

Medicina interna de bezerros clonados

Distúrbios clínicos observados nos primeiros
30 dias de vida*

Internal medicine of cloned calf

Clinical disorders observed during the first 30 days of life

*Palestra proferida no 5º Congresso de Medicina Veterinária de Leipzig – Alemanha – Janeiro de 2010

Resumo

Apesar dos esforços realizados nos últimos quatro anos, as taxas de mortalidade dos bezerros clonados da raça que chegam a termo são ainda altas, cerca de 50%. Demonstrou-se a ocorrência de graves distúrbios cardiorrespiratórios caracterizados por hiperfonese, presença de sopros cardíacos na 1ª e 2ª bulha associados a dispneias, respiração rude e estertores. Em consequência ao não fechamento do Forâmen de Botal e do Ducto 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.

Summary

Despite all efforts during the last four years to improve cloned newborn care, the mortality rate of calf after term is still high, around 50%. Clinical symptoms observed in these cloned calf were related to severe cardiopulmonary disorders like hyperphonesty, diastolic and systolic cardiac murmurs associated to dyspnea and crackling lung sounds. Due to the patency of the Foramen Ovale and Ductus Arteriosus, in which causes the mix of arterial and venous blood, the blood oxygenation in these cloned calf is compromised. In addition, cloned calf could also present increased birth weight, hypoglycemia, hypothermia, umbilical cord abnormalities, anemia, and alopecia.

Eduardo Harry Birgel Junior ¹

Flávio Vieira Meirelles ¹

Paulo Cesar Maiorka ²

Flávia Saldanha Kubrusly ³

Rudiger Daniel Ollhoff ⁴

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Universidade São Paulo
Av. Duque de Caxias Norte, 225
Campus da USP
CEP 13635-900 – Pirassununga, SP
✉ ehbirgel@usp.br



Palavras-chave

Bezerro clonado, transferência nuclear de célula somática (TNCS), bovino, doença, distúrbios cardiopulmonares

Keywords

Cloned calf, somatic cell nuclear transfer (SCNT), bovine, disease, cardiopulmonary disorders

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).

Estudos evidenciaram distúrbios no desenvolvimento da placenta (**Figura 1**) caracterizados por diminuição do número de placentomas, aparecimento de placentomas gigantes, grande quantidade de microcotilédones acessórios com diâmetro menor do que 1,0 cm, extensas áreas na membrana corioalantoide desprovidas de placentomas associados a edema das membranas placentárias e aumento na espessura do cordão umbilical (MIGLINO et al., 2007). Distúrbios na expressão da VEGF-A – fator responsável pela permeabilidade vascular e neovascularização da placenta – têm sido descritos em placentas de clones (CAMPOS et al., 2010). Durante a gestação, a disfunção placentária leva à formação de hidroalantoide e abortamento.

Apesar dos esforços realizados nos últimos quatro anos, as taxas de mortalidade dos bezerros clonados da raça nelore que chegam a termo são ainda altas, cerca de 50%. Nesse período, foram observadas as anomalias a seguir descritas.

