



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS DE  
CLONES BOVINOS ABORTADOS E NEONATOS**

**LÍDIA DOS SANTOS PEREIRA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA/DF**

**JULHO / 2013**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS DE  
CLONES BOVINOS ABORTADOS E NEONATOS**

**LÍDIA DOS SANTOS PEREIRA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA/DF**

**JULHO / 2013**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS DE CLONES BOVINOS  
ABORTADOS E NEONATOS**

**LÍDIA DOS SANTOS PEREIRA**

**ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ RENATO JUNQUEIRA BORGES**

**CO-ORIENTADOR: PROF. DR. JANILDO LUDOLF REIS JUNIOR**

**PUBLICAÇÃO: 083/2013**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA/DF**

**JULHO / 2013**

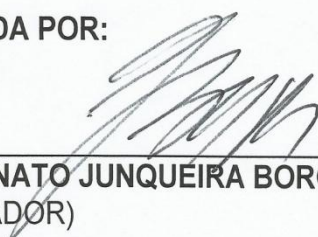
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA


ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS DE CLONES BOVINOS  
ABORTADOS E NEONATOS

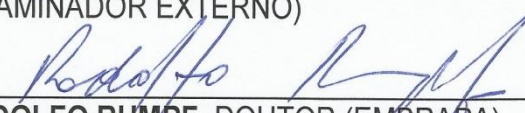
LÍDIA DOS SANTOS PEREIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA  
AO PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM  
SAÚDE ANIMAL, COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL

APROVADA POR:

  
\_\_\_\_\_  
JOSÉ RENATO JUNQUEIRA BORGES, DOUTOR (UnB)  
(ORIENTADOR)

  
\_\_\_\_\_  
LUCIANA SONNE, DOUTORA (UFRGS)  
(EXAMINADOR EXTERNO)

  
\_\_\_\_\_  
RODOLFO RUMPF, DOUTOR (EMBRAPA)  
(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, 22 de Julho de 2013

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

PEREIRA, L. S. **Aspectos anatomopatológicos de clones bovinos abortados e neonatos.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2013, 90p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

Pereira, Lídia dos Santos

**Aspectos anatomopatológicos de clones bovinos abortados e neonatos. / Lidia dos Santos Pereira** orientação de José Renato Junqueira Borges. Brasília, 2013. p.:il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

1. Neonatologia 2. bovino 3. bezerro 4. clone 5. histopatologia 6. necropsia I. Borges, J.R.J. II. Doutor

*“Bom mesmo é ir a luta com  
determinação, abraçar a vida com paixão,  
perder com classe e vencer com ousadia, pois  
o triunfo pertence a quem se atreve.  
A vida é muita para ser insignificante.”  
(Charles Chaplin)*

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram para que este momento se tornasse realidade. Foi um período de grande aprendizado, tanto profissional quanto pessoal. Nestes dois anos muitas foram as pessoas que ajudaram direta ou indiretamente na conclusão deste trabalho e peço perdão pois certamente não conseguirei expressar minha gratidão à todos.

Meus agradecimentos ao meu orientador, Prof. José Renato Junqueira Borges por acreditar e me dar a oportunidade de concluir este trabalho, que venham os próximos!

Ao meu Co-orientador Prof. Janildo Ludolf Reis Junior pela paciência e incentivo em sempre melhorar.

À toda equipe do laboratório de patologia veterinária (LPV-UNB) que me ensinaram com toda paciência e dedicação uma área totalmente nova, em especial à minha amiga Mirna, Gustavo (Baiano), Lícia, Lili e a todos os residentes.

À toda equipe da Geneal por me abrir as portas e por acreditar que colheremos os frutos deste trabalho, sem vocês nada disso seria possível, em especial ao Dr. Rodolfo, Edson, Chivas, mas igualmente à todos os funcionários que me acolheram como membro da equipe. Adoro vocês!

À toda equipe do HVETÃO pelo aprendizado diário.

Ao decanato de pesquisa e pós-graduação (DPP) pelos recursos financeiros concedidos.

Aos amigos, de longe e de perto, que em momento algum me faltaram.

À minha família que sempre me apoiou e acreditou em mim. Convivemos com a distância e com a saudade, mas valeu a pena!

Ao meu Coração (Wanderson) que em todos os momentos esteve ao meu lado mesmo nas horas de maior estresse, me dando força e às vezes me deixando levemente desesperada.

A todos o meu muito obrigada!

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT .....	xii
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUÇÃO.....	1
REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
Clonagem .....	2
Clonagem no Brasil .....	4
Problemas clonagem.....	4
Placentação.....	5
Hidropisia, distocia e falhas no reconhecimento materno fetal.....	6
Defeitos genéticos .....	7
Perdas tardias e neonatais.....	8
Características fenotípicas e laboratoriais de bezerros clonados.....	8
Macrossomia .....	10
Achados de necropsia.....	12
Características comportamentais e reprodutivas .....	14
OBJETIVOS.....	15
REFERÊNCIAS.....	16
CAPÍTULO II.....	21
ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS DE BEZERROS CLONADOS	
ABORTADOS.....	21
INTRODUÇÃO.....	21
MATERIAIS E MÉTODOS .....	23
RESULTADOS.....	24



DISCUSSÃO.....	32
CONCLUSÃO .....	36
REFERÊNCIAS.....	38
CAPÍTULO III.....	41
ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS DE BEZERROS CLONADOS COM ÓBITO NEONATAL.....	41
INTRODUÇÃO.....	41
MATERIAIS E MÉTODOS .....	44
RESULTADOS.....	47
DISCUSSÃO .....	62
CONCLUSÃO .....	69
REFERÊNCIAS.....	71
CAPÍTULO IV .....	75
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	75
ANEXO I - APROVAÇÃO CEUA .....	76

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1:</b> Distribuição das amostras nos grupos, idade gestacional e peso (Kg) de clones bovinos abortados.....	<b>24</b>
<b>Tabela 2.2:</b> Alterações microscópicas observadas no fígado de animais abortados. ....	<b>25</b>
<b>Tabela 2.3:</b> Alterações microscópicas observadas no baço de animais abortados. .	<b>27</b>
<b>Tabela 2.4:</b> Alterações microscópicas observadas nos rins de animais abortados. .	<b>28</b>
<b>Tabela 2.5:</b> Alterações microscópicas observadas nos pulmões de animais abortados. ....	<b>30</b>
<b>Tabela 2.6:</b> Alterações microscópicas observadas no coração de animais abortados. ....	<b>32</b>
<b>Tabela 3.1:</b> Distribuição das amostras nos grupos, idade gestacional e peso (Kg) de bezerros clonados que vieram a óbito no período neonatal. ....	<b>45</b>
<b>Tabela 3.2:</b> Distribuição das amostras nos grupos.....	<b>46</b>
<b>Tabela 3.3:</b> Achados microscópicos observados no fígado de bezerros clones e controles.....	<b>50</b>
<b>Tabela 3.4:</b> Achados microscópicos observados no baço de bezerros clones e controles.....	<b>52</b>
<b>Tabela 3.5:</b> Achados microscópicos observados nos rins de bezerros clones e controles.....	<b>55</b>
<b>Tabela 3.6:</b> Achados microscópicos observados nos pulmões de bezerros clones e controles.....	<b>58</b>
<b>Tabela 3.7:</b> Achados microscópicos observados no coração de bezerros clones e controles.....	<b>62</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1:</b> Principais etapas da TNCS. ....	<b>3</b>
<b>Figura 2.1:</b> Alterações macroscópicas e microscópicas observadas no fígado de fetos bovinos clonados abortados. ....	<b>26</b>
<b>Figura 2.2:</b> Alterações macroscópicas e microscópicas observadas no baço de fetos bovinos clonados abortados. ....	<b>27</b>
<b>Figura 2.3:</b> Alterações macroscópicas e microscópicas observadas nos rins de fetos bovinos clonados abortados. ....	<b>29</b>
<b>Figura 2.4:</b> Alterações macroscópicas observadas nos pulmões de fetos bovinos clonados abortados. ....	<b>30</b>
<b>Figura 2.5:</b> Alterações microscópicas observadas nos pulmões de fetos bovinos clonados abortados. ....	<b>31</b>
<b>Figura 2.6:</b> Alterações macroscópicas e microscópicas observadas no coração de fetos bovinos clonados abortados. ....	<b>32</b>
<b>Figura 3.1:</b> Alterações macroscópicas observadas no fígado de neonatos clonados e controles. ....	<b>47</b>
<b>Figura 3.2:</b> Alterações microscópicas observadas no fígado de neonatos clonados e controles. ....	<b>49</b>
<b>Figura 3.3:</b> Alterações macroscópicas e microscópicas observadas no baço de neonatos clonados e controles. ....	<b>51</b>
<b>Figura 3.4:</b> Alterações macroscópicas observadas nos rins de neonatos clonados e controles. ....	<b>53</b>
<b>Figura 3.5:</b> Alterações microscópicas observadas nos rins de neonatos clonados e controles. ....	<b>54</b>
<b>Figura 3.6:</b> Alterações macroscópicas observadas nos pulmões de neonatos clonados e controles. ....	<b>56</b>
<b>Figura: 3.7:</b> Alterações microscópicas observadas nos pulmões de neonatos clonados e controles. ....	<b>57</b>
<b>Figura 3.8:</b> Alterações macroscópicas observadas no coração de neonatos clonados e controles. ....	<b>60</b>
<b>Figura 3.9:</b> Alterações microscópicas observadas no coração de neonatos clonados e controles. ....	<b>61</b>

## RESUMO

A transferência nuclear de células somáticas ou clonagem é uma técnica que permite produzir um indivíduo geneticamente igual a um outro indivíduo adulto. Esta técnica abre inúmeras possibilidades para a medicina e para a reprodução animal. Porém, existem inúmeros relatos de problemas associados à clonagem. A taxa de perda nos períodos embrionário e fetal ainda é muito alta quando comparado a outras biotécnicas, além disso, há uma maior incidência de hidropisias e distocias, diminuindo a eficiência e aumentando o custo da técnica. Os animais que vem a termo frequentemente apresentam uma síndrome chamada de macrossomia e apresentam dificuldades de adaptação à vida extrauterina e por isso muitas vezes vem a óbito. No presente trabalho realizou-se necropsia e coleta de fragmentos de órgãos para avaliação histopatológica de 69 bezerros clonados, destes, 28 foram abortados e 41 com óbito neonatal. As principais alterações observadas foram no fígado, rins e pulmões tanto nos animais abortados quanto com óbito neonatal. No fígado, 85% dos animais avaliados apresentaram degeneração hepática. Nos rins identificou-se a presença de um pigmento acastanhado no interior dos túbulos corticais em aproximadamente 90% das amostras avaliadas, a presença deste pigmento não relatada anteriormente em animais clonados. Nos pulmões o achado que mais chamou atenção foi o grande número de animais que apresentaram lesões características de pneumonia (55%). Alterações nestes órgãos foram cruciais para que os animais viessem a óbito. Isto aconteceu, sobretudo devido a problemas na adaptação ao ambiente extrauterino e em decorrência de infecções adquiridas no período neonatal. Os achados encontrados no presente trabalho denotam a necessidade de investigação anatomopatológica detalhada de animais clonados que não foram viáveis, na tentativa de mapear as anormalidades apresentadas por estes animais.

**Palavras-Chave:** Neonatologia, bovino, bezerro, clone, necropsia, histopatologia.

## **ABSTRACT**

The somatic-cell nuclear transfer or cloning is a technique that allows a donor adult individual to produce another genetically identical individual. This technique opens numerous possibilities for medicine and animal reproduction. However, several reports describe cloning-associated issues. Embryo and fetal loss is still very high when compared to other techniques, furthermore, there is high incidence of dystocia and hydrops, which decreases efficiency and increases costs. Animals that come to term often exhibit a syndrome called macrosomia and have difficulties in adapting to life outside the uterus and death is a common consequence. In this study 69 (28 aborted and 41 neonatal death) cloned bovines were submitted to gross and histopathological examination. The main findings were in the liver, kidneys and lungs from both aborted and neonatal animals. In the liver, 85% of the animals evaluated showed hepatic degeneration. Kidney was identified the presence of a pigment brownish within the cortical tubules in approximately 90% of the samples, the presence of this pigment does not reported previously cloned. In the lungs the finding that more attention was the large number of animals showing lesions characteristic of pneumonia (55%). These changes were crucial for the animals to come to death. This was mainly due to problems in adapting outside the uterus and infections in the neonatal period. Further investigation focusing on anatomic pathology changes are necessary to map the abnormalities in cloned animals.

**Keywords:** Neonatology, calf, clone, necropsy, histopathology.

# CAPÍTULO I

## INTRODUÇÃO

Clonagem animal com fins reprodutivos vem ganhando cada vez mais espaço em nosso país. Através da clonagem é possível produzir indivíduos geneticamente idênticos e preservar o material genético de diversas espécies. Apesar das vantagens, a eficiência da técnica de clonagem ainda é baixa, muitas são as perdas nas diversas etapas do processo. Estudos relacionam as perdas que ocorrem durante a gestação a problemas na placentação e à reprogramação anormal do núcleo da célula doadora que levaria a transcrição anormal de genes que regulam o crescimento, causando as anormalidades observadas em bezerros clonados. A principal anormalidade identificada em neonatos clonados é a macrossomia em que os animais nascem com excessivo tamanho fetal e anormalidades pulmonares, cardíacas, umbilicais, entre outras. Animais que apresentam macrossomia são tidos como neonatos de risco e apresentam uma maior taxa de mortalidade no período neonatal. Além da macrossomia, várias anormalidades têm sido observadas em neonatos clonados, tais como: hipertensão pulmonar, aumento dos vasos umbilicais, hemorragia umbilical, infecções umbilicais, falha da transferência de imunidade passiva, hipertermia paradoxal, deformidades musculoesqueléticas e problemas cardíacos congênitos. Apesar das anormalidades observadas, a maioria dos exames laboratoriais não demonstram diferença quando comparados à bezerros não clonados. Em relação aos achados de necropsia de animais clonados que vieram a óbito por motivos diversos, há relatos frequentes de que a necropsia não revelou achados significativos, porém, em outros trabalhos são relatados outros achados como: imaturidade pulmonar, hipertensão pulmonar, hepatomegalia, esteatose hepática, cardiomegalia, com hipertrofia do ventrículo direito, displasia renal, deformidades em membros, entre outros. Quanto aos achados histológicos a literatura a respeito é bastante escassa, porém, há descrição de degeneração hepática do tipo gordurosa, anormalidades na vascularização placentária, displasia renal, atelectasia pulmonar e hipertensão pulmonar, observada pela muscularização da camada média dos vasos. Estudos sustentam que animais clonados que sobrevivem desenvolvem-se normalmente e não apresentam diferenças comportamentais e reprodutivas quando comparados à animais não clonados. Além

disso, já está cientificamente comprovado que animais clonados são capazes de reproduzir e gerar crias férteis, que não apresentam os mesmos problemas identificados nos clones. Ainda há muito para ser pesquisado em relação à saúde de animais clonados e os achados histopatológicos podem vir a esclarecer problemas estruturais que levam à disfunção de órgãos nestes animais.

## **REFERENCIAL TEÓRICO**

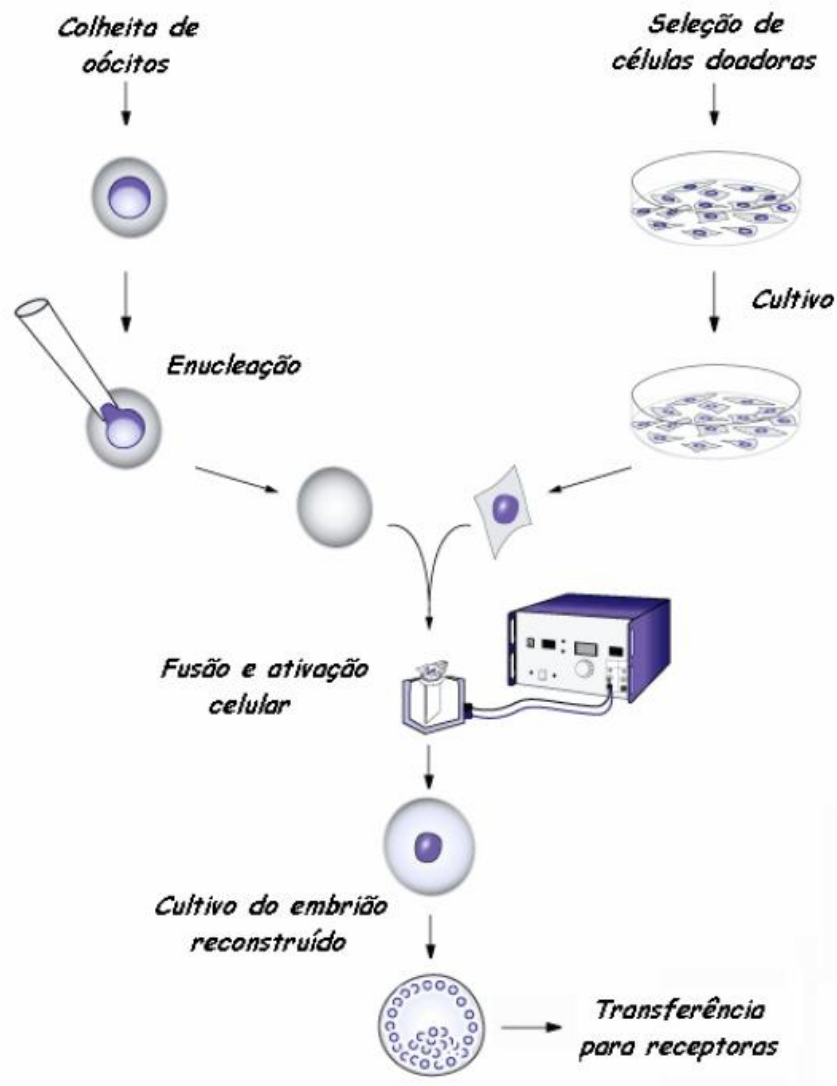
### **Clonagem**

A clonagem é uma biotécnica que permite produzir um indivíduo geneticamente idêntico a outro (MEE, 2004; ZATZ, 2004). Existem diversas aplicações potenciais para a técnica de clonagem. Na medicina espera-se realizar tratamentos utilizando a terapia celular, possibilitando o tratamento de inúmeras doenças, entre elas: diabetes, Parkinson, Alzheimer, esclerose múltipla, acidentes neurovasculares, leucemia, entre outras. E também a produção de órgãos e tecidos para transplante autólogo, evitando assim a possibilidade de rejeição (SCHWINDT; BARNABÉ e MELLO 2005). No que compete à medicina veterinária a clonagem poderia auxiliar na conservação de espécies ameaçadas de extinção (LANZA *et al.* 2000), na recuperação de genótipos considerados importantes do ponto de vista do melhoramento genético animal e na possibilidade de recuperar o genótipo de um animal que por razões diversas não pode expressar todo seu potencial zootécnico.

Desde 1997 quando foi apresentado ao mundo o primeiro animal clonado diversas espécies têm sido clonadas com sucesso, dentre elas, ovinos, (WILMUT *et al.* 1997), camundongos (WAKAYAMA *et al.* 1998), bovinos (GALLI *et al.* 1999), caprinos (BAGUISI *et al.* 1999), suínos (POLEJAEVA *et al.* 2000), animais silvestres como o muflão (LOI *et al.* 2001), bisão indiano (LANZA *et al.* 2000), dromedário (KHATIR e ANOUASSI, 2008) e cervo (BERG *et al.* 2007), além de coelhos (CHESNÉ *et al.* 2002), gatos (SHIN *et al.* 2002), muares (WOODS *et al.* 2003), equinos (GALLI *et al.* 2003), ratos (ZHOU *et al.* 2003), cães (LEE *et al.* 2005) e búfalos (SHI *et al.* 2007), demonstrando assim a evolução e o domínio dos procedimentos de clonagem.

O grande avanço obtido através do domínio da técnica de clonagem se deu pela produção de um indivíduo geneticamente igual a outro indivíduo adulto, utilizando-se de células somáticas já diferenciadas (ZATZ 2004). Até então se

acreditava que a célula uma vez diferenciada não se desdiferenciaria novamente. Isto foi possível utilizando-se de oócitos enucleados de uma doadora e nele inserindo o núcleo da célula somática. Através de impulsos elétricos, eletrofusão, o material genético doador é fundido com o citoplasma do oócito enucleado, havendo assim a reprogramação celular. A célula assim formada se desdiferencia em uma célula totipotente, capaz então de formar um indivíduo completo (WILMUT *et al.* 1997), a este processo chama-se transferência nuclear de células somáticas (TNCS). As células totipotentes assim formadas passam por um cultivo para o desenvolvimento do embrião. Após o cultivo o embrião formado é transferido para o útero de uma receptora sincronizada, iniciando a prenhez, conforme ilustrado na Figura 1.1.



**Figura 1.1:** Principais etapas da TNCS.  
Fonte: Pereira e Freitas (2009).



## **Clonagem no Brasil**

Apesar de já se ter obtido sucesso na clonagem de diversas espécies animais, o animal que melhor se adaptou a técnica foi o bovino (DINNYÉS *et al.* 2002), estando atualmente entre as espécies mais clonadas inclusive com fins comerciais. No Brasil, o primeiro clone foi produzido no ano de 2001, com a produção de um bovino fêmea da raça Simental (RUMPF; IGUMA e SOUZA 2001). Desde então o país tem desenvolvido cada vez mais pesquisas na área.

A clonagem comercial de bovinos vem ganhando cada vez mais espaço no Brasil, principalmente quando em 2009 o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) autorizou o registro de animais clonados em suas respectivas associações de classe (BRASIL, 2012), agregando maior valor comercial aos mesmos. Apesar dos avanços obtidos nos últimos anos, o Brasil ainda não dispõe de uma legislação específica que regulamente atividades de pesquisa, produção, importação, liberação no ambiente e comercialização de produtos oriundos de animais clonados, porém, um projeto de lei tramita desde 2005, estando atualmente em fase de terminação (ABREU, 2007).

## **Problemas clonagem**

Apesar de já se ter obtido muitos avanços no decorrer dos 16 anos que se trabalha com TNCS, o crescimento do mercado de clones bovinos ainda esbarra na baixa eficiência. A eficiência geral da técnica ainda está muito aquém do desejado quando comparado com técnicas de inseminação artificial (IA) e produção *in vitro* de embriões (FIV). Apenas 0,5 a 5% dos embriões reconstruídos produzem animais a termo (HEYMAN *et al.* 2002; PALMIERI *et al.* 2008), esta baixa taxa de sucesso é um resultado cumulativo das perdas nas diversas etapas do processo (WILMUT *et al.* 2002). Heyman *et al.* (2002) estimaram que para TNCS ocorreram entre 33–43% de perdas até 90° dia de gestação, um valor muito alto quando comparado a 8,5%-11,8 % para animais produzidos por FIV (JONKER, 2004) Em geral, apenas 9% dos embriões transferidos resultam em produtos, e a eficiência varia entre 0 a 45%, dependendo da linhagem celular utilizada (PANARACE *et al.* 2007).

Em bovinos, as principais perdas ocorrem no período embrionário. O período embrionário se inicia na concepção e vai até o 42° dia de gestação (HUBBERT, 1974). A morte embrionária precoce é responsável por aproximadamente 40% de

toda a perda de gestação em bovinos clonados (FARIN, CROSIER, e FARIN, 2001). Além das expressivas perdas iniciais, na técnica de clonagem ocorrem ainda importantes perdas tardias, no período fetal e perinatal. O período fetal se inicia do 42º dia de gestação até o 270º dia de gestação (HUBBERT, 1974) e o período neonatal se inicia do parto até o 28º dia de vida (HUBBERT, 1974; FARIN, CROSIER e FARIN, 2001).

### **Placentação**

Muito se tem estudado a respeito dos distúrbios na placentação em animais clonados e sua relação com as anormalidades observadas em clones. Acredita-se que a principal causa de perdas de prenhez no primeiro trimestre de gestação seja devido a anormalidades no desenvolvimento ou na função placentária (HEYMAN *et al.* 2002; LEE *et al.* 2004). Os abortos ocorrem principalmente devido a uma elevada frequência de perdas pós-implantação e inibição do desenvolvimento fetal (LEE *et al.* 2004; PALMIERI *et al.* 2008).

As razões para tais perdas ainda não são bem entendidas (PALMIERI *et al.* 2008), mas acredita-se que falhas na prenhez de clones possam estar relacionadas à anormalidades placentárias, como placentomegalia, redução da vascularização na membrana corioalantoidiana, hipoplasia do epitélio trofoblástico e membrana basal alterada (LEE *et al.* 2004, PALMIERI *et al.* 2008). As razões pelas quais ocorrem tais alterações ainda não estão completamente esclarecidas, porém, pesquisas indicam que seja devido a falhas na reprogramação celular levando a modificações epigenéticas dos principais genes reguladores essenciais para o desenvolvimento da placenta normal (PALMIERI *et al.* 2008).

Nos embriões clonados que conseguem implantar observam-se membranas fetais e cotilédones maiores e edematosos. Além disso, encontra-se número reduzido de placentomas que apresentam tamanho e peso maior que o normal (CHAVATTE-PALMER *et al.* 2002, PACE *et al.* 2002). Acredita-se que o aumento de tamanho e peso dos placentomas seja devido a tentativa de compensar um número reduzido dos mesmos (CHAVATTE-PALMER *et al.* 2002). Lee *et al.* (2004) estudando a formação fetal do cotilédone e a vascularização das membranas corioalantoidianas observaram que a mesma se inicia normalmente em animais

clonados, por volta do dia 50 de gestação, porém, menos cotilédones formam placentomas com êxito.

Panarace *et al.* (2007) utilizando a avaliação ultrassonográfica para estimar a viabilidade fetal de bovinos clonados correlacionou a observação de edema placentário, associado a um número de placentomas reduzido e com tamanho aumentado ao maior risco de perda da gestação. Palmieri *et al.* (2008) acreditam que a alta taxa de perdas tardias em animais clonados possa estar relacionada à circulação materno-fetal prejudicada, tomando por base a alta prevalência de defeitos vasculares placentários.

### **Hidropisia, distocia e falhas no reconhecimento materno fetal**

Um problema muito comum em prenhez de animais clonados é a hidropisia. Acredita-se que problemas durante a placentação estejam relacionados à maior taxa de hidropisias em animais clonados. Heyman *et al.* (2002) observaram que as receptoras que desenvolveram hidropisia grave possuíam placentomas aumentados de tamanho e em menor número.

A hidropisia é a principal causa de morte materna e fetal em prenhez de animais clonados. Cerca de 60% das perdas tardias de animais clonados são devido à hidropisia (LEE *et al.* 2004). O feto morre na fase final da gestação devido a compressão causada pelo líquido dentro do útero e à falta de nutrição oriunda da placenta ou muitas vezes vem a óbito no pós-parto imediato, devido a problemas na adaptação à vida extrauterina. A receptora vem a óbito devido ao excessivo tamanho uterino que impede o consumo de alimentos, deixando-a magra e debilitada, além do acúmulo de fluidos dentro do útero que conduz à severa desidratação e alterações hemodinâmicas relacionadas à compressão dos grandes vasos (HILLMAN e GILBERT, 2007).

