

INFLUÊNCIA DA DEXAMETASONA SOBRE LEUCÓCITOS DE BEZERROS ORIUNDOS DA TÉCNICA DE TRANSFERÊNCIA NUCLEAR

Influence of dexamethasone on leukocytes of calves from the nuclear transfer technique

NORONHA, Isabella Marconato

Faculdade de Jaguariúna – FAJ

RIBEIRO, Karina A. Rosa

Faculdade de Jaguariúna – FAJ

Resumo

A clonagem animal ganhou grande importância na Medicina Veterinária, não só por agregar alto valor tecnológico à veterinária, mas também pelo positivo impacto financeiro no Agronegócio. Entretanto, ainda que as técnicas de clonagem estejam aprimoradas, elas não alcançam o máximo de sua eficiência, haja vista que muitos clones bovinos não resistem ao primeiro mês de vida. Alguns dos fatores associados as mortes neonatais dizem respeito a ocorrência de diversos distúrbios metabólicos, fisiológicos e/ou imunológicos que podem acometer os clones neonatos. O objetivo deste trabalho foi avaliar qualitativamente e quantitativamente os leucócitos de bezerros oriundos da técnica de transferência nuclear (TN) e a influência da dexametasona, utilizada como indutor do parto, nestas células, afim de avaliar o papel destes fatores nas primeiras horas de vida do clone. Foram realizadas coletas de sangue (3 a 5 ml) por punção da veia jugular, de 15 bezerros clonados em uma empresa do interior do estado de São Paulo. Não houve seleção prévia de animais quanto ao sexo ou raça. Todos os clones nascidos durante o período estabelecido para o experimento foram submetidos às coletas, que ocorreram imediatamente após o parto (0 horas – (T0)), 24 (T1) e 48 horas (T2) após o parto. Outras três coletas foram realizadas com intervalos de 7 dias (T3, T4 e T5). A confecção do esfregaço sanguíneo foi realizada pela técnica da cunha ou deslizamento, seguida da coloração das lâminas pela utilização de panótico

rápido, estabelecida por Romanowsky. As amostras foram avaliadas por análise microscópica dos elementos celulares. Para a contagem total foi utilizada a técnica de contagem manual em câmara de Neubauer, tendo solução de Turk como diluente. A contagem diferencial foi feita com 100 células no corpo da lâmina corada. Os dados foram analisados pelo PROC MIXED (SAS, versão 9.2, 2010), para comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey e foram consideradas diferenças estatísticas quando $P < 0,05$. Dos animais avaliados, 2 morreram antes de completar 24 horas, enquanto outros 2, após completarem 48 horas. Dos 15 clones avaliados, a dexametasona foi utilizada como indutor do parto em 10 deles, dos quais, 9 nasceram de cesariana e 1 de parto normal. Dos demais 5 clones não induzidos com dexametasona, 3 nasceram de cesariana e 2 de parto normal. No momento do nascimento (coleta 0h) o grupo não induzido apresentou maiores valores de precursores mielóides ($6,74 \pm 1,03$) que o grupo induzido ($1,60 \pm 0,32$) ($P = 0,009$), no entanto, 24 horas após o nascimento, essa diferença não foi aparente (não induzido; $2,74 \pm 1,18$; induzido $1,76 \pm 0,41$) ($P = 0,838$). Os precursores mielóides são encontrados na circulação periférica, em casos de inflamações ou injúrias. O fato de o grupo induzido ter apresentado menor número desses precursores, pode ser um indicativo da ação da dexametasona como indutor da maturação fetal, demonstrando o potencial deste fármaco para contribuir positivamente com a saúde do clone nas primeiras horas de vida.

Palavras-chaves: clonagem; bezerros; dexametasona.

Abstract

Animal cloning has gained great importance in veterinary medicine, not only by adding a great technological involvement to the vet, but also by the positive financial impact on agribusiness. However, even if cloning techniques improved, many cattle clones don't resist the first month of life, especially in function of disturbs from physiology, biochemistry or immunological causes that can affect the neonate clone. The aim of this work was to evaluate qualitatively and quantitatively the leukocytes of calves from the nuclear transfer technique (TN) and the influence of dexamethasone, used as an inducer of childbirth, in these cells, in order to evaluate the role of these factors in the early hours of the

