

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

SISTEMAS DE DUCHAS, ASPERSORES E SOMBRITES
DESTINADOS A PROMOÇÃO DA REDUÇÃO DO
ESTRESSE TÉRMICO EM VACAS LEITEIRAS A PASTO E
SUA INFLUÊNCIA SOBRE PARÂMETROS PRODUTIVOS,
FISIOLÓGICOS E REPRODUTIVOS.

Autora: Karoline de Lima Guimarães Yamada
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos
Coorientador: Prof. Dr. Júlio César Damasceno

MARINGÁ
Estado do Paraná
maio - 2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

SISTEMAS DE DUCHAS, ASPERSORES E SOMBRITES
DESTINADOS A PROMOÇÃO DA REDUÇÃO DO
ESTRESSE TÉRMICO EM VACAS LEITEIRAS A PASTO E
SUA INFLUÊNCIA SOBRE PARÂMETROS PRODUTIVOS,
FISIOLÓGICOS E REPRODUTIVOS.

Autora: Karoline de Lima Guimarães Yamada
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos
Coorientador: Prof. Dr. Júlio César Damasceno

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTORA EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de Concentração Produção Animal

MARINGÁ
Estado do Paraná
maio - 2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

Yamada, Karoline de Lima Guimarães

Y19s Sistemas de duchas, aspersores e sombrites destinados a promoção da redução do estresse térmico em vacas leiteiras a pasto e sua influência sobre parâmetros produtivos, fisiológicos e reprodutivos / Karoline de Lima Guimarães Yamada. -- Maringá, PR, 2020. 130 f.: il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos.

Coorientador: Prof. Dr. Júlio César Damasceno.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2020.

1. Estresse térmico. 2. Bioclimatologia. 3. Bem estar animal - Vacas leiteiras. 4. Resfriamento evaporativo. 5. Sombreamento artificial. I. Santos, Geraldo Tadeu dos, orient. II. Damasceno, Júlio César, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

CDD 23.ed. 636.214

Rosana de Souza Costa de Oliveira - 9/1366



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

SISTEMAS DE DUCHAS, ASPERSORES E SOMBRITES
DESTINADOS A PROMOÇÃO DA REDUÇÃO DO
ESTRESSE TÉRMICO EM VACAS LEITEIRAS A PASTO E
SUA INFLUÊNCIA SOBRE PARÂMETROS PRODUTIVOS,
FISIOLÓGICOS E REPRODUTIVOS

Autora: Karoline de Lima Guimarães Yamada
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos

TITULAÇÃO: Doutora em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 08 de maio de 2020.



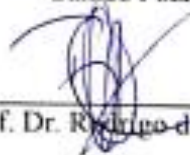
Prof. Dr. Fabio Luiz Bim
Cavalieri



Prof. Dr. Francilaine Eloise De
Marchi



Prof. Dr. Magali Soares dos
Santos Pozza



Prof. Dr. Rodrigo de Almeida



Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos
Orientador

“Minha fé não está firmada
Nas coisas que podes fazer
Eu aprendi a Te adorar pelo que és

Dele vêm o sim e o amém
Somente dele e mais ninguém
A Deus seja o louvor

Se Deus fizer, Ele é Deus
Se não fizer, Ele é Deus
Se a porta abrir, Ele é Deus
Mas se fechar, continua sendo Deus

Se a doença vier, Ele é Deus
Se curado eu for, Ele é Deus
Se tudo der certo, Ele é Deus
Mas se não der, continua sendo Deus

Deus é Deus”

Delino Marçal

Aos meus pais, Joaquim Celso Branco Guimarães e Sônia Ferreira de Lima Guimarães, exemplos do mais puro amor, carinho e companheirismo, que me fizeram não desistir dos meus objetivos e estiveram comigo em todos os momentos proporcionando toda oportunidade e apoio necessário em todos os momentos, até aqui. Não há palavras que expressem meu eterno amor e gratidão.

Ao meu marido, Leandro Hideyuki Yamada, por me incentivar e apoiar em todos os momentos mesmo quando eu não merecia. A ti sempre serei grata.

Ao meu avô Hudson Carlos Guimarães (*In memoriam*). Avô querido que nunca soube que foi quem me inspirou e me ensinou a ter amor pelos animais. A ti minha eterna gratidão e saudade.

À minhas primas queridas Anne Ellen Guimarães e Danielle Lima Molinari, amigas verdadeiras e companheiras, sempre me acalmando, apoiando e animando. Sem elas esse sonho seria mais árduo.

DEDICO ESTE TRABALHO

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu escudo e fortaleza, mão forte sempre a me amparar.

Aos meus pais, por todo carinho, força, companheirismo e dedicação nesses anos todos de estudo. Obrigada por nunca desistirem de mim, acreditando mais em mim do que eu mesma.

Ao meu marido Leandro H. Yamada, por se fazer presente mesmo quando não podia, por ser meu equilíbrio, por me compreender e nunca me deixar desistir nos momentos de angústia.

Ao meu querido professor Geraldo Tadeu dos Santos, pelo exemplo, pela paciência, orientação e ensinamentos. Obrigada por me acolher.

Ao professor Júlio César Damasceno, pelos ensinamentos e conversas, sempre pronto a me ajudar.

Ao querido professor Luiz Paulo Rigolon, que além dos ensinamentos e ajuda sempre presente se mostrou um amigo querido, sempre me aconselhando e ajudando quando estive doente.

Ao professor Fábio L. B. Cavaliere, que mesmo sem me conhecer foi solícito e companheiro me ajudando na realização do projeto, tornando um grande amigo.

Ao grande amigo Eduardo Lucacin, pela paciência, ajuda e empréstimo dos animais para o experimento.

Ao Ricardo Alexandre Bonadio Manhanini, meus sinceros agradecimentos pelo suporte e ajuda na instalação dos sistemas do experimento.

Ao meu querido e amado tio Ricardo Luiz B. Guimarães, por me ajudar nos artigos, sempre respondendo prontamente, além de me apoiar e animar.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPZ) pelo incentivo e por tornar possível a conclusão deste projeto.

Aos colaboradores da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI/UEM), pela convivência, contribuição, apoio e ensinamentos durante os desenvolvimentos experimentais, sem vocês esse trabalho não seria possível.

Ao grupo do Núcleo Pluridisciplinar de Pesquisa e Estudo da Cadeia Produtiva do Leite (NUPEL), em especial aos amigos Micheli Regiani Sipperti, Monique Figueiredo, Jesus Alberto Cardozo Osório, Kléves Vieira Almeida e Jean Carlos Steinmacher Lourenço, por todo o carinho, dedicação, diversão e ajuda durante o experimento, e análises, sem vocês não teria conseguido. E, a todos os alunos de graduação que fizeram parte do experimento.

A todos os professores do PPZ, pela contribuição direta ou indireta em minha formação acadêmica.

BIOGRAFIA

KAROLINE DE LIMA GUIMARÃES YAMADA, filha de Joaquim Celso Branco Guimarães e Sônia Ferreira de Lima Guimarães, nasceu em Umuarama, Paraná, no dia 27 de abril de 1991.

Cursou graduação em Zootecnia na Universidade Estadual de Maringá, no período de 2010 a 2014.

Em março de 2015, iniciou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Nutrição e Produção de Grandes Ruminantes, sob orientação do Prof. Dr. Antonio Ferriani Branco.

No dia 10 de março de 2017, submeteu-se à banca examinadora para defesa da dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Zootecnia.

Em março de 2017, dando continuidade a seus estudos, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, em nível de doutorado, na área de concentração Produção Animal, sob orientação do Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos e coorientação do Prof. Dr. Júlio César Damasceno.

No dia 08 de maio de 2020, submeteu-se à banca examinadora para o exame de qualificação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de doutora em Zootecnia.

ÍNDICE

	Página
Sumário	
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIACÕES	xiv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xx
I. INTRODUÇÃO	23
II. REVISÃO DE LITERATURA	25
1. Variáveis meteorológicas	25
2. Vias de dissipação de calor dos animais ao ambiente	26
3. Zona de conforto térmico	27
4. Índices de conforto térmico	28
4.1 <i>Índice de Temperatura e Umidade (ITU)</i>	28
4.2 <i>Índice de Temperatura de Globo Negro e Umidade (ITGU)</i>	29
5. Parâmetros comportamentais	30
6. Parâmetros fisiológicos	31
6.1 <i>Frequência respiratória</i>	31
6.2 <i>Temperatura retal</i>	32
6.3 <i>Frequência cardíaca</i>	32
6.4 <i>Temperatura de pelame</i>	33
7. Parâmetros hematológicos	34
8. Parâmetros minerais	34
9. Alterações de hormonais	35
9.1 <i>Cortisol</i>	35
9.2 <i>Hormônios tireoidianos (T₃ e T₄)</i>	36
9.4 <i>Insulina</i>	37

9.4	<i>LH e FSH</i>	38
9.4.1	<i>Produção in vitro de embriões</i>	39
9.4.2	<i>O estresse térmico e a produção in vitro de embriões leiteiros</i>	40
10.	Parâmetros bioquímicos	41
10.1	<i>Ureia</i>	41
11.	Triglicerídeos, colesterol e HDL	42
12.	Efeitos do estresse térmico sobre parâmetros de produção e composição do leite ..	44
12.1	<i>Produtivos</i>	44
12.2	<i>Composição do leite</i>	44
13.	Estratégias para amenizar os efeitos do estresse térmico em bovinos leiteiros	45
13.1	<i>Mecanismos diminuidores de estresse térmico</i>	46
13.1.1	<i>Sombreamento</i>	46
13.1.2	<i>Sombreamento natural</i>	46
13.1.3	<i>Sombreamento artificial</i>	47
13.1.4	<i>Ventilação</i>	48
13.1.5	<i>Sistema de resfriamento adiabático evaporativo (SRAE)</i>	48
REFERÊNCIAS	50
III.	OBJETIVO GERAL	59
I.	INFLUENCE OF DIFFERENT HEAT-STRESS-REDUCING SYSTEMS ON PHYSIOLOGICAL, BEHAVIORAL RESPONSES AND SOCIAL DOMINANCE OF HOLSTEIN AND JERSEY COWS AND HEIFERS ON PASTURE	60
1.	Introduction	61
2.	Material and Methods	62
3.	Results	67
4.	Discussion	69
	Conclusion	72
	Acknowledgments	72
	Conflict of interest	73
	Animal welfare statement	73
	Authors' contributions	73
	References	73
	Tables	76
	Figures captions	78
	Figures	78
	Highlights	80

II. <i>IN-VITRO</i> PRODUCTION OF DAIRY COW AND HEIFER EMBRYOS IS INFLUENCED BY PASTURE HEAT-STRESS-REDUCTION SYSTEMS	81
ABSTRACT	81
INTRODUCTION.....	82
MATERIAL AND METHODS.....	83
RESULTS	91
DISCUSSION	93
CONCLUSION.....	97
ACKNOWLEDGMENTS	98
STATEMENT OF ANIMAL	98
CONFLICT OF INTEREST	98
REFERENCES.....	98
TABLES.....	100
FIGURES.....	103
III. INFLUENCE OF THREE HEAT-STRESS-REDUCING SYSTEMS OF ANIMALS GRAZING ON HORMONAL, MINERAL, BLOOD, AND LIPID BIOMARKERS	107
Acknowledgements.....	107
Abstract.....	107
1. INTRODUCTION.....	108
2. MATERIAL AND METHODS.....	109
3. RESULTS	112
4. DISCUSSION	113
5. CONCLUSION.....	116
Animal welfare statement.....	116
Conflict of interest.....	117
Funding	117
Authors' contributions	117
References.....	117
TABLES.....	120
FIGURE LEGENDS	126
FIGURE.....	126

LISTA DE TABELAS

	Página
I. INFLUENCE OF DIFFERENT HEAT-STRESS-REDUCING SYSTEMS ON PHYSIOLOGICAL, BEHAVIORAL RESPONSES AND SOCIAL DOMINANCE OF HOLSTEIN AND JERSEY COWS AND HEIFERS ON PASTURE.....	60
Table 1- Meteorological data collected during the experimental period.....	76
Table 2- Duration (minutes) of behavioral activities in relation to different pasture heat stress reduction systems.	76
Table 3- Duration (minutes) and frequency of use of pasture heat stress reduction systems.....	776
Table 4- Treatment x breed and treatment x age interactions on duration (minutes) and frequency of system use.....	77
Table 5- Respiratory rate (mov.min ⁻¹) and coat surface temperature (°C) evaluated in different treatments	77
 II. <i>IN-VITRO</i> PRODUCTION OF DAIRY COW AND HEIFER EMBRYOS IS INFLUENCED BY PASTURE HEAT-STRESS-REDUCTION SYSTEMS.....	 81
Table 1- Average dry matter (DM), mineral matter (MM), organic matter (OM), crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF) and ether extract (EE) of pasture, feed and silage supplied to lactating cows and pubescent heifers	100
Table 2- Meteorological data collected during the experimental period.....	101
Table 3- Respiratory rate (RR; movements/min ⁻¹), hair coat surface temperature (CS; °C) and rectal temperature (RT; °C) evaluated in different treatments	101
Table 4- Average total oocyte, viable oocytes, embryos and hatching in different treatments, breed and age group	102
Table 5- Developments of interactions treatment x breed over the hatching.	102

Table 6- Milk Yield (kg / day) and milk composition (%) of Holstein and Jersey cows submitted to sprinkler, showers and artificial shadow systems.	103
---	-----

III. INFLUENCE OF THREE HEAT-STRESS-REDUCING SYSTEMS OF ANIMALS GRAZING ON HORMONAL, MINERAL, BLOOD AND LIPID BIOMARKERS..... 107

Table 1- Average dry matter (DM), mineral matter (MM), organic matter (OM), crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF) and ether extract (EE) of pasture, feed and silage supplied to lactating cows and pubescent heifers	120
Table 2- Climatic variables measured during the experimental periods	121
Table 3- Average values of the concentrations of T ₃ (µg/dL), T ₄ (µg/dL), cortisol (µg/dL), Na ⁺ , K ⁺ and Cl ⁻ (ng/mL) in the different treatments (Treat), breeds (Br) and age groups (Ag)	122
Table 4- Breakdown of interaction between treatment x breed and treatment x age group for T ₃	123
Table 5- Average values of erythrogram and leukogram in different treatments (Treat), breeds (Br) and age groups (Ag)	124
Table 6- Average levels of cholesterol, HDL, triglycerides, glucose and urea (mg/dL) according to the different treatments (Treat), breeds (Br) and age groups (Ag) ...	125
Table 7- Breakdown of treatment x breed interaction on urea in the blood	126

LISTA DE FIGURAS

	Página
I. INFLUENCE OF DIFFERENT HEAT-STRESS-REDUCING SYSTEMS ON PHYSIOLOGICAL, BEHAVIORAL RESPONSES AND SOCIAL DOMINANCE OF HOLSTEIN AND JERSEY COWS AND HEIFERS ON PASTURE.....	60
Figure 1-(a) sprinkling + natural shade; (b) showers + natural shade; and (c) artificial shade.....	78
Figure 2- (a) Duration in minutes of using the systems in isolation and the artificial shade in each system; (b) Frequency of using the systems in isolation and the artificial shade in each system	79
Figure 3-(a) Influence of duration (minutes) of use of sprinkler, shower and artificial shade systems; (b) Influence of frequency of use of sprinkler, shower and artificial shade systems	79
Figure 4- (a) Regression analysis of hair coat surface temperature (°C) of animals subjected to THI sprinkler + artificial shade, shower + artificial shade and artificial shade systems; (b) Regression analysis of respiratory rate (mov. Min ⁻¹) of animals subjected.....	80
 II. <i>IN-VITRO</i> PRODUCTION OF DAIRY COW AND HEIFER EMBRYOS IS INFLUENCED BY PASTURE HEAT-STRESS-REDUCTION SYSTEMS.....	 81
Figure 1- Sprinkler system + artificial shade (The sprinkler system was provided by an 8m ² area structure, and was composed of volcano sprinklers and had a flow rate of 8 liters / minute. The artificial shade system was provided by a structure of 3.5 meters high and an area of 16m ² , covered by artificial shading with 80% solar energy	103
Figure 2- Shower system + artificial shade (the shower system was provided by a structure of 8 m ² in area and consisted of showers with a flow rate of 12 liters / minute.	