A distocia também é outra alteração bastante comum em prenhez de animais clonados. Nessas prenhez a distocia ocorre frequentemente devido ao excessivo tamanho fetal (KATO *et al.* 1998), sendo comum a realização de cesariana. Estudos indicam que fetos com anormalidade de crescimento dentro do útero que nascem muito acima ou abaixo do tamanho ideal têm dificuldades na adaptação da vida extrauterina no período pós-parto imediato e a distocia tem sido relacionada à redução da sobrevivência neonatal (GARRY *et al.* 1996).

Outro problema muito comum associado à clonagem é a falta de preparação das receptoras de clones para o parto. Estas receptoras, mesmo quando a termo, muitas vezes não apresentam características de proximidade ao parto, tais como: relaxamento de ligamentos pélvicos, relaxamento de vulva, desenvolvimento da glândula mamária e início natural do parto e com frequência apresentam algum grau de hidropisia (KATO *et al.* 1998; WILMUT *et al.* 2002).

Lee *et al.* (2004) acreditam que o reconhecimento materno-fetal deficiente esteja relacionado ao desenvolvimento anormal da placenta e aos problemas placentários citados anteriormente, o que levaria à falta de preparação para o parto observada em receptoras de bezerros clonados. A expressão reduzida de proteínas envolvidas na regulação da placentogênese, fetogênese, esteroidogênese e a atividade do sistema imunitário pode ser responsável pelas falhas no reconhecimento materno-fetal em receptoras de bezerros clonados (PALMIERI *et al.* 2008).

### **Defeitos genéticos**

Alterações na transcrição de genes podem estar relacionadas às anormalidades observadas em prenhez de clones. Autores acreditam que os defeitos observados em animais clonados, tais como: problemas na placentação, perda precoce de embriões, hidropisias, macrossomia, entre outros, podem estar relacionados ao resultado de uma reprogramação incompleta do núcleo da célula somática doadora, o que leva a uma falta de expressão ou desenvolvimento anormal de genes importantes contribuindo para baixa eficiência geral da técnica de clonagem (DANIELS, HALL, e TROUNSON, 2000; LEE, *et al.* 2004).

Daniels, Hall, e Trounson (2000) em um estudo comparando os padrões de transcrição de seis genes importantes no desenvolvimento, observaram transcrição anormal em três genes, a saber, IL6, FGF4 e FGFR2, estes genes desempenham um papel importante na implantação e desenvolvimento inicial pós-implantação em mamíferos e a alteração em sua expressão pode estar relacionada à maior taxa de perdas pós-implantação em animais clonados.

Chavatte-Palmer *et al.* (2002) estudando a expressão de IGF-I (principal regulador do crescimento após o nascimento), IGF-II (principal regulador do crescimento dentro do útero) e IGFBP<sub>2</sub> (responsável por regular taxas de

crescimento e desenvolvimento celular), observaram que IGF-I e IGFBP não mostraram diferenças na expressão quando comparou-se prenhez de animais clonados com animais não clonados, porém, IGF-II foi mais elevada ao nascimento em clones que em controles, podendo esta alteração estar relacionada ao aparecimento da macrosomia em animais clonados.

Mesmo os animais aparentemente saudáveis podem ter alterações na expressão gênica que não são graves o suficiente para impedir o desenvolvimento no nascimento, porém, estas alterações podem causar anormalidades fisiológicas sutis que podem ser difíceis de detectar. A ampla desregulação de genes de animais clonados sugere que mamíferos podem ser tolerantes a determinadas anormalidades epigenéticas e que a letalidade pode somente ocorrer como resultado de defeitos genéticos cumulativos (HUMPHERYS *et al.* 2001).

### **Perdas tardias e neonatais**

Em gestações de clones é comum a ocorrência de perdas no último trimestre de gestação e no período neonatal. A maior parte destas perdas ocorre devido à hidropisia (LEE *et al.* 2004). Perdas tardias tem um sério efeito econômico sobre o custo da clonagem, pois as receptoras tem que ser mantidas sob condições controladas por vários meses, sem um resultado final satisfatório (HEYMAN *et al.* 2002).

Animais clonados frequentemente nascem fracos e necessitam de tratamento intensivo para sobreviver. Garry *et al.* (1996) trabalhando com bezerros provenientes de clonagem de células embrionárias relataram que estes demoraram a ficar em estação e a apresentar reflexo de sucção. Estas anormalidades de comportamento foram documentadas como fatores de risco para morbidade/mortalidade de neonatos clonados. Panarace *et al.* (2007) relataram que a incidência de mortalidade ao nascimento em seu laboratório foi de 18%, já para Heyman *et al.* (2002) esta percentagem foi relativamente baixa, 10%, porém, ainda assim um número bastante expressivo quando comparado com animais não clonados, 2,9% (USDA, 2010).

### **Características fenotípicas e laboratoriais de bezerros clonados**

Observações de campo demonstraram que animais clonados nascem aparentemente normais e bem formados, porém, a incidência de problemas no

período neonatal é alta, mesmo quando o manejo do neonato é feito de forma correta, realizando estímulo respiratório adequado, cura do umbigo, colostragem e aquecimento do neonato, ainda assim o número de animais clonados que vem a óbito em decorrência de infecções bacterianas é bastante expressivo, mesmo que o atendimento seja realizado tão logo quanto possível (GARRY *et al.* 1996). Estima-se que 75% dos animais clonados necessitam de antibioticoterapia nos primeiros dias de vida, tendo por principais motivadores o aparecimento de hipertermia, cordão umbilical aumentado e persistência do canal do úraco (PANARACE *et al.* 2007). Na experiência de Taneja *et al.* (2001) praticamente todos os neonatos necessitaram ser hospitalizados para cuidados intensivos, ainda assim a taxa de sucesso foi de apenas 50%.

A origem das anormalidades fetais ainda não está bem esclarecida, porém são relatados como principais fatores que levam o animal a óbito: hipotermia, imaturidade pulmonar, atelectasia e hipertensão pulmonar, que ocorre devido à hipoxemia e vasoconstrição (TANEJA *et al.* 2001). Akagi *et al.* (2003) relatam que a incidência de mortalidade neonatal foi de 63% em seu trabalho, um número bastante alto, porém, que não difere muito de outros autores. Taneja *et al.* (2001) relataram uma taxa de mortalidade de 50% e Panarace *et al.* (2007) afirmam que em suas pesquisas 42% dos bezerros morreram, desde o parto até 150 dias de vida.

Quanto aos parâmetros laboratoriais, as análises mostraram que animais clonados apresentam parâmetros laboratoriais dentro da normalidade, tomando por base as referências de bovinos adultos. Valores de hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular médio, concentração corpuscular de hemoglobina, leucometria global e diferencial foram considerados normais quando comparados a animais não clonados (LANZA *et al.* 2001; CHAVATTE-PALMER *et al.* 2002; BATCHELDER *et al.* 2007). Em relação aos parâmetros bioquímicos, as avaliações de ureia, creatinina, glicose, bilirrubina, aspartato aminotransferase (AST), sorbitol desidrogenase (SDH), albumina, globulina, proteínas totais, glicose e ácidos graxos livres apresentaram-se dentro da faixa de normalidade (GARRY *et al.* 1996; LANZA *et al.* 2001; CHAVATTE-PALMER *et al.* 2002; BATCHELDER *et al.* 2007). Além disso, exames de hemogasometria não revelaram anormalidades em relação a concentração de eletrólitos e para os valores de pO<sub>2</sub> (90,4 a 94,7 mmHg) e pCO<sub>2</sub> (34,3 a 38,8 mmHg). A análise da urina apresentou-se negativa para glicose, corpos

cetônicos, bilirrubina, sangue, proteína e os valores de densidade e pH foram normais (LANZA *et al.* 2001).

Neonatos clonados frequentemente apresentam dificuldade na regulação da temperatura corporal. Vários são os relatos de que estes animais sofrem com hipotermia ou hipertermia, porém, não parece haver relação entre elas (CHAVATTE-PALMER *et al.* 2002). Garry *et al.* (1996) relatam que bezerros clonados apresentaram uma tendência à hipotermia, apesar dos cuidados de suporte. Esta hipotermia foi relatada como um fator que reduziria a chance de sobrevivência do animal (TANEJA *et al.* 2001). Chavatte-Palmer *et al.* (2002) relataram perturbações em relação ao controle da temperatura corporal em animais clonados de até três semanas de vida, ao que os autores chamaram de hipertermia paradoxal, pois estes animais apresentavam picos de temperatura de até 41,8°C, sem quaisquer alterações clínicas, e esta hipertermia não apresentava resposta ao tratamento com anti-inflamatórios não esteroidais. Os autores sugerem que as alterações observadas na temperatura corporal possam estar relacionadas a menor síntese de hormônios tireoidianos, pois concentrações plasmáticas de tiroxina (T4) foram menores nos clones que nos controles. Panarace *et al.* (2007) relatam que problemas na regulação da temperatura corporal estavam presentes em 37% dos bezerros clonados avaliados em seu experimento.

Em relação à síntese de hormônios e metabolismo de bezerros clonados, estudos mostram que não houve diferença entre neonatos clonados quando comparados a bezerros não clonados, nos valores de hormônio do crescimento, cortisol e glucagon. Já os valores de tiroxina (T4) e triiodotironina (T3) foram mais baixos em clones que em controles, podendo estar relacionados aos problemas de regulação da temperatura corporal citados anteriormente. Em contrapartida os valores de insulina e leptina foram mais altos em clones que em controles ( GARRY *et al.* 1996; CHAVATTE-PALMER *et al.* 2002).

### **Macrossomia**

Bezerros clonados frequentemente apresentam uma anormalidade chamada de macrossomia ou síndrome do neonado gigante (Large Offspring Syndrome – LOS). Os animais afetados pela síndrome nascem com peso superior ao de neonatos normais, possuem placentas edematosas, umbigo grosso e vasos

umbilicais aumentados (YOUNG *et al.* 1998; WILMUT *et al.* 2002). Estes animais comumente apresentam problemas na adaptação à vida extrauterina, manifestando no pós-parto imediato ou tardio dificuldade respiratória, acidose metabólica, hipotermia e reflexo de sucção diminuído ou ausente, além disso, animais que apresentam macrossomia são tidos como neonatos de risco e apresentam maiores chances de óbito no período neonatal (TANEJA *et al.* 2001; PANARACE *et al.* 2007).

A macrossomia foi inicialmente reconhecida em neonatos oriundos da técnica de FIV, aonde se acreditava que o meio de cultivo do embrião influenciaria no seu aparecimento, porém, com a melhoria na técnica conseguiu-se reduzir consideravelmente sua incidência nesta biotécnica (YOUNG *et al.* 1998; HORTA, 1999), porém, a macrossomia ainda é frequentemente observada em neonatos oriundos da técnica de clonagem, estima-se que 20-30% dos bezerros nascidos por esta técnica apresentem a síndrome (GARRY *et al.* 1996; WILMUT *et al.* 2002).

Atualmente, o mecanismo proposto para explicar a ocorrência da macrossomia é a alteração dos padrões epigenéticos, que resultam na alteração da expressão de genes importantes para a regulação do crescimento e desenvolvimento da placenta e do feto (CHAVATTE-PALMER *et al.* 2002; FARIN, FARIN, e PIEDRAHITA, 2004). Para Lee *et al.* (2004) a macrossomia observada em animais clonados não é consequência da cultura *in vitro* e mostra correlação com as anormalidades observadas na placenta, corroborando para a afirmação de Chavatte-Palmer *et al.* (2002) de que o aumento do tamanho e peso dos clones foi específico da técnica de clonagem e não decorre da exposição aos meios de cultivo utilizados na técnica.

Diversos autores comparam a macrossomia à Síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) ou a Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel (SGBS) que acomete bebês humanos (GARRY *et al.* 1996; CHAVATTE-PALMER *et al.* 2002; RHIND *et al.* 2003). Estudos comprovaram que estas síndromes são causadas por alterações na impressão de genes durante o desenvolvimento fetal (PILIA *et al.* 1996; WEKSBURG *et al.* 1996; CANO-GAUCI *et al.* 1999; WEKSBURG *et al.* 2010). Bebês humanos acometidos pela BWS apresentam excessivo tamanho fetal, defeitos na parede abdominal, displasia renal, visceromegalias e defeitos musculoesqueléticos, semelhantes aos observados em bezerros clonados (CANO-GAUCI *et al.* 1999; RHIND *et al.* 2003; WEKSBURG *et al.* 2010). Estas anormalidades estão associadas



à expressão anormal de IGF2, principal gene responsável pelo crescimento do feto (WEKSBERG *et al.* 2010). Já na SGBS os bebês afetados apresentam crescimento excessivo, anormalidades esqueléticas, defeitos renais e cardíacos, tendo como causa a mutação no gene GPC3, que controla a divisão celular e o crescimento (PILIA *et al.* 1996; WEKSBERG *et al.* 1996). O aumento da utilização de técnicas de reprodução assistida tem sido associado ao aumento da frequência de aparecimento dessas síndromes em humanos (WEKSBERG *et al.* 2010).

Os sinais encontrados em bebês humanos afetados pelas síndromes descritas anteriormente são muitas vezes semelhantes aos animais afetados pela macrossomia (CHAVATTE-PALMER *et al.* 2002; RHIND *et al.* 2003). Em bezerros e em cordeiros clonados têm-se pesquisado a influência dos genes IGF na incidência da síndrome. Chavatte-Palmer *et al.* (2002) ao mapear a expressão de genes IGF (IGF-I, IGF-II e IGF-BP) não encontraram diferença na expressão de IGF-I e IGF-BP, porém, a expressão de IGF-II foi maior em animais clonados que em controles, podendo estar relacionada ao aparecimento de macrossomia em bezerros clonados. Cano-gauci *et al.* (1999) em um estudo com camundongos deficientes em GPC3 comprovou que os animais apresentaram crescimento excessivo, maior taxa de morte perinatal, rins císticos ou displásicos e desenvolvimento pulmonar anormal, indicando que alterações no gene GPC3 podem causar alterações nos animais semelhantes às observadas em humanos.

Estudos indicam que a macrossomia se desenvolve ainda no primeiro terço da gestação. Por volta do 100º dia de gestação fetos clonados já exibiam desregulação do crescimento e aqueles que sobreviveram até o 150º dia de gestação foram 17% mais pesados que os controles (LEE *et al.* 2004). As anormalidades do crescimento parecem estar limitadas ao crescimento intrauterino, pois após o nascimento a variação de peso e a taxa de crescimento de clones e controles mostra-se bastante semelhante (GARRY *et al.* 1996).

### **Achados de necropsia**

Em relação aos achados de necropsia em bovinos clonados alguns autores relatam que não foram encontrados defeitos macroscópicos (KATO *et al.* 1998; LEE *et al.* 2004), concordando com os dados de Wilmut *et al.* (1997) que na análise *post-mortem* de ovinos clonados não encontraram qualquer anormalidade ou sinais de

infecção. Em contrapartida, as mortes neonatais são frequentemente associadas a problemas respiratórios e de bezerros que estavam deprimidos e em decúbito prolongado. (WILSON *et al.* 1995, GARRY *et al.* 1996, PANARACE *et al.* 2007). Bezerros que morrem devido à anóxia aguda ou imaturidade pulmonar muitas vezes não demonstram achados patológicos significativos (MEE, 2011), isto pode explicar a aparente normalidade em muitas necropsias. Panarace *et al.* (2007) relatam que desconforto respiratório foi o sinal mais comum em bezerros que morreram sem qualquer outro sinal de anormalidade.

Em relação aos achados gerais observa-se grande quantidade de gordura envolvendo órgãos abdominais (CHAVATTE-PALMER *et al.* 2002, AKAGI *et al.* 2003), anemia (GARRY *et al.* 1996) e septicemia aguda (GARRY *et al.* 1996, TANEJA *et al.* 2001). O cordão umbilical muitas vezes encontra-se aumentado e são comuns infecções umbilicais, abscessos umbilicais, hemorragia de vasos umbilicais e persistência do canal do úraco (GARRY *et al.* 1996; TANEJA *et al.* 2001; PACE *et al.* 2002; WILMUT *et al.* 2002; LEE *et al.* 2004; PANARACE *et al.* 2007). Problemas posturais e musculoesqueléticos tais como anormalidades de articulações e membros, contratura de tendão, luxação de patela e poliartrite fibrinosa são comumente relatados (GARRY *et al.* 1996; PACE *et al.* 2002; AKAGI *et al.* 2003; PANARACE *et al.* 2007).

Problemas respiratórios respondem por grande parte dos achados macroscópicos em necropsias de neonatos clonados, são eles: imaturidade pulmonar com pulmões atelectásicos, edema pulmonar, pneumonia, aspiração de mecônio, hipertensão pulmonar, congestão pulmonar, hérnia diafragmática, hipoplasia pulmonar e excesso de fluido pleural (GARRY *et al.* 1996; KATO *et al.* 1998; TANEJA *et al.* 2001; PACE *et al.* 2002; ENRIGHT *et al.* 2002; WILMUT *et al.* 2002; AKAGI *et al.* 2003). Problemas cardíacos relatados em clones foram: cardiomegalia, associada as vezes à hepatomegalia, insuficiência circulatória, defeito cardíaco congênito, falência cardíaca (efusão peritoneal e pleural, coração globoso e dilatado, congestão hepática), ducto arterioso patente e dilatação dos vasos principais (GARRY *et al.* 1996; LANZA *et al.* 2001; PACE *et al.* 2002; WILMUT *et al.* 2002; AKAGI *et al.* 2003; LEE *et al.* 2004).

Nos rins foram observadas alterações em relação ao tamanho do órgão que se apresenta frequentemente aumentado e com acúmulo de gordura disperso na

cápsula, alguns apresentavam uma aparência disforme. Também é descrita pielonefrite secundária à infecção umbilical, além de depósito de lipofuscina no epitélio tubular (PACE *et al.* 2002; CHAVATTE-PALMER *et al.* 2002; ENRIGHT *et al.* 2002; AKAGI *et al.* 2003; LEE *et al.* 2004). O fígado frequentemente apresenta hepatomegalia, esteatose hepática, aspecto de noz moscada, e fibrose hepática (CHAVATTE-PALMER *et al.* 2002; WILMUT *et al.* 2002; AKAGI *et al.* 2003; LEE *et al.* 2004).

Problemas do trato gastrointestinal relatados em bezerros clonados foram enterite crônica, intussuscepção com obstrução intestinal, úlceras por consumo de corpos estranhos, torção da raiz do mesentério (GARRY *et al.* 1996; LANZA *et al.* 2001; PACE *et al.* 2002; WILMUT *et al.* 2002; AKAGI *et al.* 2003). Disfunções do sistema nervoso tais como: hidrocefalia, anormalidades estruturais do cérebro e edema cerebral também são relatadas (PACE *et al.* 2002; WILMUT *et al.* 2002; AKAGI *et al.* 2003).

Em relação ao desenvolvimento do sistema imunológico foram relatadas, deficiência imunológica, insuficiência do sistema imunitário e hipoplasia linfóide (ENRIGHT *et al.* 2002; WILMUT *et al.* 2002), porém, pesquisas relatam que mesmo com o sistema imunitário menos desenvolvido bezerros clonados apresentam resposta à infecção semelhante aos animais não clonados (LANZA *et al.* 2001).

### **Características comportamentais e reprodutivas**

Savage *et al.* (2003) objetivando verificar as influências genéticas de comportamento em clones do mesmo genótipo, observaram que os clones não mostraram indícios comportamentais de envelhecimento, exceto por brincar menos e aparentemente apresentar maior curiosidade e agressividade que os controles. Os clones preferiam ficar em companhia de seus companheiros clones e do doador a companhia dos controles que podem indicar mecanismos genéticos de reconhecimento de parentesco. Bezerros clonados apresentaram comportamento normal desenvolvendo noções de dominância e hierarquia (LANZA *et al.* 2001).

Em relação ao desenvolvimento dos animais clonados, estudos apontam que a taxa de crescimento, o desenvolvimento ponderal e a idade reprodutiva em clones não diferiu quando comparado aos controles não clonados (LANZA *et al.* 2001; ENRIGHT *et al.* 2002; PACE *et al.* 2002; HEYMAN *et al.* 2004).

Enright *et al.* (2002) analisaram o nível de hormônios sexuais em novilhas clonadas e concluíram que as mesmas possuem nível hormonal normal e capacidade reprodutiva intacta, concordando com estudos feitos por Pace *et al.* (2002). Quanto a lactação e ao desenvolvimento da prole de animais clonados, estudos comprovam que não houve diferença entre o leite de animais clonados e não clonados e que a prole de animais clonados mostrou-se aparentemente saudável, não apresentando os problemas que acometem os clones (LANZA *et al.* 2001; PACE *et al.* 2002; PANARACE *et al.* 2007).

Em relação a atividade reprodutiva de machos, estudos comprovam que o sêmen de touros clonados apresenta a mesma qualidade quando comparado ao sêmen de animais não clonados e esses são capazes de gerar prole fértil e normal (HEYMAN *et al.* 2004; ORTEGON *et al.* 2007; PANARACE *et al.* 2007).

## **OBJETIVOS**

O presente estudo objetivou relatar os principais achados macroscópicos e microscópicos de bovinos clonados abortados e com óbito neonatal.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, K. Regulamenta as atividades de pesquisa, produção, importação, liberação no ambiente e comercialização de clones de mamíferos, exceto humanos, peixes, anfíbios, répteis e aves. **Projeto de lei do senado nº 73, de 2007**. 2007 Disponível em: <http://www.senado.gov.br/atividade/materia/detalhes.asp>
- AKAGI, S., ADACHI, N., MATSUKAWA, K., KUBO, M., e TAKAHASHI, S. Developmental potential of bovine nuclear transfer embryos and postnatal survival rate of cloned calves produced by two different timings of fusion and activation. **Molecular reproduction and development**, 66(3), p.264–272 2003.
- BAGUISI, A., BEHBOODI, E., MELICAN, D. T., POLLOCK, J. S., DESTREMPES, M. M., CAMMUSO, C., WILLIAMS, J. L., *et al.* Production of goats by somatic cell nuclear transfer. **Nature biotechnology**, 17(5), p.456–61. 1999.
- BATCHELDER, C. A, BERTOLINI, M., MASON, J. B., MOYER, A. L., HOFFERT, K. A, PETKOV, S. G., FAMULA, T. R., *et al.* Perinatal physiology in cloned and normal calves: hematologic and biochemical profiles. **Cloning and stem cells**, 9(1), p.83–96. 2007.
- BERG, D. K., LI, C., ASHER, G., WELLS, D. N., e OBACK, B. Red deer cloned from antler stem cells and their differentiated progeny. **Biology of reproduction**, 77(3), p. 384–94 2007.
- BRASIL, Regulamento do serviço de registro genealógico das raças zebuínas / **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Associação Brasileira de Criadores de Zebu**, p. 30, 2012.
- CANO-GAUCI, D. F., SONG, H. H., YANG, H., MCKERLIE, C., CHOO, B., SHI, W., PULLANO, R., *et al.* Glypican-3 – deficient Mice Exhibit Developmental Overgrowth and Some of the Abnormalities Typical of Simpson-Golabi-Behmel Syndrome, **The Journal of Cell Biology** 146(1), p.255–264 1999.
- CHAVATTE-PALMER, P., HEYMAN, Y., RICHARD, C., MONGET, P., LEBOURHIS, D., KANN, G., CHILLIARD, Y., *et al.* Clinical , Hormonal , and Hematologic Characteristics of Bovine Calves Derived from Nuclei from Somatic Cells. **Biology of reproduction**, 66, p.1596–1603 2002.
- CHESNÉ, P., ADENOT, P. G., VIGLIETTA, C., BARATTE, M., BOULANGER, L., e RENARD, J.-P.. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature biotechnology**, 20(4), p.366–9. 2002.
- DANIELS, R., HALL, V., e TROUNSON, A. O. Analysis of Gene Transcription in Bovine Nuclear Transfer Embryos Reconstructed with Granulosa Cell Nuclei. **Biology of reproduction**, 63, p.1034–1040. 2000.
- DINNYÉS, A., DE SOUSA, P., KING, T., e WILMUT, I. Somatic Cell Nuclear Transfer: Recent Progress and Challenges. **Cloning and stem cells**, 4(1), 81–90. 2002.

ENRIGHT, B. P., TANEJA, M., SCHREIBER, D., RIESEN, J., TIAN, X. C., FORTUNE, J. E., e YANG, X. Reproductive characteristics of cloned heifers derived from adult somatic cells. **Biology of reproduction**, 66(2), p.291–6. 2002.

FARIN, C. E., FARIN, P. W., e PIEDRAHITA, J. A. Development of fetuses from in vitro–produced and cloned bovine embryos. **Journal of Animal Science**, 82(E), p.53–62. 2004.

FARIN, P. W., CROSIER, A. E., e FARIN, C. E. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, 55, p.151–170. 2001.

GALLI, C, DUCHI, R., MOOR, R. M., e LAZZARI, G. Mammalian leukocytes contain all the genetic information necessary for the development of a new individual. **Cloning**, 1(3), 161–70. 1999.

GALLI, CESARE, LAGUTINA, I., CROTTI, G., COLLEONI, S., TURINI, P., PONDERATO, N., DUCHI, R., *et al.* Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. **Nature**, 424(6949), p.635. 2003.

GARRY, F. B., ADAMS, R., MCCANN, J. P., e ODDE, K. G. Postnatal characteristics os calves produced by nuclear transfer cloning. **Theriogenology**, 45, p.141–152. 1996.

HEYMAN, Y., CHAVATTE-PALMER, P., LEBOURHIS, D., CAMOUS, S., VIGNON, X., e RENARD, J. P. Frequency and Occurrence of Late-Gestation Losses from Cattle Cloned Embryos. **Biology of reproduction**, 66, p.6–13. 2002.

HEYMAN, Y., RICHARD, C., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., LAZZARI, G., CHAVATTE-PALMER, P., VIGNON, X., e GALLI, C. Zootechnical performance of cloned cattle and offspring: preliminary results. **Cloning and stem cells**, 6(2), p.111–20, 2004.

HILLMAN, R., e GILBERT, R. O. Reproductive diseases. In T. Divers e Simon Peek (Eds.), **Rebhun's Diseases of Dairy Cattle** (2nd ed., p.395–396). St. Louis, Missouri. 2007.

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

HUBBERT, W. T. Factors affecting survival of the bovine fetus and neonate. **Theriogenology**, 1 p.15–34 1974. Disponível em: [http://agricola.nal.usda.gov/cgi-bin/Pwebrecon.cgi?v1=3eti=1,3eCNT=30eHC=4eReIBibID=35477254eHostBibID=35045899eProfileCode=ISSARTESEQ=20130331170359ePID=IMqwhHSKRNIETJsXvX8\\_rN7YPI2TL](http://agricola.nal.usda.gov/cgi-bin/Pwebrecon.cgi?v1=3eti=1,3eCNT=30eHC=4eReIBibID=35477254eHostBibID=35045899eProfileCode=ISSARTESEQ=20130331170359ePID=IMqwhHSKRNIETJsXvX8_rN7YPI2TL)

HUMPHERYS, D., EGGAN, K., AKUTSU, H., HOCHEDLINGER, K., III, W. M. R., BINISZKIEWICZ, D., YANAGIMACHI, R., *et al.* Epigenetic Instability in ES Cells and Cloned Mice. **Science**, 293, p.95–97. 2001.

JONKER, F. H. Fetal death: comparative aspects in large domestic animals, **Animal Reproduction Science**, 83, p.415–430. 2004.

