

Aspectos neonatológicos en terneros considerados de alto riesgo, producidos por fecundación *in vitro* y clonación. Revisión bibliográfica y reporte de un caso

Mucci, N.⁽¹⁾, Kaiser; G.⁽¹⁾ y Mutto, A.⁽²⁾

Resumen

Las biotécnicas reproductivas modernas, como la producción *in vitro* de embriones por fertilización *in vitro* y clonación, se caracterizan por un bajo porcentaje de eficiencia. Esto se debe a la ocurrencia de pérdidas embrionarias dentro del laboratorio o luego de su transferencia, pero también luego del nacimiento. Por esto, resulta necesario el conocimiento y el manejo neonatológico de los individuos nacidos de técnicas *in vitro*, considerados de "alto riesgo". En la presente revisión se resumen cuestiones relacionadas a la infraestructura necesaria para llevar a cabo estos trabajos, así como los aspectos fisiológicos y patológicos más relevantes a la hora del manejo de estos animales. Asimismo, se presenta un caso en el que se conjugaron conocimientos básicos de manejo hasta prácticas veterinarias de alta complejidad durante un total de 80 días, en una ternera Jersey producida por clonación nacida bajo el Síndrome de la Cría Grande.

Palabras clave: bovino; neonatología; *in vitro*; clonación.

Neonatal aspects in high-risk calves produced by *in vitro* fertilization and cloning. Literature review and case report

Summary

Modern reproductive biotechnologies such as *in vitro* embryo production by *in vitro* fertilization and cloning, are characterized by a low efficiency rate. This occurs due to embryonic loss during early development in the lab or after transferences, but also after birth. For this reason it results of great interest the understanding and neonatal care of the individuals obtained by *in vitro* techniques, considered of "high risk." In this review, we summarize some issues related to the facilities needed to carry out these work, as well as the most relevant physiological and pathological aspects of these animals. A case that combined basic knowledge of veterinary practice management to highly complex ones for a total of 80 days in a Jersey calf produced by cloning born under the large offspring syndrome is also presented.

Key Words: bovine; neonatology; *in vitro*; clone.

(1) Laboratorio de Producción (fecundación *in vitro* y clonado) y Criopreservación de embriones, Grupo de Biotecnología de la Reproducción, EEA INTA Balcarce, Argentina.
mucci.nicolas@inta.gob.ar

(2) Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción, IIB-INTECH UNSAM-CONICET Buenos Aires, Argentina.

Recibido: 17 de diciembre de 2013.

Aceptado: 7 de marzo de 2014.

Taurus. Año 16, Nº62: 14-25

1. Introducción.
2. Cuidados prenatales de los neonatos producidos *in vitro*.
 - 2.1. Monitoreo fetal.
 - 2.2. Inducción al parto y evaluación obstétrica.
3. Asistencia al parto y control neonatal.
 - 3.1. Instalaciones y equipamiento.
 - 3.2. Procedimientos neonatológicos.
 - 3.3. Complicaciones.
4. Reporte de un caso.
5. Bibliografía.

1. Introducción

En los últimos años, la obtención de embriones por fecundación *in vitro* o por clonación ha avanzado más allá de los fines de estudio. Diversos centros alrededor del mundo son capaces en la actualidad de ofrecer sus servicios comerciales para multiplicar genética de alto valor a través de las técnicas mencionadas. Más recientemente, la transgénesis se posicionó como la biotécnica del futuro, la que apoyándose en aquellas otras, asegura la posibilidad de mejorar características propias de cada especie, o modificarlas por intercambio de genes desde otras. Sin embargo, pese al avance en los conocimientos íntimos de los mecanismos que gobiernan estos procesos, la baja eficiencia de los mismos obliga a pensar que existen aún muchos otros por descubrir.

Si bien en la mayoría de los casos se produce muerte embrionaria e interrupción de la gestación, muchas veces las preñeces avanzan, pero en condiciones alejadas de las fisiológicas. Esto da lugar entonces, a gestaciones que pueden comprometer la vida de la madre, el feto, o luego del parto condicionar la sobrevivencia del neonato por manifestación de diversas afecciones ⁽²⁰⁾.

En este sentido se ha informado, por casi ya dos décadas, que el cultivo y manipulación de embriones bovinos se encuentran asociados con el desarrollo de anomalías en fetos y terneros ^(6, 19), entre las que se pueden mencionar como más comunes el sobrepeso al nacer ⁽⁴⁵⁾, la deformación en los miembros ⁽²³⁾, problemas respiratorios ⁽³⁷⁾ y anomalías metabólicas ⁽¹¹⁾. En términos generales, muchas de estas afecciones se han agrupado bajo el término de Síndrome de la Cría Grande o LOS (*Large Offspring Syndrome*) ^(6, 19). Más recientemente, y debido a la

heterogeneidad de los fenotipos de los animales nacidos bajo este síndrome, se ha propuesto el término de Síndrome de la Cría Anormal o AOS (*Abnormal Offspring Syndrome*) ⁽²⁰⁾.

Tanto las pérdidas embrionarias que se registran en los sistemas *in vitro*, y que continúan luego de la transferencia y parto, como también las anomalías mencionadas en gestaciones de riesgo, podrían estar relacionadas a los siguientes aspectos:

- Baja o nula competencia de las gametas para desarrollar en sistemas de producción *in vitro* (PIV).
- Falta de ajuste del sistema de PIV de embriones a los requerimientos de las gametas o embriones cultivados.
- Fallas en la activación del genoma embrionario (reprogramación nuclear).
- Alteraciones en la expresión génica, asociado a mecanismos de *imprinting* genético.

En la Tabla 1 se indica la eficiencia en términos de gestación y preñez hasta la fecha estimada de parto, detallando en distintos períodos los porcentajes de pérdidas en vacas transferidas con embriones producidos por clonación por transferencia nuclear con células somáticas.

Tabla 1. Pérdidas embrionarias/fetales en varios estadios de gestación de vacas transferidas con embriones producidos por clonación por transferencia nuclear. (Adaptado de Panarace y col. ³⁷⁾.

	Embriones/fetos/terneros (%)
Embriones transferidos	3374
Preñeces a día 30	1242 (37)
Preñeces a día 60	752 (22)
Preñeces a día 90	580 (17)
Preñeces a día 180	474 (14)
Preñeces a término	358 (11)

Si bien en embriones producidos *in vitro* se verifican pérdidas similares, la magnitud de las mismas es menor ya que con tasas de gestación de 40% a día 30 postransferencia obtenidas con embriones en fresco (sin criopreservar), es posible llegar a término con un 30% de las mismas (datos propios, no publicados). Esto pone claramente de manifiesto, que los embriones producidos por clonación son más problemáticos y que seguramente los eventos de reprogramación nuclear condicionan su sobrevivencia y desarrollo posterior ⁽³⁸⁾. En un estudio retrospectivo, que abarcó cinco años, se informó que, del total de terneros clones nacidos sólo un 58%

son capaces de alcanzar la edad de 150 días aún con asistencia neonatológica ⁽³⁷⁾. Esto pone de manifiesto, la importancia del conocimiento y manejo especializado de estos animales durante la última fase de gestación y el peri-parto.

2. Cuidados prenatales de los neonatos producidos *in vitro*

En términos generales, puede decirse que los embriones producidos *in vitro*, y fundamentalmente por clonación, luego de su transferencia a hembras receptoras producen gestaciones, partos y terneros considerados de alto riesgo ⁽²¹⁾. Por este motivo, al momento de plantearse el manejo neonatológico de este tipo de animales, es necesario tener en cuenta varios aspectos fundamentales desde el punto de vista teórico y práctico, tales como infraestructura y equipamiento necesario, conocimiento de la fisiología neonatológica (fundamentalmente medio interno) y bases terapéuticas de los principales desvíos de la misma.