The artificial sprinkler system was provided by a structure of 3.5 meters high and an area	104
Figure 3- Artificial shade system (provided by 3.5 meters high structure and area of 16m ² , covered by artificial shade with 80% solar	104
Figure 4- Regression analysis of the hair coat surface temperature (CS) animals subjected to spray systems, shower and shading in relation to Heat Load Index. ...	105
Figure 5- Regression analysis of the respiratory frequency (RR) animals subjected to spray systems, shower and shading in relation to Heat Load Index.	105
Figure 6- Regression analysis of the rectal temperature (RT) animals subjected to spray systems, shower and shading in relation to Heat Load Index.	106

III. INFLUENCE OF THREE HEAT-STRESS-REDUCING SYSTEMS OF ANIMALS GRAZING ON HORMONAL, MINERAL, BLOOD AND LIPID BIOMARKERS	107
Figure 1- Sprinkler + artificial shade system.	126
Figure 2- Shower + artificial shade system.....	127
Figure 3- Artificial shade system	127

LISTA DE ABREVIACOES

ITU- Índice de temperatura e umidade

ITGU- Índice de temperatura de globo e umidade

Mov.min⁻¹- Movimentos por minuto

Bat.min⁻¹- Batimentos por minuto

HHA- Hipotálamo hipófise adrenal

HHG- Hipotálamo hipófise gonadal

T₄- Tiroxina

T₃-Triiodotironina

SRAE- Sistema de resfriamento adiabático evaporativo

Tbs- Temperatura de bulbo seco

Tpo- Temperatura de pondo de orvalho

Tgn- Temperatura do globo negro

FR- Frequência respiratória

TR- Temperatura retal

TP- Temperatura de pelame

CO₂- Gás carbônico

HCO₃-Bicarbonato

LH- Hormônio luteinizante

FSH- Hormônio folículo estimulante

CRH- Hormônio liberador de corticotrofina

ACTH- Hormônio adrenocorticotrófico

TRH- Hormônio liberador de tireotrofina

TSH- Hormônio estimulante da tireoide

BEN- Balanço energético negativo

AGNE- Ácidos graxos não esterificados

TG- Triglicerídeos

HDL- High density lipoprotein

HSP- Heat shock protein

CCS- Contagem de células somáticas

GnRH- Hormônio liberador de gonadotrofina

Tasp- Tratamento com aspersão + sombrite

Tchu- Tratamento com chuveiro + sombrite

Tsom- Tratamento com sombrite

Tspr- Treatment with sprinkler + artificial shade

Tsho- Treatment with shower + artificial shade

Tas- Treatment with artificial shade

SARS- Evaporative adiabatic cooling systems

FEI- Fazenda experimental de Iguatemi

Ta- Air temperature

RH- Relative humidity

Tbg- Black globe temperature

WS- wind speed

HLI- Heat load index

THI- Temperature and humidity index

MCV- Mean corpuscular volume

MCHC- Mean corpuscular hemoglobin concentration

R- Radiation

F- Fat

TS- Total solids

PROT- Protein

LAC- Lactose

SCC- Somatic cell count

SCE- Somatic cell score

RT- Rectal temperature

RR- Respiratory rate

CS- Coat surface temperature

Gra- Grazing

Rumi- Ruminating

SI- Standing idle

LI- lying idle

Groo- Grooming

RESUMO

Neste trabalho o principal objetivo foi avaliar em ambiente tropical os efeitos de três sistemas destinados a promoção da redução do estresse térmico de vacas lactantes e novilhas púberes de diferentes raças criadas a pasto, sobre parâmetros fisiológicos, comportamentais, sanguíneos, hormonais, reprodutivos e metabólicos. O trabalho foi desenvolvido na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI/UEM) durante os meses de outubro e novembro de 2018. Foram utilizados doze animais, sendo 3 vacas lactantes da raça Holandês, 3 novilhas púberes da raça Holandês, 3 vacas lactantes da raça Jersey e 3 novilhas púberes da raça Jersey. Os animais foram distribuídos em 4 quadrados-latinos 3 x 3 em esquema fatorial 3 x 2 x 2 durante 3 períodos. Os tratamentos testados foram: aspersão + sombrite (Tasp), chuveiro + sombrite (Tchu) e sombrite (Tsom). O objetivo do artigo I, foi avaliar a influência dos sistemas destinados a promoção da redução do estresse térmico sobre parâmetros preferenciais, fisiológicos e comportamentais dos animais. Para isso foram avaliados: frequência respiratória; temperatura de pelame; frequência e duração de utilização dos sistemas; comportamento (ócio deitado, ócio em pé, ruminação, *grooming* e pastando); e dados climáticos (temperatura do ar, umidade relativa do ar, e índice de temperatura e umidade). Os parâmetros comportamentais de ócio em pé e pastejo foram influenciados pelos tratamentos. O padrão racial influenciou os comportamentos de ócio deitada, ruminação e *grooming*. O tempo e a frequência de utilização dos sistemas sofreram efeito para tratamento e grupo etário. As análises de regressão apresentaram correlações positivas e significativas para frequência respiratória e temperatura de pelame em relação ao ITU sobre os tratamentos. Os resultados deste estudo indicam que variáveis etárias e raciais influenciam as variáveis analisadas e que os sistemas que utilizaram água (aspersão e chuveiro) proporcionaram melhores parâmetros comportamentais e fisiológicos aos animais do que apenas o uso do sombrite. No artigo II o objetivo do trabalho foi analisar a influência dos sistemas redutores de

estresse térmico sobre os parâmetros fisiológicos, produtivos e reprodutivos dos animais. Para isso foram avaliados dados climáticos (temperatura do ar, umidade relativa, radiação solar, velocidade do vento e temperatura de globo e ICT); parâmetros fisiológicos (frequência respiratória, temperatura de pelame a temperatura retal); parâmetros reprodutivos (número de oócitos e produção embrionária), parâmetros leiteiros (produção, gordura, proteína, lactose, sólidos totais e contagem de células somáticas (CCS)). O período do dia (manhã e tarde) influenciou os valores de frequência respiratória, temperatura de pelame e temperatura retal. As raças, o grupo etário e as interações analisadas não influenciaram valores de frequência respiratória e temperatura de pelame. Os tratamentos influenciaram os valores de frequência respiratória e temperatura de pelame. A Temperatura retal foi diferente entre vacas e novilhas. Houve efeito dos tratamentos sobre a quantidade de oócitos totais aspirados e a quantidade de oócitos viáveis. Não foram encontradas diferenças significativas para raça, grupo etário, e para a interação entre tratamento x grupo etário sobre os aspectos reprodutivos analisados. Houve interação entre sistemas e raças sobre a eclosão. Não houve efeito da interação entre tratamento e raça sobre a produção leiteira. Não foi verificada significância para a produção de leite, seus componentes e CCS nos diferentes tratamentos. Houve efeito da raça sobre a produção, gordura, proteína, sólidos totais e CCS. Os resultados permitem concluir que os tratamentos de aspersão + sombrite e chuveiros + sombrite proporcionaram melhores parâmetros de frequência respiratória e temperatura de pelame, porém, todos os sistemas foram eficientes na manutenção da temperatura retal, e que, a utilização desses recursos associados à produção *in vitro* de embriões é uma estratégia a ser considerada para maior sucesso do setor. O artigo III testou a influência dos sistemas redutores de estresse térmico a pasto sobre biomarcadores hormonais (T_3 , T_4 e cortisol), minerais (Na^+ , K^+ , Cl^-), sanguíneos e lipídicos. Em todos os períodos experimentais foram realizadas coletas de sangue, por punção da veia coccígea para as futuras análises. Os tratamentos e o grupo etário influenciaram nos teores de T_3 . Houve interação significativa dos sistemas para a raça e grupo etário sobre os teores de T_3 . Os tratamentos, a raça, o grupo etário e as interações tratamento x raça e tratamento x grupo etário não influenciaram nos teores hormonais de T_4 e cortisol. Não houve efeito dos tratamentos, grupos etários e interações, sobre os teores de Na^+ , K e Cl^- . Houve efeito da raça sobre os níveis de Na^+ e K^+ . Os aspectos sanguíneos analisados não foram influenciados pelo grupo etário e pela interação tratamento x raça. Houve efeito da raça sobre os teores de hemoglobina, hematócrito e volume corpuscular médio. Os níveis de glicose, colesterol

total, HDL, TG e ureia não foram alterados em função dos tratamentos. O grupo etário influenciou nos valores de glicose, colesterol, HDL, triglicerídeos e ureia. Houve interação significativa dos sistemas para a raça sobre os teores de ureia. Conclui-se assim, que os diferentes sistemas redutores de estresse térmico testados não influenciaram os biomarcadores séricos analisados. As variações ocorridas foram resultantes do padrão racial e dos grupos etários analisados. Como conclusão geral, observou-se que a maior parte dos resultados são inéditos, e mostram que a utilização de meios que mitiguem o estresse térmico de animais criados a pasto em países de clima tropical e subtropical é necessária. Sendo a utilização de chuveiros e aspersores os sistemas que proporcionaram os melhores parâmetros fisiológicos, comportamentais e reprodutivos.

Palavras-chave: estresse térmico, produção de leite, reprodução, sistema extensivo, pasto

ABSTRACT

In this work, the main objective was to evaluate in a tropical environment the effects of three systems destined to promote the thermal stress reduction of lactating cows and pubescent heifers from different breeds raised on pasture, on physiological, behavioral, blood, hormonal, reproductive and metabolic parameters. The experiment was carried out at the Iguatemi Experimental Farm (FEI/UEM) during October and November 2018. Twelve animals were used, 3 Holstein, 3 heifers Holstein, 3 Jersey cows and 3 heifers jersey. The animals were distributed in four 3×3 Latin squares in a $3 \times 2 \times 2$ factorial arrangement. The treatments were sprinkler system + artificial shade, shower system + artificial shade, and artificial shade. The objective of article I was to evaluate the systems influence designed to promote the thermal stress reduction on preferential, physiological, and behavioral parameters of animals. For this, the following were evaluated: respiratory rate; hair coat surface temperature; frequency and duration of systems use; behavior (lying idle, standing idle, rumination, grooming and grazing); and climatic data (air temperature, relative humidity, and temperature and humidity index). The behavioral parameters of standing idle and grazing were influenced by the treatments. The racial pattern influenced the behavior of lying idle, ruminating, and grooming. The systems use time and frequency were affected by treatment and age group. The regression analyzes showed a positive and significant correlations for respiratory frequency and hair coat surface temperature in relation to the THI on treatments. The results of this study indicate that age and racial variables can influence the analyzed variables and systems that used water (sprinkler and shower) provided better behavioral and physiological parameters to animals than just using the artificial shade. In article II, the objective of the study was to analyze the influence of heat stress-reducing systems on physiological, productive, and reproductive parameters of animals. For this, climatic data (air

temperature, relative humidity, solar radiation, wind speed, and globe temperature and HLI) were evaluated; physiological parameters (respiratory rate, hair coat surface temperature to rectal temperature); reproductive parameters (oocyte number and embryonic production) and milk parameters (production, fat, protein, lactose, total solids and somatic cell count (SCC)). The period (morning and afternoon) influenced the values of respiratory rate, hair coat surface temperature and rectal temperature. Breeds, age group and interactions analyzed did not influence respiratory rate and hair coat surface temperature. The treatments influenced respiratory rate and hair coat surface temperature values. The rectal temperature was different between cows and heifers. There was a treatment effect on the aspirated and viable oocytes number. No significant differences were found for breed, age group and the interaction between treatment x age group on the reproductive aspects analyzed. There was interaction between systems for breeds on hatching. There was no effect of treatment x breed interaction on milk yield. No significance was found for milk yield, its components and SCC for treatments. There was a breed effect on production, fat, protein, total solids, and somatic cell score. The results allow us to conclude that the sprinkler + artificial shade and showers + artificial shade treatments provided better parameters of respiratory frequency and hair coat surface temperature, however, all systems were efficient in maintaining the rectal temperature, and that the use of these resources associated with in vitro production of embryos is a strategy to be considered for the sector's greatest success. Article III tested the influence of pasture-reducing stress systems on hormonal biomarkers (T_3 , T_4 and cortisol), minerals (Na^+ , K^+ , Cl^-), blood and lipids. Blood samples were collected at all experimental periods by puncture of coccygeal vein. The treatments and age group influenced the T_3 levels. There was a significant systems interaction for breed and age group on the T_3 levels. Treatments, breed, age group, and treatment x breed and treatment x age group interactions did not influence the T_4 and cortisol hormonal levels. There was no effect of treatments, age groups and interactions on Na^+ , K^+ and Cl^- levels. There was a breed effect on Na^+ and K^+ levels. The blood aspects analyzed were not influenced by the age group and the interaction between treatment and breed. There was a breed effect on the hemoglobin, hematocrit and mean corpuscular volume levels. Glucose, total cholesterol, HDL, TG, and urea levels were not affected by treatments. The age group influenced the glucose, cholesterol, HDL, TG, and urea levels. There was a significant system interaction for breed on the urea levels. It was concluded that the different heat stress reducing systems tested did not influence serum biomarkers. The variations that occurred

were due to the breed patterns and the age groups analyzed. As a general conclusion, it was observed that most of the results are unpublished and show that the use of systems that mitigate the thermal stress of animals raised on pasture in countries with tropical and subtropical climate is necessary. The showers and sprinklers use are the systems that provided the best physiological, behavioral, and reproductive parameters.

Keyword: thermal stress, milk production, reproduction, extensive system, pasture

I. INTRODUÇÃO

A maior parte do território brasileiro está situada entre os trópicos de Câncer e Capricórnio, e o clima é caracterizado por altas temperaturas anuais e alto índice de radiação solar (Dikmen and Hansen, 2009), sendo estes fatores climáticos de efeito marcante sobre o conforto e bem-estar animal, principalmente para bovinos provenientes de países europeus criados a pasto (Façanha et al., 2013).

Grande parte da produção leiteira do país origina-se de pequenas e médias propriedades rurais, as quais mantêm seus animais a pasto sob grande interferência do clima, sendo esse cenário de desafio quanto a adaptabilidade de bovinos (Silva et al., 2002). Mesmo nesse cenário o país se posiciona em lugar de destaque na produção leiteira mundial, sendo o quarto maior produtor de leite com 33,8 bilhões de litros produzidos em 2018 (IBGE, 2020).

Bovinos leiteiros possuem uma faixa de termoneutralidade que conseguem expressar melhor seu potencial produtivo, denominada, zona de conforto térmico, que variando de acordo com a raça, idade, sexo, condição fisiológica (Ferro et al., 2010). Não há concordância entre os limiares superior e inferior dessa zona de conforto, porém, acredita-se que valores acima de 21 °C dependendo da umidade já afetam o bem-estar de vacas da raça Holandês lactantes (Martello et al., 2004). Por esse motivo, índices para se averiguar o conforto desses animais são necessários, sendo os mais utilizados: o índice de temperatura e umidade (ITU), que relaciona a temperatura de bulbo seco com a temperatura do pondo de orvalho (El-Tarabany et al., 2017); e o índice de temperatura de globo negro e umidade (ITGU), que associa a temperatura de globo negro com a temperatura do ponto de orvalho (Buffington et al., 1981). Ambos expressando numericamente o grau de conforto dos animais.