KATO, Y., TANI, T., SOTOMARU, Y., KUROKAWA, K., KATO, J.-Y., DOGUCHI, H., YASUE, H., *et al.* Eight Calves Cloned from Somatic Cells of a Single Adult. **Science**, 282, p.2095–2098. 1998.

KHATIR, H., e ANOUASSI, A. Preliminary assessment of somatic cell nuclear transfer in the dromedary (*Camelus dromedarius*). **Theriogenology**, 70, p.1471–1477. 2008.

LANZA, R P, CIBELLI, J. B., DIAZ, F., MORAES, C. T., FARIN, P. W., FARIN, C. E., HAMMER, C. J., *et al.* Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. **Cloning and stem cells**, 2(2), p.79–90. 2000.

LANZA, ROBERT P, CIBELLI, J. B., FABER, D., SWEENEY, R. W., HENDERSON, B., NEVALA, W., WEST, M. D., *et al.* Cloned Cattle Can Be Healthy and Normal. **Science**, 294(nov.), p.1893–1894. 2001.

LEE, B. C., KIM, M. K., JANG, G., OH, H. J., YUDA, F., KIM, H. J., HOSSEIN, M. S., *et al.* Dogs cloned from adult somatic cells. **Nature**, 436(7051), p.641. 2005.

LEE, R. S. F., PETERSON, A. J., DONNISON, M. J., RAVELICH, S., LEDGARD, A. M., LI, N., OLIVER, J. E., *et al.* Cloned cattle fetuses with the same nuclear genetics are more variable than contemporary half-siblings resulting from artificial insemination and exhibit fetal and placental growth deregulation even in the first trimester. **Biology of reproduction**, 70, p.1–11. 2004.

LOI, P., PTAK, G., BARBONI, B., FULKA, J., CAPPAL, P., e CLINTON, M. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. **Nature biotechnology**, 19(10), p.962–4. 2001.

MEE, J. Bovine Neonatal Survival – Is Improvement Possible? Epidemiology of Bovine Perinatal Mortality Incidence of Perinatal Mortality. **WCDS Advances in Dairy Technology**, 23, p.161–174. 2011.

MEE, J. F. Managing the dairy cow at calving time, **Veterinary Clinics Food Practice** 20, p.521–546. 2004.

ORTEGON, H., BETTS, D. H., LIN, L., COPPOLA, G., PERRAULT, S. D., BLONDIN, P., e KING, W. A. Genomic stability and physiological assessments of live offspring sired by a bull clone, Starbuck II. **Theriogenology**, 67(1), p.116–126. 2007.

PACE, M. M., AUGENSTEIN, M. L., BETTHAUSER, J. M., CHILDS, L. A., EILERTSEN, K. J., ENOS, J. M., FORSBERG, E. J., *et al.* Ontogeny of cloned cattle to lactation. **Biology of reproduction**, 67(1), p.334–9. 2002.

PALMIERI, C., LOI, P., PTAK, G., e DELLA SALDA, L.. Review paper: a review of the pathology of abnormal placentae of somatic cell nuclear transfer clone pregnancies in cattle, sHEp, and mice. **Veterinary pathology**, 45(6), p.865–880. 2008.

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

PEREIRA, A. F., e FREITAS, V. J. F. Clonagem em ruminantes: progressos e perspectivas atuais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 33(1), p.118–128. 2009.

PILIA, G., HUGHES-BENZIE, R. M., MACKENZIE, A., BAYBAYAN, P., CHEN, E. Y., HUBER, R., NERI, G., *et al.* Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome. **Nature Genetics**, 12(mar), p.241–247. 1996.

POLEJAEVA, I. A., CHEN, S. H., VAUGHT, T. D., PAGE, R. L., MULLINS, J., BALL, S., DAI, Y., *et al.* Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature**, 407(6800), p.86–90. 2000.

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

RUMPF, R., IGUMA, L. T., e SOUZA, R. V. Produção de clones pela transferência nuclear em bovinos. **Revista CFMV**, 7(22), p.16–24. 2001.

SAVAGE, A. F., MAULL, J., TIAN, X. C., TANEJA, M., KATZ, L., DARRE, M., e YANG, X. Behavioral observations of adolescent Holstein heifers cloned from adult somatic cells. **Theriogenology**, 60, p.1097–1110. 2003.

SCHWINDT, T. T., BARNABÉ, G. F., e MELLO, L. E. A. M. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, 16(1), p.13–19. 2005.

SHI, D., LU, F., WEI, Y., CUI, K., YANG, S., WEI, J., e LIU, Q. Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. **Biology of reproduction**, 77(2), p.285–91. 2007.

SHIN, T., KRAEMER, D., PRYOR, J., LIU, L., RUGILA, J., HOWE, L., BUCK, S., *et al.* A cat cloned by nuclear transplantation. **Nature**, 415(6874), p.859. 2002.

TANEJA, M., FRENCH, R., LEVINE, H., TAURO-MILLER, D., e X. YANG. Clinical and pathological status of cloned calves born pre-term. **Theriogenology**, 55 (abstract), p.293. 2001.

USDA. Mortality of Calves and Cattle on U.S. Beef Cow-calf Operations. **Centers for Epidemiology and Animal Health** p. 1-4, 2010.

WAKAYAMA, T., PERRY, A. C., ZUCCOTTI, M., JOHNSON, K. R., e YANAGIMACHI, R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Nature**, 394(6691), p.369–74. 1998.



- WEKSBERG, R., SHUMAN, C., e BECKWITH, J. B. Beckwith – Wiedemann syndrome. **European Journal of Human Genetics**, 18, p.8–14. 2010.
- WEKSBERG, R., SQUIRE, J. A., e TEMPLETON, D. M. Glypicans: a growing trend. **Nature Genetics**, 12(mar), p.225–227. 1996.
- WILMUT, I., BEAUJEAN, N., SOUSA, P. A. DE, KING, T. J., e PATERSON, L. A. Somatic cell nuclear transfer. **Nature**, 419(Out), p.583–586. 2002.
- WILMUT, I., SCHNIEKE, A. E., MCWHIR, J., KIND, A. J., e CAMPBELL, K. H. S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, 385, p.810–813. 1997.
- WILSON, J. ., WILLIAMS, J. ., BONDIOLI, K. ., LOONEY, C. ., WESTHUSIN, M. ., e MCCALLA, D. Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. **Animal Reproduction Science**, 38(1-2), p.73–83. 1995.
- WOODS, G. L., WHITE, K. L., VANDERWALL, D. K., LI, G.-P., ASTON, K. I., BUNCH, T. D., MEERDO, L. N., *et al.* A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. **Science**, 301(5636), p.1063. 2003.
- YOUNG, L. E., SINCLAIR, K. D., e WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sHEp. **Journals of Reproduction and Fertility**, 3, p.155–163. 1998.
- ZATZ, M. Clonagem e células-tronco. **Ciência e Cultura**, 56(3), p.23–27. 2004.
- ZHOU, Q., RENARD, J.-P., LE FRIEC, G., BROCHARD, V., BEAUJEAN, N., CHERIFI, Y., FRAICHARD, A., *et al.* Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. **Science**, 302(5648), p.1179. 2003.

## CAPÍTULO II

### ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS DE BEZERROS CLONADOS ABORTADOS

#### INTRODUÇÃO

Atualmente as biotécnicas de reprodução vêm se difundindo e ganhando cada vez mais força em nosso país. Técnicas como inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE), fertilização *in vitro* (FIV) e transferência nuclear de células somáticas (TNCS), ou clonagem, estão cada vez mais acessíveis ao produtor, sendo amplamente utilizadas com fins comerciais. A clonagem é uma biotécnica que permite produzir um indivíduo geneticamente idêntico a outro (MEE, 2004; ZATZ, 2004) e existem diversas aplicações potenciais para esta técnica. No que compete à medicina veterinária a clonagem poderia auxiliar na conservação de espécies ameaçadas de extinção (LANZA *et al.* 2000) na recuperação de genótipos considerados importantes do ponto de vista do melhoramento genético animal e na possibilidade de recuperar um genótipo de um animal que por razões diversas não pode expressar todo seu potencial zootécnico.

A técnica de TNCS consiste na transferência do núcleo de uma célula somática já diferenciada para o interior de um oócito previamente enucleado, havendo a fusão dos mesmos por impulsos elétricos (WILMUT *et al.* 1997). Desta forma, o material genético doador é fundido com o citoplasma do oócito enucleado, havendo assim a reprogramação celular. A célula assim formada se desdiferencia em uma célula totipotente, capaz então de formar um indivíduo completo (ZATZ, 2004). As células totipotentes produzidas passam por um cultivo para o desenvolvimento do embrião. Após o cultivo, o embrião formado é transferido para o útero de uma receptora sincronizada, iniciando a prenhez (WILMUT *et al.* 1997).

Apesar da capacidade de produzir clones ter melhorado significativamente, a eficiência da técnica ainda está muito aquém do desejado. Apenas 0,5 a 5% dos embriões reconstruídos produzem animais a termo (HEYMAN *et al.* 2002; PALMIERI *et al.* 2008) esta baixa taxa de sucesso é um resultado cumulativo das perdas nos estágios embrionário, fetal e perinatal (WILMUT *et al.* 2002). Heyman *et al.* 2002 estimam que para TNCS ocorrem entre 33–43% de perdas até 90° dia de gestação,

um valor muito alto quando comparado à 8,5%-11,8 % para animais produzidos por FIV (JONKER, 2004).

As razões para as excessivas perdas que ocorrem nos estágios fetal e embrionário em animais oriundos de TNCs são pobremente entendidas (DESOUZA *et al.* 2001), porém, pesquisas indicam que a baixa eficiência e o desenvolvimento anormal de animais clonados são principalmente em virtude da reprogramação incompleta e da expressão gênica anormal (DANIELS, HALL, e TROUNSON, 2000).

As anormalidades na reprogramação genética podem se refletir em diversas alterações placentárias, como edema, redução na vascularização, hipoplasia do epitélio trofoblástico e alterações na lâmina basal (PALMIERI *et al.* 2008). Podem ainda ocorrer maior taxa de hidropisias, que em receptoras de clones pode chegar a 43%, (WELLS *et al.* 2003). Crescimento fetal desproporcional, deformidades musculoesqueléticas e desenvolvimento anormal de órgãos do feto, gerando assim um aumento das taxas de morte embrionária precoce e aborto (FARIN, PIEDRAHITA, e FARIN, 2006).

De acordo com Grunert e Gregory (1984) e Roberts (1971), aborto pode ser definido como expulsão de feto vivo sem condições de sobrevivência ou de feto morto em qualquer fase da gestação. Entende-se como feto inviável aquele que se encontra no período fetal, que em bovinos é 42 a 270 dias de gestação (ASTIZ *et al.* 2010). Nesta fase o feto ao ser expulso ou tendo o parto induzido não sobrevive fora do útero, em condições naturais (ASTIZ *et al.* 2010).

Escassos são os estudos que detalham os achados anatomopatológicos de animais clonados abortados. DeSousa *et al.* (2001) avaliando o desenvolvimento fetal de ovelhas clonadas observaram crescimento retardado dos fetos, além de hepatomegalia, hemorragia cutânea e deficiência na vascularização placentária. Wells *et al.* (1997) avaliando fetos ovinos clonados observaram, subdesenvolvimento, hidronefrose, defeito em septo interventricular e anormalidades musculoesqueléticas. Rhind *et al.* (2003) avaliando cordeiros clonados que não foram viáveis após o nascimento observaram defeitos no fechamento da parede corporal e defeitos musculoesqueléticos, além de, problemas renais, pulmonares, cardiovasculares e hepáticos. Hill *et al.* (2000) observaram em fetos de bezerros clonados esteatose hepática e desenvolvimento retardado de membros e cabeça.

Em um outro trabalho encontraram ainda anasarca, alterações pulmonares, cardíacas, hepáticas, placentárias e umbilicais (HILL *et al.* 1999).

A detalhada investigação anatomopatológica de animais clonados que vieram a óbito pode ser útil no entendimento das anormalidades que ocorrem nestes animais e este conhecimento pode ajudar a aprimorar a técnica de clonagem na espécie bovina. O presente estudo objetivou relatar os principais achados macroscópicos e microscópicos de bovinos clonados abortados.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Amostras provenientes de 28 fetos bovinos abortados foram avaliadas neste estudo. Todos os fetos eram clones de animais de raças zebuínas oriundos de uma empresa privada de clonagem comercial. As amostras foram coletadas no período de 2009 a 2012 e a análise do material foi realizada no período de 2011 a 2013. Programas de sanidade do rebanho, vacinação, vermifugação e controle de doenças foram realizados de acordo com o manejo sanitário da propriedade.

Das 28 (100%) amostras classificadas como abortos, 12 (43%) eram de aborto espontâneo (ESPONTÂNEO) e 16 (57%) de abortos induzido (INDUZIDO) (Tabela 2.1). O aborto induzido foi realizado mediante indução precoce do parto, devido principalmente à hidropisia severa apresentada pelas receptoras. Os animais abortados possuíam idade gestacional entre 151 até 269 dias de gestação. Foram coletadas informações relativas ao período gestacional, data e hora da morte e histórico clínico do animal e da receptora. Os animais foram submetidos à necropsia logo após a constatação do óbito ou aborto.

Fragmentos de fígado, baço, rim, pulmões e coração foram coletados e fixados em formol 10% tamponado. Após a fixação, as amostras foram rotineiramente processadas para histopatologia, seguindo clivagem, inclusão e embebição em parafina e microtomia (4 micrômetros). A leitura das amostras foi realizada em microscópio de luz de lâminas coradas pela hematoxilina-eosina (HE).

Após triagem inicial amostras de fígado e rim foram submetidas à coloração de Ácido Periódico de Schiff (PAS) para evidenciação de glicogênio. As amostras de rim foram submetidas à coloração de PAS, de Hall, para evidenciação de pigmentos biliares, de Perls, para evidenciação de ferro e de lipofuscina e de Ziehl Neelsen para lipofuscina.

**Tabela 2.1:** Distribuição das amostras nos grupos, idade gestacional e peso (Kg) de clones bovinos abortados.

<b>Nº Animal</b>	<b>Grupo</b>	<b>Dias Gestação</b>	<b>Peso (Kg)</b>
1	Espontâneo	151	10
2	Espontâneo	169	13
3	Induzido	173	16
4	Induzido	195	22
5	Espontâneo	208	8
6	Induzido	210	38
7	Espontâneo	212	10
8	Espontâneo	213	30
9	Induzido	214	30
10	Espontâneo	220	23
11	Induzido	220	23
12	Induzido	221	25
13	Induzido	225	20
14	Induzido	226	20
15	Espontâneo	226	20
16	Induzido	228	23
17	Induzido	228	35
18	Espontâneo	233	22
19	Induzido	236	35
20	Induzido	238	21
21	Espontâneo	248	10
22	Induzido	250	44
23	Induzido	250	32
24	Espontâneo	262	25
25	Espontâneo	265	79
26	Induzido	266	28
27	Induzido	269	37
28	Espontâneo	269	55

## **RESULTADOS**

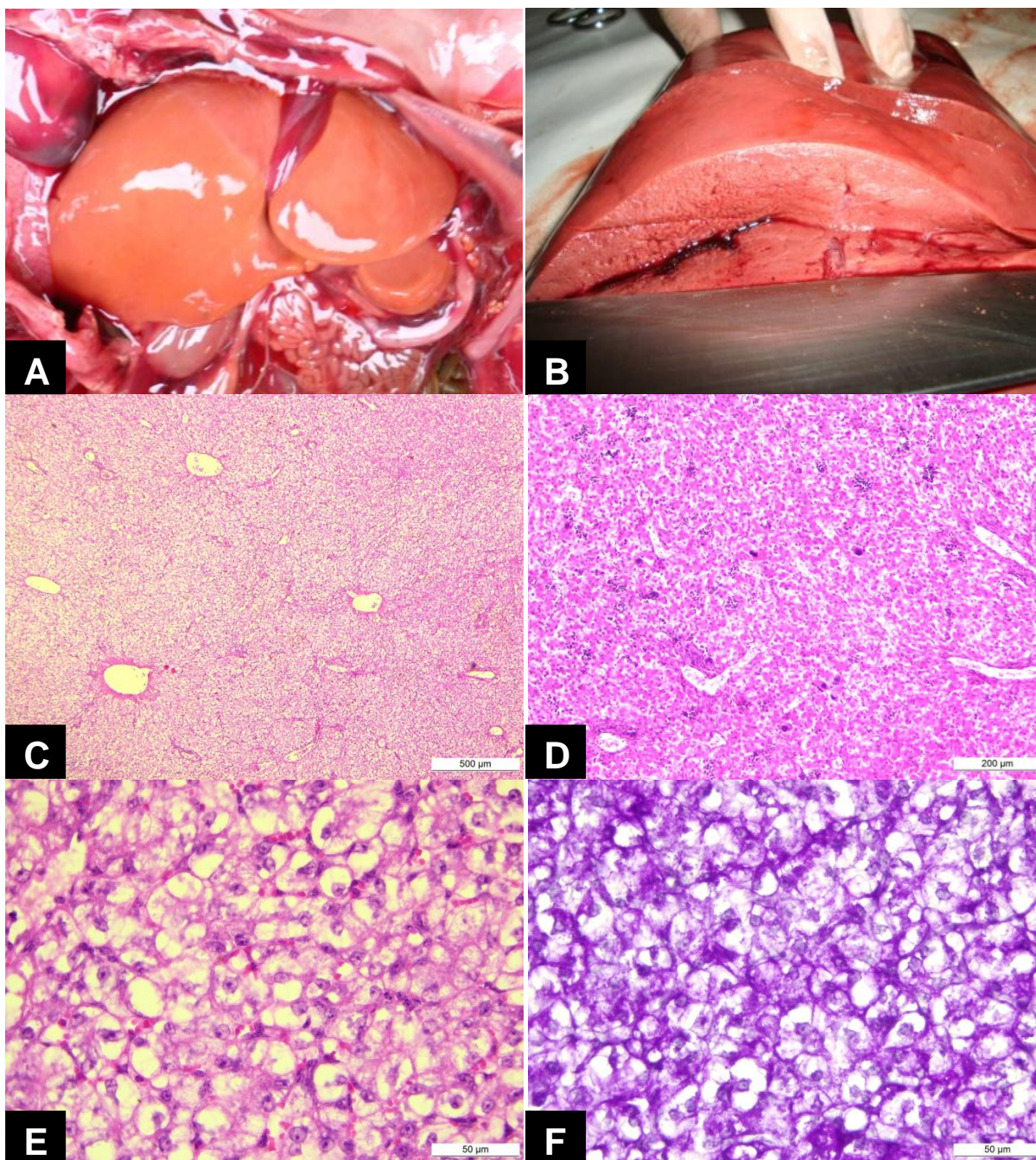
Nos abortos espontâneos e induzidos a autólise acentuada foi um achado comum, tanto na macroscopia quanto na microscopia. Nestas amostras não foi possível a avaliação anatomopatológica. Nos animais cujo aborto foi induzido, entretanto, houve a possibilidade de se identificar outros achados, os quais estão listados abaixo.

No fígado macroscopicamente foram identificadas alterações relativas ao tamanho do órgão que se apresentava com bordos hepáticos arredondados, hepatomegalia, porém, sem evidenciação de padrão lobular (Figura 2.1-A). Quanto à coloração, o fígado se apresentou na maioria dos animais com coloração mais

pálida a amarelada tanto na superfície quanto ao corte, apresentava aspecto brilhante e por vezes superfície irregular e sua consistência estava mais amolecida que o normal (Figura 2.1-B). Microscopicamente, das 26 amostras analisadas 19 apresentaram autólise, o que impossibilitou a avaliação das mesmas, todas as amostras provenientes do grupo ESPONTÂNEO (10/10) apresentaram autólise, e dos animais do grupo INDUZIDO (9/16). Sete amostras de fígado foram passíveis de serem analisadas e pôde-se observar um padrão lobular bem definido, sinusóides quase imperceptíveis e espaços porta próximos em 4 animais (Figura 2.1-C). A hematopoiese extramedular é um achado comum em fetos não clonados e foi observada em 5 animais deste estudo (Figura 2.1-D). Além disso foi identificada degeneração hepática em 6/7 animais, esta degeneração foi observada na forma de vacuolização dos hepatócitos, que de acordo com a morfologia dos vacúolos demonstrou ser de origem gordurosa (vacúolos bem definidos deslocando o núcleo para a periferia (Figura 2.1-E). Havia também em alguns animais hepatócitos contendo microvacúolos, estes foram identificados como sendo provenientes de degeneração glicogênica uma vez que houve coloração positiva acentuada pelo método do ácido periódico de Schiff (PAS), (Figura 2.1-F). Foi observado infiltrado histiocítico em 1 animal e infiltrado neutrofílico em outro animal. A distribuição dos achados observados no fígado está disposta na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2:** Alterações microscópicas observadas no fígado de animais abortados.

<b>Achados</b>	<b>Induzido (n=7)</b>
Vacuolização de hepatócitos	6 (86%)
Vacuolização discreta	1 (17%)
Vacuolização moderada	2 (33%)
Vacuolização acentuada	3 (50%)
PAS negativo	3 (43%)
PAS positivo	2 (29%)
Padrão lobular bem definido	4 (57%)
Sinusóides quase imperceptíveis	4 (57%)
Espaços porta próximos	4 (57%)
Hematopoiese extramedular	5 (71%)
Infiltrado histiocítico	1 (14%)
Infiltrado neutrofílico	1 (14%)



**Figura 2.1:** Alterações macroscópicas e microscópicas observadas no fígado de fetos bovinos clonados abortados.

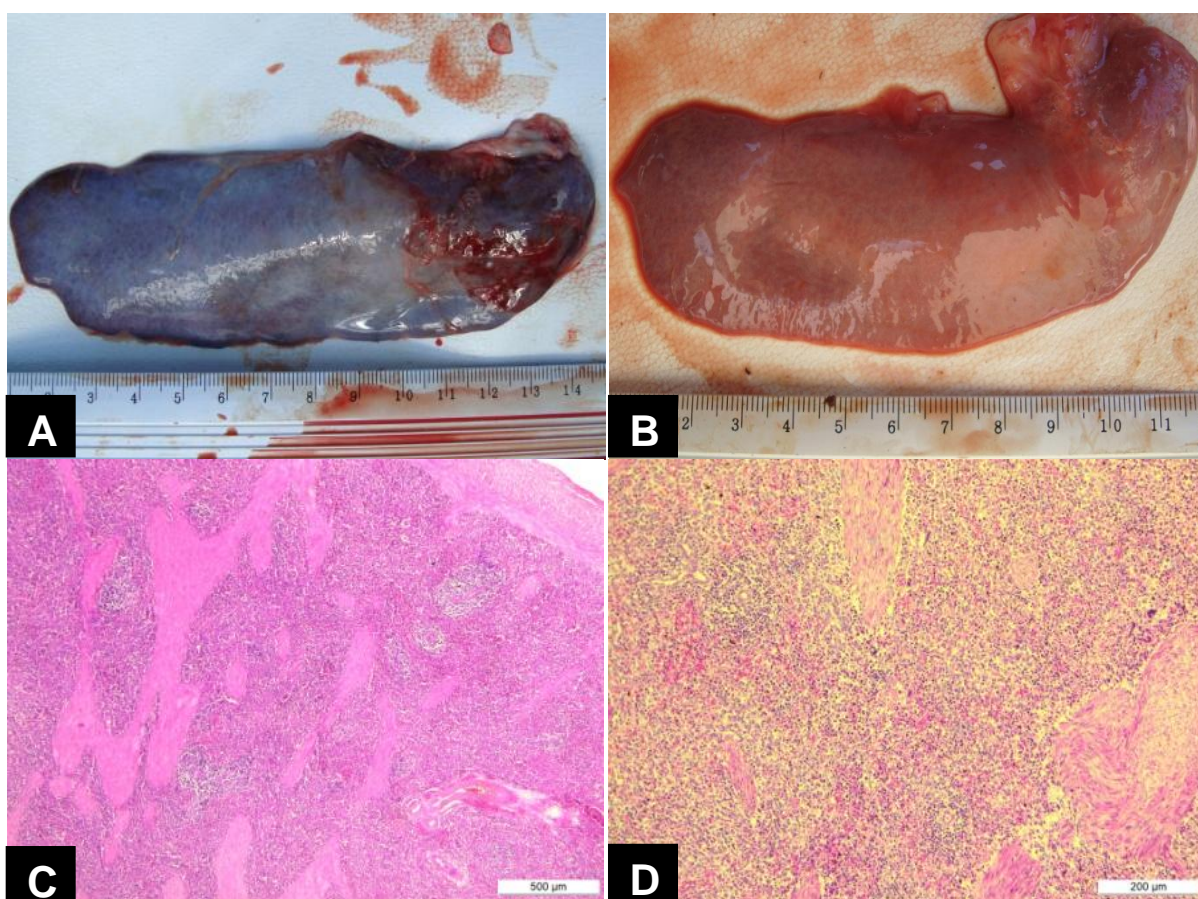
**(A)** Fígado aumentado de tamanho, com bordos hepáticos arredondados, hepatomegalia. **(B)** Coloração pálida, esteatose hepática. **(C)** Padrão lobular bem definido, espaços porta próximos (HE 500µm). **(D)** Hematopoiese extramedular (HE 200µm) **(E)** Vacuolização acentuada de hepatócitos (HE 50µm). **(F)** Vacuolização apresentando coloração positiva pelo método de PAS (PAS 50µm).

No baço macroscopicamente foi observada palidez, com coloração menos intensa que o normal e cápsula ligeiramente espessada (Figura 2.2-A, B). Microscopicamente, das 23 amostras analisadas 17 apresentaram autólise, que impossibilitou a avaliação das mesmas, das amostras provenientes do grupo

ESPONTÂNEO 10/10 e nos animais do grupo INDUZIDO 7/13 apresentaram autólise. Nas 6 amostras restantes pode-se identificar pouca evidência da polpa branca em 2/6 animais (Figura 2.2-C, D), hemorragia em 2/6 animais, congestão e hematopoiese extramedular (Figura 2.2-D) foram observadas em 1/6 animais de cada grupo e 3/6 animais apresentaram o órgão sem quaisquer alterações. A distribuição dos achados observados no baço está descrita na Tabela 2.3.