Se consideran de particular importancia todas aquellas instalaciones edilicias y equipos que sean necesarios para la asistencia de los animales previo a su nacimiento, así como durante el parto propiamente dicho y en los cuidados posteriores al mismo.

2.1. Monitoreo fetal

Previo al parto se debe considerar el monitoreo de la gestación hasta el momento del nacimiento, y el manejo de éste, fundamentalmente por inducción farmacológica.

El monitoreo fetal consiste fundamentalmente en un examen obstétrico y en seguimientos ecográficos mensuales para observar el tamaño y la viabilidad fetales, y el comportamiento placentario (desarrollo de edema o hidroalantosis) particularmente común en este tipo de gestaciones ^(2, 29, 34). Asimismo, deberá preverse el manejo nutricional de las hembras gestantes y el plan sanitario indicado para asegurar una buena provisión de calostro en caso de ser requerido. Para todas estas prácticas serán necesarias entonces, instalaciones adecuadas como mangas, corrales, casillas de operación, etc., provistas de techo e iluminación para protegerse de las inclemencias climáticas y asegurar el trabajo durante la noche. El monitoreo de las gestaciones es necesario no sólo para descartar las hembras que hayan perdido sus fetos sino para identificar aquellas consideradas de riesgo, cuyos

fetos padezcan el síndrome de sufrimiento fetal y sobre las cuales deberá prestarse la mayor atención a la hora de la inducción del parto y posterior seguimiento de sus fetos ⁽¹⁹⁾. Son estos últimos especialmente, sobre los cuales deberemos apuntar todos nuestros conocimientos para asegurar su sobrevivencia. Durante este período, será necesario contar con un equipo de ultrasonografía con transductor lineal para la evaluación de placenta y convexo para la evaluación del feto (actividad cardíaca, posición de grandes vasos, tamaño, etc.).

2.2. Inducción al parto y evaluación obstétrica

La inducción del parto se efectuará de acuerdo a la fecha estimada de parto (FEP), teniendo en cuenta la edad del embrión transferido y el promedio de días de gestación de la raza del embrión y de la receptora. En general se considera como fecha apropiada para la inducción, unos 10 días antes de la FEP ⁽¹²⁾. Existen distintos protocolos para la inducción del parto en bovinos, muchos de ellos basados en la administración de corticoides y prostaglandinas (30 mg IM dexametasona + 25 mg IM prostaglandina). El fundamento fisiológico de estos tratamientos es simular la última fase de gestación generando manifestación de actividad de parto a partir de las 24-36 hs.

Una vez llevado a cabo el tratamiento de inducción, se considera importante efectuar una evaluación obstétrica cada cinco horas para determinar la situación de la hembra y fundamentalmente del feto. Se deberá evaluar presencia de edema vulvar, grado de dilatación cervical, así como viabilidad, posición y tamaño fetales (este último deber estar definido previamente durante el transcurso del monitoreo de gestación). En este momento se deberá contar con todo el instrumental, drogas y material descartable necesarios para asistir al parto.

3. Asistencia al parto y control neonatal

Para asistir el parto y fundamentalmente para el posterior seguimiento y asistencia del neonato, será necesario contar con una sala de neonatología lo más cercana posible a las instalaciones previamente descritas como necesarias para el manejo de las receptoras. La comunicación y el acceso entre ambas secciones, manga (fundamentalmente casilla de operaciones) y sala de neonatología deberán ser lo más directos posible, con techo e iluminación adecuada para asegurar trabajos nocturnos.

3.1. Instalaciones y equipamiento

La sala de neonatología debe contar con varias dependencias que aseguren tanto la asistencia de los animales como la permanencia del personal a cargo de guardia. Por ello, a menudo éstas constan de dos grandes áreas bien definidas: área de personal y área de cuidados. La primera consiste básicamente en habitación dormitorio, cocina y baño, mientras que la segunda, también dividida pero en dos ambientes, consta de un área de asistencia primaria y otra de internación. En la zona de asistencia primaria se recibe el animal para su evaluación neonatológica y se efectúan diversas maniobras de intervención directa. Debe constar además, de puertas de acceso bien amplias, camilla, mesadas, agua, y vitrinas para el almacenamiento de drogas, material descartable y demás elementos imprescindibles para la asistencia inicial. A su vez, debe haber una comunicación directa con la zona de internación, preferentemente separadas por puertas de acceso de doble hoja, de tipo vaivén. En la zona de internación se efectuarán los cuidados intensivos por lo que deberá contar con líneas de sostén para soluciones parenterales, colchones impermeables, luz infrarroja como fuente de calor, líneas de oxígeno y estanterías, como elementos principales. A su vez, esta zona deberá organizarse en boxes para la individualización de los distintos pacientes. Será necesario contar con una ficha de seguimiento de cada animal, desde el momento de inducción del parto de las receptoras, en la que se registrarán todas las maniobras y tratamientos efectuados hasta el día del alta.

Son equipos indispensables dentro de la sala de neonatología, heladera, freezer, baño de María, termómetros, tensiómetro, oxímetro de pulso, pHímetro, balanza para animales, balanza de mesada y ecógrafo portátil con transductor multifrecuencia microconvexo. Cabe destacar, que en muchos centros avanzados ya se cuenta con monitores multiparamétricos y dosificadores parenterales automáticos.

3.2. Procedimientos neonatológicos

De acuerdo a las evaluaciones obstétricas, se dispondrá de información referida al tamaño del ternero a asistir. Esto permitirá determinar cuál será la asistencia al parto de elección ya que si el animal presenta tamaño y viabilidad normales, es posible esperar hasta que el mismo se inicie natu-

ralmente para asistirlo con las adecuadas maniobras obstétricas. En caso de sobrecrecimiento, y como máximo a las 36 horas posteriores a la inducción, se efectuará la operación cesárea independientemente del desencadenamiento de los mecanismos de parto ⁽⁶⁾.

En una eutocia, un ternero de tamaño y peso normales deberá ser acomodado junto a su madre para facilitar su reconocimiento y cuidados. Mientras tanto, deberán ser controlados ambos a distancia para evaluar comportamiento de estación, succión, etc. En caso de no manifestarse comportamientos normales en tiempo y forma, deberá trasladarse el animal a la sala de neonatología para evaluar su estatus fisiológico e instaurar las terapias correspondientes en caso de ser necesarias.

Una vez en la sala, los terneros se colocan en una camilla para efectuar los primeros controles (temperatura, frecuencia y patrón respiratorio, frecuencia cardíaca, pulso, saturación de oxígeno, tono muscular, respuesta a estímulos, entre otros), algunos de los cuales, serán tomados en cuenta para determinar el índice Apgar y cuantificar su estatus fisiológico. Por este motivo, el estado fisiológico a través del análisis de sangre completo es determinante después de la recepción en la sala de neonatología. Hay que llevar a cabo este procedimiento siguiendo un protocolo de acción estandarizado, con planteo de guardia permanente ya que en la mayoría de los casos de LOS/AOS los animales nacen con parámetros fisiológicos normales pero comienzan a alterarse a partir de las primeras cuatro horas de vida.