1 Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade São Paulo/Brasil

2 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade São Paulo/Brasil

3 Centro de Biotecnologia – Instituto Butantan/Brasil

4 Centro de Ciências Agrárias e Ambientais – Pontifícia Universidade Católica Paraná/Brasil

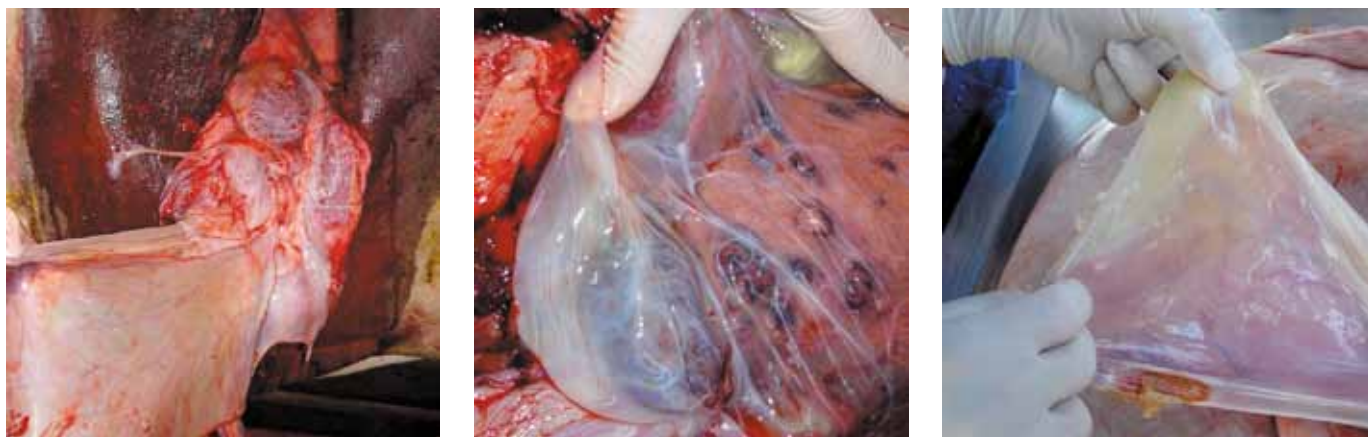


Figura 1: Anomalias placentárias observadas em gestações de bezerros clonados
Esquerda placentomas gigantes **Centro** Microcotilédones Acessórios (< 1,0 cm) **Direita** edema das membranas placentárias

Hipóxia/Sofrimento Fetal

A disfunção placentária constitui importante fator de risco para a instalação da hipoxemia no feto clonado. Em consequência a esse sofrimento fetal/hipóxia, nota-se com frequência o tingimento dos fetos por mecônio (**Figura 2**). Esse sinal de sofrimento fetal tem sido observado

pela técnica de clonagem, observou-se a existência de traçados cardiotográficos compatíveis com a ocorrência de sofrimento fetal/hipóxia intrauterina. Essas alterações puderam ser observadas a partir de exames realizados entre 90 e 30 dias antes do parto. Constatou-se que na fase final da gestação, entre 90 e 30 dias antes do parto,

existem sinais de hipóxia fetal caracterizada por hipoatividade do feto e ausência de resposta cardíaca à estimulação fetal por beliscamento do espaço interdigital. Os clones tingidos de mecônio e que morreram nas primeiras horas de vida apresentavam com mais frequência bradicardia e o número de acelerações transitórias da frequência cardíaca era significativamente menor do que o observado nos grupos que não estavam em sofrimento fetal.

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, dez dias a mais do que na raça holandesa). O parto foi induzido com 8 mg de acetonido de triancinolona aplicado por via intramuscular sete dias antes da



Figura 2: Bezerro clonado tingido de mecônio – sinal de hipóxia ou sofrimento fetal durante a vida intrauterina

em 50,0% dos bezerros, sendo a incidência de mortalidade nos primeiros dois dias de vida maior em bezerros clonados tingidos de mecônio.

Em dissertação recém-finalizada (NUNES, 2009), na qual foi acompanhada a cardiotografia de fetos gerados

cesariana associado a 20 mg de dexametasona aplicada por via intravenosa 36 e 24 horas antes do parto e 500 ug de prostaglandina F2α aplicada por via intramuscular 24 horas antes do parto. Apesar de a cesariana ser realizada 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 intravenosa 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.

Bezerros asfixiados apresentavam ausência do reflexo de sucção, dificuldade em manter-se em decúbito esternal, nasciam tingidos de mecônio ou eliminavam o

neonatal precoce ou tardia. Considerou-se que os distúrbios cardiorrespiratórios e de oxigenação observados nesses bezerros estavam relacionados à ocorrência de sofrimento fetal/hipóxia na vida intrauterina.

Distúrbios Cardiorrespiratórios

Pesquisas realizadas na Universidade de São Paulo têm evidenciado, em bezerros clonados, graves distúrbios cardiorrespiratórios caracterizados por hiperfonese, reforço de bulhas, presença de sopros cardíacos na 1ª e 2ª bulhas

CRITÉRIO DE AVALIAÇÃO	PONTOS		
	0	1	2
Reação da cabeça a um jato de água	Ausente	Diminuída	Espontânea, movimentos ativos
Reflexos orbitário e interdigital	Ausente	Um reflexo positivo	Ambos os reflexos positivos
Respiração	Ausente	Arritmica	Ritmica
Coloração de mucosas	Azulada	Branco-azulada	Rósea

