0,1 mg / Kg peso vivo por via intra-venosa, devendo esta medicação ser a de eleição nesse tratamento, pois associou-se a ocorrência desses episódios de bradicardia e arritmia a presença de estímulos do sistema nervoso parassimpático. Bezerros clonados estão predispostos a vagotonia em virtude de dilatação do abomaso por líquido amniótico espesso e viscoso durante a vida intra-uterina ou em consequência da irritação de vias aéreas e da presença de broncoespamos decorrentes dos problemas cardiopulmonares (Birgel Junior *et al.*, dados não publicados).

#### V. MACROSSOMIA / SÍNDROME DO BEZERRO GIGANTE

Desde o início do desenvolvimento da técnica de fertilização *in vitro* de embriões e da clonagem de bovinos e ovinos, tem sido descrita uma nova síndrome: a Síndrome do bezerro gigante [2,11]. A síndrome do neonato gigante tem sido comumente relacionada a gestações prolongadas e a falhas de sinalização do parto [9]. A ocorrência de macrossomia foi observada em 20,9 % (9/4) dos bezerros da raça Nelore, ao passo que 69,8 % (30/43) apresentavam peso dentro da normalidade e 9,3 % (4/43) apresentavam peso significativamente menor do que o esperado para a raça Nelore [30]. A média de peso dos animais da raça Nelore ao nascimento foi de 38 kg, com amplitude de variação entre 14 e 62 kg [30].

Acredita-se que essa síndrome esteja associada a distúrbios do metabolismo de carboidratos na placenta e/ou do feto, mimetizando quadro de gigantismo fetal descrito na gestação de mulheres com diabetes [4,5]. Alguns pesquisadores descreveram alterações hormonais em bezerros clonados recém-nascidos caracterizados por aumento dos teores plasmáticos de insulina [16] e leptina [10] e diminuição dos teores plasmáticos de tiroxina [10, 16], triiodotirosina [16] e IGF-2 [10] e interpretaram esses achados como sendo um indício de distúrbio na regulação de energia intra-útero responsável pela macrossomia e pelos distúrbios de saúde observados nos clones [16].

Em 23,0% dos bezerros clonados foi observado hipoglicemia e/ou distúrbios de termoregulação nas primeiras 24 h de vida. Esses distúrbios podem estar relacionados a síndrome que mimetiza a diabetes gestacional da mulher ou a distúrbios decorrentes da hipóxia durante a vida perinatal com consumo das reservas de glicogênio hepático [4,5].

Para minimizar ou evitar a ocorrência de hipoglicemia/ hipotermia, tem-se optado por realizar o parto no período vespertino (temperatura corpórea materna entre 0,5 e 1,0°C maior do que no período matutino devido as variações nictemerais da temperatura), secagem do bezerro utilizando-se toalhas e secadores de cabelo. Os animais tingidos de mecônio foram lavados com detergente para retirar a gordurosa crosta de mecônio que dificultava a secagem dos bezerros. Imediatamente após o parto os bezerros eram transferidos para sala na qual a temperatura ambiente era de 30°C. A mamada do colostro nas primeiras horas de vida, além da transferência de imunidade passiva, é importante para o fornecimento de energia a recém-nascido. A glicemia e temperatura corpórea foram controlados às 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 36 e 48 h de vida, sendo que nos animais nos quais a glicemia fosse menor do que 50 mg /dL aplicavam-se por via intra-venosa 0,2 g/dL de glicose por via intravenosa. Com essa dosagem os animais retornavam à normoglicemia (80 a 120 mg/dL) e evitava-se a ocorrência de quadros de hiperglicemia [4,5,30].

