DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE LACTATO DE BEZERROS ORIUNOS DA TÉCNICA DE TRANSFERÊNCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS

Determination of calves' levels of lactate coming from somatic cell nuclear transfer technique

Maranin, Tarcísio Donizete

Faculdade Jaguariúna

Ribeiro, Karina A. R.

Orientadora

Micai, Ricardo A.

Co-Orientador

Resumo

A bovinocultura hoje é responsável pela maioria dos clones produzidos com fins comerciais. Atualmente existem 1.500 animais nascidos pela técnica de TNCS por todo o mundo e no Brasil, até 2014, a última estatística, foram catalogados 109 clones. A avaliação do perfil bioquímico é de grande importância na avaliação das condições corporais, pois o elevado teor de lactato logo após o nascimento é indicativo de hipóxia, importante quadro metabólico capaz de causar danos ao sistema nervoso central e simpático do recém-nascido. Uma das formas de determinar a ocorrência da hipóxia tecidual nos neonatos é através da dosagem de lactato plasmático, razão pela qual, o objetivo deste trabalho foi averiguar os níveis de lactato ao nascimento e 48 horas de vida, a fim de estabelecer ou descartar uma possível correlação entre os níveis deste analito e a ocorrência de acidose respiratória. Foram coletadas 24 amostras de sangue periférico de 12 fêmeas no total das raças Gir, Nelore e Senepol nos períodos entre 0 hora e 48 horas pós-nascimento. As amostras foram analisadas em um analisador bioquímico automático, da marca TEKNA 3000 VET. A média de lactato ao nascimento (tempo 0) foi de 116,5 mg/dl e 48 horas após foi de 75,5 mg/dl. Em alguns casos houveram diferenças significativas nos valores encontrados em relação a literatura, o que sugere atenção a este importante marcador bioquímico nas primeiras horas de vida.

Palavras Chaves: Clonagem; Bezerro; Lactato.

Abstract

Cattle raising is responsible for the vast majority of clones produced for commercial purposes. Currently, there are more than 1500 animals, which are born by SCNT worldwide. In Brazil, 109 clones were catalogued until 2014. Biochemical profile is valuable for body score condition assessment, once high levels of lactate at birth is an indicator of hypoxia – metabolic condition capable of damaging a newborn's Central Nervous System and Sympathetic Nervous System. Measuring plasmatic lactate levels is a manner of determining tissue hypoxia in newborns. This study aims at assessing lactate levels in newborns at birth and 48 hours later, in order to correlate the anylite and the occurrence of respiratory acidosis. Twenty four samples of peripheral blood have been taken from twelve Gyr, Nelore, and Senepol cows between 0 – 48 hours after birth. Analyses were carried out in a TEKNA 3000 VET Biochemistry Analyzer Automatic. Average lactate levels were 116,5 mg/dL at 0 hour and 75,5 mg/dL at 48 hours. Some analyzed cases showed significates difference when compared with the literature, that's demonstrate the important of this biochemistry marker, specialty in the first hour calve's life.

Key words: cloning; calves; lactate.

Introdução

A bovinocultura é hoje responsável pela maioria dos clones produzidos comercialmente no Brasil. Estima-se que existam aproximadamente 1.500 animais nascidos pela técnica de Transferência Nuclear de Células Somáticas (TNCS) por todo mundo, e em especial, na América do Norte, Japão, Nova Zelândia, Europa, Ásia e América do Sul (HEYMAN, 2005).

A Clonagem ou técnica de transferência nuclear (TN) é uma biotécnica que permite a geração de um organismo geneticamente idêntico ao outro. Para sua execução, retira-se o núcleo de uma célula embrionária ou somática de interesse, e após, o mesmo é transferido para um óocito previamente enucleado (CAMPBELL et al.; 1996).

Os partos dos clones são frequentemente sujeitos a assistência veterinária, especialmente em virtude do fato de que em muitos casos, não ocorre a sinalização fisiológica do parto na matriz, o que contribui para a ocorrência de um grande número de partos cesáreos, a fim de minimizar a ocorrência de problemas de saúde à matriz e especialmente ao neonato (KOMNINOU, 2008).