0 a 3 pontos – bezerros sem vitalidade
4 a 6 pontos – pacientes sem risco
7 e 8 pontos – boa vitalidade

FIGURA 3 – Avaliação da viabilidade de bezerros recém-nascidos pelo sistema APGAR

mecônio nos primeiros 15 minutos de vida. Nas avaliações do APGAR (Figura 3), realizadas ao nascimento e cinco minutos de vida, e da hemogasometria foi possível caracterizar a seguinte evolução clínica:

- bezerros que apresentavam APGAR ruim (0 a 3 pontos), sinais de acidose na hemogasometria e morte na primeira hora de vida, sendo esses distúrbios associados com má-formação do coração ou outros órgãos (fígado e rim), condição incompatível com a vida;
- bezerros que apresentavam APGAR ruim (0 a 3 pontos), sinais de acidose respiratória e mista na hemogasometria, sendo nesses animais diagnosticada asfixia neonatal precoce; alguns sobreviviam e outros morriam;
- bezerros que apresentavam APGAR bom (7 ou 8 pontos) mamavam colostro, permaneciam em estação e, a partir de 12 a 24 horas, após o parto desenvolviam quadro de hipóxia que culminava com a morte entre 24 e 48 horas de vida;
- bezerros que nasciam com APGAR bom (7 ou 8 pontos) apresentavam hemogasometria compatível com a de animal saudável e permaneciam vivos.

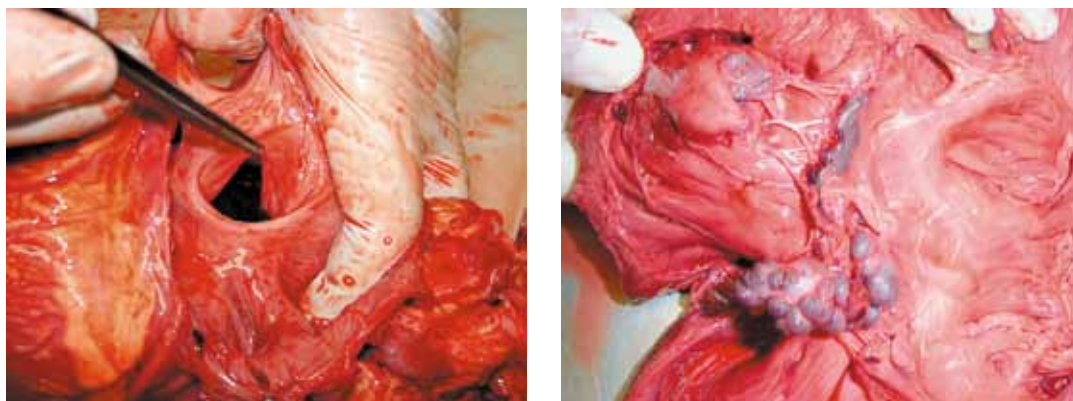
No nosso entender, os animais que desenvolveram quadro de hipóxia a partir de 12 a 24 horas de vida não podem ser classificados como apresentando asfixia



Figura 4: Doppler colorido em região de septo interatrial indica a presença de comunicação interatrial. AE: átrio esquerdo; AD: átrio direito; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; CIA: comunicação interatrial.

associados a dispneias, respiração rude, estertores e diminuição dos valores da PO₂ no sangue arterial (BIRGEL JUNIOR et al., 2010; MEIRELLES et al., 2010). Observou-se nos exames de ecocardiografia presença de comunicação interatrial – persistência do Forâmen de Botal (Figura 4), fluxo turbulento sistólico no interior do átrio direito, indicando a existência de insuficiência da valva tricúspide

Figura 5: Ocorrência de anomalias cardíacas
Esquerda persistência do forâmen ovale
Direita cistos hemáticos em valvas atrioventriculares



e hipertrofia concêntrica do miocárdio (POGLIANI, 2010). Essas alterações foram confirmadas nos exames anatomopatológicos (**Figura 5**). Encontraram-se persistência do forâmen ovale (forâmen de Botal) em 60%, hipertrofia

ao não fechamento do Forâmen de Botal e do Ducto Arterioso, há mistura de sangue arterial e venoso, comprometendo a capacidade de oxigenação do sangue dos bezerros clonados. Em amostras colhidas no 3º e 4º dia de



Figura 6: Fornecimento de oxigênio por meio de cateter intranasal

do miocárdio em 18,2%, persistência do ducto arterioso em 9,1% e dilatação do ventrículo em 9,1% dos bezerros necropsiados.