#### VI. OCORRÊNCIA DE ANEMIA

Apesar de encontrar-se na literatura poucas referências sobre distúrbios do hemograma em bezerros clonados a partir da transferência nuclear de células somáticas [2,36], pesquisa realizada na Universidade de São Paulo, Komninou [25] observou a ocorrência de anemia de grau moderado a intensa, do tipo normocítico e normocrômico nos clones. Evidenciou-se nessa pesquisa [25] que a anemia instalava-se gradualmente a partir das 12 h de vida atingindo ao final da primeira semana, a sua intensidade máxima. Os valores médios obtidos para o eritrograma dos bezerros no 7º dia de vida foram os seguintes: Hemácias -  $4,33 \times 10^6/\text{mm}^3$ ; Volume Globular - 23 %, Taxa de Hemoglobina - 7,25 g/dl; VCM - 52,89  $\mu^3$ ; HCM - 16,65 pg; CHCM - 31,47%. A anemia observada era de origem ferropriva, pois evidenciou-

se nesses animais uma significativa diminuição dos teores séricos de ferro associada à diminuição do índice de saturação da transferrina (IST), enquanto os valores da capacidade total de ligação do ferro (CTLF) não sofreram influência durante o período [25]. Durante o estudo dos tipos de hemoglobinas, utilizando-se técnica de eletroforese foram identificados três fenótipos de Hemoglobina adulta (Hb-A; Hb-B e Hb-AB) e a presença de hemoglobina fetal (Hb-fetal), não sendo observadas anomalias que pudessem sugerir a ocorrência de hemoglobinopatias hereditárias e/ ou congênitas [25]. Durante a avaliação da dinâmica da hemoglobina do tipo fetal (Hb-fetal) no primeiro mês de vida observou-se, que todos os grupos animais apresentaram comportamento similar, caracterizado por sua diminuição com o desenvolvimento etário. A recuperação gradativa dos valores eritrograma ocorreu a partir do 15º dia de vida [25].

Nos casos de anemia a principal recomendação terapêutica foi o tratamento dos bezerros com sais de ferro nos primeiros dias de vida e como medida preventiva a suplementação das receptoras com sais de ferro nos últimos meses de gestação.

#### VII. ANOMALIAS NAS ESTRUTURAS UMBILICAIS, DEFORMIDADES FLEXURAS E ALOPECIA

Anomalias umbilicais com infecção e persistência do úraco; devido ao aumento na espessura do cordão umbilical em decorrência de edema na gelatina de Warthon e alteração na estrutura dos vasos umbilicais tem sido descrita em bezerros clonados [2,30,32]. (Observou-se aumento na espessura do cordão umbilical que dificultava a sua ruptura espontânea. As artérias umbilicais não sofreram retração para a cavidade abdominal, ficando expostas no resquício do cordão umbilical e nos primeiros três dias após o nascimento notou-se no umbigo presença de forte pulsação dessas artérias, tornando necessário o uso de clamps nas artérias com o intuito de evitar hemorragias. Observaram-se, ainda, hematomas intra-abdominais envolvendo o úraco e as artérias [4,5]. Apesar dessas alterações, a desinfecção do cordão umbilical utilizando-se tintura de iodo a 2% mostrou-se eficiente no combate de complicações, pois a ocorrência de onfalites, onfaloflebites, onfaloarterites, onfalouraqites ou persistência do úraco foi observada em menos de 5,0% dos clones [4,5,30].

Deformidades flexurais e articulares foram relatadas freqüentemente em bezerros clonados, podem acometer membros anteriores ou posteriores, serem unilaterais ou bilaterais e atingir tendões flexores ou extensores [15,16]. Em bezerros clonados da raça Nelore foi observado com freqüência deformidades das extremidades dos membros anteriores e posteriores, caracterizadas hiperextensão da articulação metacarpo/metatarsofalangea e lassidão (frouxidão) dos tendões flexores [5,30]. Essas alterações tiveram bom prognóstico e desapareciam gradualmente sem que qualquer tratamento fosse realizado.

Entre 15 e 20 dias de vida observou-se a ocorrência de alopecia em cerca de 75,0 % dos bezerros, cuja origem pode estar relacionada com distúrbios na síntese e absorção de vitaminas, pois a suplementação dos bezerros com complexo de vitamina ADE diminuiu os sintomas [4,5,30].