clone. Blood collections were performed (3 to 5 ml) jugular vein puncture, 15 calves cloned in a company in the State of São Paulo in Brazil. There was no prior selection of animals as to gender or race. All the clones were born during the period established for the experiment were subject to collections, that occurred immediately after delivery (0 hours – (T0)), 24 (T1) and 48 hours (T2) after delivery. Three other collections were made at intervals of 7 days (T3, T4 and T5). The making of the blood smear was performed by wedge or sliding technique, followed by staining the blades by the use of fast panótico, established by Romanowsky. The samples were evaluated by microscopic analysis of cellular elements. For the total count was used the technique of counting Chamber Neubauer manual, having solution of Turk as a diluent. The differential count was done with 100 cells in the body of the blade looped. Data were analyzed by PROC MIXED (SAS, version 9.2, 2010), for comparison of means was used the Tukey test, and were considered statistical differences when $P < 0.05$. Of animals evaluated, 2 died before completing 24 hours, while other 2, after completing 48 hours. Of the 15 clones evaluated, dexamethasone was used as a labor inducer in 10 of them, of which 9 were born by Cesarean and 1 of natural childbirth. The remaining 5 clones induced with dexamethasone, 3 were born by Cesarean and 2 of natural childbirth. At the time of birth (collects 12:00 am) not induced group presented higher values of myeloid precursors (6.74 ± 1.03) that induced Group (1.60 ± 0.32) ($P = 0.009$), however, 12:00 am after birth, this difference was not apparent (not induced; 1.18 ± 2.74 ; induced 1.76 ± 0.41) ($P = 0.838$). Mieloides precursors are found in the peripheral circulation, in cases of inflammation or injury. The fact the Group has made fewer of those induced precursors, may be indicative of the action of dexamethasone as fetal maturation inducer, demonstrating the potential of this drug to contribute positively to the health of the clone in the first hours of life.

Key-words: cloning; calves; dexamethasone.

Introdução

Largamente empregada na medicina veterinária, a técnica de clonagem animal representa uma parcela significativa do setor de agronegócios (FIGUEIREDO;FREITAS;GONÇALVES,2008), mas do ponto de vista biológico, ainda necessita de maior eficiência, especialmente em virtude do grande número de problemas que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário e fetal dos clones, e que culmina, em uma elevada taxa de mortalidade pós-natal.

Segundo KOMNINOU (2008) a principal causa das mortes de clones logo após o nascimento tem sido atribuída a distúrbios placentários, ao sobrepeso dos clones, a alta incidência de hidropsia e ao retardamento das fases de abertura e dilatação das vias fetais durante o parto.

Ainda durante a primeira semana de vida, um grande número de bezerros morre devido a distúrbios de adaptação neonatal de diversas ordens (fisiológicas, bioquímicas, imunológicas e hematológicas). As ocorrências destes distúrbios representam um desafio à produção comercial de animais clonados (KOMNINOU, 2008). Acredita-se que uma ineficiência do Sistema Imune dos bezerros clonados possa estar associada a estes distúrbios de adaptação neonatal, o que torna necessário uma extensa avaliação quantitativa e da capacidade funcional das células deste sistema.

Há casos em que a vida da matriz pode estar comprometida em função da gestação, tais como a ocorrência de gestações gemelares e o tamanho anormal de bezerro (maior que o tamanho médio dos bezerros ao nascimento). Nestes casos, a indução do parto bovino é indicada, a fim de preservar a vida da matriz e do clone. Na maioria dos casos, a indução do parto cesáreo é feita com a administração de corticóides de curta ação, prostaglandinas, associação de corticóides de curta ação e prostaglandina, ou ainda a associação de corticóide de curta ação, prostaglandina e corticóide de longa. (VIEIRA,2011)

Os glicocorticoides são hormônios esteroides, sintetizados no córtex da glândula adrenal. É uma das classes de medicamentos mais frequentemente usadas em razão das suas propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras (ANTONOW et al, 2007).

O efeito dos corticosteróides na aceleração da maturação de órgãos em animais é conhecido há mais de 50 anos. Liggins, em 1969, foi quem

inicialmente percebeu que os fetos de ovelhas, quando expostos intra-útero aos corticosteróides, mostravam-se viáveis mesmo ao nascerem em idades gestacionais precoces (LEÃO;SILVA, 2008).

Por quase 20 anos, inúmeros pesquisadores repetiram os estudos de Liggins e Howie, realizando estudos randomizados e controlados sobre uso de corticosteróide antenatal em gestantes em risco de parto pré-termo. A maioria dos estudos confirmou os resultados do estudo pioneiro, concluindo pelos benefícios desta prática (LEÃO;SILVA, 2008).

Do ponto de vista fisiológico, sabe-se que o momento da diferenciação pulmonar relaciona-se com o aumento de corticoide circulante, o que reforça o conceito de que os corticoides endógenos, interagindo com outros hormônios, são importantes moduladores fisiológicos da maturação tecidual e que a terapia corticoide antenatal mimetiza o efeito dos glicocorticoides endógenos. Considera-se que o uso antenatal de corticoide nas doses recomendadas ocasiona atividade glicocorticoide similar à do estresse fisiológico no plasma fetal (LONGO e PEREIRA, 2007).