Por ser uma biotécnica recente, a clonagem de animais, ainda apresenta um alto índice de perda fetal, entretanto, ainda assim os resultados são positivos, especialmente em função da produtividade dos clones sobreviventes (MARCHESE, 2014).

Em receptoras prenhas de clone, é comum que a gestação se prolongue. Isto ocorre devido á redução dos níveis de cortisol, que passa a ser insuficiente para o sistema IGF (fator crescimento insulina-dependente), ocasionando alterações no processo normal do desenvolvimento do parto (MATSUZAKI & SHIGA, 2002). Em função disto, mesmo que o feto atinja o final do estágio de maturação, a matriz receptora não sinaliza o parto através de sinais fisiológicos, pois não apresenta a dilatação de cérvix. Nestes casos, o feto pode apresentar sinais de sofrimento fetal, razão pela qual, a cirurgia cesariana passa a ser recomendada (HILL et al.; 1999).

As principais alterações fisiológicas caracterizadas como complicações do período neonatal são observadas nas primeiras horas de vida do clone, entre o parto até 24 horas, e ocorrem, na maioria dos casos, devido a distúrbios de adaptação neonatal que envolvem os sistemas circulatórios e cardiovasculares (MARCHESE, 2014). Deficiências nestes sistemas podem desencadear hipóxia por alterações na circulação uteroplacentária ou por distúrbios do cordão umbilical (SIRISTATIDIS et al.; 2003) e a maioria das perdas gestacionais de clones está associada a estas falhas (WELLS,1999); (HILL et al.; 1999); (BUCZINSKI et al.; 2009).

Uma circulação fetal ineficiente pode levar ao quadro de hipoxemia e hipóxia tecidual no clone. Esta ocorrência pode se desenvolver muito precocemente, ainda no parto, e desencadear um estado de sofrimento fetal, que neste caso, será provocado por deficiência placentária (KOMNINOU, 2008).

Nas gestações de conceptos clonados, os placentônios apresentam variados números e tamanhos (MIGLINO et al.; 2007) e na grande maioria dos casos, são maiores em tamanhos e menores em quantidade. Esta alteração acarreta um menor fluxo sanguíneo ao concepto e assim, uma menor passagem de oxigênio, ocasionando sofrimento fetal do clone no pré-parto (BATCHERLDER et al.; 2007).

Quando os distúrbios fisiológicos atingem o sistema respiratório, é possível utilizar várias manobras para provocar o início dos movimentos necessários à manutenção deste sistema, a fim de evitar hipóxia e acidose, preservando a vida do clone. Uma destas manobras consiste em estimular os termos receptores localizados na pele do animal, por meio do derramar de 5 litros (em média) de água a 5°C sobre a cabeça do neonato imediatamente após o nascimento. Nos casos que as manobras não são suficientes, a respiração espontânea pode ser rapidamente estimulada por administração intravenosa na dosagem de 10 a 400 mg de cloridrato de doxapram (KUMAR, 2009). Estes procedimentos auxiliam o processo de troca gasosa do neonato, diminuindo as complicações ocasionadas pela acidose lática de causa respiratória (BLUEL et al.; 2010), ainda preocupante em clones neonato.

Em função da composição bioquímica do plasma sanguíneo, pode-se por meio dele, avaliar a situação metabólica de muitos dos tecidos animais, uma vez que, diversas injúrias teciduais ocasionadas por transtorno no funcionamento de órgãos específicos, levam ao desiquilíbrio metabólico (COTE E HOFF, 1991) e ao surgimento de metabólitos e/ou enzimas no plasma.

A análise da concentração de lactato plasmático, um metabólico bioquímico, após o parto, pode servir como um importante indicador da ocorrência de hipóxia no clone recém-nascido, uma vez que essa molécula é considerada um marcador de perfusão tecidual. Bioquimicamente, o aumento do lactato refletiria uma intensa metabolização das reservas energéticas, causada especialmente pelo aumento da atividade simpática, derivada do estresse adaptativo ao nascimento (STEINHARDT et al.; 1995) e ainda que a produção de lactato ocorra em todos os tecidos, o lactato plasmático representa de forma mais efetiva o derivado dos músculos, cérebro, hemácias e intestino. Entretanto, é importante salientar que há circunstâncias onde seus valores estarão elevados e ainda assim, dissociados a hipoperfusão tecidual (SILVA et al.; 2001), tal como na ocorrência de hipoglicemia ou sepse.