En el caso de terneros con registros de sobrecrecimiento y nacidos por cesárea, debe prestarse atención a la presencia de meconio en el líquido amniótico al momento de la extracción, ya que el mismo es considerado un indicador de sufrimiento fetal (fundamentalmente por hipoxia) y posible desencadenante de cuadros patológicos futuros que comprometerán su adaptación a la vida extra uterina ⁽⁵⁾. Entre estos, se pueden mencionar la encefalopatía neonatal por hipoxia ⁽²⁴⁾ sepsis, problemas en la absorción de calostro, alteraciones respiratorias por inactivación del surfactante o neumonía química ⁽¹⁾, y problemas de cicatrización de los vasos umbilicales ⁽⁴⁴⁾. Estos animales deben ser trasladados de inmediato a la sala de neonatología y una vez evaluados como fue descripto, recibirán una terapia antimicrobiana de amplio espec-

tro y si fuera posible, plasma por vía endovenosa para asegurar una rápida disponibilidad de anticuerpos en sangre.

Paralelamente a estas evaluaciones, se deberán instaurar maniobras tendientes a la higiene de las vías aéreas superiores, mediante aspiración intermitente con bomba de vacío y sonda, secado del animal y atención del cordón umbilical⁽³⁵⁾. Este último punto es importante ya que en la mayoría de los casos en que el animal se presenta con sobrecrecimiento, el cordón umbilical está aumentado de tamaño (6-8 cm de diámetro) por lo que requiere una ligadura en masa o su clampeo durante la asistencia del parto, y posteriormente la ligadura individual de cada vaso sanguíneo y la aplicación de apósitos para prevenir la infección sistémica por esta vía⁽⁴⁾. Antes de decidir el destino del neonato, se obtendrá una muestra de sangre para hemocultivo y se tomarán muestras con y sin anticoagulante para análisis sanguíneo completo y sangre arterial con anticoagulante para estudio de gases arteriales. Esto último constituye una práctica poco instaurada en medicina veterinaria, pero resulta fundamental a la hora de definir el futuro tratamiento de los animales considerados de riesgo. Como ya se describió, es frecuente el nacimiento de terneros con sobrecrecimiento teñidos de meconio, que en general desarrollan algún tipo de afección respiratoria. Esto es debido al sufrimiento fetal, estos animales aspiran líquido amniótico con meconio durante la vida intrauterina, lo que permite que ese fluido actúe como caldo de cultivo para futuras y potenciales infecciones bacterianas. A su vez, esto dificulta la expansión pulmonar y por tanto la oxigenación en las primeras fases de desconexión madre-feto. Por esta razón, se instaura la terapia de administración de oxígeno humidificado a una tasa de 10 l/minuto hasta que los resultados de oximetría de pulso y del análisis de gases indiquen buenos niveles de oxígeno en sangre arterial. En otros casos, estos animales desarrollan un síndrome bien descrito en neonatología humana, llamado hipertensión pulmonar persistente⁽²⁶⁾. En este cuadro persiste luego del parto, un estado de hipertensión de la vasculatura pulmonar que asegura junto con el ductus arterioso y el foramen oval, un desvío de sangre hacia el circuito mayor⁽²⁵⁾. Al momento de la desconexión madre-feto, los niveles de oxígeno en sangre caen abruptamente y ello desencadena las

primeras señales en rampa en el centro respiratorio, responsables de los primeros movimientos respiratorios. Esto produce el cierre de ambas vías de comunicación por aumento de mediadores lipídicos (prostaglandina E₂) y por tanto, la normalización de los niveles de saturación de hemoglobina y oxígeno en sangre (Tabla 2). Si el animal desarrollara hipertensión pulmonar persistente, diagnosticada por una baja saturación de oxígeno durante la administración de este gas como se indicó previamente, deberá instaurarse rápidamente una terapia con sildenafil oral o iv⁽³⁰⁾ u óxido nítrico⁽¹⁷⁾ por vía inhalatoria con el propósito de relajar la vasculatura alveolar y permitir la hematosis.

Tabla 2. Valores del equilibrio ácido-básico (sangre arterial) en bovinos neonatos normales luego de una hora del nacimiento. Adaptado de Smith⁽³⁸⁾.

Análisis	Valor registrado
pH	7,25-7,35
PCO ₂ mmHg	45,1-55,6
Saturación de O ₂	70% nacimiento
	90% 24 hs de vida
PO ₂ mmHg	48,8-70
HCO ₃ mEq/L	20,7-26,3
Exceso de base mMol/L	+6,5

En todos los casos, deberá efectuarse un seguimiento *in situ* de la glucemia mediante el uso de Glucometers® para efectuar correcciones lo antes posible. Posteriormente, si el animal presenta un índice Apgar (Tabla 3) igual o superior a 7, y la saturación de oxígeno presenta valores por encima de 80%, podrá ser transferido al corral con la madre para asegurar el reconocimiento lo antes posible. Esto no sólo evita costos de crianza artificial, sino que asegura una adecuada alimentación por parte de la vaca. En caso de que el neonato no se incorporara dentro de las primeras dos a tres horas deberá llevarse nuevamente a la sala de neonatología para evaluar la glucemia, ya que luego de transcurrido ese tiempo, y de no haberse incorporado ni ingerido calostro, los niveles de glucosa podrían estar bajos y exacerbar la ausencia de deseo de succión y/ o su capacidad de incorporación. Si bien está descrito que luego del nacimiento la glucemia puede caer por debajo de los índices normales, más aún en clones⁽⁴⁾, la ingestión de calostro asegura rápidamente la restauración de los mismos. Asimismo, en cualquier caso es imprescindible garantizar una buena absorción de calostro dentro de las primeras horas de nacido, para

permitir la absorción de inmunoglobulinas. Para esto deberá contarse con un banco de calostro congelado, de sanidad probada, el cual será descongelado en baño de María a 37°C y administrado de forma tal de alcanzar el 10% del peso vivo del animal durante las 24 primeras horas de vida. Con esta cantidad de calostro, se estima que se logra la absorción de al menos 100 g de inmunoglobulinas antes que el epitelio intestinal se torne impermeable a las macromoléculas ⁽²⁸⁾. Debido a que existen terneros que no aceptan el calostro descongelado, en algunos casos deberá preverse la necesidad de recurrir al ordeño de la receptora que gestó al ternero para asegurar la ingesta de calostro.

Tabla 3. Valoración de status fisiológico de acuerdo a índice Apgar.

Parámetro	0	1	2
Frec. Cardíaca	Ausente	<100 irregular	>100 regular
Frec. Respiratoria	Ausente	irregular	regular
Tono muscular	Cojera lateral	Semi flexión	Esternal activo
Reflejo nasal y auricular	No responde	Mueca/Débil movimiento de pabellón	Estornudo o tos/movimiento de pabellón o sacudida de cabeza

NOTA: 7-10 es considerado normal // 4-7 pueden requerir maniobras básicas de reanimación o resucitación // 3 o menos requiere inmediata asistencia médica.

En las Tablas 4 y 5 se muestran algunos valores sanguíneos y clínicos que deben ser tomados en cuenta durante la evaluación de neonatos bovinos de alto riesgo.

3.3. Complicaciones

En muchos casos hemos visto que entre 24 y 30 horas después del nacimiento los signos clínicos del ternero son compatibles con un cuadro de sepsis, aunque los resultados de laboratorio (hemogramas, hemocultivos) no siempre son coincidentes con el diagnóstico presuntivo. El aumento del recuento de leucocitos totales, junto con las variaciones en la fórmula leucocitaria, son considerados clásicamente como indicadores de sepsis. Sin embargo, y teniendo en cuenta que los bovinos presentan una fórmula leucocitaria normal con predominio de linfocitos, hemos podido observar al igual que otros autores ⁽⁵⁾, que algunos animales presentan recuentos normales de leucocitos, aunque el porcentaje de neutrófilos y linfocitos se

Tabla 4. Valores sanguíneos normales en bovinos neonatos normales y clones. Adaptado de Brisville y col. ⁽⁵⁾.