Essas considerações indicam que a exposição do feto ao corticóide no período antenatal pode conferir benefícios para a maturação de diversos órgãos e tecidos.

Com base nas complicações biológicas pós-parto que reduzem a sobrevivência dos clones e no mecanismo de ação dos corticóides utilizados na indução do parto de bezerros clonados, o objetivo deste trabalho foi verificar se a quantidade de leucócitos presente nas primeiras horas de vida nos bezerros é semelhante aos valores de referência para a espécie e se a utilização de corticoide de curta ação (dexametasona) para a indução do parto, de bezerros oriundos da técnica de transferência nuclear (TN), influencia na quantidade de precursores mielóides na circulação periférica, no momento do parto e após 24 horas.

Metodologia

Para a execução do trabalho foram realizadas coletas de sangue (3 a 5 ml) de 15 bezerros clonados, nascidos de cesariana ou parto normal.

Não houve seleção prévia de sexo nem raça. Todos os clones nascidos durante o período estabelecido para o experimento foram submetidos às coletas, que ocorreram imediatamente após o parto (0 horas – (T0)), 24 (T1) e 48 horas (T2) após o parto. Outras três coletas foram realizadas com intervalos de 7 dias (T3, T4 e T5).

Dos 15 clones avaliados, a dexametasona foi utilizada como indutor do parto em 10 deles, dos quais, 9 nasceram de cesariana e 1 de parto normal. Dos demais 5 clones não induzidos com dexametasona, 3 nasceram de cesariana e 2 de parto normal

Os animais que foram induzidos, as mães receberam aplicação de 22mg de Dexametasona, por via intramuscular, 36 horas antes do parto.

Destes animais avaliados, 2 morreram antes de completar 24 horas, enquanto outros 2, após completarem 48 horas.

Para verificar mais precisamente a relação da dexametasona com a quantidade de precursores mielóides foram avaliados apenas os animais que estavam nas mesmas condições, sendo 3 animais induzidos e 3 animais não induzidos nascidos de cesariana.

As amostras foram coletadas em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) por meio de punção da veia jugular externa. A confecção do esfregaço sanguíneo foi realizada pela técnica da cunha ou deslizamento, seguida da coloração das lâminas pela utilização de panótico rápido, estabelecida por Romanowsky. As amostras foram avaliadas por análise microscópica dos elementos celulares. Para a contagem total foi utilizada a técnica de contagem manual em câmara de Neubauer, tendo solução de Turk como diluente. A contagem diferencial foi feita com 100 células no corpo da lâmina corada (QUADRO 1).

Os dados foram analisados pelo PROC MIXED (SAS, versão 9.2, 2010), para comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey e foram consideradas diferenças estatísticas quando $P < 0,05$.

Desenvolvimento

Quadro 1. Leucócitos totais em cada coleta

Leucócitos totais/mm ³													
Animal	Indução	0 horas	VG*	24 horas	VG*	48 horas	VG*	4 ^a coleta	VG*	5 ^a coleta	VG*	6 ^a coleta	VG*
1	não	23750	30	20950	28	12150	22	8550	25	17300	29	23000	29
2	sim	14700	35	óbito		óbito		óbito		óbito		óbito	
3	sim	15000	34	7900	32	7500	27	6150	30	12800	36	6100	35
4	não	16550	34	14200	36	10800	36	13750	36	7300	34	12000	36
5	sim	11050	31	16650	28	5650	26	14900	27	7600	35	10350	37
6	sim	6300	38	16600	36	4950	38	15400	34	8050	36	10700	38
7	não	28550	38	17800	36	11100	31	óbito		óbito		óbito	
8	sim	13700	50	15300	38	6750	36	13400	36	11450	38	8650	38
9	sim	5950	39	óbito		óbito		óbito		óbito		óbito	
10	sim	27000	34	13900	33	6450	30	13100	33	10200	34	10100	34
11	sim	15050	45	5150	39	5650	35	óbito		óbito		óbito	
12	não	7800	32	4800	29	4650	31	2900	23	4400	24	5850	27
13	sim	3650	29	4100	25	3350	22	6300	20	4500	26	3750	24
14	não	3750	21	4450	26	3100	20	5050	17	5100	20	5250	25
15	sim	8700	29	10650	24	4800	20	3700	20	3300	24	4400	24
* VG : valor global.													
Observações:													
Animal 2: óbito em 4 horas pós parto. Parada cardiorespiratória\necropsia: persistência de ducto arterioso													
Animal 7: vaca com hidropsia antecipou o parto 12 dias. Bezerro prematuro e persistência de ducto arterioso													
Animal 9: óbito. insuficiência renal e hepática													
Animal 11: parto normal													
Animal 12: parto normal													
Animal 13 : parto normal													