Estudos demostram que o lactato também é produzido pela placenta e distribuído na circulação materna e fetal, constituindo para o aumento do “carbono” no crescimento fetal (pela metabolização da glicose), o que é bastante positivo, especialmente em função do fato de que a taxa respiratória fetal impõe necessidades de mínimas necessárias de fontes carbono ao feto (HAY et al.;1988).

Dada a importância que o lactato desempenha na fisiologia e bioquímica fetal e após o nascimento e seu papel de indicador dos parâmetros relacionados a ocorrência de acidose, o objetivo desse trabalho foi avaliar o perfil bioquímico do lactato plasmático e suas concentrações na primeira hora de vida e após as primeiras 48 horas, em neonatos bovinos de clones de diferentes raças, a fim de observar a existência ou não de uma correlação entre os níveis de lactato plasmático e a ocorrência de acidose como causa da morte neonatal de clones.

Materiais e Métodos

No período de 11 de julho de 2016 a 15 de outubro de 2016 foram colhidas 24 amostras de sangue periférico total, as 0 e 48 horas após o nascimento de 12 bezerras clonados das raças Gir, Nelore e Senepol (TABELA 1), sendo: 1 Senepol, 4 Nelore, 7 Gir (QUADRO 1).

As amostras foram oriundas de clones produzidos para fins comerciais, em uma empresa de clonagem localizada no interior de São Paulo na cidade de Mogi Mirim, a qual autorizou através de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido a colheita do material necessário a execução desta pesquisa.

Quadro 1: Identificação dos animais avaliados, contendo raça, data de nascimento, indução e tipo de parto.

Clone	Raça	Nascimento	Indução do parto	Parto
Clone 1	Senepol	18/07/2016	Sim	Cesariana
Clone 2	Nelore	09/08/2016	Sim	Cesariana
Clone 3	Nelore	10/08/2016	Sim	Cesariana
Clone 4	Gir	16/08/2016	Sim	Cesariana
Clone 5	Gir	17/08/2016	Sim	Cesariana
Clone 6	Gir	18/08/2016	Sim	Cesariana
Clone 7	Gir	19/08/2016	Sim	Cesariana
Clone 8	Gir	24/08/2015	Sim	Cesariana
Clone 9	Gir	26/08/2016	Sim	Cesariana
Clone10	Gir	30/08/2016	Sim	Cesariana
Clone 11	Nelore	13/09/2016	Sim	Cesariana
Clone 12	Nelore	14/09/2016	Sim	Cesariana

Processamento das Amostras

Para determinação dos teores de lactato nas amostras de plasma, foram colhidos aproximadamente 3,5 mL de sangue por punção através da veia jugular externa, utilizando-se sistema Vacutainer® em tubos de 4 mL contendo fluoreto + K3 EDTA. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 2.000 RPM por 10 minutos, para a sedimentação figurados do sangue.

O plasma sanguíneo foi separado por aspiração em uma alíquota acondicionada em tubos plásticos com tampa ¨Eppendorf. As alíquotas de plasma foram conservadas em freezer a - 20°C. As amostras refrigeradas são encaminhadas para o laboratório Center Vet, em Jaguariúna, onde foi realizada a avaliação do teor de lactato.

Determinação dos Teores Séricos de Lactato

A determinação dos teores séricos de lactato foi realizada por testes enzimáticos, por meio da ação catalítica da enzima lactato oxidase, seguindo indicação de proporção contida no kit enzimático comercial (ELITECH CLINICAL SYSTEMS LACTATE). Todos os testes foram executados no analisador bioquímico automático TEKNA 3000 VET, e a leitura das concentrações plasmáticas de lactato foram feitas por espectrofotometria, no comprimento de onda 546nm.