**Tabela 2.3:** Alterações microscópicas observadas no baço de animais abortados.

Achados	Induzido (n=6)
Pouca evidência da polpa branca	1 (17%)
Hemorragia	2 (33%)
Congestão	1 (17%)
Hematopoiese extramedular	1 (17%)
Ausência de achados	3 (50%)



**Figura 2.2:** Alterações macroscópicas e microscópicas observadas no baço de fetos bovinos clonados abortados.

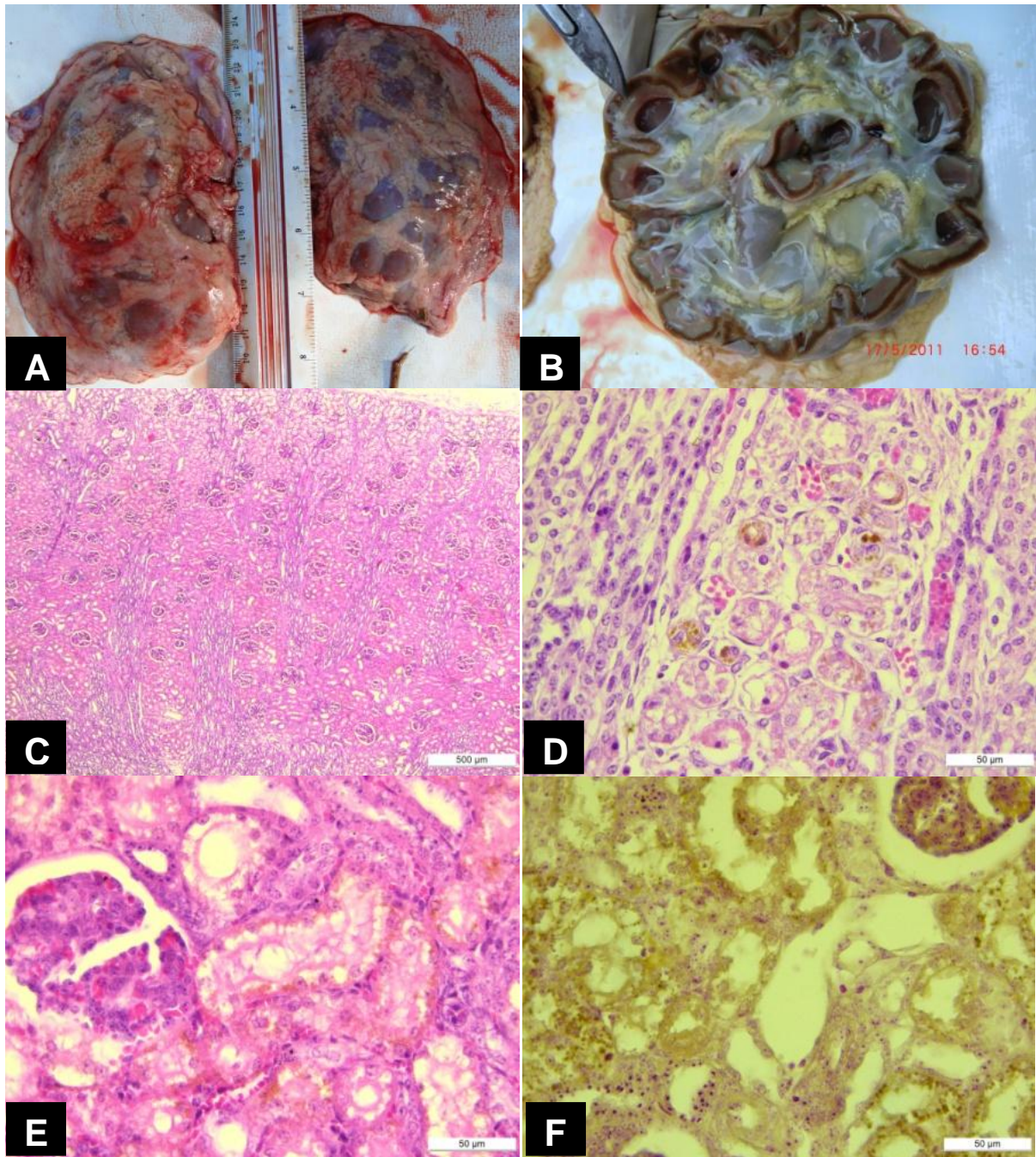
(A, B) Baço evidenciando palidez e espessamento da cápsula esplênica. (C) Pouca evidência de polpa branca (HE 500µm). (D) Hematopoiese extramedular folículos linfóides em formação (HE 200µm).



Os rins macroscopicamente apresentaram moderado acúmulo de gordura perirrenal (Figura 2.3-A), coloração castanho-enegrenhada tanto na superfície quanto ao corte, na região cortical e a região medular apresentando-se vinhosa. Na região da pelve (cálice e papilas renais) observou-se quantidade moderada de material gelatinoso, translúcido e amarelado, de consistência amolecida com dilatações císticas da pelve e cálices renais (Figura 2.3-B). Microscopicamente, das 28 amostras analisadas 21 apresentaram autólise, que impossibilitou a avaliação das mesmas, destas todas as amostras provenientes do grupo ESPONTÂNEO (12/12) e nos animais do grupo INDUZIDO 9/16. Nas 7 amostras restantes foram identificados em 6/7 animais glomérulos com aspecto embrionário, estes glomérulos apresentam-se bastante próximos, com tamanho menor quando comparado ao rim de animais adultos e hiper celulares (Figura 2.3-C). Observou-se também em 6/7 animais, grânulos de coloração acastanhada no interior dos túbulos corticais e medulares (Figura 2.3-D, E). Na tentativa de identificar a origem destes pigmentos foram realizadas colorações especiais para identificação de pigmentos biliares (Hall), para evidênciação de ferro e hemossiderina (Perls), para evidênciação de glicogênio (PAS) e para evidênciação de lipofuscina (lipofuscina e Ziehl Neelsen). Destas, apenas a coloração de lipofuscina corou os grânulos observados, porém não tão caracteristicamente (Figura 2.3-F), quando comparado a um controle para lipofuscina. Foi observada também dilatação tubular em 3/7 casos e congestão cortical e medular em 2/7 animais. Os achados observados nos rins estão dispostos na Tabela 2.4.

**Tabela 2.4:** Alterações microscópicas observadas nos rins de animais abortados.

<b>Achados</b>	<b>Induzido (n=7)</b>
Grânulos acastanhados no interior de túbulos	6 (86%)
Quantidade discreta	2 (29%)
Quantidade moderada	1 (14%)
Quantidade acentuada	1 (14%)
Glomérulos com aspecto embrionário	6 (86%)
Dilatação tubular	3 (43%)
Congestão	2 (29%)



**Figura 2.3:** Alterações macroscópicas e microscópicas observadas nos rins de fetos bovinos clonados abortados.

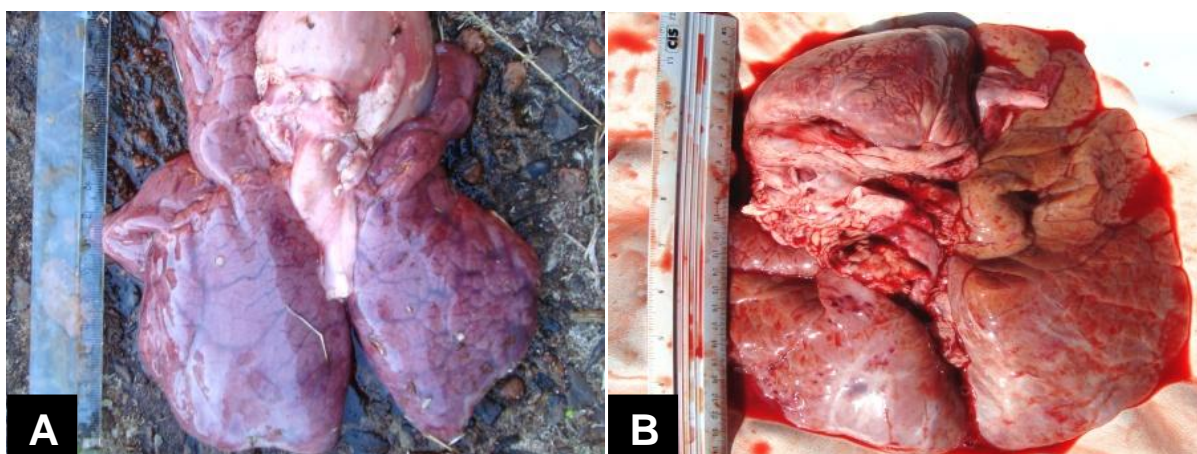
(A) Acúmulo de gordura perirrenal. (B) Material gelatinoso, translúcido e amarelado, de consistência amolecida e com dilatações císticas da pelve e cálices renais. (C) Glomérulos com aspecto embrionário (HE 500µm). (D, E) Grânulos acastanhados no interior de túbulos corticais (HE 50µm). (F) Grânulos corados pela coloração de lipofuscina (Lipofuscin 50µm).

Nos pulmões macroscopicamente foi encontrada congestão, atelectasia (Figura 2.5-A, B), padrão homogêneo da superfície, que se apresentava brilhante e lisa (sem diferenciação lobular), principalmente em lobos caudais. Microscopicamente, das 27 amostras analisadas 16 apresentaram autólise, que

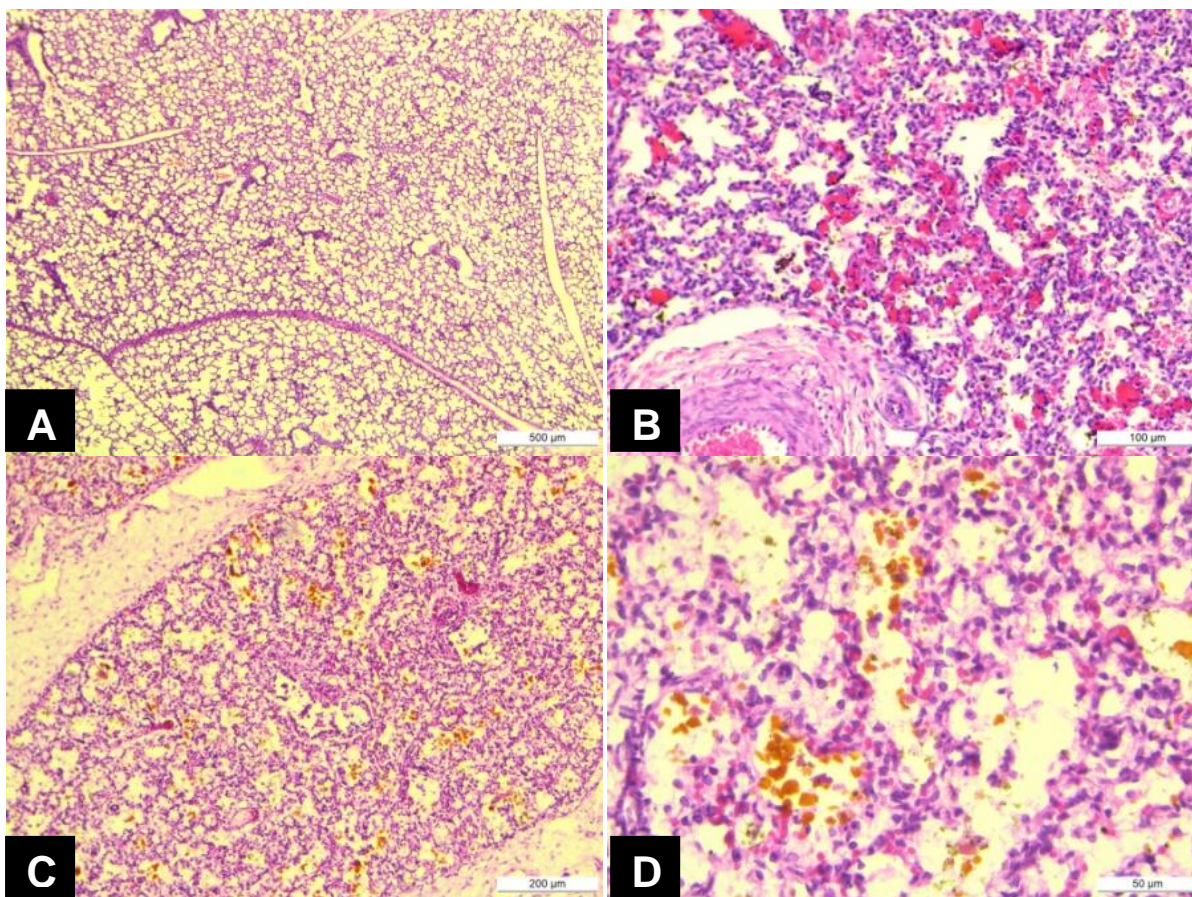
impossibilitou a avaliação das mesmas, das amostras provenientes do grupo ESPONTÂNEO 9/11 e nos animais do grupo INDUZIDO 7/16 apresentaram autólise. Nos 11 fragmentos restantes pôde-se observar atelectasia (Figura 2.5-A), infiltrado inflamatório (Figura 2.5-B) em 9/11 amostras, nestes fragmentos o infiltrado observado foi linfocítico em 1/9 caso, histiocítico em 4/9 casos e neutrofílico em 3/9 casos, alguns animais apresentavam mais de um tipo de infiltrado no mesmo órgão. Mecônio na luz alveolar foi observada em 4/11 animais (Figura 2.5-C, D), congestão pulmonar discreta multifocal foi observada em 1/11 animal e hemorragia em cápsula, septo interlobular e pleura foi identificada em 2 animais cada. Em 2/11 animais os fragmentos observados não apresentaram qualquer lesão. A distribuição dos achados observados nos pulmões está descrita na Tabela 2.5.

**Tabela 2.5:** Alterações microscópicas observadas nos pulmões de animais abortados.

Achados	Espontâneo (n=2)	Induzido (n=9)	Total (n=11)
Infiltrado linfocítico	0	1 (11%)	1 (9%)
Infiltrado histiocítico	1 (50%)	4 (44%)	5 (45%)
Infiltrado neutrofílico	0	3 (33%)	3 (27%)
Mecônio	1 (50%)	3 (33%)	4 (36%)
Congestão	1 (50%)	0	1 (9%)
Hemorragia	0	2 (22%)	2 (18%)
Ausência de achados	0	2 (22%)	2 (18%)



**Figura 2.4:** Alterações macroscópicas observadas nos pulmões de fetos bovinos clonados abortados. (A, B) Atelectasia e congestão pulmonar.

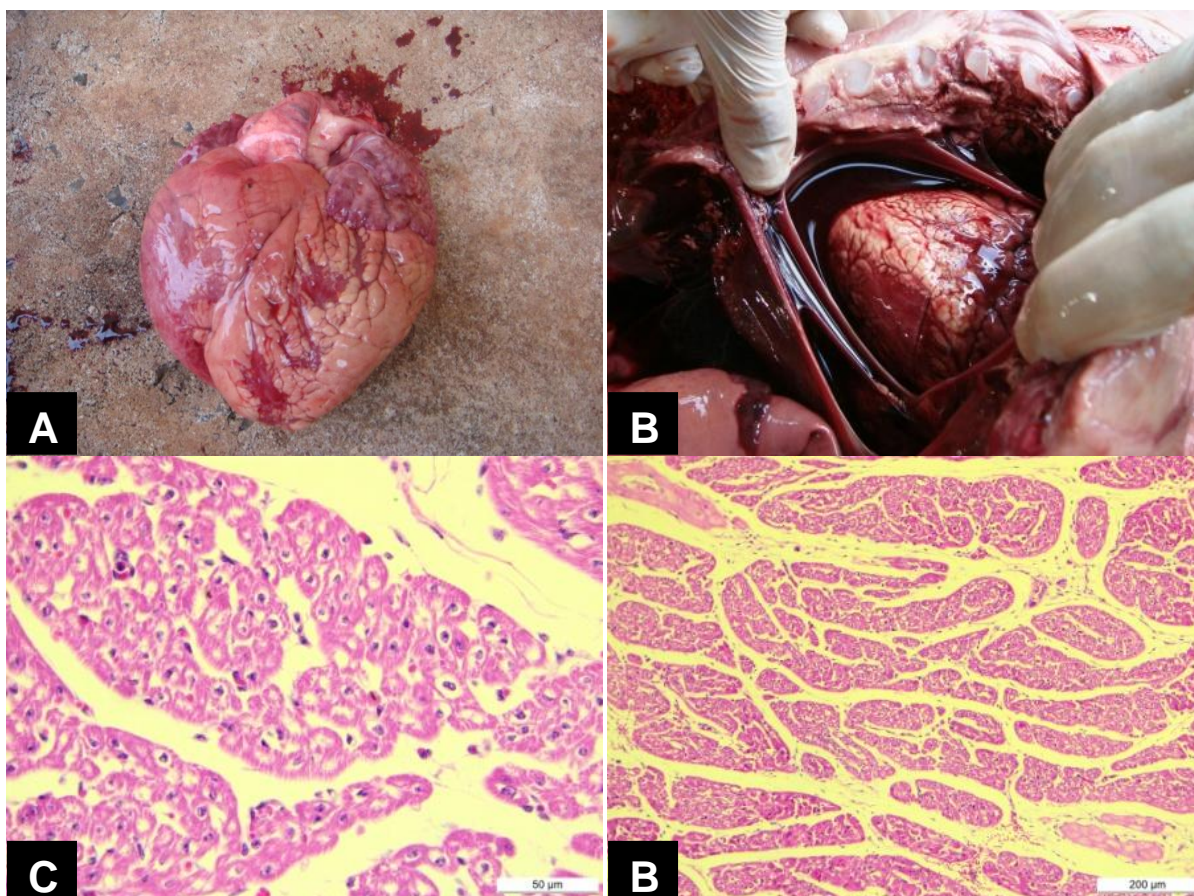


**Figura 2.5:** Alterações microscópicas observadas nos pulmões de fetos bovinos clonados abortados. **(A)** Atelectasia (HE 500µm). **(B)** Presença de infiltrado linfocítico e neutrofílico (HE 100µm). **(C, D)** Mecônio na luz alveolar (HE 200 µm e 50µm).

No coração macroscopicamente foi observada acentuada quantidade de gordura em epicárdio (Figura 2.6-A) um animal apresentou hemopericárdio (Figura 2.6-B). A coloração do miocárdio mostrou-se mais pálida que o normal. Não foram identificados defeitos congênitos macroscópicos. Microscopicamente foram avaliados 27 fragmentos de coração. Em 16 foi observada autólise, impossibilitou a avaliação das mesmas, das amostras provenientes do grupo ESPONTÂNEO 9/12 e nos animais do grupo INDUZIDO 7/15 apresentaram autólise. Nos 11 fragmentos restantes foi observada vacuolização de fibras cardíacas (Figura 2.6-C) em 9/11 animais, esta vacuolização foi observada muitas vezes juntamente a um maior espaçamento de feixes de fibras cardíacas (Figura 2.6-D), observado em 7/11 animais. Em 1/11 animal os fragmentos observados não apresentaram qualquer lesão. A distribuição dos achados observados no coração está descrita no Tabela 2.6.

**Tabela 2.6:** Alterações microscópicas observadas no coração de animais abortados.

Achados	Espontâneo (n=3)	Induzido (n=8)	Total (n=11)
Vacuolização	2 (67%)	7 (87,5%)	9 (81%)
Espaçamento	2 (67%)	5 (62,5%)	7 (63%)
Ausência de achados	1 (33%)	0	1 (9%)



**Figura 2.6:** Alterações macroscópicas e microscópicas observadas no coração de fetos bovinos clonados abortados.

(A) Acentuada quantidade de gordura em epicárdio, (B) Hemopericárdio, (C) Vacuolização de cardiomiócitos (HE 50µm), (D) Espaçamento de feixes de fibras cardíacas (HE 500µm).

## DISCUSSÃO

Alguns autores relatam que não obtiveram resultados dignos de nota na necropsia de bezerros clonados (TANEJA *et al.* 2001; CHAVATTE-PALMER *et al.* 2002), porém, algumas anormalidades são relatadas com certa frequência e a maioria delas também foi observada no presente trabalho, esteatose e degeneração hepáticas, pouca evidência de polpa branca, congestão em fígado, baço e rins, discutidos posteriormente. Outros achados observados no presente estudo ainda não foram relatados por outros grupos de pesquisa e merecem estudos mais detalhados.

Nos animais que foram abortados espontaneamente a autólise foi uma característica predominante. Este fato é comprovado pela literatura que relata que autólise moderada a severa ocorre em bezerros que vem a óbito espontaneamente, isso se deve ao fato que geralmente os fetos ao serem expulsos do útero já estão mortos há muitos dias (OKANO *et al.* 2003; MORRELL *et al.* 2008). Por esta razão, pela multiplicidade de causas associadas ao aborto e pela falta de amostras adequadas, na maioria dos casos a etiologia do aborto não pode ser determinada (KIRKBRIDE, 1990).

As alterações macroscópicas observadas no fígado, como hepatomegalia, coloração pálida e amarelada e consistência amolecida foram observadas por outros autores em animais clonados abortados (HILL *et al.* 2000; DESOUSA *et al.* 2001; HEYMAN *et al.* 2002). DeSousa *et al.* (2001) sugerem que a hepatomegalia, bem como demais anormalidades presentes em bezerros clonados sejam devidas às alterações placentárias, tais como: edema de placenta e placentomas maiores e em menor número, estas alterações placentárias levariam a um déficit nutricional do feto que conduziria à degeneração hepática, bem como retardamento no desenvolvimento fetal. Esta hipótese está de acordo com o observado no presente estudo aonde foi observada degeneração hepática em 86% das amostras analisadas, sendo 50% destas caracterizadas como degeneração hepática acentuada. Esta degeneração foi interpretada como degeneração gordurosa (devido à morfologia dos vacúolos), estando de acordo com os achados obtidos por Hill *et al.* (1999) e Akagi *et al.* (2003), porém, por vezes esteve associada à degeneração glicogênica, uma vez que nos microvacúolos houve coloração acentuada pelo método de PAS em 2/6 casos. Como a presença de glicogênio hepático é um achado comum só foi considerada degeneração glicogênica quando houve coloração acentuada pelo método PAS, concordando com os dados de Okano *et al.* (2003) que afirmam que houve coloração PAS positiva em fígados de fetos não clonados e a presença de glicogênio nestes animais seria um achado normal. Acredita-se que o padrão lobular bem definido juntamente com sinusóides quase imperceptíveis e espaços porta próximos possam ser um achado comum a animais neonatos, devido sobretudo à imaturidade hepática, amostras de fígado de bezerros neonatos não clonados também apresentam esta mesma característica (dados não publicados). Hematopoiese extramedular é um achado comum em fetos e neonatos

segundo Okano *et al.* (2003) e ocorre principalmente devido à imaturidade do sistema hematopoiético.

Os achados observados no baço, coloração pálida, congestão, hemorragia, hematopoiese extramedular e pouca evidenciação dos folículos linfoides, foram também observados por outros autores em bezerros clonados, (SANTOS, 2008) em contrapartida, Okano *et al.* (2003) analisando características microscópicas do baço de bezerros não clonados abortados identificaram estas mesmas características, indicando que estes achados não são específicos de bovinos clonados. Em relação ao espessamento da cápsula esplênica, não foram identificadas alterações semelhantes na literatura.

No que se refere aos rins a coloração castanho-enegrecida observada tanto na cortical como na medular renal também foi observada por Santos, (2008), porém não há uma hipótese clara sobre a origem da sua ocorrência. A presença de cistos e dilatação da pelve e cálices renais, muitas vezes esteve associada à dilatação tubular na microscopia e está de acordo com os achados observados por Rhind *et al.* (2003) e Wells *et al.* (1997) que analisando amostras de rim de cordeiros e bezerros clonados, respectivamente, observaram como uma das principais alterações a formação de cistos e a hidronefrose bilateral severa. Em relação à característica embrionária dos glomérulos, este foi um achado considerado normal, pois bezerros neonatos não clonados também apresentam esta mesma característica (dados não publicados). Quanto aos grânulos observados no interior dos túbulos renais, não foi possível a identificação de sua origem. No entanto sabe-se que não são decorrentes do acúmulo de pigmentos biliares, ferro, hemossiderina ou glicogênio, pois não foi obtida coloração característica pelas técnicas utilizadas (Hall, Perls e PAS, respectivamente). Okano *et al.* (2003) descrevem uma vacuolização do epitélio tubular renal em bezerros abortados que apresentou marcação positiva no método de PAS, porém, no presente trabalho a coloração de PAS não corou caracteristicamente os grânulos observados, no entanto, houve coloração positiva por este método nos túbulos coletores da medular renal. Os grânulos observados apresentam muitas características semelhantes à lipofuscina, porém, pelas técnicas utilizadas neste estudo não foi possível tal confirmação, a coloração para lipofuscina corou os grânulos, porém, não com a coloração esperada. Segundo Zachary e Mcgavin, (2012) a lipofuscina pode se acumular

dentro das células epiteliais dos túbulos renais em bovinos idosos, na forma de finos grânulos dourados. Macroscopicamente pode ser observada como estrias de coloração marrom no córtex renal, semelhante ao observado na macrocopia nos animais aqui relatados. Akagi, *et al.* (2003) descreveram uma lesão renal como depósito de lipofuscina no epitélio tubular de um bezerro clonado que morreu aos 13 dias de vida. Acredita-se que a presença de tais grânulos seja um achado que mereça estudos posteriores, na tentativa de identificar a origem dos grânulos e sua relação com as alterações renais observadas. A congestão cortical e medular observada no presente trabalho também foi observada por Okano *et al.* (2003) em bezerras não clonadas abortadas espontaneamente, indicando portanto não se tratar de uma alteração específica de animais clonados.

Nos pulmões, o infiltrado de origem linfocítica, neutrofílica e histiocítica foi o achado mais marcante, uma vez que 8/9 amostras apresentaram algum tipo de infiltrado. Infiltrado neutrofílico e histiocítico também foram observados no fígado de 1 animal. Okano *et al.* (2003) afirmam ter encontrado infiltrados mononucleares, discretos a moderados em amostras de fígado, rins e pulmões em bezerras não clonadas abortadas, porém, no mesmo trabalho citam que este infiltrado só foi encontrado em animais abortados, enquanto que nos animais controle, fetos não abortados, não foi identificada sua presença, podendo ser correlacionado à causas infecciosas de aborto. Nas amostras analisadas no presente estudo não é possível excluir a presença de causas infecciosas, porém, a propriedade de origem dos animais clonados conta com rígido programa sanitário, o que reduziria as chances de causas infecciosas. A congestão pulmonar, um achado observado por diversos autores (HILL *et al.* 1999; OKANO *et al.* 2003; RHIND *et al.* 2003) somente foi observada em 1 animal analisado. Hemorragia em cápsula, septo interlobular e pleura observada em 2 animais não foi observada em outros relatos. Foi identificado mecônio na luz alveolar tal como no trabalho de Akagi *et al.* (2003), esta aspiração de mecônio pode ter sido provocada pela indução do parto sem que houvesse parto natural, havendo assim sofrimento fetal. Todos os animais, tanto os abortados espontaneamente quanto os que tiveram o aborto induzido apresentaram atelectasia, concordando com os achados publicados por DeSousa *et al.* (2001), que observaram acentuada atelectasia em cordeiros clonados abortados. A hipertensão pulmonar congênita, citada por diversos autores (HILL *et al.* 1999; DESOUSA *et al.*



2001; RHIND *et al.* 2003) foi observada no presente trabalho, estando correlacionada à elevada pressão venosa sistêmica, congestão hepática e aumento do ventrículo direito, porém, não foram observadas lesões características de espessamento da túnica média dos vasos e desalinhamento dos mesmos tal como observado por Rhind *et al.* (2003) em fetos ovinos clonados. Apenas duas das amostras analisadas no presente estudo apresentaram histologia pulmonar normal contrastando com o observado por Wells *et al.* (1997) que afirmam ter encontrado histologia pulmonar normal nos fetos ovinos clonados analisados.