Animais estressados termicamente alteram padrões normais comportamentais e fisiológicos visando diminuição dos estímulos estressantes. Alterações na frequência e quantidade da ingestão de alimentos visam diminuição do calor endógeno causado pelo processo de digestão. O aumento da ingestão de água e a procura por lugares mais frescos nas horas mais quentes do dia também são frequentemente observados (Wankar and Yadav, 2018). Porém, muitas vezes essas alterações são insuficientes, não havendo liberação satisfatória de calor do animal, podendo levar à redução da produção leiteira (podendo ser diminuída em até 40%) (Staples and Thatcher, 2011) afetando também a hemodinâmica (Souza et al., 2011) processos hormonais (Silva, 2016) e reprodutivos (Wolfenson and Roth, 2018).

A dissipação insuficiente de calor altera os valores referência de temperatura retal (entre 38,1 e 39,1 °C) (Ferreira et al., 2006) de frequência respiratória (média de 50 mov.min⁻¹) (Silva et al., 2012), frequência cardíaca (entre 60 e 70 bat.min⁻¹) (Rossarolla, 2007) e de temperatura de pelame (entre 31,6 e 34,7 °C) (Martello et al., 2004), porém, muitas vezes a alteração de apenas um desses parâmetros não designa a instalação do estresse térmico aos animais (Rossarolla, 2007).

Alterações significativas também ocorrem no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (Silva, 2016), os quais levam a modificações no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG) (Ferro et al., 2010). A ativação do eixo HHA ocasiona aumento dos níveis de cortisol e catecolaminas, levando a alterações no eixo HHT e diminui a produção dos hormônios tireoidianos (T₃ e T₄), gonadais e afeta o sistema imune (Mukherjee et al., 2011). Ainda, em se tratando de bovinos de leite, a principal alteração percebida é a queda na produção e qualidade do leite, fato esse resultante da redução do consumo e maiores níveis dos hormônios adrenérgicos (Cowley et al., 2015). Por conseguinte, a utilização de mecanismos que visem minimizar os danos causados pelo estresse térmico sobre os animais, no caso vacas leiteiras, se tornam essenciais para melhor manutenção e êxito da atividade (Bernabucci et al., 2014).

Como estratégias de diminuição do estresse térmico tem-se: a utilização de sombreamentos (Barbosa et al., 2004), sejam eles naturais, realizados por árvores (Alves et al., 2015), ou artificiais, realizados por diferentes materiais como, telas, telhas, fibrocimento, entre outros (Souza et al., 2010); estratégias de manejo nutricional, como o aumento da oferta de concentrados (Simões, 2014), e a inclusão de minerais, principalmente os perdidos pelo processo de suor como o sódio, magnésio, cálcio, cloro e potássio (Pires, 2013); o cruzamento de raças, que consiste em cruzar animais mais

adaptados fisiologicamente e anatomicamente com os animais menos adaptados buscando animais com características mais favoráveis ao ambiente tropical (Façanha et al., 2013); a utilização de métodos reprodutivos como a inseminação artificial em tempo fixo (sincronizando o estro) e a produção *in vitro* de embriões (transferência de embriões que já passaram da fase crítica de sensibilização térmica); e por fim, a utilização de mecanismos adiabáticos evaporativos, que tem como fundamento a utilização da água para umidificar o ambiente ou o animal, resultando em maior conforto aos animais (Wolfenson and Roth, 2018).

O investimento em Sistema de Resfriamento Adiabático Evaporativo (SRAE) é uma alternativa viável, com retorno financeiro garantido e que proporciona bem-estar aos animais (Martello et al., 2004). Inúmeros trabalhos utilizando SRAE e analisando sua influência sobre parâmetros fisiológicos, reprodutivos e de bem-estar já foram realizados, principalmente em sistemas intensivos de criação como *free-stall* ou em sala de espera pré ou pós-ordenha e, em sua grande maioria mostram resultados satisfatórios (Barbosa et al., 2004; Laganá et al., 2005; Legrand et al., 2011, 2009; Spiers et al., 2018), porém, pesquisas e resultados sobre a utilização desses sistemas a pasto ainda são escassos, o que seria de extrema valia principalmente para produtores que não possuem condições de grandes investimentos em galpões e climatizações.

Diante do exposto objetivou-se com este trabalho estudar a eficiência de diferentes sistemas redutores de estresse térmico a pasto e a associação destes sobre características fisiológicas, comportamentais, produtivas, hormonais e reprodutivas de vacas lactantes e novilhas púberes das raças Holandês e Jersey.

II. REVISÃO DE LITERATURA

1. Variáveis meteorológicas

Animais criados em países de clima tropical e a pasto estão mais expostos a condições climáticas adversas do que animais criados em sistemas de confinamentos, tornando-os mais susceptíveis ao estresse térmico (Berman, 2011).

A combinação da temperatura do ar, umidade relativa do ar, chuva, vento e radiação solar compõe o clima, o qual interfere no desempenho animal, podendo afetar fatores produtivos, fisiológicos e reprodutivos, sendo assim, é fator importante de

restrição da eficiência animal, principalmente em sistemas extensivos de criação (Tucker et al., 2008; West, 2003).

A temperatura do ar é o fator climático que quantifica a agitação de moléculas do ar quando a radiação solar atinge a superfície terrestre. É a característica do clima mais sentida de modo direto e pode ser influenciada pela latitude, gases e características físicas do ambiente. A associação de alta temperatura e alta umidade do ar, causam problemas na termólise (Ynoue et al., 2017).

A umidade relativa do ar é o elemento atmosférico dado pela razão entre a pressão parcial de vapor exercida pelas moléculas de água que pairam no ar e a pressão de saturação. A umidade é de grande importância para o conforto animal pois, a alta saturação do ar inibe o processo evaporativo da água pela pele e pelo sistema respiratório, prejudicando a homeostase do corpo, já a baixa saturação pode provocar desidratação e irritação da mucosas (Ferro et al., 2010).

A radiação solar é a designação dada pela transferência de energia térmica através de ondas eletromagnéticas emitidas pelo sol, sendo diretamente responsável pela transferência de calor do ambiente para o animal (Sparrow, 2018).

O vento é a movimentação do ar na atmosfera proveniente de diferentes pressões atmosféricas. A utilização de vento, seja ele de forma natural ou artificial, através de ventiladores, é de grande importância para o conforto dos animais pois, auxiliam na remoção do vapor de água proveniente da transpiração, desde que a temperatura do ar seja menor que a temperatura corporal do animal (Baêta and Souza, 2010).

2. Vias de dissipação de calor dos animais ao ambiente

O ambiente exerce influência na regulação térmica entre o animal e o meio através de mecanismos de transferência de calor. A dissipação de calor de um corpo para o ambiente se dá por quatro formas: condução, convecção, radiação (não evaporativos) e evaporação (ofego e suor) (West, 2003).

As três primeiras vias de dissipação necessitam de gradiente térmico, e são a cerca de 75% das perdas de calor, nela o calor corporal excedido é transferido para o ambiente mais frio. Os outros 25% são representados pela evaporação e são realizados quando os mecanismos não evaporativos não são mais eficientes e a temperatura se encontra acima da zona de conforto térmico dos animais, sendo o último meio de defesa do organismo em relação à temperatura ambiental (Collier et al., 2006).

A condução é o mecanismo de transferência de calor dado por contato direto entre um corpo mais quente para um mais frio, ou seja, quando a temperatura da pele do animal estiver mais elevada que a do ambiente, ele perderá calor para as moléculas de ar (Ferro et al., 2010). A perda de calor do animal por condução também é dependente de características do animal, como, a espessura do pelo e a quantidade de gordura, fatores esses que podem dificultar este processo, sendo o mecanismo de dissipação de calor menos efetivo por necessitar de contato com superfície mais fria (Baêta and Souza, 2010).

A convecção é a forma de dissipação de calor caracterizada pelo movimento de um fluido pela sua diferença de densidade, ou seja, é a perda de calor em que líquidos ou gases entram em contato com um corpo mais quente. Ela pode ocorrer de maneira forçada, pelo uso de ventiladores, ou de forma natural, pela diferença de densidade (Cattelan and Vale, 2013).

A radiação é caracterizada pela transferência de calor através de ondas eletromagnéticas (raios cósmicos, gama, x, ultravioleta, luz visível, infravermelho, ondas hertzianas) que vão desde o final da faixa de luz visível até o início da faixa de micro-ondas (Sparrow, 2018).

E a evaporação é o processo que consiste na passagem gradual do estado líquido para o estado gasoso, pelo aumento da temperatura. Quando a temperatura ambiente excede a zona de conforto térmico dos animais os mecanismos de dissipação de calor não são mais efetivos, então, os animais utilizam mecanismo evaporativos para manterem sua temperatura em equilíbrio, via evaporação do suor e da respiração (Maia et al., 2009).

3. Zona de conforto térmico

Os bovinos, como todos os mamíferos, mantêm sua temperatura corporal relativamente constante, independente das variações de temperatura do ambiente, sendo assim, denominados, animais homeotérmicos. Para manterem a temperatura corporal, os animais lançam mão de mecanismos fisiológicos e comportamentais (Ferro et al., 2010).

Dentro de uma faixa de temperatura, os animais mobilizam minimamente mecanismos para a sua termorregulação, essa faixa é determinada de zona de conforto térmico ou termoneutralidade, sendo limitada pela temperatura crítica superior e temperatura crítica inferior (Ferro et al., 2010).

Na literatura não há concordância entre os limites da zona de conforto térmico pois, esta pode variar com as variáveis climáticas, raça, nível de produção, nutrição e estágio fisiológico. Segundo Pereira (2005) essa faixa varia de 0 a 16 °C para animais de

origem europeia (*Bos taurus taurus*) e de 10 a 27 °C para animais de origem indiana (*Bos taurus indicus*). Para Martello et al. (2004), vacas em lactação estão em conforto térmico quando a temperatura está entre 4 a 24 °C, porém essa faixa pode variar de acordo com a umidade o ar podendo ser de 7 a 21 °C. Para Nascimento et al. (2013), a zona de conforto térmico para animais leiteiros varia de 10 a 20 °C.

4. Índices de conforto térmico

São dois os índices mais utilizados para verificação do conforto térmico, sendo eles, o Índice de Temperatura e Umidade (ITU) e o Índice de Temperatura de Globo Negro e Umidade (ITGU) (Façanha et al., 2013).

4.1 Índice de Temperatura e Umidade (ITU)

O Índice de Temperatura e Umidade (ITU) é o índice mais utilizado entre os pesquisadores é de fácil obtenção e associa a temperatura do ar com a temperatura do ponto de orvalho (El-Tarabany et al., 2017). Inúmeras propostas foram realizadas para a aferição do ITU, porém, a mais utilizada é a proposta por Thom (1959) que estimava a sensação de conforto térmico em humanos, e posteriormente adaptada para bovinos por Du Preez et al. (1990).

A equação do cálculo é dada por:

$$ITU = T_{bs} + 0,36 T_{po} + 41,2$$

Em que: T_{bs} : Temperatura do termômetro de bulbo seco, C°; T_{po} : Temperatura do ponto de orvalho, C°.

Deste modo, se o animal estiver dentro de uma faixa de ITU adequada, ele irá desempenhar bem suas funções produtivas. De acordo com Du Preez et al. (1990) essas classes são divididas em: normal, em valores de ITU menores que 70; alerta, em valores de ITU situados entre 70 a 72; alerta e acima do índice crítico para perdas na produção de leite, em valores de ITU situados entre 73 a 78; perigo, em valores de ITU situados entre 79 a 82; e emergência, em valores de ITU situados acima de 82. Porém, pesquisas mais recentes mostram que valores de ITU de 68 já são considerados prejudiciais aos animais, principalmente vacas de alta produção, podendo ocorrer perda de 2,2 kg/leite por dia (Zimbelman et al., 2009); Entretanto, essa faixa de valores pode variar de acordo com a idade, estágio fisiológico e raça do animal.

Sendo assim, a aplicação do ITU por produtores de leite é uma ferramenta para tomadas de decisão quanto ao a adoção de estratégias para redução do estresse térmico, e assim diminuir perdas econômicas que estes possam vir a ter (Bertocchi et al., 2014). Cerutti et al. (2013) em pesquisa com vacas da raça Holandês, avaliaram a aspersão associada a sombra na sala de espera e a não climatização da sala de espera. Os autores observaram que o ITU para o grupo das vacas submetidas a sala climatizada apresentou valor de 71,34, caracterizado como valor normal, já o valor obtido para as vacas do tratamento sem climatização foi 79,76, considerado de perigo aos animais, o que levou a uma diminuição da produção de leite, mostrando assim, a importância de um ambiente climatizado para um melhor bem-estar aos animais.

Em animais mestiços de Holandês x Zebu, gerando vacas $\frac{1}{2}$ sangue, $\frac{3}{4}$ e $\frac{7}{8}$ HZ foram observados valores de ITU de 80, 77 e 75, respectivamente, e estes não afetaram a temperatura retal dos animais. O estudo concluiu que, as vacas $\frac{1}{2}$ sangue HZ possuíam maior tolerância ao calor que as $\frac{7}{8}$ HZ. Em vista disso, o intervalo de grau de sangue entra como alternativa para a definição do cruzamento que gere maior rentabilidade na produção. Porém, mais estudos ainda são necessários para a determinação adequada de ITU para animais mestiços (Azevedo et al., 2005).

4.2 *Índice de Temperatura de Globo Negro e Umidade (ITGU)*

O Índice de Temperatura de Globo Negro e Umidade (ITGU) foi criado por Buffington et al. (1981) e associa a temperatura de globo negro e a temperatura de ponto de orvalho. O termômetro de globo negro quantifica a carga térmica radiante, que é a quantidade total de energia térmica que um indivíduo troca com o ambiente (Buffington et al., 1981)

A equação do cálculo é dada por:

$$ITGU = TGn + 0,36 Tpo + 41,5$$

Em que: TGn: Temperatura do globo negro, °C; Tpo = Temperatura do ponto de orvalho, °C.

De acordo com Baêta e Souza (2010) valores de ITGU até 74 pontos denominam conforto aos animais; valores entre 75 e 78, situação de alerta; valores entre 79 e 84, perigo; e valores acima de 85 emergência, e cuidados devem ser tomados imediatamente.

Entretanto, assim como o ITU, essa faixa de valores pode variar de acordo com a idade, estágio fisiológico e raça do animal.

Em estudo realizado por Souza et al. (2010) em vacas mestiças (Holandês/Jersey), submetidas a tratamento com sombra ou não, os autores relataram que o uso de sombra proporcionou um ITGU médio de 74, considerado situação de conforto aos animais (e menores valores de temperatura retal e de frequência respiratória), e que o grupo de vacas sem sombra possuíram um ITGU de 78 considerado situação de alerta.

Já para Martello et al. (2004), a influência do ITGU em vacas da raça Holandês em três ambientes (controle; sombrite; e aspersão + ventilação), constataram que a menor média de ITGU foi para o ambiente climatizado (75), porém, esse valor não refletiu em maior consumo de alimentos e de produção de leite, e esse valor não foi associado a algum tipo de estresse, mostrando que mais estudos devem ser realizados acerca dos valores críticos de ITGU para os animais.

5. Parâmetros comportamentais

Para manterem a temperatura corpórea, quando em estresse térmico, os animais alteram padrões fisiológicos e de comportamento como tentativa de diminuir ou de se libertarem dos estímulos que causam esse estresse. Uma das principais e mais visíveis mudanças comportamentais é a diminuição da ingestão de matéria seca, que leva ao menor tempo de ruminação e maior tempo em ócio e, conseqüentemente a diminuição na quantidade de calor despendida nessa ação (Wankar and Yadav, 2018). A menor ingestão de alimentos leva também a menor disponibilidade de energia para a produção leiteira, que pode ser diminuída de 25 a 40% (Staples and Thatcher, 2011).