Resultados

Os bezerros clonados apresentaram, de maneira geral, leucocitose nas primeiras horas de vida, pois segundo Brisville et al (2013), o valor de referência para bezerros é de 4 a 12 mil leucócitos/mm³, em contrapartida com a média observada neste trabalho, que foi de 13.433 leucócitos/mm³. De forma geral, os animais apresentaram grande variação no número de leucócitos, sendo o maior valor de 28.550 leucócitos/mm³ e o menor 3.650 leucócitos/mm³ leucócitos, no momento do parto.

Em relação a dexametasona e a presença dos precursores mielóides no sangue periférico, ao nascimento (coleta 0h) o grupo não induzido apresentou maiores valores de precursores mielóides ($6,74 \pm 1,03$) que o grupo induzido ($1,60 \pm 0,32$) ($P=0,009$), entretanto, 24 horas após, essa diferença não era mais observada (não induzido; $2,74 \pm 1,18$; induzido $1,76 \pm 0,41$) ($P=0,838$) (TABELA 2). Fisiologicamente, os precursores mielóides são encontrados na circulação periférica apenas em casos de inflamações teciduais ou alterações no ambiente medular. O fato de o grupo induzido ter apresentado menor número desses precursores, pode ser indicativo da ação da dexametasona como indutor da maturação celular em nível medular do feto (FIGURAS 1 e 2).

O cortisol reduz a mobilização de leucócitos circulantes por inibição da produção e ligação de moléculas de adesão aos receptores; diminui a atividade fagocitária e bactericida dos neutrófilos, embora aumente a fração destas células em circulação, por estimulação da sua liberação a partir da medula óssea (BUENO; GOUVEA, 2011)

O cortisol diminui ainda o número de linfócitos circulantes, particularmente os T auxiliares, envolvidos na resposta a substâncias estranhas e diminui, igualmente, a sua função. Toda a imunidade mediada por células está deprimida. O mecanismo de depressão desta resposta é complexo, mas inclui a redução na produção de mediadores intercelulares que ativam o sistema imune e o bloqueio da progressão no ciclo celular das células envolvidas (BUENO; GOUVEA, 2011)

No entanto, segundo LONGO e PEREIRA, os corticoides, também auxiliam na maturação de diversos órgãos e tecidos, quando utilizado em doses corretas pré-parto, pois ocasiona uma atividade glicocorticoide similar à do estresse fisiológico no plasma fetal.

Tabela 2. Interferência da dexametasona na quantidade de precursores mielóides na circulação periférica

Grupo	Tempo		Valor de P
	0h	24h	
Não induzido	6.74±1.03	2.74±1.18	0.036
Induzido	1.60±0.32	1.76±0.41	0.998
Valor de P	0.009	0.838	

Figura 1. Relação de leucócitos totais, nos animais induzidos e não induzidos.

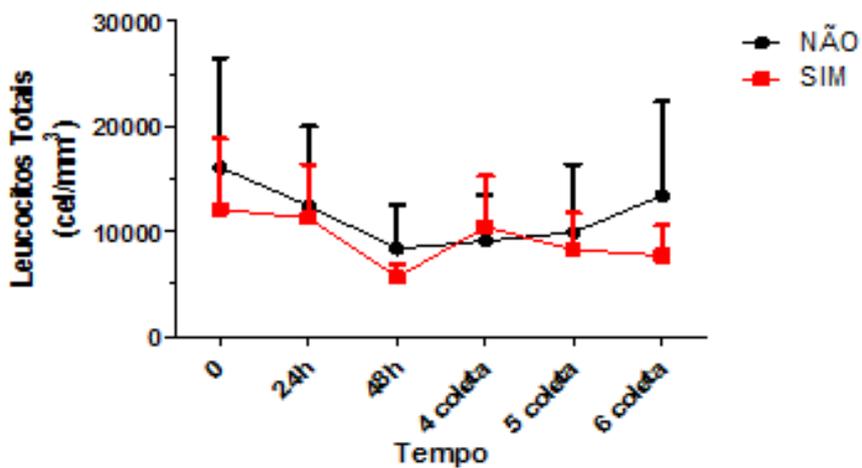
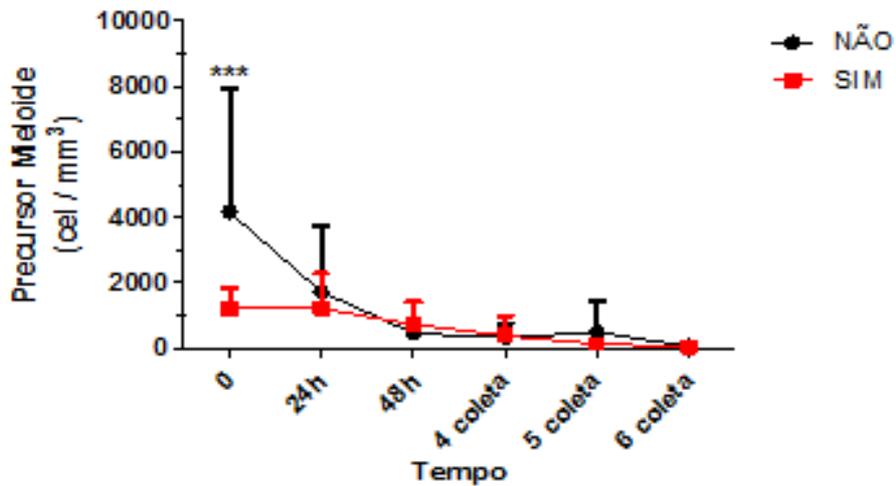