A observação de maior quantidade de gordura em capsula e pelve renais e em base cardíaca e epicárdio pode estar relacionada ao fato de clones possuírem um maior acúmulo de gordura abdominal, tal como relatado por Chavatte-Palmer *et al.* (2002), apesar de não terem sido encontrados relatos referentes especificamente a estes órgãos na literatura. Acredita-se que o hemopericárdio tenha sido um achado isolado, uma vez que só foi observado em um animal, não foi correlacionado com nenhuma afecção específica e não há relatos semelhantes na literatura. Em relação à palidez observada no miocárdio, não foram encontrados relatos semelhantes ou explicação na literatura consultada. Não foram identificados defeitos congênitos macroscópicos tal como observado por Wells *et al.* (1997) e DeSousa *et al.* (2001). Em relação aos achados microscópicos de vacuolização e espaçamento de fibras cardíacas, não foram encontrados relatos semelhantes em animais clonados. A literatura cita a vacuolização cardíaca tal como a degeneração cardíaca, causada pela infiltração de gordura no miocárdio (THOMSON, 1998), no presente trabalho não é possível afirmar que os vacúolos observados são oriundos de infiltração gordurosa pois as amostras não foram próprias para a realização de coloração específica.

## **CONCLUSÃO**

A coleta de amostras e a padronização dos dados foi dificultada devido ao longo tempo de coleta (5 anos). A metodologia de coleta e os fragmentos de órgãos coletados foram alterados ao longo do tempo, por este motivo se torna difícil a obtenção de uma análise minuciosa de cada animal abortado. Porém, a avaliação dos órgãos coletados possibilita uma análise dos aspectos anatomopatológicos desses tecidos.

De acordo com as alterações observadas pode-se concluir que os órgãos que apresentaram maiores achados patológicos foram o fígado e os pulmões e que alterações nestes órgãos foram predominantes para que o feto se tornasse inviável. É possível que defeitos placentários estejam correlacionados às alterações observadas contudo são necessários estudos posteriores na tentativa de estabelecer uma relação causa-efeito dos achados observados.

Os achados encontrados no presente trabalho vem a corroborar com os achados obtidos por outros autores e denota a necessidade de investigação patológica detalhada de animais clonados que não foram viáveis, na tentativa de mapear as anormalidades apresentadas por estes animais, buscando um maior entendimento de tais achados e colaborando com a melhoria da técnica de clonagem.

## REFERÊNCIAS

- AKAGI, S., ADACHI, N., MATSUKAWA, K., KUBO, M., e TAKAHASHI, S. Developmental potential of bovine nuclear transfer embryos and postnatal survival rate of cloned calves produced by two different timings of fusion and activation. **Molecular Reproduction and development**, 66(3), p.264–272. 2003.
- ASTIZ, S., BULNES, G. A., PARTIDA, E. L., VILLALOBOS, P. N., LOPEZ, C. M., e MARTIN, J. V. G. Bovine neonatology. In J. Hudson, Roberts (Ed.), *Animal and plant productivity* (1st ed., p. 466). **Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)**. 2010. Disponível em: <http://www.eolss.net/Sample-Chapters/C10/E5-15A-33.pdf>
- CHAVATTE-PALMER, P., HEYMAN, Y., RICHARD, C., MONGET, P., LEBOURHIS, D., KANN, G., CHILLIARD, Y., *et al.* Clinical , hormonal , and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. **Biology of reproduction**, 66, p.1596–1603. 2002.
- DANIELS, R., HALL, V., e TROUNSON, A. O. Analysis of Gene Transcription in Bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. *Biology of reproduction*, 63, p.1034–1040. 2000.
- DESOUSA, P. A., KING, T., HARKNESS, L., YOUNG, L. E., WALKER, S. K., e WILMUT, I. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sHEp fetuses and placentae. **Biology of reproduction**, 65, p.23–30. 2001.
- FARIN, P. W., PIEDRAHITA, J. A, e FARIN, C. E. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, 65(1), p.178–91. 2006.
- GRUNERT, E., e GREGORY, R. M. **Diagnóstico e terapêutica da infertilidade na vaca** Porto Alegre: Editora Sulina. p. 174.1984.
- HEYMAN, Y., CHAVATTE-PALMER, P., LEBOURHIS, D., CAMOUS, S., VIGNON, X., e RENARD, J. P. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. **Biology of reproduction**, 66, p.6–13. 2002.
- HILL, J.R., ROUSSEL, A. J., CIBELLI, J. B., EDWARDS, J. F., HOOPER, N. L., MILLER, M. W., THOMPSON, J. A., *et al.* Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). **Theriogenology**, 51, p.1451–1465. 1999.
- HILL, JONATHAN R, BURGHARDT, R. C., JONES, K., LONG, C. R., LOONEY, C. R., SHIN, T., SPENCER, T. E., *et al.* Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first- trimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biology of reproduction**, 63, p.1787–1794. 2000.
- JONKER, F. H. Fetal death: comparative aspects in large domestic animals, **Animal Reproduction Science**. 83, 415–430. 2004.

- KIRKBRIDE, C. A. Infectious bovine rhinotracheitis (bovine herpesvirus group I) viral abortion. In C. A. KIRKBRIDE (Ed.), **Laboratory diagnosis of livestock abortion**. (3a ed., pp. 91–97). Iowa: Iowa State University, 1990.
- LANZA, R. P., CIBELLI, J. B., DIAZ, F., MORAES, C. T., FARIN, P. W., FARIN, C. E., HAMMER, C. J., *et al.* Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. **Cloning and stem cells**, 2(2), p.79–90. 2000.
- MEE, J. F. Managing the dairy cow at calving time, *Veterinary Clinics Food Animals*. 20, 521–546. 2004.
- MORRELL, E. L., MOORE, D. P., ODEÓN, A. C., POSO, M. A., ODRIOZOLA, E., CANTÓN, G., PAOLICCHI, F., *et al.* Retrospective study of bovine neonatal mortality: cases reported from INTA Balcarce , Argentina. **Revista Argentina de Microbiologia**, 40, p.1–7. 2008.
- OKANO, W., BRACARENSE, A. P. F. R. L., REIS, A. C. F., e ALFIERI, A. A. Achados histológicos em fetos bovinos abortados e não abortados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 55(2), 223–225. 2003.
- PALMIERI, C., LOI, P., PTAK, G., e DELLA SALDA, L. Review paper: a review of the pathology of abnormal placentae of somatic cell nuclear transfer clone pregnancies in cattle, sHEp, and mice. **Veterinary Pathology**, 45(6), p.865–880. 2008.
- RHIND, S. M., KING, T. J., HARKNESS, L. M., BELLAMY, C., WALLACE, W., DESOUSA, P., e WILMUT, I. Cloned lambs — lessons from pathology. **Nature biotechnology**, 21(7), p.744–745. 2003.
- ROBERTS, S. J. **Veterinary Obstetrics and Genital Diseases**. (S. J. Roberts, Ed.) (2nd ed.). Michigan: Ann Arbor. 1971.
- SANTOS, C. R. **Patologia de neonatos bovinos clonados**. São Paulo. Universidade de São Paulo-USP 101p. Dissertação de mestrado (Mestrado em Patologia experimental e comparada) 2008.
- TANEJA, M., FRENCH, R., LEVINE, H., TAURO-MILLER, D., e X. YANG. Clinical and pathological status of cloned calves born pre-term. **Theriogenology**, 55 (abstract), p.293. 2001
- THOMSON R. G., Alterações histopatológicas. In Thomson, R. G. (Ed.), **Patologia Geral Veterinária** (2a ed., pp. 251–256). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1998.
- WELLS, D. N., LAIBLE, G., TUCKER, F. C., MILLER, A. L., OLIVER, J. E., XIANG, T., FORSYTH, J. T., *et al.* Coordination between donor cell type and cell cycle stage improves nuclear cloning efficiency in cattle. **Theriogenology**, 59, p.45–59. 2003.
- WELLS, D. N., MISICA, P. M., DAY, T. A. M., e TERVIT, H. R. Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: a comparison between in vivo- and in vitro-matured cytoplasts. **Biology of reproduction**, 57, p.385–393. 1997.

WILMUT, I., BEAUJEAN, N., SOUSA, P. A. DE, KING, T. J., e PATERSON, L. A. Somatic cell nuclear transfer. **Nature**, 419 (Out), p.583–586. 2002.

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

ZACHARY, J. F., e MCGAVIN, M. D. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. (J. F. Zachary e M. D. McGavin, Eds.) (5th ed., pp. 38–39; 605). Elsevier. 2012.

ZATZ, M. Clonagem e células-tronco. **Ciência e Cultura**, 56(3), p.23–27. 2004.

## CAPÍTULO III

### ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS DE BEZERROS CLONADOS COM ÓBITO NEONATAL

#### INTRODUÇÃO

Clonagem animal com fins reprodutivos vem ganhando cada vez mais espaço em nosso país. Através da clonagem é possível produzir indivíduos geneticamente idênticos, possibilitando um melhor aproveitamento de indivíduos com alto potencial zootécnico e preservando o material genético de espécies ameaçadas de extinção (PEREIRA e FREITAS, 2009).

O grande avanço obtido através do domínio da técnica de clonagem se deu pela produção de um indivíduo geneticamente igual a outro indivíduo adulto, utilizando-se de células somáticas já diferenciadas (ZATZ, 2004). Na técnica de clonagem o núcleo de uma célula somática do doador é transferido para um oócito enucleado é então realizado o processo de reprogramação epigenética, por eletrofusão. Este processo irá ativar a divisão celular. A célula formada se torna então totipotente, capaz de se diferenciar em um novo indivíduo com as mesmas características genéticas do doador (WILMUT *et al.* 1997).

Apesar dos avanços significativos obtidos em relação ao domínio da técnica de clonagem, especialmente em bovinos (DINNYÉS *et al.* 2002) o crescimento do mercado da clonagem ainda esbarra na baixa eficiência da técnica. Apenas 0,5 a 5% dos embriões reconstruídos produzem animais a termo (HEYMAN *et al.* 2002; PALMIERI *et al.* 2008) esta baixa taxa de sucesso é um resultado cumulativo das perdas nos estágios embrionário, fetal e perinatal (WILMUT *et al.* 2002). Heyman *et al.* 2002 estimaram ocorrer entre 33–43% de perdas em gestações oriundas de transferência nuclear de células somáticas (TNCS) até o 90° dia de gestação, o que é um valor muito alto quando comparado à 8,5%-11,8% de gestações oriundas de produção *in vitro* de embriões (FIV) (JONKER, 2004).

Acredita-se que problemas na placentação, tais como: placentomegalia, redução da vascularização da membrana corioalantoidiana, hipoplasia do epitélio trofoblástico e membrana basal alterada poderiam resultar em perdas expressivas durante o primeiro trimestre de gestação (HEYMAN *et al.* 2002; LEE *et al.* 2004;

PALMIERI *et al.* 2008). Além disso, falhas na reprogramação epigenética poderiam levar à transcrição anormal de genes que regulam a implantação, o desenvolvimento inicial pós-implantação e o crescimento fetal causando maior taxa de perdas tardias e outras anormalidades observadas em bezerros clonados tais como a macrossomia (CHAVATTE-PALMER *et al.* 2002; DANIELS, HALL, e TROUNSON, 2000; LEE *et al.* 2004) e a maior taxa de mortes no período neonatal.

O período neonatal em bovinos compreende animais do momento do nascimento até 28 dias de vida (ASTIZ *et al.* 2010). Pode-se dividir ainda em período neonatal imediato, que vai do nascimento até 24 horas de vida e período neonatal tardio que vai de 2 a 28 dias de vida (ASTIZ *et al.* 2010; RADOSTITIS, LESLIE, e FETROW, 1996).

A principal anormalidade identificada em neonatos clonados é a macrossomia, em que os animais nascem com excessivo tamanho fetal, anormalidades placentárias e umbilicais, além de dificuldades na adaptação à vida extrauterina (WILMUT *et al.* 2002; YOUNG, SINCLAIR, e WILMUT, 1998). Estando relacionada à maior incidência de mortalidade no período perinatal (PANARACE *et al.* 2007; TANEJA *et al.* 2001). Atualmente, o mecanismo proposto para explicar a ocorrência da macrossomia é ocorrência de alterações dos padrões epigenéticos, resultando na alteração da expressão de genes que são importantes para a regulação do crescimento e desenvolvimento da placenta e do feto (CHAVATTE-PALMER *et al.* 2002; FARIN, FARIN, e PIEDRAHITA, 2004).

Além da macrossomia várias anormalidades tem sido observadas em neonatos clonados, tais como: hipertensão pulmonar, asfixia neonatal, anemia, problemas imunológicos, hipotermia, hipertermia paradoxal, aumento dos vasos umbilicais, hemorragia e infecções umbilicais, falha da transferência de imunidade passiva e infecções bacterianas que necessitam de antibioticoterapia (CHAVATTE-PALMER *et al.* 2004; CHAVATTE-PALMER *et al.* 2002; GARRY *et al.* 1996; PALMIERI *et al.* 2008; PANARACE *et al.* 2007; RENARD *et al.* 1999 e TANEJA *et al.* 2001). Apesar das anormalidades observadas, a maioria dos exames laboratoriais não demonstrou diferença quando comparados a bezerros não clonados (CHAVATTE-PALMER *et al.* 2002).

Entre os principais achados de necropsia observados em animais clonados podemos citar: problemas do sistema respiratório tais como, imaturidade pulmonar,

atelectasia, edema pulmonar, pneumonia, aspiração de mecônio, hipertensão, congestão pulmonar e excesso de fluido pleural (GARRY *et al.* 1996; KATO *et al.* 1998; TANEJA *et al.* 2001; LANZA *et al.* 2001; PACE *et al.* 2002; ENRIGHT *et al.* 2002; WILMUT *et al.* 2002; AKAGI *et al.* 2003). Problemas hepáticos, hepatomegalia, esteatose, congestão e fibrose hepática, (CHAVATTE-PALMER *et al.* 2002; WILMUT *et al.* 2002; AKAGI *et al.* 2003); LEE *et al.* 2004). Problemas renais, dos quais pode-se citar: rins aumentados e com acúmulo de gordura disperso na cápsula, aparência disforme, pielonefrite e hidronefrose (AKAGI *et al.* 2003; CAMPBELL *et al.* 2007; CHAVATTE-PALMER *et al.* 2002; ENRIGHT *et al.* 2002; PACE *et al.* 2002; RHIND *et al.* 2003). Problemas cardíacos, cardiomegalia, insuficiência circulatória e defeitos cardíacos congênitos (GARRY *et al.* 1996; LANZA *et al.* 2001; PACE *et al.* 2002; WILMUT *et al.* 2002; AKAGI *et al.* 2003; LEE *et al.* 2004).

Além disso, também são relatados frequentemente problemas umbilicais como: aumento e hemorragia de vasos umbilicais, persistência do canal do úraco, infecções e abscessos umbilicais, (GARRY *et al.* 1996; TANEJA *et al.* 2001; PACE *et al.* 2002; WILMUT *et al.* 2002; LEE *et al.* 2004; PANARACE *et al.* 2007). Defeitos posturais e musculoesqueléticos, anormalidades de articulações e membros, contratura de tendão, luxação de patela e poliartrite, (GARRY *et al.* 1996; PACE *et al.* 2002; AKAGI *et al.* 2003; PANARACE *et al.* 2007). Problemas do trato gastrointestinal, enterite, intussuscepção, úlceras e torção da raiz do mesentério, (GARRY *et al.* 1996; LANZA *et al.* 2001; PACE *et al.* 2002; WILMUT *et al.* 2002; AKAGI *et al.* 2003). Disfunção no sistema nervoso, hidrocefalia, anormalidades estruturais e edema cerebral (PACE *et al.* 2002; WILMUT *et al.* 2002; AKAGI *et al.* 2003) e problemas do sistema imunológico, deficiência imunológica, insuficiência do sistema imunitário e hipoplasia linfóide (ENRIGHT *et al.* 2002; RENARD *et al.* 1999; WILMUT *et al.* 2002).

Estudos sustentam que animais clonados que sobrevivem desenvolvem-se normalmente e não apresentam diferenças comportamentais e reprodutivas quando comparados a animais não clonados (CHAVATTE-PALMER *et al.* 2004; ENRIGHT *et al.* 2002; LANZA *et al.* 2001; PACE *et al.* 2002). Além disso, são capazes de reproduzir e gerar crias férteis, que não apresentam os mesmos problemas



observados nos animais clonados (CHAVATTE-PALMER *et al.* 2004; ORTEGON *et al.* 2007; PANARACE *et al.* 2007).

Os relatos de necropsia de animais clonados são escassos e muitas vezes apenas são relatadas anormalidades pontuais, que apesar de possuírem relevância, não caracterizam uma população de animais clonados e não permitem traçar um perfil das anormalidades apresentadas por estes animais. Além disso, pouco se encontra descrito sobre a morfofisiologia normal de bovinos jovens, o que nos leva a uma imediata comparação com os animais adultos, induzindo muitas vezes ao erro por não levar em consideração as mudanças pelas quais passam os tecidos para que adquiram o aspecto considerado normal. Ainda há muito para ser pesquisado em relação à saúde de animais clonados e os achados patológicos e histopatológicos podem esclarecer problemas estruturais que levam à disfunção dos órgãos. Neste sentido este trabalho objetivou comparar as características histológicas de diversos tecidos de animais clonados que vieram a óbito no período neonatal.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Amostras provenientes de 41 bezerros clonados com óbito neonatal foram avaliadas. Todos os animais clonados eram originários de raças zebuínas, pertencentes à subespécie *Bos taurus indicus*. As amostras foram coletadas em uma empresa de clonagem comercial no período de 2009 a 2012 e a análise do material foi realizada no período de 2011 a 2013. Programas de sanidade do rebanho, vacinação, vermifugação e controle de doenças foram realizados de acordo com o manejo sanitário da propriedade.

Das 41 amostras analisadas, 25 (61%) pertenciam a animais que vieram a óbito no período neonatal imediato, período do nascimento até 48 horas de vida, (IMEDIATO) e 16 (39%), a animais que vieram a óbito no período neonatal tardio, entre 2 e 28 dias de vida, (TARDIO). A idade gestacional desses animais variou de 272 dias de gestação a 308 dias de gestação, conforme observado na Tabela 3.2. Foram coletadas informações relativas ao período gestacional, parto, medicamentos e procedimentos realizados, data e hora da morte e histórico clínico do animal. Os animais foram submetidos à necropsia logo após a constatação do óbito. Foram coletadas amostras de tecido para posterior análise histopatológica.

**Tabela 3.1:** : Distribuição das amostras nos grupos, idade gestacional e peso (Kg) de bezerros clonados que vieram a óbito no período neonatal.

<b>Nº Animal</b>	<b>Grupo</b>	<b>Dias Gestação</b>	<b>Dias De Vida</b>	<b>Peso (Kg)</b>
1	Imediato	272	0,5	43
2	Imediato	275	0	38
3	Imediato	275	2	50
4	Tardio	278	13	67
5	Imediato	280	0	59
6	Tardio	280	5	50
7	Tardio	280	20	50
8	Imediato	282	1,5	32
9	Imediato	283	2	23
10	Tardio	283	7	23
11	Imediato	285	1	48
12	Tardio	285	19	54
13	Imediato	286	1,5	30
14	Imediato	288	0,75	48
15	Imediato	288	0	30
16	Tardio	289	9	47
17	Tardio	289	7	53
18	Imediato	290	0	52
19	Imediato	291	0	62
20	Imediato	292	1	45
21	Imediato	292	1	30
22	Tardio	292	5	55
23	Imediato	293	1	46
24	Imediato	294	2	48
25	Imediato	294	2	35
26	Imediato	294	0	50
27	Tardio	294	5	49
28	Imediato	295	0	45
29	Imediato	295	1,5	40
30	Tardio	295	15	64
31	Imediato	296	0	32
32	Tardio	296	3	38
33	Tardio	296	6	50
34	Imediato	299	0,5	45
35	Imediato	300	0	49
36	Imediato	301	0	55
37	Tardio	301	4,5	49
38	Tardio	301	6	38
39	Tardio	302	12	54
40	Tardio	303	14	40
41	Imediato	308	0,5	50

Visando comparar as alterações histológicas observadas em animais clonados e constatar se estas alterações são comuns a animais neonatos ou são exclusivas de animais clonados foram utilizados 4 animais controle (CONTROLE), (Tabela 3.2). Os animais controle foram machos de aptidão leiteira, pertencentes à subespécie *Bos taurus taurus*, estes animais usualmente são descartados do plantel por não terem valor comercial. Os animais controle foram eutanasiados com idades variando entre 2 a 4 dias de vida. Para eutanásia utilizou-se metodologia aceita pelo CFMV conforme recomenda a Resolução nº 714 (CFMV, 2002). Os animais foram sedados com Xilazina 2% na dose de 0,1 mg/kg, após a sedação os animais foram induzidos a plano anestésico com Thiopental 0,5 mg/kg, uma vez constatado o plano anestésico foi introduzido um cateter na cisterna magna e por ele infundido 50 mL de lidocaína ou até constatação de parada respiratória do animal. Os controles foram submetidos à necropsia logo após a eutanásia e foram coletadas amostras de diversos órgãos para confecção de lâminas histológicas.

**Tabela 3.2:** Distribuição das amostras nos grupos.

Clones			Controle	Total Geral
Imediato	Tardio	Total		
25	16	41	4	45

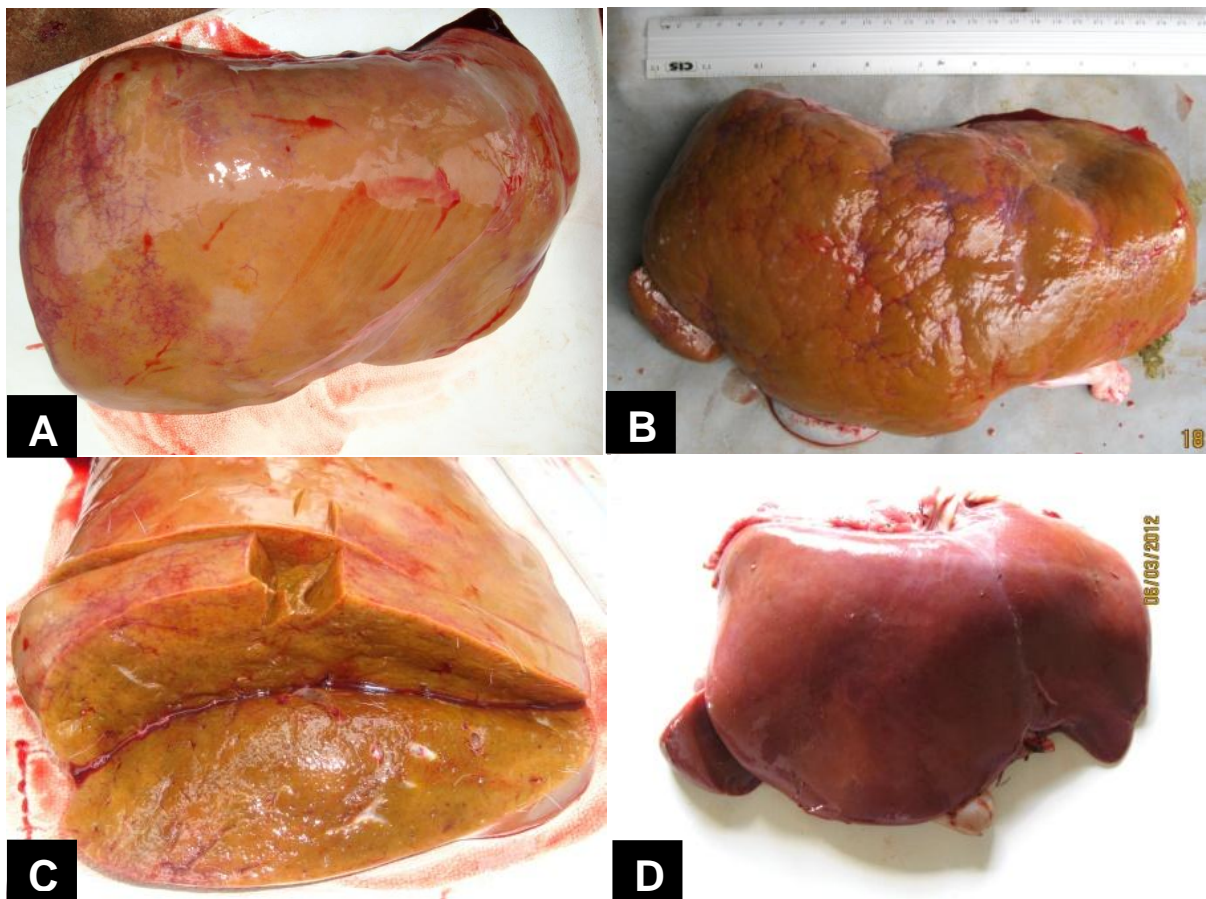
O material coletado foi fixado em formol 10% tamponado. Após a fixação as amostras foram submetidas à clivagem e acomodação em cassetes para inclusão, embebidas em parafina, cortadas a 4 micrômetros de espessura e foram confeccionadas lâminas histológicas. Foi utilizada inicialmente para a triagem a coloração padrão de hematoxilina-eosina (HE), as lâminas foram avaliadas em microscópio de luz.

Após triagem inicial amostras de fígado e rim foram submetidas à coloração de Ácido Periódico de Schiff (PAS). As amostras de rim foram submetidas à coloração de Hall, para evidenciação de pigmentos biliares, de Perls, para evidenciação de ferro, de PAS para evidenciação de glicogênio, de lipofuscina e de Ziehl Neelsen para lipofuscina.

Na leitura das lâminas observou-se as características histológicas dos tecidos dos animais controle e comparou-se com os achados observados nos animais clonados. Este trabalho foi submetido e aprovado pela comissão de ética no uso de animais da Universidade de Brasília processo nº 2312/2013 (ANEXO I).

## RESULTADOS

No fígado, macroscopicamente foram identificadas as seguintes alterações quando comparado aos animais controle. Hepatomegalia, bordos arredondados e não cortantes inclusive com impressão das costelas (Figura 3.1-A). Superfície irregular (Figura 3.1-B), cápsula espessada e opaca, em alguns animais e brilhante em outros, hematoma subcapsular em um animal. Quanto à coloração, pode-se notar que se apresentava mais pálida ou amarelada, tanto à superfície quanto ao corte, alguns apresentando inclusive manchas avermelhadas na superfície e ao corte (Figura 3.1-C). Identificou-se ainda congestão. Nos controles observou-se coloração acastanhada, tanto na superfície quanto ao corte, bordos regulares, superfície lisa e brilhante (Figura 3.1-D).