Análisis	Terneros normales	Terneros clones
Eritrocitos (x10 ⁶ /μL)	5-10	5,8-6
Hemoglobina (g/dL)	8-15	6,1-8,7
Hematocrito (%)	24-46	20,3-32,3
Glóbulos blancos (x 10 ³ /μL)	4-12	7,8-16,6
Neutrófilos (x 10 ³ /μL)	0,6-4	5,6-14,2
Linfocitos (x 10 ³ /μL)	2,5-7,5	0,7-1,8
Monocitos (x 10 ³ /μL)	0-0,8	0-0,7
Platelets (x 10 ³ /μL)	100-800	374-722
Fibrinógeno (mg/dL)	0-500	100-260
Glucosa (mg/dL)	47-88	25,2-75,6
Urea (mg/dL)	4,5-18,2	9-11,8
Creatinina (mg/dL)	0,6-1,4	1,6-2,5
Bilirrubina total (mg/dL)	0,4-0,7	0-0,8
Aspartato aminotransferasa (IU/L)	11-21	30-104
Gamma glutamil transpeptidasa (IU/L)	6-10	9-39
Creatina quinasa (IU/L)	0-302	0-300
Proteínas totales séricas (g/dL)	4-4,8	5,9-8
Albúmina (g/dL)	2-2,4	2,7-4
Globulinas (g/dL)	1,6-2	2,6-4,5
Sodio (meq/L)	140-146	134-147
Cloro (meq/L)	95,6-102,8	96-109
Potasio (meq/L)	4,2-5,2	3,8-5,3
Calcio total (mg/dL)	12-13,6	8,8-10,8
Fósforo (mg/dL)	6,2-7,4	3,4-8,7
Anion gap (meq/L)	21-29	7-18

Tabla 5. Parámetros fisiológicos considerados normales en terneros.

Parámetro				
Frecuencia cardíaca	Frecuencia respiratoria	Presión sanguínea (mmHg)	Glucemia (mg/dl)	Temperatura (°C)
60 - 70 nacimiento	Superior a 40	Sistólica 100 - 125	80 - 120	Hasta 39
90 - 110 al normalizar la F. Respiratoria		Diastólica 50 - 60		

encuentra invertido. Los neutrófilos representan los mediadores principales de la defensa celular innata del neonato y se ha observado en los neonatos humanos, que los mismos se activan y aumentan en número con el inicio de la sepsis ⁽⁴³⁾. Como consecuencia de este cuadro, se produce un agotamiento de las reservas de polimorfonucleares (PMN) en la médula ósea lo que provoca la liberación de formas inmaduras hacia la circulación (descrito como un desplazamiento a la izquierda). La proporción de estas formas puede utilizarse para estimar la probabilidad de sepsis ^(14, 15). La fuente más probable de bacterias patógenas en la sepsis neonatal es el medio ambiente contaminado ⁽²²⁾. Sin embargo, tanto en medicina humana como en veterinaria, se ha propuesto que la infección tam-

bién puede ser adquirida en el útero o durante el parto^(13, 22). Muchos informes han demostrado que los animales clonados presentan alteraciones placentarias, incluyendo presencia células inflamatorias, anomalías en la microvascularización, membranas corioalantoideas edematosas y disminución de espesor del epitelio, entre otras, que pueden estar asociados pérdidas embrionarias tempranas, abortos, y hasta el compromiso del neonato^(2, 18, 29, 34). En este sentido, en algunos clones hemos podido identificar por hemocultivo la presencia de *Clostridium* spp o *Peptostreptococcus* anaeróbicos. Estas bacterias son predominantemente ruminales en bovinos adultos, por lo que es posible pensar que la patogenia en algunos casos de sepsis podría relacionarse a una infección adquirida *in utero*, generando al mismo tiempo alteraciones en el recuento de glóbulos blancos inmediatamente después del nacimiento. Esto último podría verse agravado por la escasa ingestión de calostro que se da en muchos clones y destaca la importancia de la disponibilidad de un banco de calostro o de plasma congelado para ser inmediatamente administrado.

La acidosis es un hallazgo frecuente en pacientes en estado crítico durante una sepsis grave / shock séptico, y un potente predictor de mortalidad⁽⁷⁾. Por otra parte, el exceso negativo de base, por debajo -3 meq / L aún con valores de pH arterial normal, se considera un indicador de la acidosis asociada con la sepsis⁽¹⁰⁾. Por este motivo, los resultados del equilibrio ácido-básico y la determinación del exceso de base resultan muy útiles para el diagnóstico de sepsis, en ausencia de cualquier otro marcador, incluido el hemocultivo. Una vez obtenidos estos resultados hay que proceder a corregir el pH arterial para mejorar los parámetros clínicos del animal y mejorar la respuesta a la terapia antimicrobiana.

Los tamaños relativos de los pre-estómagos varían en gran medida durante el desarrollo prenatal a partir del día 56^o de gestación. Inicialmente, tienen el mismo tamaño pero a medida que progresa el desarrollo fetal se produce un notable aumento de tamaño del abomaso que llega a ser más grande que el rumen al momento del nacimiento⁽³³⁾. En la práctica veterinaria cuando los terneros, tanto normales como clonados, nacen débiles o presentan ausencia de reflejo de succión, se indica la alimentación por sonda, principalmente durante las primeras horas de vida, que es cuando debe garantizarse la absorción ade-

cuada de calostro^(5, 21). En lactantes normales, la comunicación entre el esófago y el estómago verdadero (abomaso) se encuentra favorecida por el cierre de la gotera esofágica y el pequeño tamaño de los preestómagos cuya capacidad de almacenamiento durante las primeras semanas de vida es prácticamente virtual. Una vez en el estómago, la leche (o el sustituto lácteo) se coagula y la digestión continúa como en los animales monogástricos. De acuerdo a nuestras observaciones en necropsias de clones bovinos nacidos con sobrecrecimiento, los preestómagos, y particularmente el rumen, se encuentran dilatados con un contenido de hasta con 5 litros de líquido amniótico, en general teñido con meconio y con un pH por debajo de 5,5 (datos no publicados). Esto representa un riesgo potencial a la hora de indicar nutrición enteral con sonda en estos animales ya que la probabilidad de incorporar leche o calostro en el rumen es muy alto, pudiendo generarse así, una acidosis ruminal. Por esta razón, cuando la alimentación por sonda presente algún riesgo y el ternero desarrolle algún tipo de intolerancia a la leche, o acidosis ruminal, deberá considerarse la necesidad de implementar una nutrición parenteral, parcial o total, hasta que el neonato aprenda a ingerir sólidos.

El plasma representa un fluido obtenido por centrifugación y sedimentación de componentes celulares de la sangre. Contiene factores de crecimiento, nutrientes e inmunoglobulinas, entre otros elementos. Por esta razón representa un tratamiento interesante para estos animales ya que no sólo permite la administración de nutrientes, sino también una cantidad importante de inmunoglobulinas, fundamentales en ese momento particular. Por considerarse un expansor del volumen sanguíneo debe administrarse bajo monitoreo de la función cardiovascular, en dosis de 20 ml/kg/día por vía iv, teniendo en cuenta que en algunos casos pueden producirse picos de temperatura⁽⁴²⁾. Los requerimientos hídricos para alcanzar un total de 80-100 ml/Kg/día deben cubrirse mediante administración oral, o en su defecto por vía parenteral a una tasa de 30-50 ml/Kg/hora, teniendo en cuenta las pérdidas adicionales por hipertermia (10 ml/Kg/°C) o por deshidratación (ml = % deshidratación x Kg)⁽⁸⁾.