## VIII. CONCLUSÃO

Apesar dos esforços realizados nos últimos cinco anos a taxa de mortalidade pós-nascimento dos bezerros clonados é ainda grande, cerca de 50%. Demonstrou-se a ocorrência de graves distúrbios cardiopulmonares caracterizados por taquicardia, hiperfonese, presença de sopros cardíacos na 1ª e 2ª bulha, episódios de arritmia e bradicardia associados a dispnéias, respiração rude e estertores. Em consequência ao não fechamento do Forâmen de Botal e do Duto Arterioso há mistura de sangue arterial e venoso comprometendo a capacidade de oxigenação do sangue dos bezerros clonados. Observou-se, ainda, a ocorrência de macrossomia, hipoglicemia, hipotermia, anomalias das estruturas umbilicais, anemia e alopecia

**Acknowledgements.** We thank FAPESP (grant 2005/04636-0; 2006/07141-5 2007/05785-8; 2009/08703-5) for financial support.

## REFERÊNCIAS

- 1 Abduch, M.C.D. 2004.** Ecocardiografia. In: Carvalho C.F. (Ed.) *Ultra-sonografia em pequenos animais*. São Paulo: Roca, pp. 287-345.
- 2 Batchelder C.A., Bertolini M., Mason J.B., Moyer A.L., Koffert K., Petkov S.G., Famula T.R., Angelos J., George L.W. & Anderson G.B. 2007.** Perinatal physiology in cloned and normal calves: Hematologic and biochemical profiles. *Cloning and Stem Cells*. 9(1): 83-96.
- 3 Benesi F.J. 1993.** Síndrome asfíxia neonatal dos bezerros. Importância e avaliação crítica. *Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia*. 16: 38-48.
- 4 Birgel Junior E.H., Meirelles, F.V., Maiorka P.C., Kubrusly F.S. & Ollhoff R.D. 2010.** Tierärztliche Probleme bei geklonten Rindern - die ersten 30 Tagen von Kälbern der Nelore Rasse. In: *Blaue Hefte: Proceedings 5. Leipziger Tierärztekongress. Leipzig: Leipziger Universitätverlag* (Leipzig- De). pp.164-168.
- 5 Birgel Junior E.H., Meirelles, F.V., Maiorka P.C., Kubrusly F.S. & Ollhoff R.D. 2011.** Medicina interna de bezerros clonados Distúrbios clínicos observados nos primeiros 30 dias de vida. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia*. 9: 24-31.
- 6 Humbert M., Francoual J., Duroux P. & Simonneau G. 1998.** Urinary cGMP concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Thora*. 53(12): 1059-1062.
- 7 Bondioli K.R., Westhusin M.E. & Looney C.R. 1990.** Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology*. 33(1): 165-174.
- 8 Campos D.B., Papa P.C., Marques Jr. J.E.B., Garbelotti F., Fatima L.A., Artoni L.P., Birgel Jr. E.H., Meirelles F.V., Buratini Jr. J., Leiser R. & Pfarrer C. 2010.** Somatic cell nuclear transfer is associated with altered expression of angiogenic factor systems in bovine placentomes at term. *Genetics and Molecular Research*. 9(1): 309-323.
- 9 Chavatte-Palmer P., Heyman Y., Richard C., Monget P., Bourhis D., Kann G., Chilliard Y., Vignon X. & Renard J.P. 2002.** Clinical, hormonal, e hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. *Biology of Reproduction*. 66(6): 1596-1603.
- 10 Chavatte-Palmer P., Remy D., Cordonnier N., Richard C., Issenmann H., Laigre P., Heyman Y. & Mialot J.P. 2004.** Health status of cloned cattle at different ages. *Cloning and Stem Cells*. 6(2): 94-100.