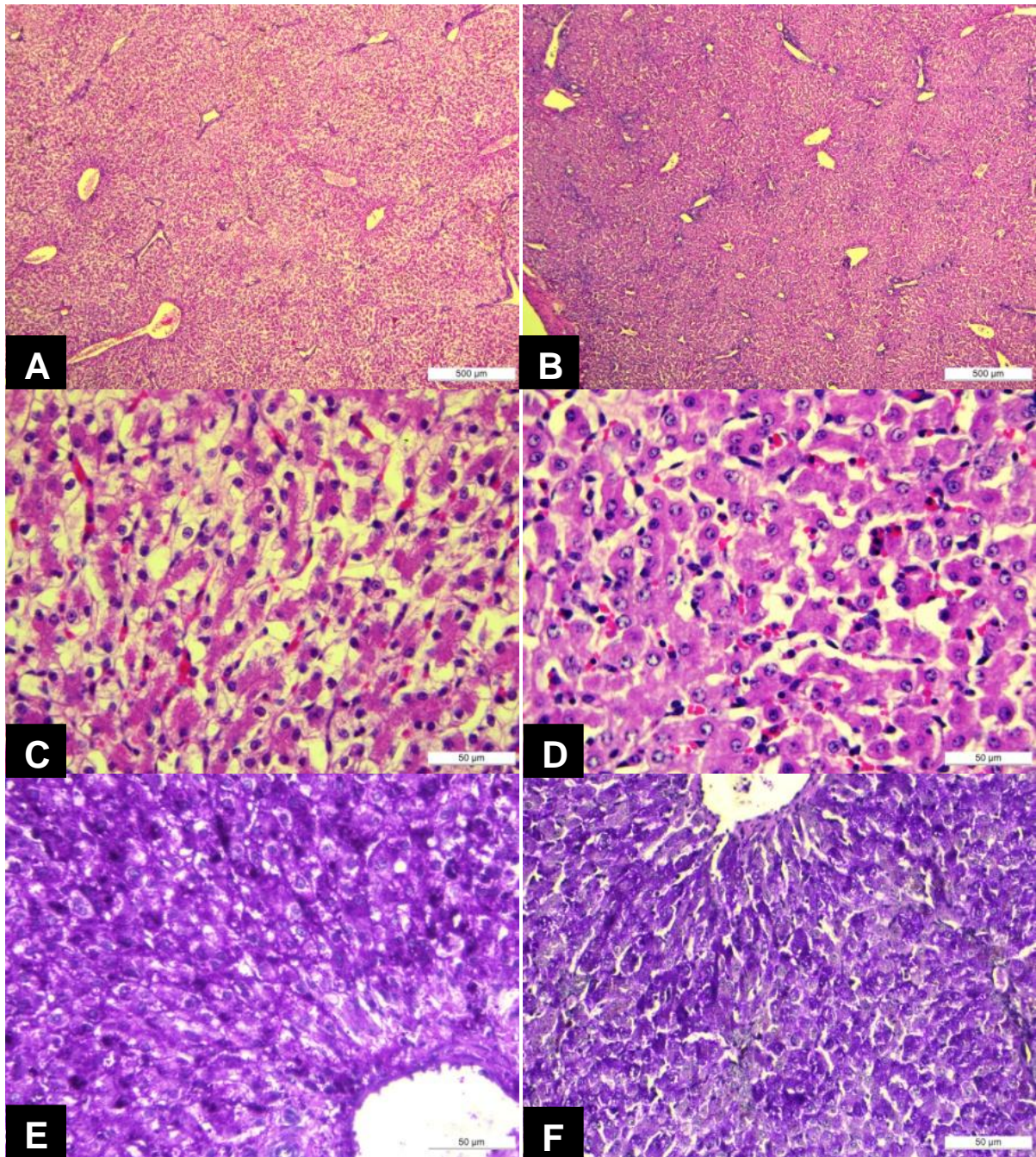


**Figura 3.1:** Alterações macroscópicas observadas no fígado de neonatos clonados e controles. **(A)** Hepatomegalia **(B)** Superfície hepática irregular. **(C)** Coloração pálida e amarelada, apresentando manchas avermelhadas. **(D)** Fígado normal, animal controle.

Microscopicamente, foram analisadas 41 amostras de fígado sendo 25/41 IMEDIATO e 16/41 TARDIO. Os achados histopatológicos foram: padrão lobular

bem definido (Figura 3.2-A) em 30/41 animais, sendo observado em todos os animais que vieram a óbito no período neonatal imediato (IMEDIATO) e em 5/16 dos animais que vieram a óbito no período neonatal tardio (TARDIO), bem como em todos os animais controle (CONTROLE), (Figura 3.2-B), sinusóides quase imperceptíveis foi observado em 25/25 IMEDIATO e em 5/16 TARDIO e também nos 4 CONTROLE, espaços porta próximos em todos os animais do grupo IMEDIATO e em 9/16 TARDIO, bem como nos 4 CONTROLE (Figura 3.2-E). Em 35/41 amostras de fígado analisadas observou-se vacuolização citoplasmática de hepatócitos (Figura 3.2-C), sendo 23/25 IMEDIATO e 12/16 TARDIO, nos CONTROLE foi observado em 3/4 animais (Figura 3.2-D). O grau de vacuolização observado em cada grupo encontra-se disposto na Tabela 3.3. Em todos os fragmentos de fígado foi realizada a coloração de PAS, para evidenciação do acúmulo de glicogênio. Destas, obteve-se coloração positiva em 17/41 amostras (Figura 3.2-E), também foi encontrada amostras PAS positivas nos animais CONTROLE (Figura 3.2-E), os resultados estão dispostos na Tabela 3.3.

Foi observado ainda no fígado, hematopoiese extramedular em 8/41 animais, sendo 4/25 IMEDIATO e 4/16 TARDIO, não sendo observada no grupo CONTROLE. Congestão hepática foi identificada em 4/41 animais, sendo 2/25 IMEDIATO e 2/16 TARDIO e não foi observada no grupo CONTROLE. Hemorragia hepática foi observada em 5/25 amostras, todas pertencentes ao grupo IMEDIATO e não foi observada em animais do grupo CONTROLE. Áreas aleatórias de discreta a moderada necrose centrolobular foram observadas em 5/41 animais, sendo 4/25 IMEDIATO e 1/16 TARDIO e não foi observada em animais do grupo CONTROLE. Fibrina na cápsula hepática e acompanhando áreas de necrose centrolubular foi observada em 2/41 animais, sendo 1/25 IMEDIATO e 1/16 TARDIO e não foi observada em animais do grupo CONTROLE. Presença de infiltrado histiocítico e neutrofílico foi observada em 2/41 animais, sendo 1/25 IMEDIATO e 1/16 TARDIO para cada tipo de infiltrado e não foi observada em animais do grupo CONTROLE. Proliferação de ductos foi observada em apenas 1/16 animal do grupo TARDIO. Em 1/25 animal do grupo IMEDIATO havia múltiplas áreas com moderada proliferação de tecido conjuntivo principalmente em espaço porta. Em 1/16 animal do grupo TARDIO foi observada discreta colestase. Apenas 3/41 amostras foram consideradas sem qualquer achado microscópico.

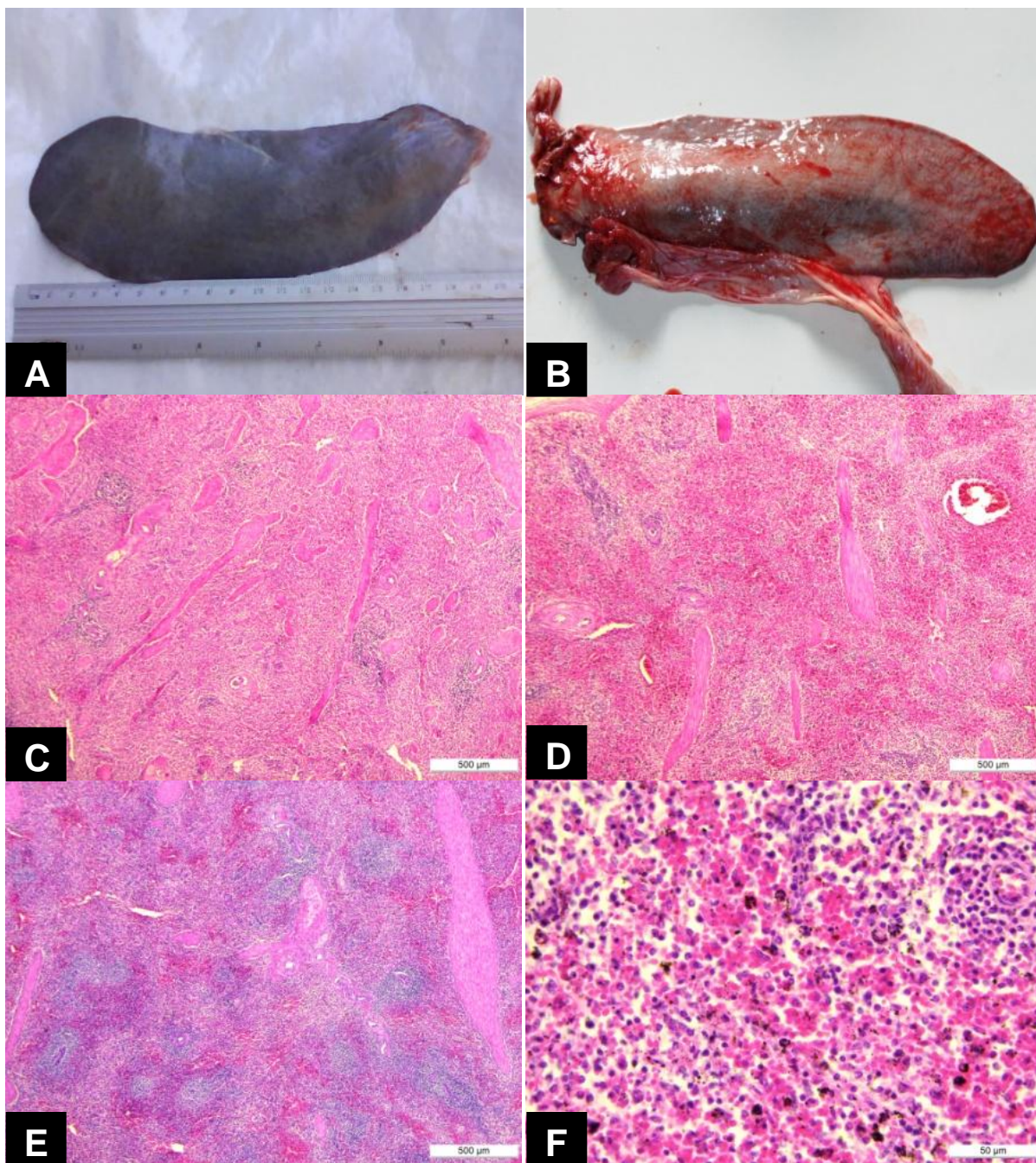


**Figura 3.2:** Alterações microscópicas observadas no fígado de neonatos clonados e controles. **(A)** Fígado clone - padrão lobular bem definido, espaços porta próximos (HE 500µm). **(B)** Fígado controle - padrão lobular bem definido, espaços porta próximos (HE 500µm). **(C)** Fígado clone - vacuolização acentuada de hepatócitos (HE 50µm). **(D)** Fígado controle - discreta vacuolização de hepatócitos (HE 50µm). **(E)** Fígado clone - vacuolização apresentando coloração positiva pelo método de PAS (PAS 50µm). **(F)** Fígado controle - coloração positiva pelo método PAS (PAS 50µm).

**Tabela 3.3:** Achados microscópicos observados no fígado de bezerros clones e controles.

Achados	Clones (n=41)			Controle (n=4)
	Imediato (n=25)	Tardio (n=16)	Total	
Padrão lobular bem definido	25 (100%)	5 (31%)	30 (73%)	4 (100%)
Sinusóides quase imperceptíveis	25 (100%)	5 (31%)	30 (73%)	4 (100%)
Espaços porta próximos	25 (100%)	9 (56%)	34 (83%)	4 (100%)
Vacuolização de hepatócitos	23 (92%)	12 (75%)	35 (85%)	3 (75%)
Vacuolização discreta	6 (24%)	9 (56%)	15 (37%)	2 (50%)
Vacuolização moderada	7 (28%)	1 (6%)	8 (20%)	0
Vacuolização acentuada	10 (40%)	2 (13%)	12 (29%)	1 (25%)
PAS negativo	10 (40%)	14 (88%)	24 (59%)	1 (25%)
PAS positivo	15 (60%)	2 (12%)	17 (41%)	3 (75%)
PAS discreto	3 (12%)	2 (13%)	4 (10%)	1 (25%)
PAS moderado	4 (16%)	0	3 (7%)	1 (25%)
PAS acentuado	8 (32%)	0	8 (20%)	1 (25%)
Hematopoiese extramedular	4 (16%)	4 (25%)	8 (20%)	0
Congestão	2 (8%)	2 (13%)	4 (10%)	0
Hemorragia	5 (20%)	0	5 (12%)	0
Necrose	4 (16%)	1 (6%)	5 (12%)	0
Fibrina	1 (4%)	1 (6%)	2 (5%)	0
Infiltrado histiocítico	1 (4%)	1 (6%)	2 (5%)	0
Infiltrado neutrofílico	1 (4%)	1 (6%)	2 (5%)	0
Proliferação de ductos	0	1 (6%)	1 (2%)	0
Proliferação de tecido conjuntivo	1 (4%)	0	1 (2%)	0
Colestase	0	1 (6%)	1 (2%)	0
Ausência de achados	0	3 (19%)	3 (7%)	0

No baço macroscopicamente pode-se notar, à superfície, cápsula espessada e esbranquiçada e esplenomegalia discreta (Figura 3.3-A). Nos controles foi observado um aspecto normal em relação à coloração, vermelho escurecida e ao tamanho do órgão (Figura 3.3-B). Microscopicamente, o achado mais comum foi a pouca evidência da polpa branca (Figura 3.3-C, D) em 19/40 animais, que pode ser evidenciado pela rarefação celular em folículos linfóides, sendo 15/24 IMEDIATO e 5/16 TARDIO. Hemorragia foi observada em 15/40 animais sendo 11/24 IMEDIATO e 4/16 TARDIO. Congestão esplênica foi observada em 9/40 animais, sendo 1/24 IMEDIATO e 8/16 TARDIO. Hemossiderose (Figura 3.3-F) foi observada em 2/16 animais do grupo TARDIO. Infiltrado histiocítico multifocal foi observado em 1/16 animal do grupo TARDIO. Onze (11/40) dos animais clonados analisados não evidenciaram qualquer achado microscópico no baço, sendo 7/24 IMEDIATO e 4/16 TARDIO, bem como em todos os animais do grupo CONTROLE. (Figura 3.3-E) Os achados podem ser melhor observados na Tabela 3.4.



**Figura 3.3:** Alterações macroscópicas e microscópicas observadas no baço de neonatos clonados e controles.

**(A)** Baço clone evidenciando palidez e espessamento de cápsula esplênica. **(B)** Baço controle, normal. **(C, D)** Baço clone, pouca evidência de polpa branca (HE 500µm e 200 µm). **(E)** Baço controle, foliculos linfoides bem definidos.(HE 500µm). **(F)** Baço clone, hemossiderose (HE 100µm)



**Tabela 3.4:** Achados microscópicos observados no baço de bezerros clones e controles.

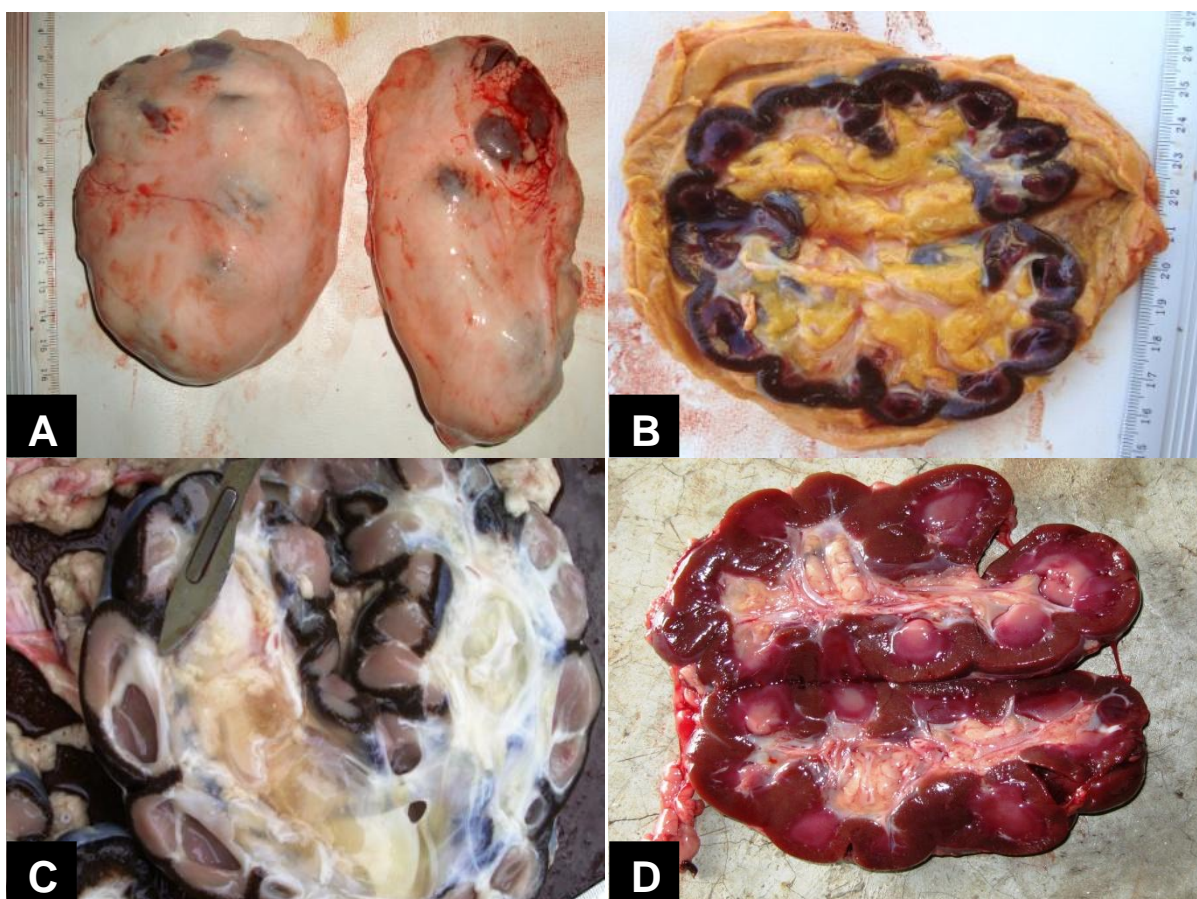
Achados	Clones (n=40)		Controle (n=4)	
	Imediato (n=24)	Tardio (n=16)	Total	
Pouca evidenciação da polpa branca	14 (58%)	5 (31%)	19 (48%)	0
Hemorragia	11 (46%)	4 (25%)	15 (38%)	0
Congestão	1 (4%)	8 (50%)	9 (23%)	0
Hemossiderose	0	2 (13%)	2 (5%)	0
Infiltrado histiocítico	0	1 (6%)	1 (3%)	0
Ausência de achados	7 (29%)	4 (25%)	11 (28%)	4 (100%)

Nos rins foi observada uma quantidade moderada a acentuada de gordura perirrenal, que também pode ser visualizada na pelve, cálices e papilas renais (Figura 3.4-A,B), bem como material gelatinoso translúcido na região da pelve renal (Figura 3.4-C). Na superfície observou-se coloração castanho-enegrecida que continuava ao corte na região cortical, na medular mantinha-se a mesma coloração, porém um pouco mais clara em relação ao córtex (Figura 3.4-B,C), em alguns animais evidenciava-se estriações esbranquiçadas a amareladas que se estendiam desde o córtex até a medular. Por vezes foram observadas pequenas dilatações císticas em região de cálices renais ou medular, nestas áreas de dilatação observou-se diminuição do córtex e da medular (Figura 3.4-C). Nos rins dos animais controle observou-se coloração acastanhada na superfície e região cortical e a região medular apresentava coloração rósea. Havia gordura na pelve renal, porém em menor quantidade que nos animais clonados (Figura 3.4-D).

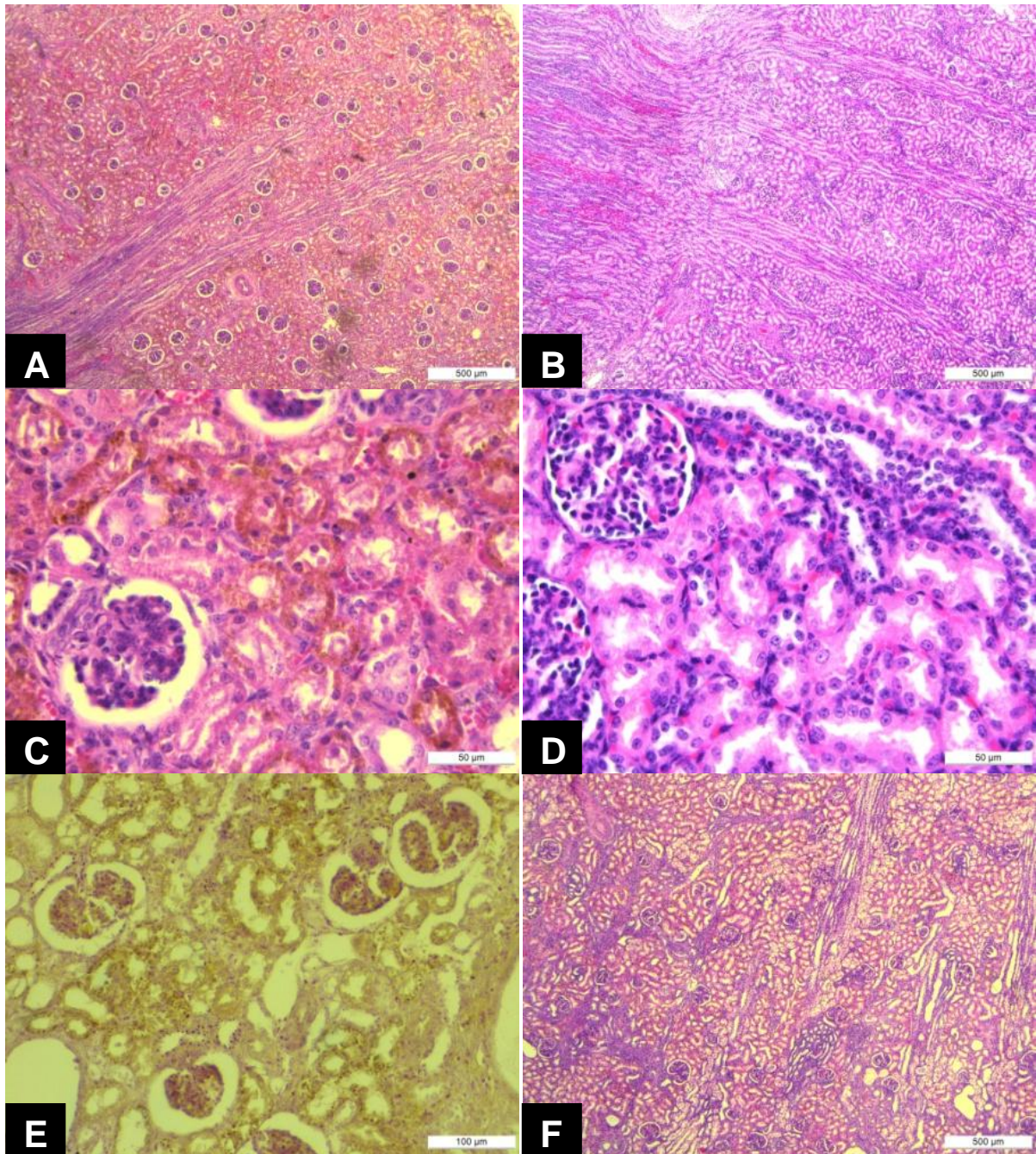
Microscopicamente foi observado nos rins, glomérulos menores, hiper celulares e mais próximos, ao que se chamou de glomérulos com aspecto embrionário (Figura 3.5-A), esta característica foi observada em 36/41 amostras analisadas, sendo, 25/25 IMEDIATO e 11/16 TARDIO, sendo este o único achado observado nos rins dos animais do grupo CONTROLE 4/4 (Figura 3.5-B). Observou-se ainda nos rins dos animais clonados grânulos acastanhados no interior das células de túbulos corticais (Figura 3.5-C) em 37/41 animais, sendo 25/25 IMEDIATO e 12/16 TARDIO. Não foi observada a presença destes grânulos nos rins dos animais do grupo CONTROLE (Figura 3.5-D), o grau de acometimento em cada grupo encontra-se melhor evidenciado na Tabela 3.5. Na tentativa de identificar a origem destes pigmentos foram realizadas colorações especiais para identificação de pigmentos biliares (Hall), para evidenciação de ferro e hemossiderina (Perls), para evidenciação de glicogênio (PAS) e para evidenciação de lipofuscina

(lipofuscina e Ziehl Neelsen). Destas, apenas a coloração de lipofuscina corou os grânulos observados, porém não tão caracteristicamente, quando comparado a um controle para lipofuscina (Figura 3.5-E).

Ainda em relação aos achados microscópicos observados nos rins dos animais clonados, 16/41 animais apresentaram congestão, sendo 8/25 IMEDIATO e 8/16 TARDIO. Hemorragia foi observada em apenas 1/16 animal do grupo TARDIO. Dilatação de túbulos corticais e medulares (Figura 3.5-F) foi observada em 5/41 animais, sendo 2/25 IMEDIATO e 3/16 TARDIO. Proliferação de tecido conjuntivo no interstício foi observada em 2/25 animais do grupo IMEDIATO. Degeneração tubular foi observada em 2/16 animais do grupo TARDIO. Infiltrado linfocítico multifocal foi observado em 2/16 animais do grupo TARDIO. Foi observada ainda fibrose, necrose tubular e infiltrado plasmocítico em 1/16 animal do grupo TARDIO.



**Figura 3.4:** Alterações macroscópicas observadas nos rins de neonatos clonados e controles. **(A)** Acentuada quantidade de gordura perirrenal. **(B)** Acentuada quantidade de gordura na pelve, cálices e papilas renais. **(C)** Presença de material gelatinoso translúcido na pelve renal, coloração castanho-enegrecida, dilatações císticas em cálices renais com diminuição do córtex e da medular.. **(D)** Rim controle



**Figura 3.5:** Alterações microscópicas observadas nos rins de neonatos clonados e controles. **(A)** Rim clone – glomérulos com aspecto embrionário (HE 500µm). **(B)** Rim controle – glomérulos com aspecto embrionário, **(C)** Rim clone - presença de grânulos acastanhados no citoplasma de túbulos da cortical renal (HE 50µm). **(D)** Rim controle - aspecto normal dos túbulos da cortical renal (50µm). **(E)** Rim clone – Grânulos corados pela coloração de lipofuscina (lipofuscina 50µm). **(F)** Rim clone – dilatação dos túbulos da cortical renal.