Esses distúrbios cardiorrespiratórios estão relacionados à produção inadequada e/ou consumo do surfactante pulmonar associado a aumento da pressão da artéria pulmonar (primária ou secundária). Em consequência

vida, observou-se valores de PO_2 no sangue arterial que variaram entre 50 e 70 mmHg.

Para o tratamento da hipóxia, utilizou-se oxigenioterapia, fornecida por meio de cateter intranasal no volume de cinco litros de O_2 por minuto durante a primeira semana de vida do bezerro (**Figura 6**). A administração de 300 a 1000 mg de surfactante por via intratraqueal, nas

primeiras horas de vida (**Figura 7**), utilizando uma agulha de 26 G determinou um significativo aumento da PO_2 do sangue arterial. Seis horas após a aplicação do surfactante observou-se nos animais tratados, PO_2 do sangue arterial igual a 127 ± 11.06 mmHg e nos animais não tratados valores iguais a 57.2 ± 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 horas de vida.

Macrossomia/Síndrome do bezerro grande

É uma característica bastante comum de ruminantes oriundos da clonagem, sendo o fenômeno referido como síndrome do bezerro grande ou LCS (do inglês “*large calf syndrome*”). A ocorrência de macrossomia foi observada em 33,0% dos bezerros da raça nelore. 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.

Em 23,0% dos bezerros clonados foram observados hipoglicemia e/ou distúrbios de termorregulação nas primeiras 24 horas de vida. Esses distúrbios podem estar relacionados à 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.

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 às variações nictimerais 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 uma sala na qual a temperatura ambiente era de 30° C. A mamada do colostro nas primeiras horas de vida, além da transferência de imunoglobulinas, é importante para o fornecimento de energia ao recém-nascido. A glicemia e a temperatura corpórea foram controladas às 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 36 e 48 horas de vida, sendo que, nos animais nos quais a glicemia fosse menor do que 50 mg/dl, aplicava-se por via intravenosa 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.

Anemia

Em pesquisa realizada na Universidade de São Paulo, Komninou (2008) observou a ocorrência de anemia de grau moderado a grave, do tipo normocítico e



Figura 7: Aplicação do Surfactante por via intratraqueal



Figura 8: Hiperextensão da articulação metacarpo/metatarsofalangea e lassidão (frouxidão) dos tendões flexores

normocrômico, sendo que a anemia instalou-se gradualmente a partir das 12 horas de vida, atingindo sua intensidade máxima ao final da primeira semana para, a partir do 15º dia de vida, ocorrer a gradual recuperação dos seus valores. A anemia observada nos bezerros clonados era de origem ferropriva, pois se evidenciou nesses animais uma significativa diminuição dos teores séricos de ferro associada à diminuição do índice de saturação da transferrina (IST). 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.

Anomalias umbilicais

Anomalias umbilicais ocorreram na maioria dos clones (**Figura 8**).

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.

Observou-se ainda hematomas intra-abdominais envolvendo o úraco e as artérias. Apesar dessas alterações,



Figura 9: Ocorrência de anomalias umbilicais **Esquerda e centro** aumento na espessura do cordão umbilical **Direita** hematoma intra-abdominal



Figura 10: Alopecia cuja origem pode estar relacionada com distúrbios na síntese e absorção de vitaminas

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.

Outras alterações

Em bezerros clonados da raça nelore, foram observadas com frequência deformidades das extremidades dos membros anteriores e posteriores, caracterizadas por hiperextensão da articulação metacarpo/metatarsofalangea e lassidão (frouxidão) dos tendões flexores (**Figura 9**). Essas alterações tinham 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 (**Figura 10**).

Referências

- MEIRELLES, F. V.; 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. Challenges for commercial cloning: planning the future. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34, p. 235-242, 2006.
- 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. Placentation in cloned cattle: Structure and microvascular architecture. *Theriogenology*, v. 68, n. 4, p. 604-617, 2007.
- NUNES, M. T. O uso da cardiocardiografia 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.
- 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.