- 11 Chavate-Palmer P., Souza N., Laigre P., Camous S., Ponter A.A., Bekers J.F. & Heyman Y. 2006. Ultrasound fetal measurements and pregnancy associated glycoprotein secretion in early pregnancy in cattle recipients carrying somatic clones. *Theriogenology*. 66(4): 829-840.
- 12 Cohen W.R. & Yet S.Y. 1986. The abnormal fetal heart rate baseline. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 29(1): 73-82.
- 13 Cibelli J.B., Campbell K.H., Seidel G.E., West M.D. & Lanza R.P. 2002. The health profile of cloned animals. *Nature Biotechnology*. 20(1): 13-14.
- 14 Farin P.W., Piedrahita J.A. & Farin C.E. 2006. Errors in development of fetuses and placentas from *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology*. 65(1): 178-191.
- 15 Fecteau M.E., Palmer J.E. & Wilkins P.A. 2005. Neonatal care of high-risk cloned and transgenic calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 21(3): 637-653.
- 16 Garry F.B., Adams R., McCann J.P. & Odde K.G. 1996. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. *Theriogenology*. 45(1):142-152.
- 17 Haley J., Tuffnell D.J. & Johnson N. 1997. Randomised controlled trial of cardiotocography versus umbilical artery doppler in the management of small for gestational age fetuses. *Brazilian Journal Obstetric Gynaecology*. 104(4): 431-435.
- 18 Hasler J.F., Henderson W.B., Hurtgen J.P., Jin Z.Q., Mccauley A.D., Mower S.A., Neely B., Shuey L.S., Stokes J.E. & Trimmer S.A. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*. 43(1): 141-152.
- 19 Held T.H., Scheidegger A. & Grunert E. 1986. Kardiotocographische befunde bei lebensfrischen und asphyktischen Rinderferten während der Aufweitungphase der geburt. *Zentralblatt für Veterinärmedizin*. 33: 422-431.
- 20 Hill J.R., Burghardt R.C., Jones K., Long C.R., Looney C.R., Shin T., Spencer T.E., Thompson J.A., Winger Q.A. & Westhusin M.E. 2000. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuse. *Biology of Reproduction*. 63(6): 1787-1794.
- 21 Jonker F.H., Weyden G.C & Taverne M.A.M. 1993. Fetal heart rate patterns and influence of myometrial activity during the last month of gestation in cows. *American Journal Veterinary Research*. 54(1): 158-161.
- 22 Jonker F.H., Van Oord H.A, Van Geijin H.P., Van Der Weijden G.C. & Taverne M.A. 1994. Feasibility of continuous recording of fetal heart rate in the near term bovine fetus by means of transabdominal Doppler. *The Veterinary Quarterly*. 16(3): 165-168.
- 23 Kato Y., Tani T., Sotomaru Y., Kurokawa K., Kato J., Dogushi H., Yasue H. & Tsunoda Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*. 282(5396): 2095-2098.
- 24 Kishi M., Itagaki Y., Takakura R., Imamura M., Sudo T., Yoshinari M., Tanimoto M., Yasue H. & Kashima N. 2000. Nuclear transfer in cattle using colostrum-derived mammary gland epithelial cells and ear-derived fibroblast cells. *Theriogenology*. 54(5): 675-684.
- 25 Komninou E.R. 2008. Contribuição ao estudo da hematologia de bezerros da raça Nelore, originados por meio da técnica de transferência nuclear de células somáticas (TNCS) - Clonagem. 145f. São Paulo, SP Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária, Universidade de São Paulo.
- 26 Kruip T.H.A.M. & Den Daas J.H.G. 1997. *In vitro* produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology*. 47(1): 43-52.
- 27 Locali R.F., Matsuoka P.K., Gabriel E.A, Bertini Júnior A., La Rotta C.A., Catani R., Carvalho A.C.C. & Buffolo E. 2008. Tratamento de persistência de canal arterial em recém-nascidos prematuros: análise clínica e cirúrgica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 90(5): 345-349.
- 28 Mascaro M.S., Calderon I.M.P., Maestá R.A.A.C., Bossolan G. & Rudge M.V.C. 2002. Cardiotocografia anteparto e prognóstico perinatal em gestações complicadas pelo diabete: influência do controle metabólico materno. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 24(9): 593-599.
- 29 Meirelles FV, Providelo F.D., Merighe F.D., Miranda M.S., Traldi A.S., Birgel Junior E.H., Miglino M.A., Pimentel J.R.V. & Watanabe Y.F. 2006. Challenges for commercial cloning: planning the future. *Acta Scientiae Veterinariae*. 34: 235-242.
- 30 Meirelles F.V., Birgel Junior E.H., Percin F., Bertolini M., Traldi A.S., Pimentel J.R.V, Komninou E.R., Sangali J.R., Fantinato Neto P., Nunes M.T., Pogliani F.C., Meirelles F.D.P., Kubrusly F.S., Vannucchi C.I. & Silva L.C.G. 2010. Delivery of cloned offspring: experience in Zebu cattle (*Bos indicus*). *Reproduction, Fertility and Development*. 22(1): 88-97.