Resultado e Discussão

Entre os 12 clones avaliados, a média de dias de gestação foi de 293 dias (TABELA 1).

Tabela 1: Níveis plasmáticos de lactato ao nascimento (0h) e 48h após o nascimento; Intervalo entre as amostras e dias de Gestação.

ANIMAL	Lactato 0 Hrs	Lactato 48 Hrs	Intervalo	Dias Gestação
Clone 1	59 mg/dl	45 mg/dl	14 mg/dl	286
Clone 2	22 mg/dl	15 mg/dl	7 mg/dl	294
Clone 3	29 mg/dl	20 mg/dl	9 mg/dl	295
Clone 4	174 mg/dl	82 mg/dl	92 mg/dl	294
Clone 5	157 mg/dl	58 mg/dl	99 mg/dl	295
Clone 6	227 mg/dl	350 mg/dl	(+)123 mg/dl	296
Clone 7	135 mg/dl	76 mg/dl	59 mg/dl	297
Clone 8	153 mg/dl	51 mg/dl	102 mg/dl	288
Clone 9	186 mg/dl	48 mg/dl	138 mg/dl	290
Clone 10	72 mg/dl	52 mg/dl	20/ mg/dl	294
Clone 11	85 mg/dl	34 mg/dl	51 mg/dl	294
Clone 12	100 mg/dl	75 mg/dl	25 mg/dl	295
MÉDIA	**116,5 mg/dl**	**75,5mg/dl**		**293**

Em todos os casos, os clones receberam no momento pós-parto oxigenioterapia com máscara nasal, aminofilina nos casos de baixa amplitude respiratória e doxapram foi administrada àqueles que apresentaram arritmia respiratória. Os 12 clones receberam oxigenioterapia após nascimento. Os clones 1, 4 e 11 receberam Aminofilina, enquanto que os clones 2, 3, 6, 8, 9, e 12 receberam dose de Aminofilina e Doxapram. Os clones 9 e 12 também receberam dexametasona a fim de evitar a ocorrência de complicações ocasionadas por quadros infecciosos, pois estavam tingidos de mecônio ao nascimento.

Os resultados obtidos após a leitura dos níveis plasmáticos do lactato no dos 12 clones estão apresentados na FIGURA 1.

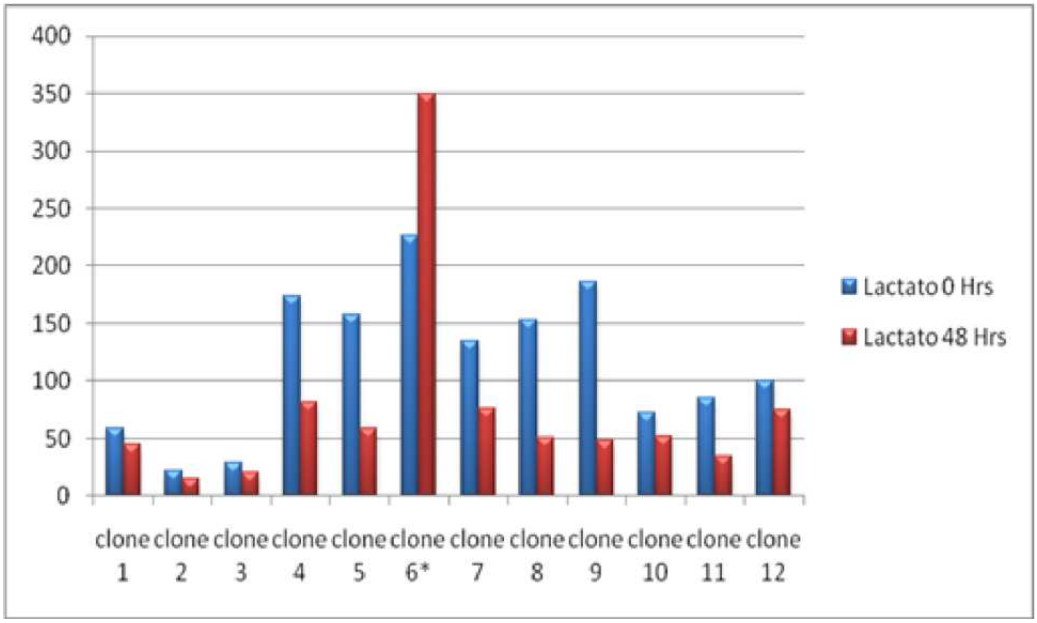

Figura 1. Concentração de lactato plasmático nos tempos 0h e 48 h após o nascimento.