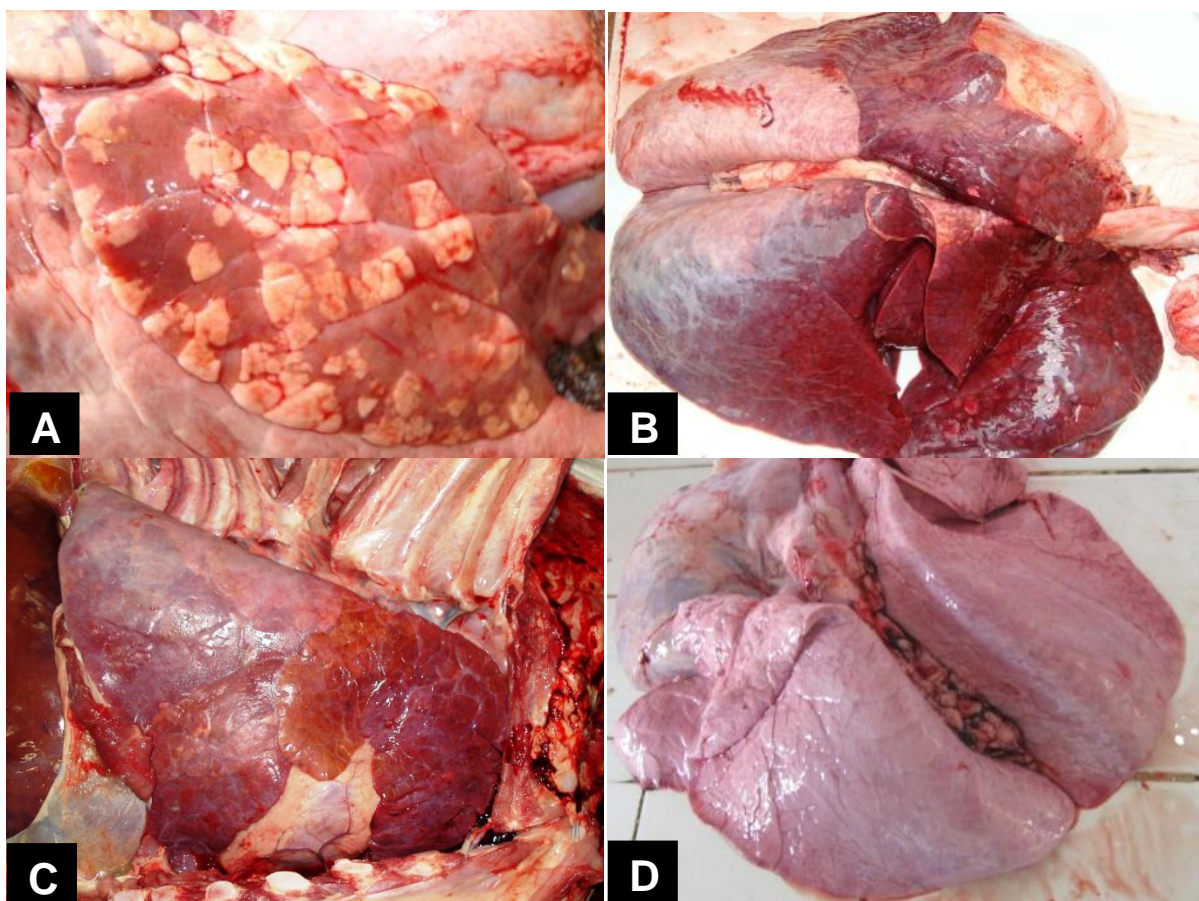
**Tabela 3.5:** Achados microscópicos observados nos rins de bezerros clones e controles.

Achados	Clones (n=41)		Controle (n=4)	
	Imediato (n=25)	Tardio (n=16)	Total	
Glomérulos com aspecto embrionário	25 (100%)	11 (69%)	36 (88%)	4 (100%)
Grânulos no interior de túbulos	25 (100%)	12 (75%)	37 (90%)	0
Quantidade discreta	8 (32%)	5 (31%)	13 (32%)	0
Quantidade moderada	6 (24%)	5 (31%)	11 (27%)	0
Quantidade acentuada	11 (44%)	2 (13%)	13 (32%)	0
Congestão	8 (32%)	8 (50%)	16 (39%)	0
Hemorragia	1 (4%)	0	1 (2%)	0
Dilatação de túbulos	2 (8%)	3 (19%)	5 (12%)	0
Proliferação de tecido conjuntivo	2 (8%)	0	2 (5%)	0
Degeneração tubular	0	2 (13%)	2 (5%)	0
Infiltrado linfocítico	0	2 (13%)	2 (5%)	0
Fibrose	0	1 (6%)	1 (2%)	0
Necrose	0	1 (6%)	1 (2%)	0
Infiltrado plasmocítico	0	1 (6%)	1 (2%)	0

Nos pulmões dos animais clonados foram observadas áreas com aspecto cárneo, levemente retraídas, áreas de atelectasia (Figura: 3.7-A). Observou-se ainda áreas multifocais, principalmente lobos cranioventrais, mas também acometendo lobos caudais, coloração avermelhada retraída com aspecto de consolidação, que ao corte fluía sangue (Figura: 3.7-B, C). Em brônquios e bronquíolos foi observada por vezes quantidade moderada de material catarral esbranquiçado, amarelado ou esverdeado. Alguns animais apresentavam desde o início da traqueia até brônquios secundários quantidade variável de espuma esbranquiçada e líquido, além de discreta a moderada quantidade de material amarelado/esverdeado de consistência grumosa a pastosa. Havia petéquias e estriações avermelhadas em laringe, traqueia e brônquios. Os pulmões dos animais controle apresentaram coloração rósea, aspecto uniforme e completamente expandido (Figura: 3.7-D).

Microscopicamente foi observado nos pulmões infiltrado de células inflamatórias em 22/40 clones e 3/4 controles. O infiltrado era constituído principalmente de histiócitos, neutrófilos e linfócitos e por vezes encontrava-se mais de um tipo de infiltrado em um tecido, com diversos tipos celulares e células gigantes multinucleadas (Figura: 3.7-A,B,C). A distribuição e a característica do infiltrado podem ser melhor observadas na Tabela 3.6. Foi observada ainda atelectasia em 18/40 animais, sendo 16/24 IMEDIATO e 2/16 TARDIO. Edema pulmonar (Figura: 3.7-D) foi identificada em 14/40 animais, sendo 8/24 IMEDIATO e

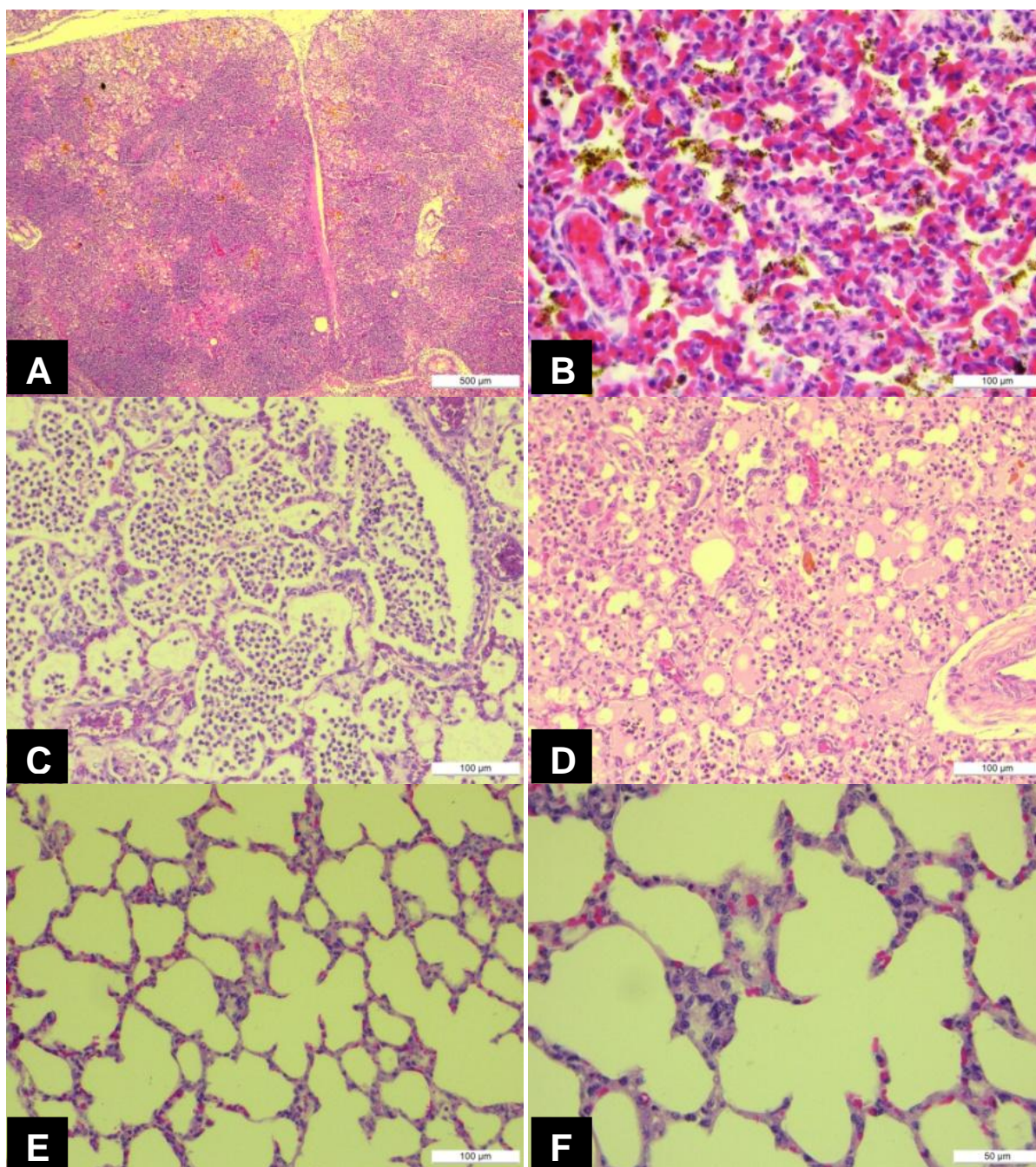
6/16 TARDIO. Congestão pulmonar foi observada em 9/40 animais, dos quais 6/24 IMEDIATO e 3/16 TARDIO, sendo observada em todos os animais CONTROLE 4/4. Hemorragia pulmonar foi visualizada em 7/40 animais, sendo 4/24 IMEDIATO e 3/16 TARDIO. Foi observada ainda substância amorfa de coloração amarelada que se acredita ser mecônio (Figura: 3.7-A,B) em 11/40 animais, sendo 10/24 IMEDIATO e 1/16 TARDIO e substância amorfa de coloração rósea que se acredita ser leite em 7 animais, sendo 6/24 IMEDIATO e 1/16 TARDIO. Muitas vezes a presença de tais substâncias pode ser associada a severo infiltrado inflamatório, indicando tratar-se de pneumonia de origem aspirativa. Nos animais controle observou-se a normalidade do órgão com alvéolos completamente expandidos (Figura: 3.7-E,F).



**Figura 3.6:** Alterações macroscópicas observadas nos pulmões de neonatos clonados e controles. **(A)** Pulmão clone - Áreas de atelectasia. **(B, C)** Pulmão clone – pneumonia, áreas de consolidação, note a reduzida área pulmonar funcional. **(D)** Pulmão controle – aspecto normal do órgão

Outras alterações pulmonares observadas com menor frequência foram: fibrina em 5/40 animais, sendo 2/24 IMEDIATO e 3/16 TARDIO. Proliferação de pneumócitos tipo II em 3/16 animais do grupo TARDIO. Espessamento de septo

interalveolar em 3/16 animais do grupo TARDIO. Trombose foi visualizada em 3/40 animais, sendo 1/24 IMEDIATO e 2/16 TARDIO. Hiperplasia de pneumócitos tipo I, proliferação de tecido conjuntivo e necrose multifocal foram observadas cada uma em 1/16 animal do grupo TARDIO.



**Figura: 3.7:** Alterações microscópicas observadas nos pulmões de neonatos clonados e controles. **(A, B)** Pulmão clone – acentuado infiltrado de células inflamatórias, presença de mecônio no interior de alvéolos (HE 500µm e 100µm). **(C)** Pulmão clone –, acentuado infiltrado de células inflamatórias (HE 100µm). **(D)** Pulmão clone – acentuado edema pulmonar (HE 100µm). **(E, F)** Pulmão controle – aspecto normal dos alvéolos pulmonares (HE 100µm e 50µm).

**Tabela 3.6:** Achados microscópicos observados nos pulmões de bezerros clones e controles.

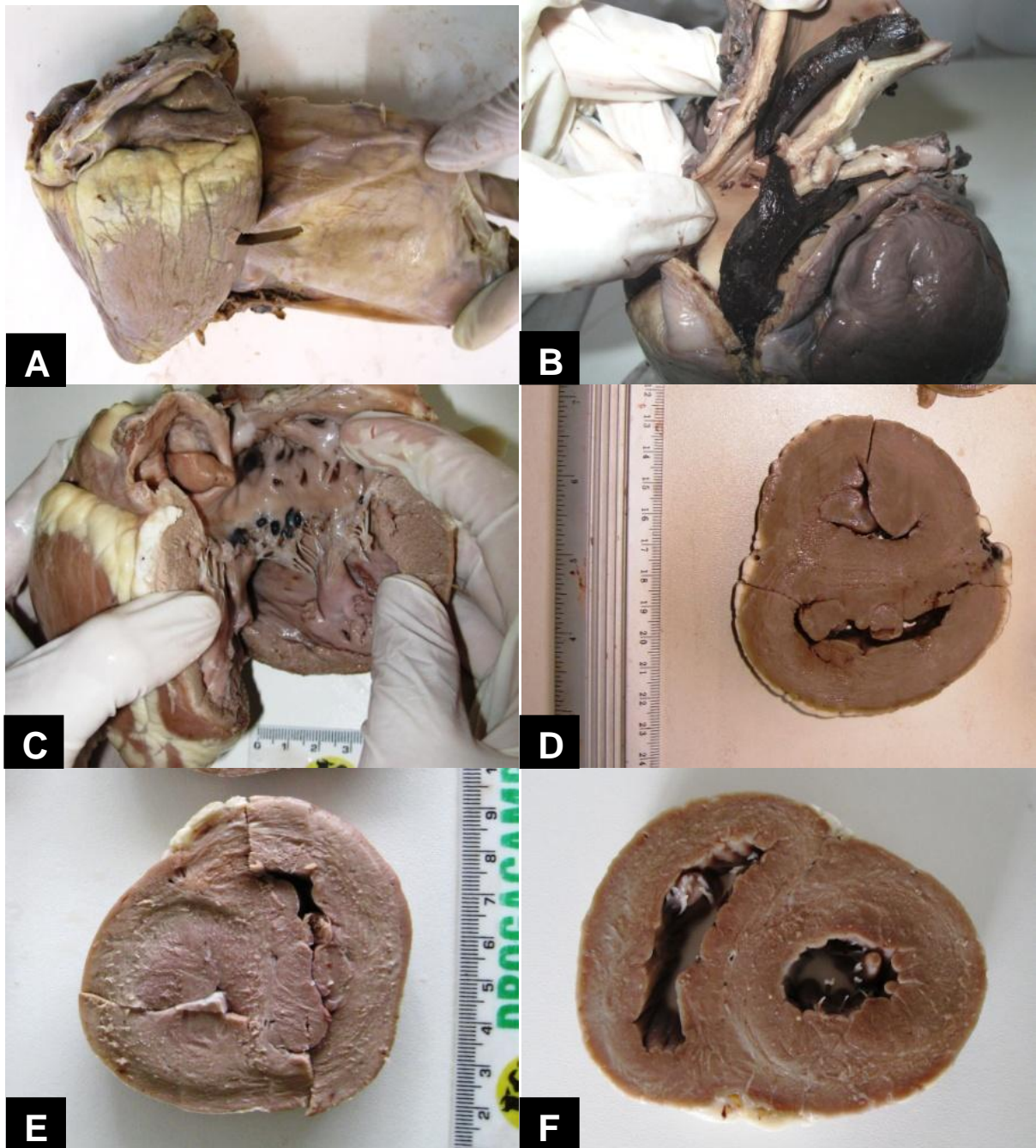
Achados	Clones (n=40)			Controle (n=4)
	Imediato (n=24)	Tardio (n=16)	Total	
Presença de Infiltrado	7 (29%)	15 (44%)	22 (55%)	3 (75%)
Infiltrado Histiocítico	6 (25%)	10 (63%)	16 (40%)	0
Infiltrado Neutrófilico	3 (13%)	13 (81%)	16 (40%)	2 (50%)
Infiltrado Linfocítico	1 (4%)	1 (6%)	2 (5%)	1 (25%)
Atelectasia	16 (67%)	2 (13%)	18 (45%)	0
Edema	8 (33%)	6 (38%)	14 (35%)	0
Congestão	6 (25%)	3 (19%)	9 (23%)	4 (100%)
Hemorragia	4 (17%)	3 (19%)	7 (18%)	0
Mecônio	10 (42%)	1 (6%)	11 (28%)	0
Leite	6 (25%)	1 (6%)	7 (18%)	1 (25%)
Fibrina	2 (8%)	3 (19%)	5 (13%)	0
Proliferação de pneumócitos II	0	3 (19%)	3 (8%)	0
Espessamento de septo	0	3 (19%)	3 (8%)	0
Trombo	1 (4%)	2 (13%)	3 (8%)	0
Hiperplasia de pneumócito tipo I	0	1 (6%)	1 (3%)	1 (25%)
Proliferação de tecido conjuntivo	0	1 (6%)	1 (3%)	0
Necrose	0	1 (6%)	1 (3%)	0

No coração macroscopicamente observou-se em alguns animais moderada quantidade de líquido no pericárdio, de consistência fluida, coloração amarelada/alaranjada e translúcida e hidropericárdio. Em um caso pode-se observar algumas aderências fibrilares entre o saco pericárdico e o epicárdio (Figura 3.8-A). Foi observado superficialmente um acúmulo de gordura em epicárdio, principalmente em septo interventricular e base. Forame oval e ducto arterioso identificáveis, porém, na maioria dos animais já estava afuncional, entretanto, em alguns animais havia evidência de persistência do ducto arterioso (Figura 3.8-B). Quantidade variável de cistos hemáticos (Figura 3.8-C) de aproximadamente 2 mm de diâmetro, aderidos ao endocárdio principalmente em região de válvulas atrioventriculares. Algumas válvulas atrioventriculares apresentavam moderada quantidade de nodulações brilhantes aderidas à válvula, levemente firmes medindo aproximadamente 2 mm de diâmetro, sugestivo de endocardiose. Hipertrofia concêntrica da musculatura, principalmente em ventrículo direito (VD) e septo interventricular (SIV), mas também presente em ventrículo esquerdo (VE), luz do VD aumentada, associado à hipertrofia da parede deste mesmo ventrículo (Figura 3.8-D, E). Nos animais do grupo CONTROLE observou-se infiltração de gordura na base e

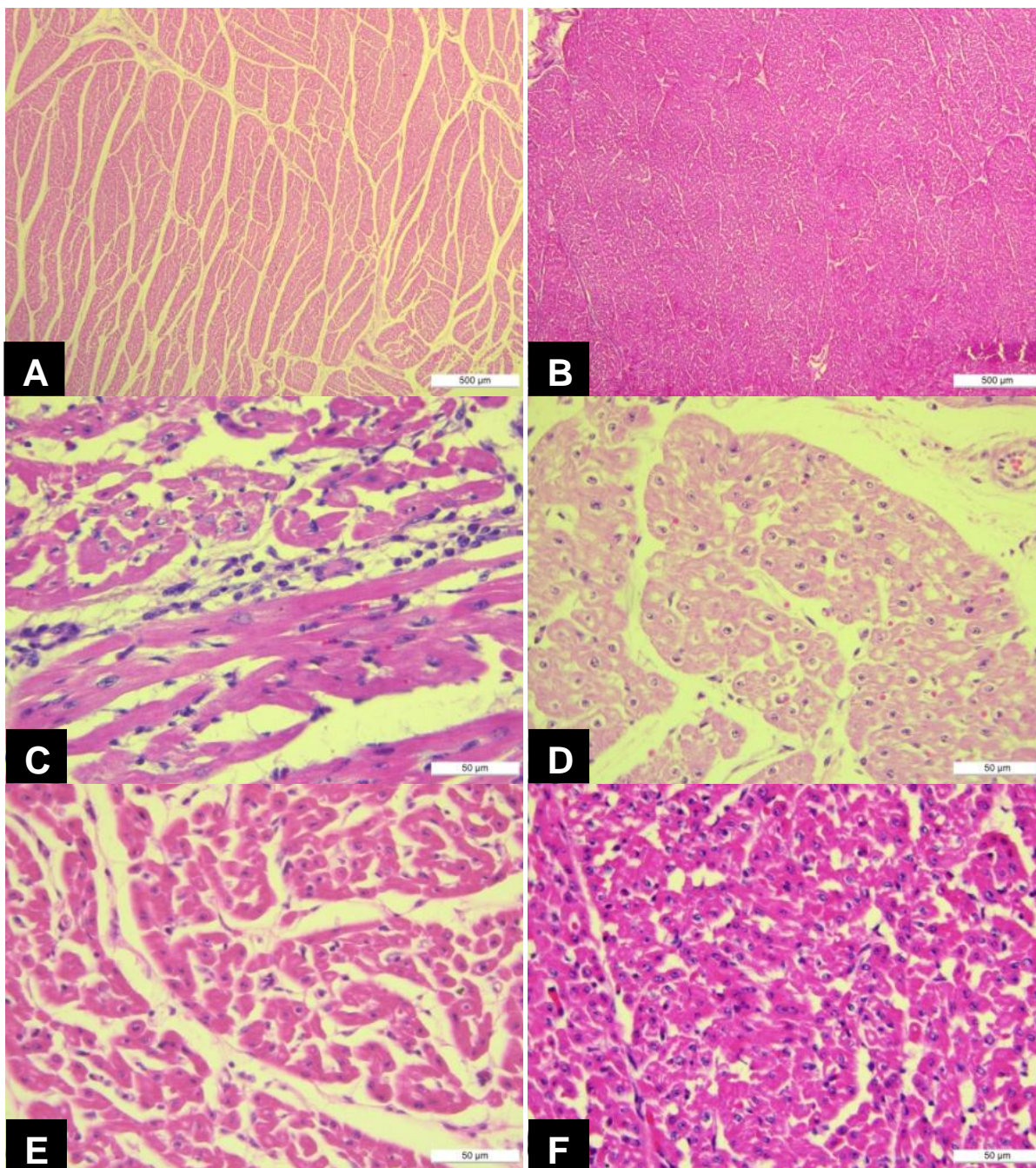
septo interventricular. Parede livre do VD e do SIV discretamente espessada (Figura 3.9-E). Forame oval e ducto arterioso identificáveis, porém não mais funcionais.

Microscopicamente, o coração dos animais clonados apresentou discreta a moderada vacuolização de fibras cardíacas em 11/40 animais, sendo 6/24 IMEDIATO e 5/16 TARDIO, estas vacuolizações encontravam-se na forma de vacúolos redondos que deixavam a célula tumefeita (Figura 3.9-D,E,F). Também foi observado maior espaçamento entre feixes de fibras (Figura 3.9-A) em 18/40 animais, sendo 10/24 IMEDIATO e 8/16 TARDIO. Nos animais controle observou-se o mesmo espaçamento de feixes de fibras cardíacas (Figura 3.9-B), porém em menor intensidade. Foi observada presença de infiltrado que foi de origem histiocítica, linfocítica e neutrofílica (Figura 3.9-C), a distribuição do infiltrado em relação aos grupos encontra-se melhor descrita na Tabela 3.7. Outras alterações observadas com menor frequência foram: presença de fibrina em 2 animais, sendo 1/24 IMEDIATO e 1/16 TARDIO. Congestão, hemorragia, aderência foram identificadas em 1/16 animal do grupo TARDIO cada. Em 15 animais não foram encontradas alterações histológicas, sendo 8/24 IMEDIATO e 7/16 TARDIO.





**Figura 3.8:** Alterações macroscópicas observadas no coração de neonatos clonados e controles. **(A)** Saco pericárdico apresentando- se aderido ao epicárdio. **(B)** Persistência de ducto arterioso. **(C)** Acentuada quantidade de cistos hemáticos na superfície de válvulas cardíacas. **(D, E)** Coração clone – corte transversal demonstrando hipertrofia de musculatura cardíaca. **(F)** Coração controle – corte transversal demonstrando característica normal do órgão.



**Figura 3.9:** Alterações microscópicas observadas no coração de neonatos clonados e controles. **(A)** Coração clone – maior espaçamento de feixes de fibras cardíacas (HE 500μm). **(B)** Coração controle –espaçamento normal de feixes de fibras cardíacas (HE 500μm). **(C)** Coração clone – presença de infiltrado de células inflamatórias e fibrina no interstício (HE 50μm) **(D, E)** Coração clone – vacuolização de cardiomiócitos (HE 50μm). **(F)** Coração controle – notar menor vacuolização e espaçamento de cardiomiócitos (HE 500μm).

**Tabela 3.7:** Achados microscópicos observados no coração de bezerros clones e controles.

Achados	Clones (n=40)			Controle (n=4)
	Imediato (n=24)	Tardio (n=16)	Total	
Vacuolização	6 (25%)	5 (31%)	11 (28%)	0
Espaçamento	10 (42%)	8 (50%)	18 (45%)	0
Infiltrado Histiocítico	1 (4%)	3 (19%)	4 (10%)	0
Infiltrado Linfocítico	3 (13%)	3 (19%)	3 (8%)	1 (25%)
Infiltrado Neutrofílico	1 (4%)	0	1 (3%)	0
Fibrina	1 (4%)	1 (6%)	2 (5%)	0
Congestão	0	1 (6%)	1 (3%)	0
Hemorragia	0	1 (6%)	1 (3%)	0
Aderência	0	1 (6%)	1 (3%)	0
Ausência de achados	8 (33%)	7 (44%)	15 (38%)	3 (75%)

## DISCUSSÃO

Alguns trabalhos relatam não encontrar qualquer alteração na necropsia de animais que vieram a óbito no período neonatal (KATO *et al.* 1998; LEE *et al.* 2004; WILMUT *et al.* 1997), tal afirmação pode ser explicada por Mee (2011) que relata que bezerros que morrem de anóxia aguda muitas vezes não têm importantes achados patológicos, o que pode esclarecer a aparente falta de achados em muitas necropsias. Além disso, mortes neonatais são frequentemente associadas à problemas respiratórios e de bezerros que estavam deprimidos e em decúbito prolongado (WILSON *et al.* 1995; GARRY *et al.* 1996). Panarace *et al.* 2007 relata que desconforto respiratório foi o sinal mais comum em bezerros que morreram sem qualquer outro sinal de anormalidade.

Em contrapartida, há uma série de relatos divulgando alterações congênicas e adquiridas de bovinos clonados (GARRY *et al.* 1996; PANARACE *et al.* 2007; RHIND *et al.* 2003; SANTOS *et al.* 2010; TANEJA *et al.* 2001), discutidos posteriormente. Apesar da aparente normalidade nas necropsias destes animais, alguns achados chamam a atenção. Nem todas as anormalidades são encontradas em todos os animais, porém, o curioso é a grande variabilidade entre elas e a grande frequência com que os animais clonados apresentam anormalidades raramente vistas em condições de campo (RHIND *et al.* 2003).

No presente trabalho foram evidenciadas diversas anormalidades nos animais avaliados, algumas ainda não descritas por outros grupos de pesquisa. Entretanto, alguns achados descritos por outros grupos como achados anormais foram considerados como sendo normais a animais neonatos quando comparado aos

animais do grupo CONTROLE. Um exemplo disto foram os achados observados microscopicamente no fígado como padrão lobular bem definido, sinusóides quase imperceptíveis e espaços porta próximos, que foram observados, sobretudo, nos animais mais jovens, que vieram a óbito no período neonatal imediato, sendo estas características observadas também nos animais controle, estes achados foram interpretados como sendo normais a animais neonatos, não sendo correlacionados com qualquer lesão hepática, porém, não foram encontrados na literatura relatos semelhantes. Tal como observado no presente trabalho, Hill *et al.* (1999) relatam ter encontrado no fígado de animais clonados superfície irregular e cápsula espessada e opaca, porém, não foi encontrada, na literatura justificativa para este achado. Hematoma subcapsular foi observado em apenas um animal e não foi encontrada justificativa para seu aparecimento, nem foi correlacionado com outras alterações específicas.