Existen varios informes sobre el uso de nutrición parenteral en potrillos, pero pocos en terneros^(3, 27, 36, 41). En estos últimos se proponen distintos modos de cubrir sus requerimientos nutricionales,

mediante la mezcla de varias fuentes de hidratos de carbono, lípidos, aminoácidos, micronutrientes y vitaminas, especialmente cuando la nutrición parenteral total (NPT) debe ser utilizada durante más de 2 semanas. En la actualidad existen fórmulas comerciales disponibles en medicina humana que suministran por vía iv, lípidos, glúcidos y proteínas de acuerdo a los requerimientos de un adulto de peso promedio. En neonatología veterinaria y específicamente en rumiantes, es necesario ajustar el goteo de modo tal de asegurar un aporte de 1 g/Kg/día de lípidos, 10 g/Kg/día de glucosa y 2 g/Kg/día de aminoácidos. Debido a que en general con las formulaciones originales, respetando los goteos recomendados se supera el aporte de lípidos, la administración debe reducirse de acuerdo a lo indicado previamente y tanto la glucosa como los aminoácidos, se administran adicionalmente hasta alcanzar la dosis requerida. Si la nutrición parenteral debiera prolongarse más de una semana, se indicará una suplementación por vía iv de complejos vitamínicos completos. En todo momento el neonato debe estar cubierto contra infecciones mediante la instauración de una terapia antimicrobiana preventiva empírica racional y un monitoreo completo y diario de los parámetros clínicos y sanguíneos. Está indicado entonces, el cambio de tubuladuras y vías de administración cada dos días. Aunque la nutrición enteral por administración de leche (10% del peso vivo en tres tomas diarias para alcanzar un aumento diario de peso de 550 g) representa la mejor forma de cubrir las necesidades del recién nacido, bajo una serie de condiciones la nutrición parenteral parcial (NPP) y la NPT constituyen la segunda y la tercera opciones para lograrlo, respectivamente.

Algunos animales que desarrollan acidosis, comienzan a ingerir paja de la cama del box o alimento seco, en caso de disponer de él. Esto produce en la mayoría de los casos, impactación ruminal por incapacidad para degradar este alimento con alto contenido en celulosa, debido a la falta de la flora celulolítica y actividad motora ruminal ⁽¹⁶⁾. En estos casos particulares se indica la transferencia de flora ruminal por sonda, a partir de un animal con fístula ruminal, alimentado con heno de alto contenido de celulosa. Este tratamiento no sólo se indica para favorecer la degradación de la fibra, sino también para acelerar la diferenciación y la maduración de las funciones de absorción y metabolismo del rumen ^(31, 39, 40).

Otra de las alteraciones habitualmente descriptas en terneros producidos *in vitro* (tanto por FIV como por clonación), es la deformación de los miembros, siendo el acortamiento de los flexores la más frecuentemente descripta. En esos casos, será necesario implementar una terapia con bajas dosis de oxitetraciclina (relaja el tejido conectivo de los tendones) y combinarla con fisioterapia manual para elongar los miembros alterados. En la tabla 6 se presentan los cuadros patológicos tanto de *frecuente* como de *muy frecuente* presentaciones en neonatos bovinos obtenidos por transferencia de embriones producidos por FIV y por clonación.

Tabla 6. Cuadros patológicos comúnmente reportadas en bovinos neonatos obtenidos por transferencia de embriones producidos por fecundación *in vitro* y clonación.

De frecuente presentación	De muy frecuente presentación
Distensión abdominal	Bacteriemia
Alopecia	Hipoglucemia neonatal
Anuria	Anemia
Atelectasia/neumonía	Deformaciones en los miembros
Neumonía por aspiración	Fiebre
Bradycardia neonatal	Agrandamiento umbilical
Hiperlactacidemia neonatal	Aspiración de meconio
Fungemia	Encefalopatía neonatal
Leucocitosis neonatal	Reversión a circulación fetal
Poliuria neonatal	Uraco persistente
Taquicardia neonatal	Deformación de miembros
Cardiomegalia	Sepsis
Hipercapnia de origen central	Circulación fetal persistente
Condrodisplasia	Taquicardia
Cólicos	Taquipnea
Contracturas cervicales o de miembros	Baja saturación de oxígeno
Diarrea	Acidosis láctica
Endocardiosis	Falta de reflejo de succión
Hematoquezia	Sobrecimiento fetal (100%)
Hiperglucemia	Anormalidades placentarias
Hipocloremia	Sufrimiento fetal
Hipotermia	Gestaciones prolongadas
Quistes hepáticos	Distress respiratorio con hipertensión pulmonar
Linfadenopatía	
Atrofia muscular	
Gastroenteropatía neonatal	
Nefropatía neonatal	
Apnea periódica	
Nefropatía pigmentaria	
Porencefalia	
Fibrosis portal	
Rinitis	
Shock	
SIRS	
Hipoplasia traqueal	
Displasia tricuspídea	
Sangrado umbilical	
Valgus	
Ventricular septal defect	
Crecimiento asincrónico de los órganos	
Insuficiencia cardíaca izquierda	

Las pérdidas que generan una baja eficiencia de este sistema de producción de embriones tienen lugar en distintas etapas, durante los procedimientos dentro del laboratorio, la transferencia, la preñez, el parto y el período neonatal. Teniendo en cuenta que en muchos de los pasos mencionados, aunque se diagnostique el o los problemas durante el período intrauterino, no existen medidas terapéuticas para revertir el proceso (fallas en la reprogramación nuclear durante el cultivo embrionario, falla de reconocimiento materno, fallas en la organogénesis, hidroamnios, hidroalantoides, entre otras), una vez que el animal ha nacido, sí es posible efectuar maniobras para aumentar sus posibilidades de sobrevivir y de esta forma, la eficiencia global del sistema. Según algunos autores⁽²¹⁾ un monitoreo rápido de los terneros inmediatamente después del nacimiento que permita el diagnóstico precoz y un tratamiento agresivo de un cuadro patológico, genera mejores pronósticos en comparación con el enfoque clásico basado en la observación y la espera. Por esta razón, la atención neonatológica de los terneros de alto riesgo debería ser considerada como una de las prioridades durante el desarrollo de un programa de producción *in vitro* de embriones, particularmente en clonación y transgénesis.

Hasta aquí se hizo una descripción muy resumida de algunos de los aspectos más importantes relacionados con la asistencia de terneros de alto riesgo. A continuación se describe un caso en que se detalla cómo se efectuó el manejo neonatológico completo de una ternera de raza Jersey, producida por clonación, durante varias semanas desde el nacimiento hasta que fue dada de alta.

4. Reporte de un caso

El parto fue inducido 5 días antes de la fecha estimada mediante la administración de 30 mg Im de dexametasona y 25 mg Im de prostaglandina F₂α (PG). Treinta y seis horas posteriores a la inducción se efectuaron maniobras obstétricas para determinar posición y viabilidad fetal, debido a la ausencia de marcadores de reflejos de parto. Se efectuó entonces, una cesárea con el animal en pie, abordando al útero por el flanco izquierdo. Inmediatamente luego del parto, la ternera recibió por vía iv 25 mg de doxapram (Viviram Holliday), 800 mg de dihidroestreptomina, 400000 UI de bencilpenicilina procaínica y 400000 UI de bencilpenicilina benzatínica (Dipenisol, Bayer), a modo

de terapia antimicrobiana preventiva.