Segundo MARCHESE (2014) a média de lactato plasmático em bezerros da raça NELORE ao nascimento é de 85,2 mg/dl e 34.8 a 37,5 mg/dl após 48(h). No presente estudo, a média da concentração de lactato dos animais desta raça foi de 59 mg/dl ao nascimento e 36 mg/dl às 48 horas, o

que indica um valor abaixo da referência (T=0h) para bezerros nascidos de parto normal.

A média de todas as diferentes raças avaliadas foi de 116,5 mg/dl (T=0h), com desvio padrão (DP) de 62,4.

A média da concentração sérica do lactato nos bezerros clonados 48h após o nascimento foi de 75,5mg/dl, bastante superior as observadas por MARCHESE (2014).

O clone 1 da raça Senepol apresentou 59 mg/dl (T=0h) e às 45 mg/dl (T2=48h).

Todos os clones da raça Gir (7) foram provenientes de parto cesarianas e apresentaram, em média os valores mais altos observados, sendo 157,7 mg/dl de lactato plasmático ao nascimento (T=0h), com destaque ao clone 6, onde o valor em no T=0h foi de 227 mg/dl. Após as 48 primeiras horas de vida, a média de lactato plasmático entre os clones desta raça foi de 102,4 mg/dl (QUADRO 2), ainda acima dos valores observados como normais aos dos indivíduos da raça NELORE. Neste tempo, 48h após o nascimento, clone 6, que apresentou concentração de 123 mg/dl de lactato plasmático. Este clone não resistiu às próximas horas, sendo observado o óbito após 52h de vida por acidose respiratória (FIGURA 1).

Na avaliação de 48 horas após o nascimento, os clones da raça Gir apresentaram a maior média, 102,4 mg/dl, valor 5 vezes maior em comparação ao clones de Nelore descritos por MARCHESE (2014).

Quadro 2. Média dos níveis séricos de lactato por raça às 0h e 48h após o nascimento.

		Lactato 0h Hrs (mg/dl)	Lactato 48h (mg/dl)
Clone 1	Senepol	59	45
MÉDIA	**SENEPOL**	**59**	**45**
Clone 2	Nelore	22	15
Clone 3	Nelore	29	20
Clone 11	Nelore	85	34
Clone 12	Nelore	100	75
MÉDIA	**NELORE**	**59**	**36**
Clone 4	Gir	174	82
Clone 5	Gir	157	58
Clone 6	Gir	227	350
Clone 7	Gir	135	76
Clone 8	Gir	153	51
Clone 9	Gir	186	48
Clone10	Gir	72	52
MÉDIA	**GIR**	**157,7**	**102,4**

Conclusão

Ainda que o número de amostras avaliadas tenha sido pequeno, foi possível constatar que os níveis plasmáticos de lactato nos indivíduos clones da raça GIR foram superiores aos observados nos indivíduos da raça NELORE, tanto no T=0h como nas próximas 48h após o nascimento e que, em havendo uma alteração significativa nos níveis de lactato no pós-parto (0h), faz-se necessário a introdução imediata de protocolos médicos que visem impedir o desenvolvimento da acidose respiratória ao longo das próximas horas de vida do clone, diminuindo as perdas relacionadas a este importante quadro metabólico que entre outros fatores, desencadeia hipóxia tecidual que pode ser fatal.

Referencias Bibliográficas

BATCHELDER, C. A.; BERTOLINI, M.; MASSON, J. B.; MOYER, A. L.; HOFFERT, K. A.; PETKOV, S. G.; FAMULA, T. R.; ANGELOS, J.; GEORGE, L. W.; ANDERSON, G.B. Perinatal physiology in cloned and normal calves: hematological and biochemical profiles. **Cloning Steam Cells**, v.9, n.1, p.83-86, 2007.