O padrão de alimentação também sofre alterações. Os animais se alimentam mais vezes, porém em porções menores, tendo preferência por se alimentarem e pastejaram nas horas mais frescas do dia. Há também a preferência por alimentos concentrados em relação à forragem, assim, têm-se menor gasto energético no processo de digestão, pois a digestão da fibra gera alto esforço muscular (Malafaia et al., 2011). Observa-se também o aumento na ingestão de água (Wankar and Yadav, 2018).

Animais submetidos em altas temperaturas também podem apresentar respiração ofegante, salivação aumentada, inquietações como chutes e abano de caudas, podendo apresentar muco as narinas e maior quantidade de lágrimas nos olhos (Wankar and Yadav, 2018).

Lágana et al. (2005) avaliaram o comportamento de vacas da raça Holandês em sistema de *free-stall*, recebendo aspersão com água ou não (controle), constataram que o consumo de água foi maior e mais frequente no grupo controle, e que estes procuraram com maior frequência a alimentação levando para maior quantidade de fezes e urina.

Para Wankar e Yadav. (2018) em estudo em que os animais foram submetidos à crescentes temperaturas (25, 30, 35 e 40 °C), os animais apresentaram principalmente nas temperaturas mais elevadas, todos os sinais anômalos de desconforto, como: perda de peso, resultado de ingestão menor de alimentos; suor; ofego; salivação excessiva; diminuição da ruminação; e aumento da ingestão de água.

6. Parâmetros fisiológicos

6.1. Frequência respiratória

O aumento da frequência respiratória é o primeiro sinal visível de animais em estresse térmico, e se mostra como método eficiente de perda de calor do animal para o ambiente, porém, se exigido por grande período de tempo, pode interferir na ingestão de alimentos, ruminação, provocar calor endógeno e desviar energia que seria utilizada para outros processos (Silva et al., 2012).

A frequência respiratória alterada por longos períodos pode causar alcalose respiratória. A alcalose se instala devido ao aumento da taxa respiratória, ocasiona maior eliminação de CO₂ dos pulmões, levando à queda de CO₂ sanguíneo, sendo assim, os rins aumentam a excreção de HCO₃ pela urina, para que a relação de CO₂/ HCO₃ seja mantida, tornando assim o pH do sangue mais alcalino (Das et al., 2016).

Hahn et al. (1997) relataram que valores de FR em até 60 movimentos por minutos indicam ausência de estresse térmico, valores situados acima de 120 mov.min⁻¹ indicam carga excessiva de calor, e valores acima de 160 mov.min⁻¹ são classificados como estresse severo, e medidas emergenciais devem ser tomadas.

Segundo Silva et al. (2012) a FR de bovinos nunca será maior do que 50 mov.min⁻¹ enquanto a temperatura ambiental for abaixo de 26 °C, e que, para vacas da raça Holandês, a frequência respiratória começa a aumentar com a temperatura ambiente em cerca de 18 °C e para vacas Jersey essa temperatura é de 21 °C.

Naas et al. (2001) avaliaram três métodos de redução de estresse térmico para vacas leiteiras a pasto durante o período do outono no estado de São Paulo, Brasil. Os tratamentos foram: sombreamento artificial (S), sombreamento mais ventilação (SV) e sombreamento associado a ventilação e aspersão (SVA). Os autores constataram que a

frequência respiratória foi semelhante em todos os mecanismos utilizados para redução do estresse térmico (34,8 para S, 32,56 para SV e 34,76 para SVA) ficando assim evidente que o uso de sistemas para redução do estresse térmico sejam eles sombreamento ou sistemas adiabáticos evaporativos são benéficos para os animais.

Resultados semelhantes foram encontrados por Avendaño-Reyes et al. (2010), os autores testaram diferentes horários de resfriamento em vacas da raça Holandês (somente antes da ordenha; antes da ordenha e às 11 horas; às 23 horas e antes da ordenha; e às 11 e às 23 horas), e concluíram que os animais que foram submetidos ao resfriamento por maior tempo obtiveram melhores valores de frequência respiratória e temperatura retal, o que influenciou em melhores parâmetros produtivos leiteiros.

6.2 *Temperatura retal*

A temperatura retal (TR) é um dos principais índices de avaliação para a adaptabilidade fisiológica dos animais em ambientes quentes. Deve-se ter um equilíbrio entre o calor que o corpo ganha e perde, pois, o aumento de apenas 1 °C na temperatura retal mostra que os mecanismos para dissipação do calor foram insuficientes e que, a homeotermia não está mantida, instalando assim o estresse térmico (Silva et al., 2012).

A temperatura retal normal média para bovinos é de 38,3 °C, podendo variar de acordo com a raça, estágio fisiológico, idade, nível nutricional e horário do dia em que se afere. Na literatura existem variações dessa medida: para Ferreira et al. (2006) varia de 38,1 a 39,1 °C e para Du Preez (1990) de 38 a 39,5 °C.

Ferreira et al. (2006) avaliaram a TR de bovinos no período manhã e tarde durante as épocas de verão e inverno e constataram que os valores se apresentaram normais no período da manhã em ambas as épocas (média de 38,02 °C), porém os valores da tarde foram superiores em ambas as épocas (média de 40,59 °C para inverno e 41,14 °C no verão), evidenciando que os animais não conseguiram manter a homeotermia e que a TR pode sofrer variação de acordo com a hora do dia, apresentando ritmo circadiano.

Cerutti et al. (2013) avaliaram a influência do uso de climatização (sombreamento associado a aspersão) ou não na sala da espera, e obtiveram resultados mais favoráveis de temperatura retal para os animais que receberam a climatização (38,8 °C) aos animais que não desfrutaram da climatização (39,4 °C) ressaltando a importância do uso de medidas que visem diminuir o estresse térmico dos animais.

6.3 *Frequência cardíaca*

A frequência cardíaca (FC) pode variar por fatores intrínsecos e extrínsecos, sendo esses, as variáveis climáticas e ambientais, e aqueles, dependentes de respostas físicas como exercícios, produção de leite e medo (Ferreira et al., 2006). O grau de adaptabilidade dos animais a intensidade do estresse térmico também causam variações na frequência cardíaca (Cerutti et al., 2013).

Valores normais de frequência cardíaca, para bovinos adultos, situam entre 60 a 70 batimentos por minuto, porém valores acima de 70 batimentos por minuto, isoladamente, não caracterizam a instalação do estresse térmico no animal, como já mencionado a frequência cardíaca pode variar por outros fatores (Rossarolla, 2007).

Segundo valores encontrados por Cerutti et al. (2013), a frequência cardíaca de vacas da raça Holandês, submetidas a tratamento com ou sem climatização (aspersão) na sala de espera, foi menor a cerca de 12 batimentos por minuto, quando comparadas aos animais do tratamento controle (54 e 67 bat./min⁻¹), mostrando novamente a importância de sistemas que visem diminuir o estresse térmico dos animais.

6.4 Temperatura de pelame

O pelame é um dos principais protetores térmicos dos animais, tanto para o frio quanto para o calor. Sua temperatura pode variar de acordo com a temperatura ambiental, umidade do ar, incidência de radiação solar, velocidade do vento (Nascimento et al., 2013) e cor (Martello et al., 2004).

Em ambiente tropical, o ideal para bovinos seria uma capa de pelame claro, com pelos assentados, curtos, grossos, e epiderme pigmentada (Martello et al., 2004). O pelame de cor branca tem maior capacidade de reflexão dos raios solares que o atingem e o de cores pigmentadas maior capacidade de absorção da radiação solar.

Maia et al. (2009), em estudo sobre o pelame de vacas da raça Holandês em ambiente tropical, perceberam que a pelagem branca era mais densa, com pelos mais compridos e possuía condutividade térmica maior do que o pelame preto (53.15 mW.m⁻¹.K⁻¹ versus 49.25 mW.m⁻¹.K⁻¹), sendo assim, animais com maior quantidade de malha branca sofreriam menos com o estresse térmico.

Para a adequada aferição da temperatura superficial do pelame (TP) é necessário a retirada aferição por meio de câmeras termográficas ou infravermelhas, em diversas regiões do corpo do animal, como: a cabeça, pescoço, garupa, flanco, cernelha e barriga. A aferição de temperatura em diversas regiões se justifica porque o corpo do animal

possui diferentes temperaturas devido pelas atividades metabólicas que exercem, e podem variar de 31,6 °C a 34,7 °C (Martello et al., 2004).

7. Parâmetros hematológicos

O sangue e seus componentes estão envolvidos com a regulação térmica dos animais. Deste modo, um hemograma entra como parâmetro para avaliar o estresse térmico em animais e sua adaptação. Porém, valores de referência podem mudar de acordo com o sexo, idade, raça, estágio fisiológicos, hora do dia e clima (Souza et al., 2011).

O estresse calórico faz com que os animais utilizem de mecanismos para maior dissipação de calor, como o aumento da frequência respiratória, suor, vasodilatação e ofego. Assim, o animal perde maior quantidade de líquido, levando a redução do volume plasmático, fazendo com que haja aumento no hematócrito (Souza et al., 2011).

Variações nas células sanguíneas interferem nos valores do hematócrito (porcentagem do volume de hemácias pelo volume total de sangue), na quantidade de leucócitos, de eritrócitos e conseqüentemente o teor de hemoglobina no eritrócito (Iriadam, 2007)

Ferreira et al. (2009) analisaram o efeito do estresse calórico no período da manhã e tarde, sobre parâmetros sanguíneos de bovinos, e encontraram valores mais elevados de hemácias, hemoglobina e de hematócrito no período da tarde. Concluindo assim, que nas horas mais quentes do dia os valores sanguíneos são mais elevados, causado pela hemoconcentração por perda de líquidos do corpo.

Dalcin et al. (2016) analisaram parâmetros hematológicos em vacas leiteiras Holandês (HO) e Girolando ($\frac{1}{2}$ e $\frac{3}{4}$ HO) e constataram que os maiores valores de hemácias, hematócrito e hemoglobina foram encontrados para o grupo $\frac{1}{2}$ HO de animais, e que tal fato pode estar relacionado a diferenças genéticas, manejo ou nutrição.

Por outro lado, Nasr e El-tarabany. (2017) estudaram a influência do estresse térmico sobre cabras leiteiras e observaram que o teor de leucócitos diminuiu com o aumento do índice de temperatura e umidade, fato atribuído para a maior concentração de cortisol, resultante de estresse agudo nos animais, o qual pode afetar o sistema imune celular.

8. Parâmetros minerais

Os minerais possuem função importante no organismo, sendo fundamentais na formação de ossos, dentes, coagulação do sangue, funcionamento do sistema nervoso, na regulação da pressão osmótica e do equilíbrio ácido-básico dos fluídos do corpo. O aumento na temperatura do ambiente altera a concentração dos minerais podendo estes variar de acordo com a duração e intensidade calórica em que os animais estão submetidos (Wankar and Yadav, 2018).

O K^+ é o principal cátion intracelular, enquanto o Na^+ e o Cl^- são os principais íons extracelulares. Animais em estresse severo apresentam grandes perdas de K^+ , sendo este o principal íon eliminado pelos ruminantes pelo suor. Temperaturas elevadas diminuem a concentração de K^+ e Na^+ , consequência da eliminação de sais como o cloreto de potássio (KCl), bicarbonato de potássio ($KHCO_3$) e bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) pelo suor e pela urina, enquanto o Cl^- aumenta, provocando redução na excreção de H^+ e na reabsorção de HCO_3 pelos rins (Marai and Haezeb, 2010).

Em estudo realizado em animais submetidos a diferentes temperaturas (25, 30, 35 e 40 °C), os níveis séricos de Na^+ , K^+ diminuíram com o aumento da temperatura, resultado de maior aumento da excreção desses íons, causando balanço mineral negativo. Já o nível sérico de Cl^- aumentou com o aumento das temperaturas, em decorrência da excreção renal da base, sendo as alterações na concentração de Cl^- geralmente proporcionais a concentração de sódio, da água corporal e do volume plasmático e inversamente proporcionais ao bicarbonato plasmático (Wankar and Yadav, 2018).

Por outro lado Ferreira et al. (2009a) encontraram aumento dos íons de sódio e potássio em animais submetidos ao estresse calórico agudo, no período da tarde, resultado de maior produção de mineralocorticoides maior reabsorção tubular de sódio e do aumento da transferência de potássio do líquido intracelular para o líquido extracelular, advindos da desidratação observada.

9. Alterações de hormonais

As variações nas concentrações de alguns hormônios servem como respostas endócrinas ao estresse térmico. Sendo assim, o estudo do efeito do estresse calórico sobre alterações hormonais é de suma importância. São exemplos desses hormônios, o cortisol, hormônios tireoidianos (T_3 e T_4), a insulina e hormônios gonadotróficos (LH e FSH).

9.1 Cortisol

Uma das maneiras que o organismo animal responde ao estresse térmico é pela variação da secreção de hormônios do sistema neuroendócrino, através da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (Dalcin et al., 2016).

A ativação do eixo HHA se dá quando o estímulo estressante por meio de impulsos nervosos chega ao sistema nervoso central atuando sobre as células paraventriculares do hipotálamo que secretam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH). O CRH por vias capilares é transportado do hipotálamo para a hipófise, promovendo maior produção e secreção do ACTH (hormônio adrenocorticotrófico). O ACTH é transportado pela circulação até a medula adrenal, e esta, aumenta a secreção do cortisol. (Encarnação, 1986).

O cortisol é denominado hormônio glicocorticoide, sintetizado do colesterol, e é a resposta mais relevante para as condições de estresse do eixo HHA. Possui efeito catabólico, ocasionando a degradação de tecidos musculares e de gordura, disponibilizando glicose na circulação (em situação de perigo a glicose é utilizada como fonte de energia rápida) (Dalcin et al., 2016).

Em trabalho realizado por Ferreira et al. (2009a) em bovinos submetidos a condições de termoneutralidade (22 °C a 70% de umidade) e ao estresse calórico (42 °C e 60% de umidade), nas estações de verão e inverno, nos períodos da manhã e da tarde, foi concluído que houve maior concentração de cortisol no verão, principalmente no período da tarde, quando a temperatura se encontrava mais elevada, resultando em estresse calórico agudo aos animais.

De acordo com Veissier et al. (2018) vacas leiteiras submetidas a pastagem sem sombra e com sombra de árvores e telas, o grupo de animais que tiveram acesso a sombra possuíam menores taxas de respiração, de temperatura retal e de concentração de cortisol. Os autores ressaltam que em países de clima temperado o uso de mecanismos que proporcionam maior bem-estar aos animais é essencial.

9.2 Hormônios tireoidianos (T_3 e T_4)

Os hormônios produzidos pela tireoide estão associados à termogênese, pois aumentam a taxa metabólica, por mecanismos como, a elevação do consumo de oxigênio dos tecidos; pela maior disponibilização de glicose; e estimulação da síntese de proteína (Horowitz, 2002).

O processo de adaptação ao calor diminui os níveis endógenos de triiodotironina (T_3) e tiroxina (T_4), ou seja, animais submetidos a ambientes em que a zona de conforto

destes seja excedida, possuem menores níveis desses hormônios, e conseqüentemente menor produção de calor metabólico (Wankar and Yadav, 2018).

O T_4 é o produto da glândula tireoide, sendo sua produção regulada pelo eixo HHT. O hormônio liberador de tireotrofina (TRH), regula a liberação do hormônio estimulador da tireoide (TSH) pela hipófise anterior, e este atua na tireoide promovendo a síntese de seus hormônios (T_3 e T_4). O T_3 é a forma ativa do hormônio, resultante da deiodação enzimática do T_4 (Todini et al., 2007).

Animais em estresse térmico necessitam diminuir o metabolismo, com esse propósito há menor deiodação do T_4 em T_3 , sendo assim menores níveis de triiodotironina serão encontrados em ambientes quentes (Todini et al., 2007).