Debido a que su piel se encontraba teñida con meconio, la ternera fue trasladada a la sala de neonatológica con el propósito de valorar su estatus fisiológico y recibir sus primeras atenciones. Se pesó (45 Kg) y se confirmó el diagnóstico presuntivo de LOS/AOS con el animal en decúbito esternal. Se procedió a la higiene de las vías aéreas superiores mediante aspiración intermitente con bomba de vacío y se determinó temperatura (38,7 °C), frecuencia cardíaca⁽¹⁴²⁾ y frecuencia respiratoria⁽⁴⁰⁾. Debido a que todos estos parámetros se encontraban dentro de rangos considerados normales, se colocó la ternera con la vaca que la había gestado. Luego de tres horas sin intentos de incorporación, se decidió ingresar la ternera nuevamente a la sala para efectuar nuevas evaluaciones y administrar calor. Con una glucemia de 26 mg/dl y sin reflejo de succión, seis horas posteriores al parto, se decidió efectuar un cateterismo venoso central (Arrow 24 Ga x 20 cm) para administrar dextrosa al 10% (45 Gotas/Minuto) hasta restablecer los niveles normales. Se tomó una muestra de sangre venosa para hemograma, hepatograma, análisis de proteínas, glucemia, uremia y creatinemia, y sangre arterial para pH en sangre y equilibrio ácido-básico (muestra obtenida por punción de arteria radial con jeringa heparinizada). Los resultados de estos estudios arrojaron valores normales. Se tomó una muestra de 10 mL de sangre venosa para hemocultivo (Britania, Argentina) y se administró oxígeno mediante una sonda intranasal (10 L/minuto). El cordón umbilical (8 cm de diámetro) fue higienizado cada 8 horas con agua oxigenada 10 vol, alcohol yodado 10 % y aplicación de talco cicatrizante.

Luego de ocho horas de ayuno, sin ingestión de calostro, se administró por vía iv 1 L de plasma bovino (descongelado, 42 g/min). Se determinó que el animal no quería ingerir calostro congelado-descongelado por lo que debió efectuarse ordeños de la vaca que la había gestado para retirar su calostro. Luego de esto se prosiguió con la administración dividida en tres tomas, de 4,5 litros diarios de leche enriquecida con crema al 10%

Veinte horas posteriores al parto se tomó una nueva muestra de sangre y se repitió su análisis completo. Los resultados de estos estudios arrojaron valores normales nuevamente. Se suspendió la administración de oxígeno. La orina se analizó mediante tiras reactivas dos veces al día, arrojando

do en todos los casos valores normales.

Treinta horas posteriores al parto la temperatura de la ternera alcanzó 40,9 °C, registrándose además una frecuencia cardíaca de 184 latidos/min y respiratoria de 96 resp/min. Se efectuó una nueva toma de muestra de sangre para hemograma y un nuevo hemocultivo. Hasta esperar los resultados de estos análisis, se reforzó la terapia antimicrobiana con 250 mg de enrofloxacin IM (Baytril, Bayer) y 500 mg de gentamicina im (Equi Systems SRL)/24hs. Se administraron 1,5 g de dipirona (Sanofi Aventis) iv/8 horas sin lograr controlar la hipertermia.

Durante los cuatro días siguientes, debido a que los análisis de sangre no mostraban marcadores de sepsis, y a que en clones se encuentran descritos síndromes febriles de origen central y paradójico, como dos entidades separadas, y edema cerebral, se intentó abordar esta problemática sin modificar el esquema antimicrobiano. Se administró 1 mg de Xilacina im (Alfasan) con el propósito de deprimir el bulbo raquídeo y de este modo disminuir la temperatura. Con el propósito de revertir un edema cerebral se administraron 50 mg de furosemida (Klonal®) iv, efectuando al mismo tiempo el seguimiento ultrasonográfico de la función renal, a través de la vejiga llena. Se administraron 50 mg de flunixin meglumina (Lab. PharmaVet) iv, con el propósito de buscar un efecto antitérmico central ya que la dipirona no produjo ninguna modificación en el cuadro descripto. Las observaciones ecocardiográficas y los registros de presión se encontraron siempre dentro de rangos normales. Concomitantemente con los registros térmicos más altos, la ternera desarrolló crisis convulsivas que fueron controladas con 5 mg de diazepam (Larjan®) y 50 mg de fenobarbital iv (Cevallos). En todos los casos en que al final del día la ingestión de leche no cubría los requerimientos mínimos de hidratación (80-100 mL/Kg/día + 20 mL/Kg/día por hipertermia), éstos se completaban con la administración de solución fisiológica por vía iv.

Durante ese tiempo, se le enseñó a la ternera, a tomar leche de la vaca, ayudándola siempre, y se intentó disminuir la temperatura con toallas frías, enemas de agua fría, baños de alcohol y baños de agua a temperatura ambiente. Ninguna de las medidas terapéuticas instauradas fue exitosa en el control de la hipertermia.

Debido al fracaso para modificar los desvíos de

los parámetros fisiológicos, se decidió suspender todo tipo de medicación a la espera de marcadores de causalidad. Veinticuatro horas más tarde, se tomaron nuevas muestras para hemograma a partir de sangre venosa y arterial para la determinación de gases y del equilibrio ácido-básico. Además, y ante los resultados negativos de los hemocultivos anteriores, se solicitó al laboratorio un cultivo para anaerobios. Los resultados de laboratorio indicaron leucocitosis (13300) y acidosis metabólica severa (pH 7,08) con valores bajos de bicarbonato (11,2 meq/L) y exceso de base de -18,6 meq/L. Esto permitió deducir que podría tratarse de un cuadro de sepsis provocado por algún tipo de microorganismo, no del todo controlado con el tratamiento antimicrobiano propuesto desde el inicio. Rápidamente se comenzó a administrar bicarbonato de sodio iv (Lab. Rivero) (solución hipertónica 8,4 g/100 mL; 60 gotas/min) hasta corregir el pH sanguíneo. Se cambió el tratamiento antimicrobiano administrando 1500 mg de metronidazol (Lab. Fada Pharma) iv/día en goteo continuo, 1050 mg/24 hs de florfenicol (Lab. Shield), y 1000 mg/12 hs de amikacina (Lab. Richet). Se administraron además, 12,5 mg totales de flunixin meglumina (Lab. PharmaVet) (dosis antiendotóxica).

Veinte horas después del comienzo del último tratamiento, los resultados de laboratorio indicaron una disminución en el recuento de glóbulos blancos (9600), un pH de sangre arterial de 7,24, y un exceso de base de -9,7 meq/L. El animal fue retirado del box y se prosiguió con la misma terapia, reemplazando el metronidazol (Flagyl®), iv por 750 mg por vía oral cada 12 hs. Las frecuencias respiratoria y cardíaca, y la temperatura disminuyeron. Este tratamiento se prolongó durante 10 días hasta que se revirtieron los signos clínicos y los marcadores de sepsis.