BLEUL, U.; BIRCHER, B.; JUD, R.S.; KUTTER, A.P.N. Respiratory and cardiovascular effects of doxapram and theophylline for the treatment of asphyxia in neonatal calves.**Theriogenology**, v.73, p.612–619, 2010.

BUCZINSKI, S.; FECTEAUR, G.; COMEAU, G.; BOYSEN, S. R.; LEFEBURE, R. C.; SMITH, L. C. Ultrasonographic fetal well-being assessment, neonatal and postpartum findings of cloned pregnancies in cattle: a preliminary study on 10 fetuses and calves. **The Canadian Veterinary Journal**, v.50; p.262-269, 2009.

CAMPBELL, K. H.; MCWHIR,J.; RITCHIEW, W. A.; WILMUT, I. Sheep cloned by cloned nuclear transfer a culture cell line. Nature, v.380, n. 6569, p. 64-66, 1996.

COTE, J. F.; HOFF, B. Interpretation of blood profiles in problem dairy herds.The BovinePractitioner, v. 26, p. 7-11, 1991.

HAY, W. W.; MEZNARICH, H. K.; DIGIACOMO, J. E.; HIRST, K.; ZERBE, G. Effects of insulin and glucose on glucose utilization in fetal sheep. **Pediatric Research**, v.23, p.281-287, 1988.

HEYMAN Y. Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v.45, p. 353-361, 2005.

HILL, J. R.; ROUSSEL, A. J.; CIBELLI, J. B.; EDWARDS, J. F.; HOOPER, N. L.; MILLER, M. W.; THOMPSON, J. A.; LOONEY, C. R.; WETSHUSIN, M. E.; ROBL, J. M.; STICE, S. L. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetures (13 case studies). **Theriogenology**, v.51, p.1451-1465, 1999.

KOMNINOU, R. E. Contribuição ao estudo da hematologia de bezerros da raça nelore, originados por meio da técnica de transferência nuclear de células somáticas (TNCS) – Clonagem, 2008.

KUMAR, P. **Applied Veterinary Gynaecology and Obstetrics.**1ed. India: International Book Distributing Co., 2009, 363p.

MARCHESE, F. J. M. Perfil bioquímico de bezerros da raça nelore, originados por meio da técnica de transferência nuclear de células somáticas (TNCS) – Clonagem, 2014.

MATSUZAKI, M.; SHIGA K. Endocrine characteristics of cloned calves. **Cloning Steam Cells**, v4, p.261-267, 2002.

MIGLINIO, M. A.; PEREIRA, F. T. V.; VISINTIN, J. A.; GARCIA, J. M.; MEIRELES, F. V.; RUMPF, R.; AMBROSIO, C. E.; PAPA, P. C.; SANTOS, T. C.; CARVALHO, A. F.; LEISER, R.; CARTER, A. M. Placentation in clonedcattle: Structureand microvascular architecture. Theriogenoloy, v.68, p. 604-617, 2007.

SILVA, E.; GARRIDO, A. G.; ASSUNÇÃO, M. S. Avaliação da perfusão tecidual no choque. **Medicina**, Ribeirão Preto, v.34, p.27-35, 2001.

SIRISTATIDIS, C.; SALAMALEKIS, E.; KASSANOS, D.; LOGHIS, C.; CREATSAS, G. Evalutionof fetal intrapartumhypoxiabymiddle cerebral and umbilical artery Doppler velocimetrywithsimultaneous cardiotocography andoximetry. **Archives of Gynecology and Obstetrics,** v.270, n.4, p.256-270, 2003.

STEINHARDT, M.; THIELSCHIER, H. H.; LEHR, A.; LADEWIG, J.; SZALONY, S.; SMIDT, D.; IHNEN, B. Clinical chemical and hematological blood values and adaptations during postnatal life in suckler calves. **Deutshe Tierarztliche Wochensschrift.;** v.102, p.399-405, 1995.

WELLS, D. N. Animal cloning: current process, challenges and future prospects. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, p.86-97, 1999.