Em trabalho realizado por Morais et al. (2008), os autores avaliaram características termorreguladoras em 200 vacas leiteiras e concluíram que o grupo animal que obteve maiores valores de frequência respiratória e temperatura retal, foram resultantes de épocas de maior carga térmica radiante e maior índice de temperatura e que estes refletiram em menores concentrações plasmáticas de hormônios tireoidianos.

Nascimento et al. (2013) estudaram o perfil dos hormônios tireoidianos em vacas das raças Guzerá e Holandês em ambiente tropical e relataram que a concentração de T_4 varia de acordo com a composição genética, sendo encontrados níveis menores em animais da raça Guzerá (75,17 ng/mL, contra 82,27 ng/mL) mostrando assim que raças zebuínas são mais adaptadas a ambientes quentes.

Já Avendaño-Reyes et al. (2010) testaram sistemas de climatização em que os animais foram resfriados: Somente antes da ordenha; antes da ordenha e às 11 horas; às 23 horas e antes da ordenha; e às 11 e às 23 horas, e a influência destes sobre aspectos fisiológicos. Os autores concluíram que, os níveis de hormônios da tireoide foram estatisticamente semelhantes mostrando que, para que se tenham resultados satisfatórios a constância e a frequência no resfriamento dos animais são necessárias para que o estresse térmico seja reduzido efetivamente, principalmente na época do verão.

9.4 Insulina

A insulina é um hormônio anabólico, produzido pelas células β -pancreáticas e está envolvida na regulação do metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. Não se sabe ao certo os mecanismos, porém, animais estressados termicamente possuem maiores níveis de insulina no sangue (Baumgard and Rhoads, 2012).

Animais em estresse térmico tendem a diminuir a ingestão de alimentos. Essa diminuição faz com que o animal entre em balanço energético negativo (BEN), se não forem tomadas medidas necessárias (Bernabucci et al., 2010). Vacas em homeotermia no início da lactação, geralmente se encontram em BEN, e como consequência possuem aumento de ácidos graxos não esterificados (AGNE) no sangue. Esse aumento se dá pela mobilização de gordura corporal com finalidade de acrescer a demanda energética que está em falta para o animal.

Vacas termicamente estressadas possuem menores níveis de AGNE no sangue, resultantes de maior teor de insulina sanguínea, que causam menor intensidade na mobilização de reservas corporais. Sendo assim, a glicose utilizada pelos tecidos aumenta, porém, os motivos para tal fato ainda não são claramente elucidados. (Bernabucci et al., 2010)

O aumento do uso de glicose por outros tecidos, principalmente o tecido muscular esquelético, diminui a demanda de glicose para a glândula mamária, prejudicando a síntese da lactose, causando queda na produção e na qualidade leiteira (Baumgard and Rhoads, 2012).

9.4 LH e FSH

Como já visto, em decorrência do calor excessivo, alterações significativas acontecem nos eixos HHA e HHT que resultam em alterações no eixo HHG, ou seja, afetam o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG) (Ferro et al., 2010).

Um desses hormônios é o GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas), que é inibido pelo CRH, e conseqüentemente há a diminuição da liberação do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH), prejudicando, o ciclo de reprodução dos animais (Rocha et al., 2012). Porém, inúmeros estudos realizados sobre o comportamento e variações desses hormônios durante o estresse térmico mostram resultados inconsistentes, muitas vezes sendo aumentados, diminuídos ou inalterados (Rensis and Scaramuzzi, 2003).

O LH possui ação nos ovários e têm a função de promover o crescimento final do folículo e a formação do corpo lúteo (produz progesterona). O FSH possui função principal no desenvolvimento dos folículos e conseqüentemente na produção de hormônios foliculares (estrógeno e inibina), podendo assim, ser visto que, esses hormônios possuem ações interligadas (Wolfenson et al., 2000). Sendo assim, alterações na produção do LH e FSH acarretam inúmeros problemas na reprodução dos animais,

como: na diminuição da detecção do estro, qualidade e quantidade de oócitos, na implantação e fertilização (Ozawa et al., 2002).

O estresse calórico, principalmente o estresse crônico, leva à diminuição do LH, que prejudica a fase pré-ovulatória, resultando em folículos menores, que podem se desenvolver parcialmente (causando atraso na onda folicular) ou podendo não eleger um folículo dominante com ovócitos de qualidade inferior, diminuindo assim o estro (Wolfenson and Roth, 2018).

A diminuição da intensidade do estro também pode ser decorrente do aumento dos níveis de cortisol, (Das et al., 2016) e da diminuição da aromatase, que resulta na diminuição do estrógeno (hormônios com ação na ovulação e no desenvolvimento de características femininas) (Wolfenson and Roth, 2018). A aromatase é a enzima chave para a síntese de estrogênio pois, um dos seus sítios de ligação, o esteroidal, liga-se ao androgênio para que o estrogênio seja produzido, sendo assim, sua redução diminui a secreção de estradiol, diminuindo os sinais do estro, a ovulação e a fertilização (Wolfenson and Roth, 2018)

A diminuição da aromatase foi observada por Guzeloglu et al. (2001), em vacas leiteiras não lactantes, alocadas em câmeras bioclimáticas com temperaturas elevadas. Segundo os autores, observou-se diminuição do estradiol e aumento da progesterona, resultantes da menor atividade de aromatase.

Roth et al. (2005) estudaram o efeito do estresse calórico sobre a produção de esteroides. Os autores relataram que a produção de estradiol no fluído folicular diminuiu, resultado de menor desenvolvimento dos folículos, que prejudica também a produção de hormônios envolvidos na maturação dos oócitos.

Wolfenson et al. (2001) analisaram as diferenças sazonais na produção de progesterona *in vitro*, constataram que houve diminuição de progesterona no verão (a cerca de 3 vezes menos, 100 *versus* 324 ng), fato relacionado a danos aos folículos e ao pequeno corpo lúteo formado. Os autores ainda enfatizaram que algum modo de resfriamento deve ser tomado como medida de mitigação do estresse térmico para que os animais não tenham maiores problemas com a fertilidade

9.4.1 Produção *in vitro* de embriões

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma ferramenta de biotecnologia reprodutiva que permite o encontro entre oócito e espermatozoide em laboratório, fora do sistema reprodutor da fêmea (Varago et al., 2008). Três etapas compreendem a PIVE,

sendo elas a maturação oocitária, a fecundação oocitária e o cultivo embrionário *in vitro*.

A maturação *in vitro* (MIV) consiste na capacitação do oócito para futura fecundação (Palma, 2001). Essa capacitação ocorre no núcleo através da condensação da cromatina e dissolução da membrana nuclear pela quebra da vesícula germinativa. Na fecundação *in vitro* (FIV) o sêmen, já capacitado é depositado em gotas nos oócitos, e ficarão de 18 a 24 horas em estufa por 38,5 °C, atmosfera controlada com 5% de CO₂ e umidade saturada (Gonçalves et al., 2007). E, por fim o cultivo *in vitro* (CIV), etapa que consiste no desenvolvimento do embrião através de sucessivas clivagens. Sete dias após a FIV os embriões estarão em estágio de blastocisto, fase que serão transferidos para as doadoras, congelados ou vitrificados (Reis Silva et al., 2017).

Porém, a PIVE como qualquer outra ferramenta possui vantagens e desvantagens. Como desvantagens tem-se: A dificuldade de criopreservação embrionária, o alto custo estrutural e dos equipamentos (Gonçalves et al., 2007) o cultivo dos embriões durante o transporte (Cavaliere et al., 2015), a padronização dos meios de cultivo utilizados (Peixer et al., 2018), a habilidade dos técnicos e também fatores inerentes aos equipamentos utilizados para a aspiração dos folículos como o transdutor, o tamanho, largura e calibre da agulha e a pressão de vácuo (Carneiro et al., 2019). Já como vantagens tem-se: Melhores resultados em relação a outras técnicas reprodutivas, aumento do melhoramento genético animal, diminuição do intervalo entre partos (aumentando o número de crias), otimização do uso do sêmen e a utilização de animais de diversas idades (bezerras pré púberes, vacas lactantes ou mesmo mortas) sem que parâmetros fisiológicos dos animais sejam prejudicados (Martins, 2010).

9.4.2 O estresse térmico e a produção *in vitro* de embriões leiteiros

Uma das principais consequências do estresse térmico sobre a dinâmica folicular é o aumento da quantidade de folículos pequenos e médios, resultantes da diminuição da inibina e do FSH (Hansen, 2009). De acordo com Wolfenson e Roth (2018), temperaturas corporais maiores do que 40 °C, tornam os folículos inviáveis, podendo afetar toda a onda folicular. O estresse térmico não afeta somente os folículos emergentes, mas também os folículos antrais, com aproximadamente 0,5 a 1,0 mm de diâmetro, mostrando assim que, os efeitos deletérios do estresse térmico podem perpetuar por várias ondas foliculares (Roth et al., 2001).

O aumento da temperatura corporal acima de 40 °C também impede o desenvolvimento embrionário pois, causa menor fluxo sanguíneo para o útero, e

consequentemente menor aporte e nutrientes para o embrião (Ferro et al., 2010; Wolfenson and Roth, 2018), causando também diminuição da glutathione peroxidase (Ozawa et al., 2002) e aumento na quantidade de radicais livres que se ligam a outras moléculas, ocasionando danos que diminuem o desenvolvimento dos embriões (Hansen, 2009).

Devido a esses motivos a produção *in vitro* de embriões entra como ferramenta biotécnica para que não haja tamanha interferência do estresse térmico sobre a reprodução das fêmeas leiteiras, minimizando a perda embrionária, pelo fato de que o cultivo, a maturação dos oócitos e a fertilização são realizadas em ambiente propício para o melhor desenvolvimento do embrião, e que a transferência para a fêmea receptora é realizada apenas com 7-8 dias, fase em que o embrião é menos susceptível ao estresse térmico (Ferro et al., 2010; Fialho et al., 2018).

Em experimento realizado por Al- Katani et al. (2002) os autores observaram que a produção *in vitro* com a posterior transferência de embriões melhorou a fertilidade das vacas leiteiras em estresse térmico quando comparadas com vacas submetidas a inseminação artificial. Mostrando que, os melhores resultados foram decorrentes das condições adequadas que a produção *in vitro* proporciona de ambiente, temperatura e meios e que a transferência só ocorre quando os embriões já se encontram mais resistentes ao estresse térmico.

Carneiro et al. (2019) avaliaram o efeito da estação do ano (verão/inverno) na Bahia, sobre a qualidade oocitária de bovinos e constataram que os oócitos dos animais analisados no verão foram menos viáveis (10,2% vs. 42,8%) e tiveram maior porcentagem de oócitos desnudos e de grau III (indesejável para produção *in vitro*). Resultados estes devido ao ambiente em que os animais foram submetidos, pois ambientes quentes alteram propriedades biológicas e químicas dos oócitos interferindo na organização dos microtúbulos, proteínas e do fuso meiótico, modificações estas que podem interferir nas taxas reprodutivas durante a fecundação *in vitro*. Sendo assim os autores concluem que a implementar a PIVE em localidades de clima quente pode trazer maiores taxas de sucesso nas demais etapas da PIVE.

10. Parâmetros bioquímicos

10.1 Ureia

A ureia é uma substância sintetizada no fígado resultante do catabolismo de aminoácidos e no caso de ruminantes também da reciclagem de amônia do fígado (Wankar and Yadav, 2018).

A concentração de ureia no sangue pode aumentar por diversos fatores, como: dieta com excesso de proteína ou de fontes de nitrogênio proteico; deficiência de energia resultante de diminuição da utilização de nitrogênio pelo rúmen; e pela maior perda de água, resultante muitas vezes das elevadas temperaturas em que os animais estão submetidos, podendo ser utilizada como parâmetro de desidratação (Marai and Haeb, 2010)

Vacas em estresse térmico, como já explicado anteriormente podem entrar em BEN, e pode ocasionar maior catabolismo de proteínas endógenas para que a lactação seja mantida, fazendo com que as concentrações de ureia e creatinina, albumina e proteína sanguínea aumentem. O aumento desses componentes é geralmente acompanhado de elevação nos valores de hematócrito (Ferreira et al., 2009)

A diminuição da ingestão de matéria seca durante o estresse térmico, diminui também o tempo de ruminação e conseqüentemente a motilidade e a taxa de passagem dos alimentos, sendo assim os alimentos ficam mais tempo no trato gastrointestinal o que possibilita maior degradação da proteína (Wankar and Yadav, 2018).

Em pesquisa realizada por O'Brien et al. (2010), sobre os efeitos do estresse térmico em bezerros, os autores submeteram os animais a dois tipos de ambiente: termoneutro com temperatura variando de 18 a 20 °C e ambiente com temperaturas variando de 29,4 a 40 °C. O grupo de animais estressados apresentou redução de 12% do consumo médio diário quando comparados ao grupo controle e tiveram aumento significativo de 75% dos níveis de ureia no sangue, explicado como ineficiência de incorporar o nitrogênio microbiano do rúmen, pois o estresse térmico pode alterar os padrões de fermentação ruminal.

Por outro lado, nenhum resultado significativo foi encontrado para valores sanguíneos de ureia, albumina e creatinina, em animais Angus e Romosinuano no período em que foram submetidos ao estresse térmico por 14 dias em ambiente variando de 26 a 36 °C. De acordo com os autores, uma das causas do aumento dos níveis sérios de ureia é a desidratação, que no caso, não aconteceu, pois, não houve restrição hídrica durante o estudo (Scharf et al., 2010).

11. Triglicerídeos, colesterol e HDL

O colesterol advém de duas fontes: a exógena proveniente da alimentação, e a endógena, advindo principalmente do fígado, a partir do acetil-CoA, e do intestino. Seu funcionamento é comedido por dois hormônios glicocorticoides, a insulina e o glucagon. Possui a função de compor as membranas celulares e precursor de hormônios esteroides e sexuais (Kaneko et al., 1997). Suas concentrações séricas podem variar de acordo com a idade, produção leiteira, estresse térmico e lactação (Uribe-Velasquez et al., 1998).

A lipoproteína de alta densidade (HDL) em bovinos, corresponde a 80% do total das lipoproteínas do plasma, sendo sintetizada no fígado e intestino (Kaneko et al., 2008). Os triglicerídeos são a principal reserva de gordura dos animais. A maior parte da sua síntese é realizada pelo fígado, porém pode ser gerado pela glândula mamária, intestino, pelo próprio tecido adiposo e pelos rins. Assim, como o colesterol, os triglicerídeos são regulados pela insulina e glucagon (Kaneko et al., 2008).

As concentrações sanguíneas de colesterol, HDL e de triglicerídeos são menores em animais estressados termicamente. Essa diminuição pode ser decorrente de menor concentração de acetato (precursor da síntese de colesterol); pelo aumento da insulina, pois esta dificulta a mobilização de tecido adiposo; ou por maior liberação de cortisol, pois o cortisol utiliza o colesterol como precursor (Marai and Haebe, 2010).

Em estudo realizado sobre a influência do estresse térmico em ovelhas, os autores relataram que, os animais submetidos ao maior estresse (ITU>84) apresentaram valores mais baixos de colesterol e triglicerídeos, quando comparados aos animais submetidos à menores índices de temperatura e umidade (ITU<65). Essa redução foi resultante de menor consumo alimentar, pela diminuição dos hormônios tireoidianos e do aumento do cortisol (Singh et al., 2016).

Scharf et al. (2010) compararam duas raças de bovinos, Angus (AG) e Romosinuano (RO), sobre ambiente termoneutro (18 a 21 °C) e ambientes com altas temperaturas (26 a 36 °C) e concluíram que os animais não possuíam diferenças significativas de colesterol (AG 64,11 e RO 58,01 mg/dL) e triglicerídeos (G 15,22 e RO 15,64 mg/dL), quando em ambiente termoneutro, porém, em ambiente quente os animais da raça Romosinuano apresentaram valores mais baixos de colesterol (RO 64,88 vs. AG 91,55), mostrando que o colesterol é influenciado pelo grau de estresse térmico, e que estes não sofreram estresse como a outra raça, mostrando também que algumas raças são mais termotolerantes que outras.