- 31 Mendenhall H.W., O'leary J.A. & Phillips K.O. 1980.** The nonstress test: the value of a single acceleration in evaluating the fetus at risk. *American Journal Obstetric and Gynecology*. 136 (1): 87-91.
- 32 Miglino M.A., Pereira F.T.V., Visintin J.A., Garcia J.M., Meirelles F.V., Rumpf R., Ambrosio C.E., Papa P.C., Santos T.C., Carvalho A.F., Leiser R. & Carter A.M. 2007.** Placentation in cloned cattle: Structure and microvascular architecture. *Theriogenology*. 68(4): 604-617.
- 33 Nunes M.T. 2009.** O uso da cardiocografia como método de diagnóstico da ocorrência de sofrimento fetal (hipóxia fetal) durante a vida intra-uterina de fetos da raça Nelore originados por meio da técnica de transferência nuclear de células somáticas adultas - Clonagem. 103f. São Paulo, SP Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) - Programa de Pós-graduação em Clínica Veterinária, Universidade de São Paulo.
- 34 Pogliani F.C. 2010.** Parâmetros ecodopplercardiográficos em bezerros da raça Nelore originados através de transferência nuclear de células somáticas adultas - Clonagem. 107f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-graduação em Clínica Veterinária, Universidade de São Paulo.
- 35 Poulsen K.P. & McGuirk S.M. 2009.** Respiratory Disease of the Bovine Neonate. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 25(1): 121-137.
- 36 Renard J.P., Chastant S., Chesné P., Richard C., Marchal J., Cordonnier N., Chavatte P. & Vignon X. 1999.** Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *Lancet*. 353(9163): 1489-1491.
- 37 Santos C.R., Grandi F., Miglino M.A., Meirelles F.V. & Maiorka P.C. 2010.** Patologia de neonatos bovinos originados por meio da técnica de transferência nuclear de células somáticas – clonagem. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*. 47(6): 447-453.
- 38 Sbrano J.C.N., Tsutsui J.M., Terra Filho M. & Mathias Junior W. 2004.** Papel da ecodopplercardiografia na avaliação da hipertensão arterial pulmonar. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 30(1): 89-97.
- 39 Schmidt M., Greve T., Avery B., Beckers J.F., Sulon J. & Hansen H.B. 1996.** Pregnancies, calves and calf viability after transfer of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology*. 46(3): 527-539.
- 40 Szenci O. 1985.** Role of acid-base disturbances in perinatal mortality of calves. *Acta Veterinaria Hungarica*. 33(3-4): 205-220.
- 41 Tsunoda Y. & Kato Y. 2002.** Recent progress and problems in animal cloning. *Differentiation*. 69(4-5): 158-161.
- 42 Weimann J., Ullrich R., Hromi J., Fujino Y., Clark M.W.H., Bloch K.D. & Zapol W.M. 2000.** Sildenafil is a pulmonary vasodilator in awake lambs with acute pulmonary hypertension. *Anesthesiology*. 92 (6): 1702-1712.
- 43 Wells D.N. 1999.** Animal cloning: current process, challenges and future prospects. *Revista Brasileira Reprodução Animal*. 23: 86-97.
- 44 Wilson J.M., Williams J.D. & Bondioli K.R. 1995.** Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. *Animal Reproduction Science*. 38(1-2): 73-83.