La ternera se llevó definitivamente con la vaca una vez que aprendió a mamar. Sin embargo, poco tiempo después, desarrolló una sobrecarga alimentaria con profusa diarrea de tipo mucoso. Su estado general desmejoró y se observó letargia con hiporreflexia. Por este motivo, la leche de la vaca se reemplazó por leche deslactosada, hasta revertir la diarrea. Se tomaron muestras de sangre venosa para hemograma y hepatograma, y de sangre arterial para determinación de pH y equilibrio ácido-básico. Los resultados indicaron aumento del recuento de glóbulos blancos (hasta 15000) y dis-

minución del pH sanguíneo con exceso de base negativo por debajo de 3 meq/L. Se corrigió el pH mediante administración iv y oral de bicarbonato de sodio, y oral de antidiarreico (Enteroplus®; Enrofloxacin 2,5%; Ftalilsulfatiazol 12,5%; Carbón de café 2,5%; Dimetilpolisiloxano activado 5%; Dextrosa 50%). Se efectuaron tomas de muestra para determinaciones bacteriológicas y virales sin obtenerse resultados positivos. Este tipo de cuadro se repitió tres veces, hasta que se decidió suspender el acceso de la ternera a la leche de la vaca y proseguir con una crianza artificial.

El día 30º se determinó un registro térmico de 36,9 °C. La ternera se observó letárgica y con hiporreflexia. Se tomaron muestras de sangre venosa para hemograma y hepatograma, y de sangre arterial para determinación de pH y equilibrio ácido-básico. Los resultados indicaron aumento del recuento de glóbulos blancos (18400) y disminución del pH sanguíneo (7,14) con exceso de base negativo por debajo de 3 meq/L (-19,4 meq/L). La determinación de presión sanguínea arrojó una máxima de 120 mmHg y una mínima de 60 mmHg, y la de glucemia 33 mg/dL. Se comenzó otra terapia contra un diagnóstico de sepsis, corrigiendo el pH mediante administración de bicarbonato de sodio iv, la glucemia mediante dextrosa 10% (25 g/min) iv y se administraron 250 mg de enrofloxacin, 250 mg de ceftiofur (Lab. Merial) y 250 mg oxitetraciclina (Pfizer)/24 hs. Cuatro días después, ante la falta de remisión de los signos y valores de laboratorio, se reemplazó la enrofloxacin por 1 g ampicilina iv (Lab. Richet). Se retomó la terapia con flunixin meglumine (Lab. PharmaVet) en dosis antiendotóxica y debido al desarrollo de una laminitis aséptica producto de la acidosis, se administraron 80 mg de ranitidina iv (Lab. Vetanco).

El día 37º tras no observarse ningún tipo de mejoría y con falta de reflejo de succión, se intentó reforzar la alimentación aumentando la concentración de leche deslactosada (leche en polvo menos diluida). Se comenzó con metronidazol por vía rectal 1000 mg/24hs y 1 g IM de ceftriaxona/12hs (Acantex®, Lab. Roche). La administración de leche concentrada en conjunto con la falta de reflejo de succión provocó un síndrome de acidosis ruminal con disminución del pH sanguíneo y una deshidratación del 12 % en alrededor de 10 hs. La observación ultrasonográfica (Sonoscape A 6 Vet, Fridimex S.A.) del rumen mostró abundante líquido con pre-

sencia de coágulos de leche. Se efectuaron sondajes para evacuar líquido ruminal con un registro de pH de 5,3. Se administró por la misma vía, agua tibia con bicarbonato de sodio hasta elevar el pH ruminal a 6,5 y mantenerlo en forma estable.

Durante los tres días siguientes se corrigió la deshidratación mediante la administración de solución fisiológica y la hipoglucemia, mediante dextrosa al 10 %. Si bien los registros térmicos fueron fluctuantes, no superaron los 39,5 °C, por lo cual se consideró que la sepsis fue controlada por la incorporación de ceftriaxona. Durante estos días se administraron 2 L de plasma bovino a modo de soporte nutricional.

Ante la ausencia de reflejo de succión y el riesgo de forzar la ingestión de leche e incluso su administración con sonda, y por los antecedentes del desencadenamiento de acidosis ruminal, se decidió comenzar con nutrición parenteral total administrando Kabiven (Fresenius Kabi AV) a razón de 12 gotas/min, solución de dextrosa 25% y solución fisiológica para cubrir sus requerimientos de hidratación. Paralelamente con esta terapia de nutrición parenteral, se comenzó a enseñar a la ternera a alimentarse con balanceado y heno estimulando su consumo con el agregado de cloruro de sodio en ambos casos.

A partir del 5º día de nutrición parenteral, se efectuó la suplementación con trece vitaminas mediante la administración iv de dos ampollas de Rivial Pediátrico (Rivero) y 5 días después, y ante la ausencia de indicadores de acidosis, con aminoácidos al 11,5 % (Rivero). De este modo, pudo completarse el régimen de nutrición parenteral total considerado ideal para bovinos neonatos, compuesto por 10 g/Kg/Día de dextrosa, 2 g/Kg/Día de aminoácidos y 1 g/Kg/Día de lípidos. Este programa se mantuvo durante 24 días hasta que se logró alcanzar un consumo de alimento balanceado y heno que permitiera mantener los niveles de glucemia y proteínas en sangre dentro de rangos normales. Este es el informe más detallado de nutrición parenteral total en rumiantes que pueda encontrarse en la bibliografía.

Una vez que la ternera logró alimentarse por sí sola mediante la ingestión de agua y balanceado, se reformuló la dieta incluyendo cascarilla y expeller de soja para proveer proteína degradable en rumen. Esto permitió generar amoníaco en rumen y neutralizar el bajo pH. Así, con patrones normales de movimiento ruminal y pH 6,5-7-2, se progresó en la dieta hasta llegar a una fórmula que

garantizar un aumento diario de peso de 700 g administrado tres veces por día.

El día 80º la ternera fue dada de alta y prosiguió una vida normal bajo un régimen de crianza artificial.