12. Efeitos do estresse térmico sobre parâmetros de produção e composição do leite

12.1 Produtivos

Vacas leiteiras, principalmente as de alta produção, expressam melhor seu potencial produtivo se estiverem dentro de sua zona de conforto térmico. O aumento de apenas 1 °C acima da sua temperatura crítica superior, acarreta uma série de mecanismos que tem como uma das consequências a redução da produção leiteira (Staples and Thatcher, 2011). Sendo o estresse térmico responsável por 35% da produção leiteira (Baumgard and Rhoads, 2012).

Segundo Cowley et al. (2015) a diminuição da produção leiteira acontece por dois motivos: a diminuição do consumo de ração ou por mecanismos fisiológicos de adaptação do organismo. Segundo os mesmos autores, em estudo com vacas climatizadas progressivamente, estes encontraram queda na produção leiteira de 20% nos animais estressados, porém, este resultado não se deu somente sobre efeito da ingestão de alimentos, mas também pelo desvio de nutrientes para outros tecidos e menos para a glândula mamária, como mecanismo de regulação e adaptação do organismo ao estresse térmico.

Sendo assim, o uso de mecanismos que minimizem o estresse térmico e não comprometa a produção leiteira se torna essencial para a atividade (Bernabucci et al., 2014). Em estudo com vacas da raça Holandês, submetidas ao estresse térmico em câmeras bioclimáticas associadas à ventiladores (ventilação contínua; por 8 horas das 11 às 19 h; e por 8 h durante a madrugada, das 23 às 7 h), constou-se que o grupo de animais submetidos a ventilação contínua tiveram maior produção de leite. Mostrando-se assim mais uma vez o benefício de sistemas que reduzam o estresse térmico dos animais (Spiers et al., 2018).

12.2 Composição do leite

A diminuição nos teores dos componentes do leite como a gordura, proteína e sólidos totais também é observada em animais em estresse térmico, causadas principalmente pela redução da ingestão de alimentos.

Uma das prováveis causas da redução da concentração de gordura é consequência da variação da ingestão de volumosos, o que modifica a relação de acetato/propionato, alterando a composição leiteira (Cowley et al., 2015). Porém, segundo Staples e Tratcher (2011) a diminuição dos teores de gordura no leite pode ser evitada se os animais forem

alimentados com dieta contendo 65% de forragem, caso contrário, pode ocorrer a modificação do perfil de ácidos graxos de leite, sendo os ácidos graxos de cadeia longa aumentados e os de cadeia curta diminuídos. A redução na ingestão de alimentos também está associada com a diminuição na concentração de proteína no leite, em consequência de um menor consumo de proteínas, e leva a diminuição na síntese de proteína microbiana no rúmen (Staples and Thatcher, 2011), porém, uma desidratação leve pode aumentar os níveis de proteína e albumina (Garcia et al., 2015). Por outro lado, o aumento da ingestão de água por animais estressados termicamente traz como consequência maior diluição dos sólidos totais do leite (Ricci et al., 2013).

O estresse térmico também pode causar maior vulnerabilidade no sistema imunológico dos animais, tendo como uma das consequências maior incidência de mastite, que está associado a elevação na contagem de CCS, pois altas temperaturas e umidade aumentam a proliferação de microrganismos e assim há maior vulnerabilidade para infecções. A lactose é o componente do leite que sofre poucas alterações, porém, vacas com CCS alto reduzem a concentração de lactose, pois, sua síntese é diminuída pelas glândulas mamárias, levando a menor produção leiteira dado que a lactose atua como regulador osmótico do volume do leite (Ludovico et al., 2015).

Diminuição nos níveis de cálcio e potássio também podem ser observadas, sendo o potássio um íon com perda exponencial, por ser o principal eletrólito perdido pelo ruminantes através do suor (Cerutti et al., 2013).

Bernabucci et al. (2014) analisaram aproximadamente 1,5 milhão de registros de composição do leite proveniente de mais de 191 mil animais, de 484 fazendas na Itália, durante 35 estações meteorológicas e relataram que durante o período de verão os valores de gorduras, proteínas, sólidos totais e de frações da caseína foram menores quando comparados ao inverno, fatos que também resultaram em piora na coagulação do leite prejudicando a fabricação queijeira.

Já Cerutti et al. (2013) relataram que não houve diferença para nenhum dos componentes do leite entre os grupos de animais submetidos ao uso de sombreamento e aspersão antes da ordenha ou não, fato justificado pelo pouco tempo de climatização recebida pelos animais. Porém, mesmo assim nos animais que tiveram acesso à sombra e aspersão apresentaram melhores parâmetros de frequência cardíaca, retal e respiratória.

13. Estratégias para amenizar os efeitos do estresse térmico em bovinos leiteiros

Entre as principais estratégias para melhor controle do estresse térmico podem-se citar o manejo nutricional, cruzamentos, protocolos reprodutivos como já visto e mecanismos de resfriamento, sendo, sombreamento natural e/ou artificial, uso de água e ventilação, Porém, para que seja tomada a melhor escolha para uma propriedade, deve-se levar em conta as necessidades dos animais, o gerenciamento dos proprietários, do capital a ser investido e da região a ser aplicada.

13.1 Mecanismos diminuidores de estresse térmico

13.1.1 Sombreamento

O uso de sombreamento, seja ele natural ou artificial, entra como alternativa de controle para reduzir os efeitos nocivos que o estresse térmico possa causar, sejam eles na reprodução, produção, ou na saúde dos animais, e deveriam ser o primeiro passo a ser realizado pelos produtores (Barbosa et al., 2004).

Barbosa et al. (2004) avaliaram os efeitos da sombra natural e artificial e aspersão, sobre as respostas fisiológicas e produtivas de vacas leiteiras da raça Holandês, no verão, e concluíram que a utilização de diferentes tipos de sombra para os animais é um meio eficiente de se aumentar o conforto térmico dos animais. Eigenberg et al. (2010) estudaram diferentes tipos de materiais de sombreamento e concluíram que todos os materiais testados propiciaram melhores condições de bem-estar aos animais em comparação a nenhuma disponibilidade de sombra.

Sendo assim, o uso de sombreamento, seja ele natural ou artificial, oferecem boas condições para a criação de animais leiteiros, principalmente nas horas mais quentes do dia (Rodrigues et al., 2010).

13.1.2 Sombreamento natural

Sombras naturais, realizadas por árvores, favorecem ótimo microclima e conseguem diminuir a incidência de radiação solar em até 30% dependendo da espécie, podendo diminuir em ambientes tropicais sob sua copa cerca de 4 °C e, em contrapartida ao sombreamento artificial, proporcionam maior umidade de ar favorecendo o bem-estar aos animais (Alves et al., 2015).

Árvores destinadas ao sombreamento devem possuir determinadas características, como: resiliência, fornecimento de sombra de qualidade, qualidade de copa, tamanho mínimo para boa projeção de sua sombra, folhas perenes, tempo de crescimento rápido e

não devem possuir frutos grandes que possam ser engolidos pelos animais e assim engasgá-los (Souza et al., 2010).

Gurguel et al. (2012) testaram diferentes exemplares arbóreas (pau-de-terra-da-areia, chico-pires e copaíba) sobre índices de conforto térmico, ITU, ITGU, e CTR. A seleção das espécies foi de acordo com a sombra, altura da copa, idade, tamanho de frutos, folhas, cascas e raízes. Os autores concluíram, que a árvore de copaíba foi superior nos testes realizados nos diferentes índices de conforto, retendo cerca de 26% da radiação, mostrando-se uma ótima opção para diminuição dos efeitos do estresse térmico nos animais.

Ferreira et al. (2014) analisaram respostas fisiológicas e comportamentais de vacas em relação a diferentes disponibilidades de sombreamento, sendo os tratamentos: sem sombra; sombra única; bosque; e árvores dispersas. Os autores relatam que os tratamentos bosque e árvores dispersas apresentaram melhores valores para o pastejo, ruminação, consumo de água e menores valores de temperatura retal e frequência respiratória. Mostrando, assim, que a inclusão de sombreamento natural na pastagem para os animais diminui o estresse calórico trazendo benefícios ao animal e economicamente ao produtor.

Resultados positivos também foram encontrados por Veissier et al. (2018) sobre os benefícios do sombreamento em pastagens. Os autores relataram que o uso de árvores associadas a telas, proporcionou maior conforto aos animais quando comparadas ao grupo controle proporcionando menores valores de frequência respiratória, temperatura retal e concentração de cortisol no leite.

13.1.3 Sombreamento artificial

O sombreamento artificial a pasto entra como medida principalmente para animais especializados, podendo ser utilizado em piquetes, ser fixo ou móvel, estar em salas de espera pré e pós ordenha (Cerutti et al., 2013)

As estruturas a serem utilizadas para a construção do sombreamento artificial podem advir de diferentes materiais, como, telas de polipropileno, pilares de eucalipto, palhas, fibrocimento, telhas galvanizadas e de ferro (Souza et al., 2010). Ainda há poucas informações sobre qual o valor de área mínima de sombra ideal para bovinos, porém, essa pode variar de acordo com as diferentes raças, sexo e idade. De acordo com Alves et al. (2015) um bovino deitado ocupa uma área de cerca de 1,8 m², e que sombras próximas a esse tamanho são insuficientes, principalmente em ambientes tropicais, já sombras que

variam de 5,6 e 9,6 m² seriam suficientes para que os animais possuíssem ao seu redor cerca de 0,5 a 1 m, o que já seria suficiente para que não houvesse competição e dominância pelos animais.

O material mais utilizado para sombreamento artificial é o sombrite (tela de polietileno) este possui baixo custo e diferentes potenciais de retenção de radiação, sendo a malha com 80% de proteção a mais utilizada (Conceição et al., 2008).

A utilização de instalações, seja ela de diferentes materiais proporciona melhorias nas respostas fisiológicas dos animais, principalmente animais de alta produção e em ambientes tropicais. Conceição (2008), em estudo sobre sombreamento de novilhas, utilizando telhas galvanizadas, fibrocimento e tela de polipropileno, sobre os aspectos fisiológicos dos animais, concluiu todas diminuíram o estresse térmico dos animais, porém a telha de fibrocimento apresentou melhores resultados.

Schutz et al. (2011) avaliaram a preferência de vacas da raça Holandês por sombra, aspersão e condições ambientais. Os autores constataram que apesar dos parâmetros fisiológicos dos animais serem menores durante a aspersão, a preferência de uso pelos animais foi significativamente maior pela sombra (62 *versus* 38%).

13.1.4 Ventilação

A ventilação, sendo ela natural ou artificial (realizada por ventiladores), é de grande importância, pois, promove a remoção da umidade, dispersão de gases, renova o ar e ajuda na dispersão do excesso de calor, fato este que influencia na diminuição do estresse térmico, principalmente nas horas mais quentes do dia. O uso da ventilação forçada geralmente está associada com algum sistema de resfriamento adiabático evaporativo (Pinheiro, 2012).

13.1.5 Sistema de resfriamento adiabático evaporativo (SRAE)

O uso de sistemas de resfriamento animal utilizando água é relativamente novo. Estratégias com o uso de sistemas bloqueadores de radiação como telas e telhas e o uso de ventiladores muitas vezes se mostravam ineficientes no controle da homeotermia, o que levou a necessidade de criação de mecanismos que utilizassem água, muitas vezes com associação de ventiladores para melhor ambiente e conforto animal fossem realizados (Wolfenson and Roth, 2018).

Os sistemas de resfriamento adiabáticos evaporativos (SRAE) são mecanismos artificiais e têm como objetivo umidificar ou molhar o ambiente em que o animal está

inserido (pasto ou confinamento) ou o próprio animal, resultando assim em melhora no ambiente, e conseqüentemente trazendo maior sensação de conforto e bem-estar aos animais (Wolfenson and Roth, 2018).

O SRAE pode ser classificado em três tipos, baseados na pressão e no tamanho de suas gotas. Sendo eles: “MIST” nebulização de baixa e média pressão; “FOG” nebulização de alta pressão; e “SPRINKLING” sistema de aspersão. Os sistemas também podem ser associados ao uso de ventilação forçada (Pinheiro, 2012).

O sistema de “MIST” e “FOG” diminuem a temperatura do ar através de minúsculas gotas de água que pairam sobre a superfície do ar. Em sistemas de criação a pasto e em ambientes de clima quente esses sistemas não são eficientes, pois, as gotículas evaporam antes mesmo de melhorarem o microclima ou os animais, sendo recomendado para ambientes fechados, já são utilizados em grande número (Perissinotto et al., 2003).

Por outro lado, o sistema de “SPRINKLING” ou aspersão, por ter maior tamanho de gotas de água, molha mais eficientemente a pelagem dos animais, propiciando em maior rapidez a perda de calor do animal para o ambiente (Pinheiro, 2012). O uso de aspersores para animais também traz benefícios quanto a diminuição do número de insetos nos animais e diminuição do ato de tremores e de abano de cauda (Schütz et al., 2011).

De um modo geral, a utilização de algum desses tipos de resfriamento, não só melhora aspectos fisiológicos e produtivos, mas também reprodutivos, sendo estratégicos para diminuir o estresse térmico de vacas, podendo aumentar a taxa de gestação, devendo ser utilizado em todo estágio gestacional (Hansen, 2009; Wolfenson and Roth, 2018).

O estudo da eficiência de diferentes sistemas adiabáticos evaporativos sobre parâmetros produtivos fisiológicos e reprodutivos dos animais é estudado de longa data. Igono et al. (1988) estudaram a utilização de aspersão e ventilação na área de alimentação de vacas leiteiras sobre parâmetros produtivos e fisiológicos. Os resultados mostraram que, a temperatura retal dos animais que estavam sobre aspersão e ventilação foi menor do que os animais que estavam somente na sombra, e estes também produziram a cerca de 2 kg a mais de leite por vaca ao dia, sugerindo assim que a utilização de aspersão é um meio lucrativo ao produtor e favorece maior conforto aos animais.

Perissinotto et al. (2003) estudaram a eficiência do sistema de aspersão e de nebulização associados com a ventilação em um estábulo e concluíram que, ambos os sistemas mantiveram o ambiente em condições ideais para os animais, porém, o sistema de aspersão aumentou a produção de leite em 8% em comparação ao sistema de

nebulização (21,1 litros/vaca *versus* 19,5 litros/vaca), resultado obtido porque o sistema de aspersão tem a finalidade de molhar o animal, enquanto o de nebulização acaba atuando mais sobre o ambiente, sendo que o sistema de aspersão oferece melhor sensação de bem-estar.

Tao et al. (2011) encontraram valores menores de temperatura retal (39 vs. 39,4 °C), frequência respiratória (45,6 vs. 78,4 mov./min⁻¹), maior de produção de leite (33,9 vs. 28,9 kg/dia) e menor quantidade de células somáticas (2,94 vs. 3,35) no grupo de vacas submetidos a aspersão e ventilação quando comparadas ao grupo controle. Os animais resfriados não diminuíram a ingestão de matéria seca e tiveram maior proliferação de células mamárias (3,3 vs. 1%), mostrando que sistemas de resfriamento adiabáticos promovem maior desenvolvimento da glândula mamária e de conforto e bem-estar para vacas leiteiras durante o período seco.

Em contrapartida, em estudo realizado por Schutz et al. (2011) sobre a preferência de vacas entre, aspersão, sombra e o ambiente (controle), os animais mostraram preferência de utilização da sombra sobre os outros ambientes testados, porém, os melhores parâmetros fisiológicos encontrados foram no sistema de aspersão.