A observação de hepatomegalia e esteatose hepática juntamente com os achados de microscopia, que evidenciaram vacuolização de hepatócitos em diversos graus nos animais clonados, porém, mais acentuada em animais do grupo imediato, podem ser interpretadas como degeneração gordurosa (devido à morfologia dos vacúolos e os achados da macroscopia). Thomson, (1998) atribui a degeneração gordurosa ao aporte de gorduras maior que a metabolização da mesma ou a diminuição da síntese de proteínas e lipoproteínas envolvidas no transporte de lipídeos para fora da célula. Isto acontece em animais em inanição ou restrição alimentar grave e também em outros quadros como: intoxicações, cetose em ruminantes e *diabetes mellitus*.

Nos animais controle também foi evidenciado algum grau de degeneração gordurosa hepática, porém, a gravidade da lesão foi muito menor quando comparada aos animais clonados, este achado pode estar relacionado também às áreas de necrose centro-lobular observadas. Thomson, (1998) cita que degeneração gordurosa, acentuação do padrão lobular e necrose centro-lobular podem estar associadas à hipóxia e à morte dos animais. DeSousa *et al.* (2001) analisando fetos ovinos clonados declaram também haver observado degeneração hepática e sugerem que a causa de tais anormalidades seja devido à falta de nutrição oriunda da placenta. No presente trabalho foi observada degeneração vacuolar hepática em diversos animais, sobretudo nos animais do grupo imediato corroborando com a

hipótese de DeSousa *et al.* (2001). Estas alterações foram cada vez menos proeminentes nos clones com o avançar da idade, podendo indicar uma regeneração hepática em resposta à alimentação enteral e a não mais dependência da nutrição placentária. Okano *et al.* (2003), avaliando o fígado de fetos bovinos e Prestes *et al.* (2009), avaliando neonatos bovinos oriundos de FIV, descrevem também haver encontrado vacuolização de hepatócitos, porém, nestes relatos não há especificação do grau de acometimento dos animais. Pode-se inferir portanto que algum grau de vacuolização de hepatócitos seja normal a animais neonatos, porém, degenerações de grau moderado a acentuado já podem ser interpretadas como achados anormais.

Okano *et al.*, (2003), em seu trabalho com fetos, atribuiu ao acúmulo de glicogênio a vacuolização hepática observada em animais abortados, confirmado pela coloração PAS. No presente trabalho foi evidenciada em alguns animais a presença de glicogênio hepático, que foi considerado normal quando em quantidade discreta a moderada, (THOMSON, 1998) e foi considerado patológico quando em quantidade acentuada, o que foi apenas identificado em 8/41 animais clonados e em 1 controle. Congestão e hemorragia hepática foram observadas em apenas 4 animais na microscopia. Santos (2008), avaliando neonatos bovinos clonados, também observou congestão hepática, indicando se tratar de um achado comum a estes animais. Nos animais controle também foi observada congestão hepática, porém, esta pode ter ocorrido devido ao Thiopental utilizado para a realização da eutanásia, Thomson, (1998) cita que a utilização de barbitúricos é uma das causas de ocorrência de congestão hepática. Hematopoiese extramedular é comum a animais neonatos e pode ser um fator pelo qual haja rarefação folicular nos órgãos linfoides, devido a imaturidade do mesmo.

Os achados macroscópicos observados no baço dos animais clonados foram pouco relevantes quando comparados a outros órgãos e em relação aos animais controle. Nos controles observou-se característica normal do órgão, sendo a única diferença observada em relação aos clones um espessamento da cápsula esplênica nestes, porém, não foi encontrada qualquer citação que justificasse o aparecimento deste achado. Em relação aos achados de microscopia, a congestão observada é considerada de aparecimento relativamente comum no baço estando muitas vezes relacionada à insuficiência cardíaca congestiva, cirrose hepática ou outras causas

de aumento da pressão retrógrada, (THOMSON, 1998). Este fato é condizente com o observado nos animais do presente trabalho, que por vezes apresentaram espessamento do ventrículo direito (VD) e degeneração hepática. A hemorragia e hemossiderose observadas são decorrentes da congestão prolongada segundo Thomson, (1998). Foi observada também pouca evidência da polpa branca no baço dos animais clonados, o que diferiu dos animais controle nos quais não foi observada tal alteração. Este achado já foi previamente relatado em clones, Renard *et al.* (1999), descreveram marcada rarefação folicular em um animal de 50 dias de vida e Santos (2008), analisando o baço de bezerros clonados relata haver encontrado hipoplasia de polpa branca, bem como alterações em outros órgãos linfóides.

Nos rins foi observada quantidade moderada a acentuada de gordura perirrenal que continuava na pelve renal. O mesmo acúmulo de gordura foi observado também no epicárdio, principalmente em base cardíaca. Pode-se notar que a quantidade de gordura observada foi maior em animais clonados do que nos animais controle. Uma maior quantidade de gordura na cavidade abdominal foi observada por Chavatte-Palmer *et al.* (2002), em bezerros clonados, porém não há relatos na literatura deste acúmulo acometendo especificamente rins e coração destes animais.

Quanto à coloração, os rins dos clones apresentaram coloração mais escurecida quando comparado aos rins dos animais controle. Esta coloração mantinha-se ao corte e em alguns animais também se podia observar estriações esbranquiçadas a amareladas que se estendiam desde o córtex até a medular, tal como observado por Santos (2008). Thomson (1998) descreve tais estriações como acúmulo de gordura o que é condizente com o acúmulo de gordura observado na cápsula e pelve renais.

Não foram observadas na literatura relatos em relação a diferenças microscópicas entre os rins de animais jovens e adultos. Porém, tanto em clones quanto em controles foram observados na cortical renal glomérulos menores, hipercelulares e mais próximos, ao que se chamou de glomérulos com aspecto embrionário, acredita-se que esta seja uma característica comum a animais neonatos.

Material gelatinoso, translúcido e amarelado, de consistência amolecida muitas vezes esteve associado à observação de formações císticas que podem ser associadas à dilatação de túbulos observada tal como relatado por Santos (2008). Rhind *et al.* (2003) analisando rins de cordeiros clonados relatam haver observado hidronefrose bilateral severa associada à lesões obstrutivas do sistema urinário, achados semelhantes também foram observados por Wells *et al.* (1997). Proliferação de tecido conjuntivo no interstício e degeneração tubular foram observadas conjuntamente em animais que apresentavam malformação de diversos órgãos.

A observação grânulos acastanhados no interior das células de túbulos corticais e medulares nos rins dos clones foi um achado diferente do observado nos rins dos animais controle, onde não havia de tais grânulos. Não foi possível a identificação da origem de tal alteração, no entanto sabe-se que o pigmento observado não é oriundo do acúmulo de pigmentos biliares, ferro, hemossiderina ou glicogênio, pois não foi obtida coloração característica pelas técnicas utilizadas (Hall, Perls e PAS, respectivamente). Okano *et al.* (2003) descrevem uma vacuolização do epitélio tubular renal em bezerros abortados que apresentou marcação positiva no método de PAS, porém, no presente trabalho a coloração de PAS não corou caracteristicamente os grânulos observados, porém, houve coloração positiva por este método nos túbulos coletores da medular renal.

Os grânulos observados apresentam muitas características semelhantes à lipofuscina, porém, pelas técnicas utilizadas neste estudo não foi possível tal confirmação, a coloração para lipofuscina corou os grânulos, porém, não com a coloração esperada. Segundo Zachary e McGavin, (2012) a lipofuscina pode se acumular dentro das células epiteliais dos túbulos renais em bovinos idosos, na forma de finos grânulos dourados. Macroscopicamente pode ser observada como estrias de coloração marrom no córtex renal, semelhante ao observado na macrocopia nos animais aqui relatados. Akagi, *et al.* (2003) descreveram uma lesão renal como depósito de lipofuscina no epitélio tubular de um bezerro clonado que morreu aos 13 dias de vida. Acredita-se que a presença de tais grânulos seja um achado que mereça estudos posteriores, na tentativa de identificar a origem do pigmento e sua relação com as alterações renais observadas.

Os pulmões foram o órgão aonde mais se encontrou alterações, praticamente todos os clones apresentaram algum achado nos pulmões. No grupo imediato o achado mais comum foi a atelectasia assim como o observado por Santos (2008). A atelectasia caracteriza-se pela expansão incompleta dos alvéolos e pode ser causada por diversos fatores, entre eles, asfixia neonatal, hipertensão pulmonar e aspiração de fluido amniótico ou mecônio (DUNGWORTH, 1993). A ocorrência de atelectasia se mostrou determinante para a sobrevivência dos animais além do período neonatal imediato, evidenciando que estes animais apresentaram dificuldades na adaptação à vida extrauterina que culminaram em óbito. A atelectasia observada em animais clonados pôde ser muitas vezes associada à imaturidade pulmonar e à deficiência na produção de surfactante (PRESTES *et al.* 2009), que conduzem a uma hipertensão pulmonar crônica. Pode-se inferir, analisando conjuntamente os achados de atelectasia, congestão e degeneração hepática e hipertrofia de VD que os animais do grupo imediato apresentaram um quadro de hipertensão pulmonar crônica, porém, lesões microscópicas que caracterizam este quadro, muscularização e espessamento da camada íntima das pequenas artérias e espessamento muscular nas veias, (DUNGWORTH, 1993), não foram identificadas no presente trabalho, tal como observado por Rhind *et al.* (2003). A aspiração de mecônio observada em diversos animais do grupo IMEDIATO também é um fator que pode contribuir para a atelectasia observada, isto ocorre pois o mecônio reage com os fosfolípidos presentes no surfactante causando falhas nesta camada e conduzindo assim à atelectasia (BLEUL, 2009).

Edema, congestão e hemorragia pulmonar podem estar associados às alterações cardíacas observadas como a hipertrofia de VD. DungWorth, (1993) associa a ocorrência de edema pulmonar ao aumento da pressão hidrostática dos capilares pulmonares e cita que a congestão pulmonar pode estar muitas vezes associada ao aumento da pressão no átrio esquerdo e a falência cardíaca, levando ao edema cardiogênico.

Nos animais do grupo TARDIO o achado mais marcante encontrado nos pulmões foi pneumonia. Isto pode ser entendido quando levamos em consideração que muitos animais que vieram a óbito no período neonatal tardio apresentaram alguma afecção, desde pneumonia aspirativa devido à falsa via ou à aspiração de mecônio ou leite, peritonite difusa, devido à ruptura de úlcera de abomaso, afecções



umbilicais e falha na transferência da imunidade passiva. Entende-se portanto que a ocorrência de tais alterações pulmonares são muitas vezes secundárias à outras afecções apresentadas pelos animais. DungWorth, (1993) cita que em quadros de septicemia é comum o desprendimento de êmbolos sépticos que após se desprenderem localizam-se nos pulmões causando grave pneumonia. A presença de trombos nos animais avaliados pode ser entendida quando se observa que os pulmões são estrategicamente situados para captar êmbolos, advindos do sistema venoso (DUNGWORTH, 1993). Outras alterações observadas nos pulmões tais como deposição de fibrina, proliferação de pneumócitos tipo II, espessamento de septo, hiperplasia de pneumócitos tipo I, proliferação de tecido conjuntivo e necrose, são achados comuns encontrados em pneumonias e também foram observadas por outros autores (HILL *et al.* 2000; LI *et al.* 2005; SANTOS, 2008).

No coração o hidropericárdio observado pode estar relacionado à insuficiência cardíaca congestiva, identificada no animal em questão. Outras causas comuns de hidropericárdio são anasarca, doenças caquetizantes e neoplasias, (ROBINSON e MAXIE, 1993). As aderências fibrilares observadas entre o saco pericárdico e o epicárdio são condizentes com um quadro inicial de pericardite fibrinosa que segundo Robinson e Maxie, (1993) em neonatos pode ser relacionada à infecção por coliformes adquirida principalmente pela via umbilical. Tal como observado no presente trabalho a hipertrofia do ventrículo direito (VD) foi relatada por diversos autores, (GARRY *et al.* 1996; HILL *et al.* 1999; RHIND *et al.* 2003; SANTOS, 2008), este achado foi atribuído por Hill *et al.* (1999) à hipertensão pulmonar congênita. Rhind *et al.* (2003) relatam que em fetos ovinos foi observada uma hipertrofia de VD e relaciona esta hipertrofia às alterações observadas em pulmões e à hipertensão pulmonar que contribui para uma pobre sobrevivência neonatal por conduzir a um quadro de asfixia neonatal (BLEUL, 2009).

Cistos hemáticos são normalmente encontrados em animais e a presença deles não é atribuída a qualquer lesão específica, porém, se observa que em animais clonados os cistos hemáticos são visualizados com maior frequência, concordando com os achados obtidos por Santos, (2008) que observou quantidade variável de cistos hemáticos, sobretudo em animais que apresentaram cardiopatias. Nos animais controle não foi observada a presença de cistos hemáticos. As lesões sugestivas de endocardiose foram observadas nos corações dos animais clonados e

não foram observadas nos animais controle. A endocardiose é uma proliferação de tecido conjuntivo frouxo na válvula, acompanhado por deposição de glicosaminoglicano, há uma degeneração concomitante de colágeno na fibrosa da válvula e sua prevalência aumenta com o avançar da idade (ROBINSON e MAXIE, 1993) Lesões relativas à endocardiose ainda não foram descritas em animais clonados.

Não foram identificadas malformações congênitas nos corações dos animais avaliados. O forame oval e ducto arterioso eram identificáveis, porém, na maioria dos animais já estava afuncional, inclusive nos animais controle. Apenas dois animais que vieram a óbito no período neonatal imediato apresentavam persistência do ducto arterioso. Edwards *et al.* (2003) relatam que a redução na pressão pulmonar, e o teor de oxigênio estimulam o fechamento funcional do ducto arterioso e do forame oval, porém, o fechamento definitivo só ocorre dias depois. Isto é condizente com os achados observados no presente estudo.

A vacuolização de miócitos cardíacos foi observada no presente trabalho, porém não foi possível a identificação da origem dos vacúolos devido às condições do material, que já estava acondicionado em formol, impossibilitando a coloração específica, que necessita que o material esteja congelado (SUDAM). Acredita-se que possa estar relacionada à degeneração gordurosa, semelhante à degeneração observada no fígado (THOMSON, 1998). Acredita-se que este achado observado nos animais do presente estudo seja semelhante aos observados por Prestes *et al.* (2009) que relatam haver encontrado degeneração cardíaca em animais oriundos de FIV. O maior espaçamento de fibras cardíacas foi uma alteração observada em animais clonados em maior grau que nos animais controle, estando muitas vezes associado à vacuolização dos miócitos. Não se sabe quais as implicações deste maior espaçamento na saúde dos animais clonados e não foram encontrados relatos semelhantes na literatura.

## **CONCLUSÃO**

De acordo com as alterações observadas pode-se concluir que nos animais pertencentes ao grupo IMEDIATO as principais causas de óbito foram problemas hepáticos, caracterizados especialmente pela acentuada degeneração hepática, e problemas na adaptação à vida extrauterina demonstrados clinicamente como

dificuldade respiratória e patologicamente como atelectasia pulmonar, que contribuíram circunstancialmente para o óbito destes animais.

Nos animais do grupo TARDIO o achado mais notório foi a grande quantidade de animais apresentando acentuada pneumonia, que em muitos casos foi secundária a outras doenças intercorrentes e acredita-se que esta pneumonia tenha contribuído significativamente para o óbito do animal. Chama atenção o fato de que mesmo com todo rigor monitorização dos animais clonados e rigoroso acompanhamento pós-natal ocorram tantos e tão diversos quadros infecciosos.

Os achados observados nos rins dos animais clonados carecem de estudos posteriores na tentativa de identificar a origem dos grânulos observados e sua relação com as demais anormalidades observadas nestes animais.

As características encontradas no presente trabalho vêm a corroborar com os obtidos por outros autores e denota a necessidade de investigação patológica detalhada de animais clonados que não foram viáveis após o nascimento na tentativa de mapear as anormalidades apresentadas por estes animais e estabelecer uma relação causa-efeito com achados observados.

## REFERÊNCIAS

- AKAGI, S., ADACHI, N., MATSUKAWA, K., KUBO, M., e TAKAHASHI, S. Developmental potential of bovine nuclear transfer embryos and postnatal survival rate of cloned calves produced by two different timings of fusion and activation. **Molecular reproduction and development**, 66(3), p.264–272. 2003.
- ASTIZ, S., BULNES, G. A., PARTIDA, E. L., VILLALOBOS, P. N., LOPEZ, C. M., e MARTIN, J. V. G. Bovine neonatology. In J. Hudson, Roberts (Ed.), *Animal and plant productivity* (1st ed., p. 466). **Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)**. 2010. Disponível em: <http://www.eolss.net/Sample-Chapters/C10/E5-15A-33.pdf>
- BLEUL, U. Respirator y Distress Syndrome in Calves. **Veterinary Clinics of NA: Food Animal Practice**, 25(1), p.179–193. 2009.
- CAMPBELL, K. H. S., FISHER, P., CHEN, W. C., CHOI, I., KELLY, R. D. W., LEE, J. H., e XHU, J. Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives. **Theriogenology**, 68, 214–231. 2007.
- CFMV. (2002). Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências. **Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002**,. Disponível em: [www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao\\_714.pdf](http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao_714.pdf)
- CHAVATTE-PALMER, P, REMY, D., CORDONNIER, N., RICHARD, C., ISSENMAN, H., LAIGRE, P., HEYMAN, Y., *et al.* Health status of cloned cattle at different ages. **Cloning and stem cells**, 6(2), p.94–100. 2004.
- CHAVATTE-PALMER, PASCALE, HEYMAN, Y., RICHARD, C., MONGET, P., LEBOURHIS, D., KANN, G., CHILLIARD, Y., *et al.* Clinical , Hormonal , and Hematologic Characteristics of Bovine Calves Derived from Nuclei from Somatic Cells. **Biology of reproduction**, 66, p.1596–1603. 2002.
- DANIELS, R., HALL, V., e TROUNSON, A. O. Analysis of Gene Transcription in Bovine Nuclear Transfer Embryos Reconstructed with Granulosa Cell Nuclei. **Biology of Reproduction**, 63, 1034–1040. 2000.
- DESOUZA, P. A., KING, T., HARKNESS, L., YOUNG, L. E., WALKER, S. K., e WILMUT, I. Evaluation of Gestational Deficiencies in Cloned SHEp Fetuses and Placentae. **Biology of reproduction**, 65, 23–30. 2001.
- DINNYÉS, A., DE SOUSA, P., KING, T., e WILMUT, I. Somatic Cell Nuclear Transfer: Recent Progress and Challenges. **Cloning and stem cells**, 4(1), 81–90. 2002.
- DUNGWORTH, D. L. The Respiratory System. In K. V. F. Jubb, P. C. Kennedy, e N. Palmer (Eds.), **Pathology of Domestic Animals** (4th ed., pp. 577–613). San Diego, California: Academic Press. 1993.

EDWARDS, J. L., SCHRICK, F. N., MCCRACKEN, M. D., AMSTEL, S. R. VAN, HOPKINS, F. M., WELBORN, M. G., e DAVIES, C. J. Cloning adult farm animals: a review of the possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer. **American Journal of Reproductive Immunology**, 50, p.113–123. 2003.

ENRIGHT, B. P., TANEJA, M., SCHREIBER, D., RIESEN, J., TIAN, X. C., FORTUNE, J. E., e YANG, X. Reproductive characteristics of cloned heifers derived from adult somatic cells. **Biology of reproduction**, 66(2), 291–6. 2002.

FARIN, C. E., FARIN, P. W., e PIEDRAHITA, J. A. Development of fetuses from in vitro–produced and cloned bovine embryos. **Journal of Animal Science**, 82(E), p.53–62. 2004.

GARRY, F. B., ADAMS, R., MCCANN, J. P., e ODDE, K. G. Postnatal characteristics os calves produced by nuclear transfer cloning. **Theriogenology**, 45, p.141–152. 1996.

HEYMAN, Y., CHAVATTE-PALMER, P., LEBOURHIS, D., CAMOUS, S., VIGNON, X., e RENARD, J. P. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. **Biology of reproduction**, 66, p.6–13, 2002.

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

HILL, JONATHAN R, BURGHARDT, R. C., JONES, K., LONG, C. R., LOONEY, C. R., SHIN, T., SPENCER, T. E., *et al.* Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first- trimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biology of reproduction**, 63, p.1787–1794. 2000.

JONKER, F. H. Fetal death: comparative aspects in large domestic animals, **Animal Reproduction Science**, 83, p.415–430. 2004.

KATO, Y., TANI, T., SOTOMARU, Y., KUROKAWA, K., KATO, J.-Y., DOGUCHI, H., YASUE, H., *et al.* Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. **Science**, 282, p.2095–2098. 1998.

LANZA, R. P., CIBELLI, J. B., FABER, D., SWEENEY, R. W., HENDERSON, B., NEVALA, W., WEST, M. D., *et al.* Cloned cattle can be healthy and normal. **Science**, 294(nov.), p.1893–1894, 2001.

LEE, R. S. F., PETERSON, A. J., DONNISON, M. J., RAVELICH, S., LEDGARD, A. M., LI, N., OLIVER, J. E., *et al.* Cloned cattle fetuses with the same nuclear genetics are more variable than contemporary half-siblings resulting from artificial insemination and exhibit fetal and placental growth deregulation even in the first trimester. **Biology of reproduction**, 70, 1–11. 2004.

LI, S., LI, Y., DU, W., ZHANG, L., YU, S., DAI, Y., ZHAO, C., *et al.* Aberrant gene expression in organs of bovine clones that die within two days after birth. **Biology of reproduction**, 72(Jul), p.258–265. 2005.

MEE, J. Bovine Neonatal Survival – Is Improvement Possible? Epidemiology of Bovine Perinatal Mortality Incidence of Perinatal Mortality. **WCDS Advances in Dairy Technology**, 23, 161–174. 2011.

OKANO, W., BRACARENSE, A. P. F. R. L., REIS, A. C. F., e ALFIERI, A. A. Achados histológicos em fetos bovinos abortados e não abortados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 55(2), 223–225. 2003.

ORTEGON, H., BETTS, D. H., LIN, L., COPPOLA, G., PERRAULT, S. D., BLONDIN, P., e KING, W. A. Genomic stability and physiological assessments of live offspring sired by a bull clone, Starbuck II. **Theriogenology**, 67(1), 116–126. 2007.

PACE, M. M., AUGENSTEIN, M. L., BETTHAUSER, J. M., CHILDS, L. A, EILERTSEN, K. J., ENOS, J. M., FORSBERG, E. J., *et al.* Ontogeny of cloned cattle to lactation. **Biology of reproduction**, 67(1), p.334–9. 2002.

PALMIERI, C., LOI, P., PTAK, G., e DELLA SALDA, L. Review paper: a review of the pathology of abnormal placentae of somatic cell nuclear transfer clone pregnancies in cattle, sHEp, and mice. **Veterinary pathology**, 45(6), 865–880. 2008.

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

PEREIRA, A. F., e FREITAS, V. J. F. Clonagem em ruminantes: progressos e perspectivas atuais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 33(1), p.118–128. 2009.

PRESTES, N. C., PIAGENTINI, M., MOYA-ARAUJO, C. F., e ROCHA, N. S. Histopathologic characterization of “IVP” calves that during the perinatal period - cases report. **ARS Veterinaria**, 25(1), p.38–41 2009.

RADOSTITIS, O. M., LESLIE, K. E., e FETROW, J. Planned animal health and production in beef cattle breeding herds. In O. M. RADOSTITS, K. E. LESLIE, e J. FETROW (Eds.), **Herd Health Food Animal Production Medicine**. (2nd ed., pp. 331–393). Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1996.

RENARD, J., CHASTANT, S., CHESNÉ, P., RICHARD, C., MARCHAL, J., CORDONNIER, N., CHAVATTE, P., *et al.* Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. **The Lancet**, 353(May 1), p.1489–1491. 1999.

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

ROBINSON, W. F., e MAXIE, M. G. The cardiovascular system. In K. V. F. Jubb, P. C. Kennedy, e N. Palmer (Eds.), **Pathology of Domestic Animals** (4th ed., pp. 1–43). San Diego, California: Academic Press. 1993.

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

SANTOS, C. R. **Patologia de neonatos bovinos clonados**. São Paulo. Universidade de São Paulo (USP) 101p. Dissertação de mestrado em patologia experimental e comparada, 2008.

TANEJA, M., FRENCH, R., LEVINE, H., TAURO-MILLER, D., e X. YANG. Clinical and pathological status of cloned calves born pre-term. **Theriogenology**, 55 (abstract), p. 293, 2001. Disponível em: <http://www.oocities.org/uconnyanglab/patho.html2001>

THOMSON R. G. Alterações histopatológicas. In T. R. G. (Ed.), **Patologia Geral Veterinária** (2ª ed., pp.251–256). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1998.

WELLS, D. N., MISICA, P. M., DAY, T. A. M., e TERVIT, H. R. Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: a comparison between in vivo- and in vitro-matured cytoplasts. **Biology of reproduction**, 57, 385–393. 1997.

WILMUT, I., BEAUJEAN, N., SOUSA, P. A. DE, KING, T. J., e PATERSON, L. A. Somatic cell nuclear transfer. **Nature**, 419(Out), p.583–586, 2002.

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

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

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

ZACHARY, J. F., e MCGAVIN, M. D. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. (J. F. Zachary e M. D. McGavin, Eds.) (5th ed., pp. 38–39; 605). Elsevier. 2012.

ZATZ, M. Clonagem e células-tronco. **Ciência e Cultura**, 56(3), p.23–27. 2004.

## **CAPÍTULO IV**

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Devido ao longo tempo de coleta, 5 anos, a padronização dos dados foi dificultada. A metodologia de coleta e os fragmentos de órgãos coletados foram alterados ao longo do tempo e por este motivo se torna difícil a obtenção de uma análise minuciosa de cada animal que compõe o trabalho. Sabe-se que existem particularidades em relação à multiplicidade de causas que conduziram os animais ao óbito, porém, a avaliação dos órgãos coletados possibilita uma análise dos aspectos anatomopatológicos desses tecidos.

De acordo com as alterações observadas pode-se concluir que os órgãos que apresentaram maiores achados patológicos tanto nos animais abortados quanto nos animais que vieram a óbito no período neonatal foram o fígado e os pulmões e que alterações nestes órgãos foram circunstanciais para que os animais fossem inviáveis. Nos animais do grupo IMEDIATO isto aconteceu sobretudo devido a problemas na adaptação ao ambiente extrauterino e nos animais do grupo TARDIO principalmente em decorrência de infecções adquiridas no período neonatal. Os grânulos observados nos rins dos animais clonados carecem de estudos posteriores na tentativa de identificar sua origem e relação com as demais anormalidades observadas nestes animais.

Os achados encontrados no presente trabalho vêm a corroborar com os achados obtidos por outros autores e denota a necessidade de investigação patológica detalhada de animais clonados que não foram viáveis, na tentativa de mapear as anormalidades apresentadas por estes animais, buscando um maior entendimento de tais achados.



## ANEXO I - APROVAÇÃO CEUA



**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 04 de março de 2013.



### DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “**MONITORAMENTO CLÍNICO, LABORATORIAL E PATOLÓGICO DE BEZERROS CLONADOS**”, UnBDOC n.º 2312/2013, sob responsabilidade do Professor José Renato Junqueira Borges foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



Prof. José Raimundo Corrêa  
Coordenador da CEUA