Figura 2. Relação de Precursores mielóides, nos animais induzidos e não induzidos, utilizando todos os 15 animais.



Considerações Finais

Nas condições experimentais apresentadas, a utilização da dexametasona como indutor do parto, influenciou para que houvesse diminuição da quantidade de precursores mielóides encontrados na circulação periférica dos clones recém-nascidos, demonstrando o potencial deste fármaco em contribuir positivamente com a saúde do clone neonato nas primeiras horas de vida, em função da maturação adequada das células leucocitárias.

Referências bibliográficas

A.-C. Brisville, G. Fecteau, S. Boysen, A. Desrochers, P. Dorval, S. Buczinski, R. Lefebvre, P. H_ellie, P. Blondin, L.C. Smith. *Neonatal Morbidity and Mortality of 31 Calves Derived from Somatic Cloning*. 2013 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23782425>>. Acesso em: 12 de julho de 2016.

ANTONOW, D.R; MONTEIRO, G.A; ARAÚJO, M.C.S. Glicocorticóides: uma meta-análise. Periódico, UNIFRA. Disc. Scientia. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria, v. 8, n. 1, p. 51-68, 2007. Disponível em: <<http://www.periodicos.unifra.br/index.php/disciplinarumS/article/view/918/862>>. Acesso em: 14 de novembro de 2016.

BIRGEL JUNIOR, E.H; D'ANGELINO, J.L; BENESI, F.J; BIRGEL, E.H;. *Valores de referência do leucograma de bovinos da raça Jersey criados no Estado de São Paulo*. Departamento de clínica médica da faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/bjvras/v38n3/9694.pdf>. Acesso: 19 de fevereiro de 2015.

FIGUEIREDO, J.R; FREITAS, V.J.F; GONÇALVES, P.B.D. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2ª edição. São Paulo – SP: Roca, 2008. Capítulo 18. Páginas 347 à 362.

JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO, J.; *Histologia básica*. 11ª edição. Rio de Janeiro – RJ: Guanabara Koogan, 2013. Capítulo 12. Páginas 225 à 229.

LEÃO, P.R.D; SILVA, A.C.P. Corticosteróides na aceleração da maturidade fetal: evidências atuais. FEMINA .Junho, 2008. vol 36. nº 6. Disponível em: http://www.febrasgo.org.br/site/wp-content/uploads/2013/05/femina_junho2008-385.pdf>. Acesso em: 14 de novembro de 2016.

LONGO e PEREIRA, L.C. Ciclo único de betametasona paramaturação pulmonar fetal em gestações com diástole zero ou reversa : impacto em resultados pós-natais. Tese (doutorado). Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007. Disponível em: <www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5139/tde-24012008.../LucianaCLPereira.pdf>. Acesso em: 14 de novembro de 2016.

KOMNINO, E.R. *Contribuição ao estudo da hematologia de bezerras da raça nelore, originados por meio da técnica de transferência nuclear somática (TNCS) – Clonagem*. Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, 2008. Disponível em: arquivos da empresa In vitro, em PDF. Acesso em: 24 de fevereiro de 2015.

VIEIRA,P.P.B. *Indução de parto em bovinos: princípios e aplicações*. Botucatu,2011. Disponível em:
<http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/121729/vieira_ppb_tcc_botf_mvz.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 22 de agosto de 2016.