REFERÊNCIAS

- Al-Katanani, Y.M., Drost, M., Monson, R.L., Rutledge, J.J., Krininger, C.E., Block, J., Thatcher, W.W., Hansen, P.J., 2002. Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified in vitro produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions. *Theriogenology* 58, 171–182. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00916-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00916-0)
- Alves, F.V., Nicodemo, M.L.F., Silva, V.P. da, 2015. Bem-estar animal em sistema de integração lavoura-pecuária-floresta, in: Embrapa Pecuária Sudeste. pp. 273–289.
- Avendaño-Reyes, L., Álvarez-Valenzuela, F.D., Correa-Calderón, A., Algándar-Sandoval, A., Rodríguez-González, E., Pérez-Velázquez, R., Macías-Cruz, U., Díaz-Molina, R., Robinson, P.H., Fadel, J.G., 2010. Comparison of three cooling management systems to reduce heat stress in lactating Holstein cows during hot and dry ambient conditions. *Livest. Sci.* 132, 48–52. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.04.020>
- Azevedo, M., De Pires, M.F.Á., Satumino, H.M., Lana, Â.M.Q., Sampaio, I.B.M., Monteiro, J.B.N., Morato, L.E., 2005. Estimativa de níveis críticos superiores do índice de temperatura e umidade para vacas leiteiras 1/2, 3/4 e 7/8 holandês-zebu em lactação. *Rev. Bras. Zootec.* 34, 2000–2008. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982005000600025>
- Baêta, F.C., Souza, C.F., 2010. Ambiência em edificações rurais: conforto animal, UFV.

ed. Viçosa, Brasil.

- Barbosa, O.R., Boza, P.R., Tadeu, G.T., 2004. Efeitos da sombra e da aspersão de água na produção de leite de vacas da raça Holandesa durante o verão. *Acta Sci. Anim. Sci.* 26, 115–122. <https://doi.org/https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v26i1.1961>
- Baumgard, L.H., Rhoads, R.P., 2012. Ruminant production and metabolic responses to heat stress. *J. Anim. Sci.* 90, 1855–1865. <https://doi.org/10.2527/jas2011-4675>
- Berman, A., 2011. Invited review: Are adaptations present to support dairy cattle productivity in warm climates? *J. Dairy Sci.* 94, 2147–2158. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3962>
- Bernabucci, U., Biffani, S., Buggiotti, L., Vitali, A., Lacetera, N., Nardone, A., 2014. The effects of heat stress in Italian Holstein dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 97, 471–486. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6611>
- Bernabucci, U., Lacetera, N., Baumgard, L.H., Rhoads, R.P., Ronchi, B., Nardone, A., 2010. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *Animal* 4, 1167–1183. <https://doi.org/10.1017/S175173111000090X>
- Bertocchi, L., Vitali, A., Lacetera, N., Nardone, A., Varisco, G., Bernabucci, U., 2014. Seasonal variations in the composition of Holstein cow's milk and temperature-humidity index relationship. *Animal* 8, 667–674. <https://doi.org/10.1017/S1751731114000032>
- Buffington, D.E., Canton, G.H., Pitt, D., 1981. Black Globe-Humidity Index (BGHI) as Comfort Equation for Dairy Cows. *Trans. ASAE* 24, 711–714. <https://doi.org/doi:10.13031/2013.34325>
- Carneiro, I. de M.B., Ana Lúcia Almeida Santana, P.A.B., Laura Nicole Filipin da Costa, Gabriel Cândido Oliveira Silva, R.S. dos S., Rocha, L.F., Barbosa, L.P., 2019. Oócitos bovinos : influência das estações do ano e maturação in vitro em meio enriquecido com quercetina. *Magistra* 30, 134–142.
- Cattellam, J., Vale, M.M. do, 2013. Estresse térmico em bovinos leiteiros. *Rev. Port. ciencias veterinárias* 108, 96–102.
- Cavaliere, F.L.B., Andreazzi, M.A., Colombo, A.H.B., Emanuelli, I.P., Mreski, D.A.B., Silva, W.M., 2015. Estudo Sobre O Cultivo in Vitro De Embriões Bovinos Durante O Transporte. *Ars Vet.* 31, 07. <https://doi.org/10.15361/2175-0106.2015v31n1p07-11>
- Cerutti, W.G., Bermudes, R.F., Viégas, J., Martins, C.M. de M.R., 2013. Respostas fisiológicas e produtivas de vacas holandesas em lactação submetidas ou não a sombreamento e aspersão na pré-ordenha. *Rev. Bras. Saude e Prod. Anim.* 14, 406–414. <https://doi.org/10.1590/S1519-99402013000300016>
- Collier, R.J., Dahl, G.E., Vanbaale, M.J., 2006. Major advances associated with environmental effects on dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89, 1244–1253. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72193-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72193-2)
- Conceição, M.N. da, Silva, I.J.O. da, Dias, C.T.D.S., 2008. Artificial Shade Effects in the Performance and Physiology of Dairy Heifers in Pasture, in: *In Livestock Environment VIII*, 31 August–4 September 2008, Iguassu Falls, Brazil (p. 119). American Society of Agricultural and Biological Engineers. pp. 827–832.

<https://doi.org/10.13031/2013.25590>

- Conceição, M.N., 2008. Avaliação da influência do sombreamento artificial no desenvolvimento de novilhas leiteiras em pastagens. Escola superior de agricultura luiz de queiroz.
- Cowley, F.C., Barber, D.G., Houlihan, A.V., Poppi, D.P., 2015. Immediate and residual effects of heat stress and restricted intake on milk protein and casein composition and energy metabolism. *J. Dairy Sci.* 98, 2356–2368. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8442>
- Dalcin, V.C., Fischer, V., Dos, D., Daltro, S., Priscila, E., Alfonzo, M., Stumpf, M.T., Kolling, G.J., Vinícius, M., Barbosa, G., Silva, D., Mcmanus, 2016. Physiological parameters for thermal stress in dairy cattle. *Rev. Bras. Zootec.* 45, 458-465. <https://doi.org/10.1590/S1806-92902016000800006>
- Das, R., Sailo, L., Verma, N., Bharti, P., Saikia, J., Imtiwati, Kumar, R., 2016. Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. *Vet. World* 9, 260–268. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.260-268>
- Dikmen, S., Hansen, P.J., 2009. Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment? *J. Dairy Sci.* 92, 109–116. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1370>
- Du Preez, J.H., Giesecke, W.H., Hattingh, P.J., 1990. Heat Stress in Dairy Cattle and Other Livestock Under southern African Conditions. Temperature-humidity index mean values during the four main seasons. *Onderstepoort J. Vet. Res.*
- Eigenberg, R.A., Brown-Brandl, T.M., Nienaber, J.A., 2010. Shade material evaluation using a cattle response model and meteorological instrumentation. *Int. J. Biometeorol.* 54, 601–607. <https://doi.org/10.1007/s00484-010-0381-6>
- El-Tarabany, M.S., El-Tarabany, A.A., Atta, M.A., 2017. Physiological and lactation responses of Egyptian dairy Baladi goats to natural thermal stress under subtropical environmental conditions. *Int. J. Biometeorol.* 61, 61–68. <https://doi.org/10.1007/s00484-016-1191-2>
- Encarnação, R. de O., 1986. Estresse e produção animal, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.
- Façanha, D.A.E., Chaves, D.F., Morais, Gurgel, J.H., Vasconcelos, Â.M. de, Costa, W.P., Guilhermin, M.M., 2013. Tendências metodológicas para avaliação da adaptabilidade ao ambiente tropical. *Rev. Bras. Saúde e Produção Anim.* v.14, n., 91–103. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S1519-99402013000100011>.
- Ferreira, F, Campos, W.E., Carvalho, A.U., Pires, M.F., Martinez, M.L., Silva, M.V.G.B., Verneque, R.S., Silva, P.F., 2009. Parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos e hormonais de bovinos submetidos ao estresse calórico. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 61, 769-776. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352009000400002>
- Ferreira, F., Campos, W.E., Carvalho, A.U., Pires, M.F.A., Martinez, M.L., Silva, M.V.G.B., Verneque, R.S., Silva, P.F., 2009. Taxa de sudação e parâmetros histológicos de bovinos submetidos ao estresse calórico. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 61, 763–768. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352009000400001>

- Ferreira, F., Pires, M.F.A., Martinez, M.L., Coelho, S.G., Carvalho, A.U., Ferreira, P.M., Facury Filho, E.J., Campos, W.E., 2006. Parâmetros fisiológicos de bovinos cruzados submetidos ao estresse calórico. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 58, 732–738. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352006000500005>
- Ferreira, L.C.B., Filho, L.C.P.M., Hotzel, M.J., Alves, A.A., Barcellos, A. de O., 2014. Respostas fisiológicas e comportamentais de bovinos submetidos a diferentes ofertas de sombra. *Cad. Agroecol.* 9, 1–14.
- Ferro, F.R. de A., Neto, C.C.C., Filho, M. da R.T., Ferri, S.T.S., Montaldo, Y.C., 2010. Efeito Do Estresse Calórico No Desempenho Reprodutivo de vacas leiteiras. *Rev. Verde* 5, 1–25.
- Fialho, A.L.L., Souza-Cáceres, M.B., Silva, W.A.L., Arruda, E.D.S., Kischel, H., Ribeiro-Ferreira, M.G.C., Medeiros, C.F., Silva, J.R., Oliveira, M.V.M., Ferraz, A.L.J., Melo-Sterza, F.A., 2018. Efeito do estresse térmico calórico agudo e crônico sobre a qualidade oocitária de bovinos de raças adaptadas. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 70, 64–72.
- Garcia, A.B., Angeli, N., Machado, L., de Cardoso, F.C., Gonzalez, F., 2015. Relationships between heat stress and metabolic and milk parameters in dairy cows in southern Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 47, 889-894. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0804-9>
- Gonçalves, P.B.D., Barreta, M.H., Sandri, L.R., Ferreira, R., Antoniazzi, A.Q., 2007. Produção in Vitro De Embriões Bovinos: Estado Da Arte¹. *Rev Bras Reprod Anim* 13, 212–217. <https://doi.org/10.5747/ca.2017.v13.nesp.000244>
- Gurguel, E.M., Seraphim, O.J., Silva, R.J.O. Da, 2012. Method of bioclimatic evaluation of trees shade quality targeting the animal thermal comfort. *Rev. Energ. na Agric.* 27, 16.
- Guzeloglu, A., Ambrose, J.D., Kassa, T., Diaz, T., Thatcher, M.J., Thatcher, W.W., 2001. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to acute heat stress. *Anim. Reprod. Sci.* 66, 15–34. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00082-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00082-3)
- Hansen, P.J., 2009. Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 3341–3350. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0131>
- Horowitz, M., 2002. From molecular and cellular to integrative heat defense during exposure to chronic heat. *Comp. Biochem. Physiol.* 131, 475–483. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00500-1](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00500-1)
- IBGE, 2020. Produção de origem animal, por tipo, 2018 [WWW Document]. Inst. Bras. Geogr. e Estatística.
- Igono, O., Johnson, D., Steevens, J., Hainen, A., Shanklin, D., 1988. Effect of season on milk temperature, milk growth hormone, prolactin, and somatic cell count of lactating cattle. *bio Meterology* 32, 194–200. <https://doi.org/10.1007/bf01045279>
- Iriadam, M., 2007. Variation in certain hematological and biochemical parameters during the peri-partum period in Kilis does. *Small Rumin. Res.* 73, 54–57. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.11.001>
- Kaneko, H., Harvey, J., Bruss, M., 1997. Clinical biochemistry of domestic animals.

Elsevier/Academic Press.

- Kaneko JJ, JW, H., ML., B., 2008. *Clinical biochemistry of domestic animals.*, 6th ed. Academic press, San Diego.
- Laganá, C., Barbosa Junio, A.M., Mélo, D.L.M.F., Rangel, J.H.A., 2005. Respostas comportamentais de vacas holandesas de alta produção criadas em ambientes quentes, mediante ao sistema de resfriamento adiabático evaporativo. *Rev. Bras. Saúde e Produção Anim.* 6, 67–76.
- Legrand, A., Schütz, K.E., Tucker, C.B., 2011. Using water to cool cattle : Behavioral and physiological changes associated with voluntary use of cow showers. *J. Dairy Sci.* 94, 3376-3386. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3901>
- Legrand, A.L., von Keyserlingk, M.A.G., Weary, D.M., 2009. Preference and usage of pasture versus free-stall housing by lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 92, 3651-3658. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1733>
- Ludovico, A., Maion, V.B., Bronkhorst, D.E., De Almeida Cristine Rego Grecco, F., Da Cunha Filho, L.F.C., Mizubuti, I.Y., De Almeida, K.M., Dos Santos Ludovico, M., De Santana, E.H.W., 2015. Losses in milk production and quality due to milk somatic cell count and heat stress of Holsteins cows in temperate climate. *Semin. Agrar.* 36, 3455–3470. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n5p3455>
- Maia, A.S.C., Silva, R.G. da, Junior, J.B.F. de S., Silva, R.B. da, Domingos, H.G.T., 2009. Effective thermal conductivity of the hair coat of Holstein cows in a tropical environment. *Rev. Bras. Zootec.* v.38, n.11, 2218–2223. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982009001100022>
- Malafaia, P., Barbosa, J.D., Tokarnia, C.H., Oliveira, C.M.C., 2011. Distúrbios comportamentais em ruminantes nao associados a doenças origem, significado e importancia. *Pesqui. Vet. Bras.* 31, 781–790.
- Marai, I.F.M., Haebe, A.A.M., 2010. Buffalo's biological functions as affected by heat stress - A review. *Livest. Sci.* 127, 89–109. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2009.08.001>
- Martello, L.S., Júnior, H.S., Silva, S. da L. e, Titto, E.A.L., 2004. Respostas fisiológicas e produtivas de vacas holandesas em lactação submetidas a diferentes ambientes. *Rev. Bras. Zootec.* 33, 181-191. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S1519-99402013000300016>
- Martins, C.F., 2010. O impacto da transferência de embriões e da fecundação in vitro na produção de bovinos no Brasil. *Embrapa Cerrados* 1–3.
- Morais, D., Maia, A., Silva, R., Vasconcelos, A., Lima, P., Guilhermino, M., 2008. Variação anual de hormônios tireoideanos e características termorreguladoras de vacas leiteiras em ambiente quente. *Rev. Bras. Zootec.* 37, 538-545. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982008000300020>
- Mukherjee, J., Pandita, S., Huozha, R., Ashutosh, M., 2011. In vitro immune competence of buffaloes (*Bubalus bubalis*) of different production potential: Effect of heat stress and cortisol. *Vet. Med. Int.* 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/860252>
- Nääs, I.D. a., Arcaro Júnior, I., 2001. Influência de ventilação e aspersão em sistemas de sombreamento artificial para vacas em lactação em condições de calor. *Rev. Bras.*

- Eng. Agrícola e Ambient. 5, 139–142. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662001000100026>
- Nascimento, G.V. do, Cardoso, E. de A., Batista, N.L., Souza, B.B. de, Cambui, G.B., 2013. Indicadores produtivos, fisiológicos e comportamentais de vacas de leite. *Agropecuária Cient. no Semiárido* 9, 28–36. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.30969/acsa.v9i4.349>
- Nasr, M.A.F., El-tarabany, M.S., 2017. Impact of three THI levels on somatic cell count, milk yield and composition of multiparous Holstein cows in a subtropical region. *J. Therm. Biol.* 64, 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.01.004>
- O'Brien, M.D., Rhoads, R.P., Sanders, S.R., Duff, G.C., Baumgard, L.H., 2010. Metabolic adaptations to heat stress in growing cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.* 38, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2009.08.005>
- Ozawa, M., Hirabayashi, M., Kanai, Y., 2002. Developmental competence and oxidative state of mouse zygotes heat-stressed maternally or in vitro. *Reproduction* 124, 683–689. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1240683>
- Palma, G.A., 2001. Producción in vitro de embriones bovinos. *Biotechnol. la Reprod.* 225–294.
- Peixer, P.F., Santos, K.J.G. dos, Santos, A.P.P. dos, Backes, C., Santos, Aqueline F.D., Camila da Silva Castro, 2018. Produção in vitro de embriões bovinos. *Rev. Espac.* 39, 2.
- Pereira, C.C.J., 2005. Fundamentos de Bioclimatologia Aplicados à Produção Animal. Belo Horizonte.
- Perissinotto, M., Moura, D.J. De, Cruz, V.F., 2003. Evaluation of the production in dairy cattle in different climatization. *Rev. Ciências Agrárias* 135–142.
- Pinheiro, M. da G., 2012. Produção de leite em ambiente tropical. *Pesqui. Tecnol.* 9, 6 p.
- Pires, M. de F.Á., 2013. Estresse calórico em vacas leiteiras: implicações e manejo nutricional, Embrapa Gado de Leite.
- Reis Silva, R., Aloísio Scalla Vulcani, V., Sousa Camargos, A., Rabelo da Costa, U., Monteiro Dutra, M., Renato Chiari, J., 2017. Produção in Vitro De Embriões Bovinos: Estado Da Arte. *Colloq. Agrar.* 13, 402–415. <https://doi.org/10.5747/ca.2017.v13.nesp.000244>
- Rensis, F. De, Scaramuzzi, R.J., 2003. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow—a review. *Theriogenology* 60, 1139–1151. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00126-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00126-2)
- Ricci, G. Dela, Orsi, A.M., Domingues, P.F., 2013. Estresse Calórico E Suas Interferências No Ciclo De Produção De Vacas De Leite – Revisão. *Vet. e Zootec.* 20, 9–18.
- Rocha, D.R., Salles, M.G.F., Moura, A.A.A.N., Araújo, A.A., 2012. Impacto do estresse térmico na reprodução da fêmea bovina. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 1, 18–24.
- Rodrigues, A.L., Souza, B.B. de, Filho, J.M.P., 2010. Influencia do sombreamento e dos sistemas de resfriamento no conforto termico de vacas leiteiras. *Agropecuária Cient. no Semiárido* 6, 14–22.