5. Bibliografía

1. Aly H. 2004. Respiratory disorders in the newborn: identification and diagnosis. *Pediatrics in Review* Vol.25 No.6:201-208
2. Arnold DR, Fortier AL, Lefebvre R, Miglino MA, Pfarrer C, Smith LC. 2008. Placental insufficiencies in cloned animals – A workshop report. *Placenta* 29:108-110.
3. Baker JC, Lippert AC. 1987. Total parenteral nutrition in the calf. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 9:71-78.
4. Batchelder CA, Bertolini M, Mason JB, Moyer AL, Hoffert KA, Famula TR, Angelos J, George L, Anderson GB. 2007. Perinatal physiology in cloned and normal calves: Physical and clinical characteristics. *Cloning and Stem Cells* 9:63-82.
5. Brisville AC, Fecteau S, Boysen S, Desrochers A, Dorval P, Buezinski S, Lefebvre R, Hélie P, Blondin P, Smith LC. 2013. Neonatal morbidity and mortality of 31 calves derived from somatic cloning. *J Vet Intern Med* 27:1218-1227.
6. Behboodi E, Anderson GB, Bondurant RH, Cargil SL, Kreuzer BR, Medrano JF. 1995. Birth of large calves that developed from *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology* 44:227-232
7. Bellomo R, Ronco C. 1999. The pathogenesis of lactic acidosis in sepsis. *Current Opinion in Critical Care: Volume 5 - Issue 6 - pp 452-457*
8. Berchtold J. 2009. Treatment of calf diarrhea: intravenous fluid therapy. *Veterinary Clinics of North America* 25:73-99.
9. Blum JW. 2006. Nutritional physiology of neonatal calves. *Journal of animal physiology and animal nutrition* 90:1-11.
10. Castellanos Ortega A, Gandarillas González MA, Teja Barbero JL, Ortiz Melón F, Obeso González T, Prieto Valderrey F, Antidrián Miguel JP. 1996. Definiciones de sepsis en la infección meningocócica infantil grave. Una revisión de 80 casos. *An Esp Pediatr* 44:219-224.
11. Chavatte-Palmer P, Heyman Y, Richard C, Monget P, LeBourhis D, Kann G, Chilliard Y, Vignon X, Renard JP. 2002. Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. *Biol Reprod.* (6):1596-603.
12. Chavatte-Palmer P, Remy D, Cordonnier N. 2004. Health status of cloned cattle at different ages. *Cloning and Stem Cells* 2:94-100
13. Chiesa C, Panero A, Osborn JE, Simonetti AF, Pacifico L. 2004. Diagnosis of neonatal sepsis: a clinical and laboratory challenge. *Clin Chem.* 50(2):279-87
14. Christensen RD, Rothstein G. 1980. Exhaustion of mature marrow neutrophils in neonates with sepsis. *Pediatr* 96(2):316-318.
15. Christensen RD, Bradley PP, Rothstein G. 1981. The leukocyte left shift in clinical and experimental neonatal sepsis. *J Pediatr* 98(1):101-105.
16. Church DC. (1974): *Fisiología digestiva y nutrición de los rumiantes* (Vol.1) Ed. Acribia, Zaragoza, España.
17. Clark RH, Huckaby JL, Kueser TJ, Walker MW, Southgate WM, Perez JA, Roy BJ, Kesler M; Clinical Inhaled Nitric Oxide Research Group. 2003. Low-dose nitric oxide therapy for persistent pulmonary hypertension: 1-year follow-up. *J Perinatol.*;23(4):300-3.
18. Constant F, Guillomot M, Heyman Y, Vignon X, Laigre P, Servely JL, Renard JP, Chavatte-Palmer P. 2006. Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. *Biol. Reprod.* 75:122-130.
19. Farin PW, Farin CE. 1995. Transfer of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*: survival and fetal development. *Biol. Reprod.* 52:676-682
20. Farin PW, Piedrahita JA, Farin CE. 2006. Errors in development of fetuses and placentas from *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology* 65:178-191
21. Fecteau ME, Palmer JE., Wilkins, P. A. 2005. Neonatal care of high-risk cloned and transgenic calves. *Vet. Clin. Food. Anim.* 21:637-653
22. Fecteau ME, Smith BP, George LP. 2009. Sepsis and meningitis in the newborn calf. *Veterinary Clinics of North America* 25:195-208.
23. Garry FB, Adams R, McCann JP, Odde KG. 1996. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. *Theriogenology* 45:141-152.
24. Graham EM, Ruis KA, Hartman AL, Northington FJ, Fox HE. 2008. A systematic review of the role of intrapartum hypoxia-ischemia in the causation of neonatal encephalopathy. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 587-595.
25. Graves ED, Redmond CR, Arensman RM. 1998. Persistent pulmonary hypertension in the neonate. *Chest* 93 (3):638-641.
26. Hill JR, Roussel AJ, Cibeli JB, Edwards JF, Hooper NL, Miller MW, Thompson JA, Looney CR, Westhusin ME, Rob JM, Stice SL. 1999. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies) *Theriogenology* 51:1451-1485.
27. Hoffsis GF, Gingerich DA, Sherman DM., Bruner RR. Jr. 1977. Total intravenous feeding of calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 17 (1):67-70.
28. Holloway NM, Tyler JW, Lakritz J, Carlson SL, Tessman RK, Holle J. 2002. Serum immunoglobulin G concentrations in calves fed fresh colostrum or a colostrum supplement. *J Vet Intern Med.* 16(2):187-91.
29. Kohan-Ghadr HR, Lefebvre RC, Fecteau G, Smith LC, Murphy BD, Suzuki Junior J, Girard C, Hélie, P. 2008. Ultrasonographic and histological characterization of the placenta of somatic nuclear transfer-derived pregnancies in dairy cattle. *Theriogenology.* 69:218-30.
30. Lavidou N, Sygdelou A, Fanos V, Xanthos T. 2012. The use of sildenafil in the treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn: a review of the literature. *Curr Pharm Des.* 18(21):3034-45.
31. Lane MA, Jesse, BW. 1997. Effect of Volatile Fatty Acid Infusion on Development of the Rumen epithelium in Neonatal Sheep. *Journal of Dairy Science.* Volume 80, Issue 4: 740-746
32. Lopes MA, White NA. 2002. Parenteral nutrition for horses with gastrointestinal disease: a retrospective study of 79 cases *Equine Veterinary Journal.* Volume 34, Issue 3, pages 250-257.
33. Michele G, Schwarze E. 1970. *Compendio de anatomía veterinaria: Embriología.* Tomo IV: Editorial Acribia. Zaragoza, España. 350p.
34. Miglino MA, Pereira FT, Visintin JA, Garcia JM, Meirelles FV, Rumpf R, Ambrósio CE, Papa PC, Santos TC, Carvalho AF, Leiser R, Carter AM. 2007. Placentation in cloned cattle: structure and microvascular architecture. *Theriogenology.* 68:604-17.
35. Nagy DW. 2009. Resuscitation and critical care of neonatal calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 6:1-11.
36. O'mahony M, Healy A, Duane M, Doherty M. 2002. Parenteral nutrition in calves: A review of the literature and a case report. *Irish Veterinary Journal* 55:433-439.
37. Panarace M, Agüero JI, Garrote M, Jauregui G, Segovia A, Cané L, Gutiérrez J, Marfil M, Rigali F, Pugliese M, Young S, Lagioia J, Garnil C, Forte Pontes JE, Ereno Junio JC, Mower S, Medina M. 2007. How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. *Theriogenology* 67:142-151
38. Smith LC, Suzuki Jr J, Goff AK, Filion F, Therrien, J, Murphy BD, Kohan-Ghadr HR, Lefebvre R, Brisville AC, Buezinski S, Fecteau G, Percin F, Meirelles FV. 2012. Developmental an epigenetic anomalies in cloned cattle. *Reprod. Dom. Anim.* 47 (suppl. 4) 107-114.
39. Sutton, J.D., McGilliard, A.D., Jacobson, N.L. 1963. Jacobson Functional Development of Rumen Mucosa. Absorptive Ability. *Journal of Dairy Science* Volume 46, Issue 5, May 1963, Pages 426-436
40. Sutton JD, McGilliard AD, Marlene Richard, Jacobson NL. 1963. Functional Development of Rumen Mucosa. II. Metabolic Activity. *Journal of Dairy Science* Volume 46, Issue 6: 530-537
41. Sweeney RW, Divers TJ. 1990. The use of parenteral nutrition in calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 6:125-131.
42. Weaver DM, Tyler JW, VanMetre DC, Hostetler DE, Barrington GM. 2000. Passive transfer of colostrum immunoglobulins in calves. *J Vet Intern Med* 14(6):569-77.
43. Weinschenk NR, Farina A, Bianchi DW. 2000. Premature infants respond to early-onset and late-onset sepsis with leukocyte activation. *J Pediatr Sep* 137(3):345-350.
44. Wells DN, Forsyth JT, Mcmillan V, Oback B. 2004. The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. *Cloning and Stem Cells* 6:101-110.
45. Wilson JM, Williams JD, Bondioli KR, Looney CR, Westhusin ME, McCalla DF. 1995. Comparison of birth and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. *Anim Reprod Sci* 38:73-83.