- Rossarolla, G., 2007. Comportamento de vacas leiteiras da raça holandesa em pastagens de milho com e sem sombra. Univ. Fed. St. Maria.
- Roth, Z., Hansen, P.J., 2005. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction* 129, 235–244. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00394>
- Roth, Z., Meidan, R., Shaham-Albalancy, A., Braw-Tal, R., Wolfenson, D., 2001. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction* 121, 745–751. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210745>
- Scharf, B., Carroll, J.A., Riley, D.G., Chase, C.C., Coleman, S.W., Keisler, D.H., Weaber, R.L., Spiers, D.E., 2010. Evaluation of physiological and blood serum differences in heat-tolerant (romosinuano) and heat-susceptible (angus) bos taurus cattle during controlled heat challenge. *J. Anim. Sci.* 88, 2321-2336. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2551>
- Schütz, K.E., Rogers, A.R., Cox, N.R., Webster, J.R., Tucker, C.B., 2011. Dairy cattle prefer shade over sprinklers: Effects on behavior and physiology. *J. Dairy Sci.* 94, 273–283. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3608>
- Silva, I., Pandorfi, H., Jr, I.A., Piedad, S.M.S., Moura, D.J. de, 2002. Efeitos da Climatização do Curral de Espera na Produção de Leite de Vacas Holandesas. *R. Bras. Zootec.*, v.31, n.5, 2036–2042.
- Silva, M.N.D.N. e, 2016. Parâmetros Fisiológicos e Bioquímicos Indicadores de Estresse Térmico em Ovinos em Ambiente Tropical. Universidade Federal do Piauí.
- Silva, T.P.D. e, Oliveira, R.G. de, Júnior, S.C.S., Santos, K.R. dos, 2012. Efeito da exposição à radiação solar sobre parâmetros fisiológicos e estimativa do declínio na produção de leite de vacas mestiças (Holandês X Gir) no sul do estado do Piauí. *Comun. Sci.* 3, 299–305.
- Simões, G.H., 2014. Avaliação de estresse térmico em vacas de leite em free stall sob diferentes condições de climatização. Universidade Federal do Paraná.
- Singh, K.M., Singh, S., Ganguly, I., Ganguly, A., Nachiappan, R.K., Chopra, A., Narula, H.K., 2016. Evaluation of Indian sheep breeds of arid zone under heat stress condition. *Small Rumin. Res.* 141, 113–117. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.07.008>
- Souza, B.B. de, Assis, D.Y.C. de, Roberto, J.V.B., Marques, B.A. de A., 2011. Efeito do clima e da dieta sobre os parâmetros fisiológicos e hematológicos de cabras da raça Saanen em confinamento no sertão paraibano. *Rev. Verde Agroecol. e Desenvolv. Sustentável* 6, 77–82.
- Souza, B.B. de, Silva, I.J. de O., Mellace, E.M., Santos, R.F.S., Zotti, C.A., Garcia, P.R., 2010. Avaliação Do Ambiente Físico Promovido Pelo Sombreamento Sobre O Processo Termorregulatório Em novilhas leiteiras. *ACSA - Agropecuária Científica no Semi-Árido* 6, 59–65. <https://doi.org/10.30969/acsav6i269>
- Sparrow, E.M., 2018. Radiation Heat Transfer, 1 edition. ed. Routledge, Belmont. California.
- Spiers, D.E., Spain, J.N., Ellersieck, M.R., Lucy, M.C., 2018. Strategic application of

- convective cooling to maximize the thermal gradient and reduce heat stress response in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 1-15. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14283>
- Staples, C.R., Thatcher, W.W., 2011. Stress in Dairy Animals: Heat Stress: Effects on Milk Production and Composition. *Encycl. Dairy Sci.* Second Ed. 561–566. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00467-2>
- Tao, S., Bubolz, J.W., do Amaral, B.C., Thompson, I.M., Hayen, M.J., Johnson, S.E., Dahl, G.E., 2011. Effect of heat stress during the dry period on mammary gland development. *J. Dairy Sci.* 94, 5976–5986. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4329>
- Thom, E.C., 1959. The Discomfort Index. *Weatherwise* 12, 57–61. <https://doi.org/10.1080/00431672.1959.9926960>
- Todini, L., Malfatti, A., Valbonesi, A., Trabalza-Marinucci, M., Debenedetti, A., 2007. Plasma total T3 and T4 concentrations in goats at different physiological stages, as affected by the energy intake. *Small Rumin. Res.* 68, 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.11.018>
- Tucker, C.B., Rogers, A.R., Schu, K.E., 2008. Effect of solar radiation on dairy cattle behaviour, use of shade and body temperature in a pasture-based system. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 109, 141–154. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2007.03.015>
- Uribe-Velasquez, L.F., Oba, E., Brasil, L.H.D., Wechsler, F.S., Stachissini, a V.M., 1998. Plasma concentrations of cortisol, thyroid hormone, lipids metabolites and corporal temperature of lactating Alpine goats submitted to heat stress. *Rev. Bras. Zootec. J. Anim. Sci.* 27, 1123–1130.
- Varago, F.C., Mendonça, L., Lagares, M.A., 2008. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Rev. Bras. Reprodução Anim.* 32, 100–109. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(96\)01393-0](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(96)01393-0)
- Veissier, I., Van laer, E., Palme, R., Moons, C.P.H., Ampe, B., Sonck, B., Andanson, S., Tuytens, F.A.M., 2018. Heat stress in cows at pasture and benefit of shade in a temperate climate region. *Int. J. Biometeorol.* 62, 585–595. <https://doi.org/10.1007/s00484-017-1468-0>
- Wankar, A.K., Yadav, B., 2018. Thermoregulatory responses in buffaloes during heat stress. Physio- metabolic, nutrient utilization and endocrine scenario. Lap Lambert Academic Publishing.
- West, J.W., 2003. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 86, 2131-2144. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73803-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73803-X)
- Wolfenson, D., Roth, Z., 2018. Impact of heat stress on cow reproduction and fertility. *Anim. Front.* 9, 32–38. <https://doi.org/10.1093/af/vfy027>
- Wolfenson, D., Roth, Z., Meidan, R., 2000. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: Basic and applied aspects. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61, 535-547. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00102-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00102-0)
- Wolfenson, D., Sonogo, H.H., Bloch, A., Shaham-Albalancy, A., Kaim, M., Folman, Y., Meidan, R., 2001. Seasonal differences in progesterone production by luteinized bovine thecal and granulosa cells. *Domest. Anim. Endocrinol.* 22, 81–90. [https://doi.org/10.1016/S0739-7240\(01\)00127-8](https://doi.org/10.1016/S0739-7240(01)00127-8)

- Ynoue, R.Y., Reboita, M.S., Ambrizzi, T., Silva, G.A.M. da, 2017. Meteorologia noções básicas. Oficina de Textos Grafia, São Paulo.
- Zimelman, R.B., Rhoads, R.P., Collier, R.J., Duff, G.C., 2009. A re-evaluation of the impact of temperature humidity index (THI) and black globe humidity index (BGHI) on milk production in high producing dairy cows. Proc. ... 158–169.

III. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi estudar e avaliar a influência de diferentes sistemas destinados a promoção da redução do estresse térmico sobre parâmetros metabólicos, fisiológicos, sanguíneos, hormonais, reprodutivos e comportamentais de vacas lactantes e novilhas púberes das raças Holandês e Jersey criadas a pasto, em ambiente tropical.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Artigo I:

Avaliar os efeitos da utilização de sistemas destinados a promoção da redução de estresse térmico a pasto sobre vacas lactantes e novilhas púberes de diferentes raças sobre parâmetros climáticos, fisiológicos (frequência respiratória e temperatura de pelame) retal) e comportamentais (utilização, preferência e procura dos sistemas)

Artigo II:

Avaliar os efeitos da utilização de sistemas destinados a promoção da redução de estresse térmico a pasto sobre vacas lactantes e novilhas púberes de diferentes raças sobre parâmetros climáticos, fisiológicos (frequência respiratória, temperatura de pelame e temperatura retal), leiteiros (qualidade e produção de leite), e produção *in vitro*.

Artigo III:

Avaliar os efeitos da utilização de sistemas destinados a promoção da redução de estresse térmico a pasto sobre vacas lactantes e novilhas púberes de diferentes raças sobre parâmetros sanguíneos (hormonais, minerais, sanguíneos, lipídicos e metabólicos).

I. Influence of different heat-stress-reducing systems on physiological, behavioral responses and social dominance of Holstein and Jersey cows and heifers on pasture

(Applied Animal Behaviour Science)

Abstract

The influence of different heat-stress-reducing systems on the physiological, behavioral, and preferential responses of Holstein and Jersey cows and heifers on pasture was evaluated. Twelve animals were used and distributed in four 3x3 Latin squares (Holstein cows; Jersey cows; Holstein heifers; Jersey heifers) all run in the same time, in a 3x2x2 factorial arrangement comprising three treatments (sprinklers + artificial shade (Tspr); showers + artificial shade (Tsho); and artificial shade (Tas)); two breeds (Holstein and Jersey); and two physiological stages (lactating cows and pubertal heifers). The following parameters were evaluated: respiratory rate; coat surface temperature; frequency and duration of use of the systems; behavior (lying idle, standing idle, rumination, grooming, and grazing); and climatic data (air temperature, air humidity and temperature-humidity index (THI)). The behavioral parameters 'standing idle' and 'grazing' were influenced by the treatment. Breed patterns influenced lying idle, rumination and grooming behaviors. The frequency and duration of use of the systems were affected by treatment and age group, being higher for the sprinkler and shower systems (184 and 178 min, respectively) compared to the artificial shade (control) (68 min) and for cows (205 and 7 visits respectively) compared to heifers (82 and 3 visits, respectively). The regression analyses showed a positive and significant correlation between respiratory rate and coat surface temperature in relation to the THI of the treatments. The results of this study indicate that age and breed may influence the analyzed variables and that the systems that used water (sprinkler and shower) promoted better behavioral and physiological parameters in animals than the use of artificial shade only, as a consequence of greater mitigation of the deleterious climate effects, and are thus recommended for use in warm climate environments.

Keywords: behavior, cow, pasture, physiological thermal stress.

1. Introduction

The weather affects the behavior, physiology, and welfare of animals, especially in tropical countries during the summer (Legrand et al., 2011). The excess heat increases body temperature (Kaufman et al., 2018) and respiratory rate (Nascimento et al., 2019) and reduces food intake (Staples and Thatcher, 2011), milk production (Bernabucci et al., 2014), and reproductive parameters, and may in extreme cases lead to death (Wolfenson and Roth, 2018)

To reduce overheating, mitigation measures can be taken, one of which is allowing access to shade (Legrand et al., 2011). Shade can be created using a variety of materials and has the purpose of reducing direct solar radiation, favoring a better microclimate (Kamal et al., 2018). An increase in air temperature motivates animals to use and compete for shaded places and such behavior is considered a valuable mechanism for reducing body temperature (Schütz et al., 2011; Tucker et al., 2008), but is often inefficient at reducing excess heat. The use of water to cool the animals is more efficient at reducing heat than shade (Schütz et al., 2011) because water has a high latent heat of evaporation and when evaporating it takes with it a large amount of heat (National Research Council – NRC, 2010). The outcomes following cooling with water include an increase in feed intake and milk yield (Chen et al., 2016), and a reduction in respiratory rate, body temperature, the number of insects and the number of movements of hooves and tails (Schütz et al., 2011).

The study of systems that use water to reduce thermal stress experienced by animals is long-standing, mainly in feedlot systems, where water is frequently used in the trough line. For example, Igono et al. (1988) studied the use of sprinklers plus ventilation in the trough line on physiological and productive responses and concluded that animals that were sprinkled with more ventilation had better rectal temperatures and produced 2 kg more milk per day when compared with animals with access to shade only. Tao et al. (2011) tested the combination of spraying and ventilation versus no air conditioning and found a better rectal temperature (39 vs. 39.4 °C), respiratory rate (45.6 vs. 78.4 mov/min) and milk production (33.9 vs. 28.9 kg/day) for the group of cows subjected to spraying and ventilation. However, Schutz et al. (2011) studied the behavioral preference of cows for sprinklers, shade, and the control environment (no shade or

sprinklers) and found a preference for shade over sprinklers and the control environment; however, the authors reported that the best physiological parameters were found in the sprinkler system.

The use of water on animals on pasture is relatively new (Wolfenson and Roth, 2018) and data are scarce. Therefore, our objectives were to examine the influence of different thermal stress reduction systems on pasture (sprinklers, showers, artificial shading and their combinations) during the hot season, in a tropical country, and to evaluate the preference for and behavior of animals in these systems. We predicted that sprinklers and showers would be more efficient at reducing the thermal load and consequently would improve physiological, comfort, and welfare results and that lactating, and Holstein animals would have a greater need to use the systems with water.

2. Material and Methods

Local and duration

The experiment was carried out from October to November 2018 (Southern Hemisphere spring) at Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), a property belonging to the State University of Maringá (UEM).

Weather

According to the Köppen classification, the climate is humid subtropical mesothermal (Cfa) with hot summers and centralized rains. During the experimental period there was no rain and the average temperature was 26 ° C.

Animals, handling and feeding

Twelve animals were selected for this study: three Holstein multiparous cows (600±30 kg, 53±11 months of age, and average milk yield of 27±3.5 kg of milk/day between the third and fourth month of lactation), three multiparous Jersey cows (370±11 kg, 40±6 months of age, and average milk yield 11±1.5 kg of milk/day between the fifth and seventh month of lactation), three

Holstein heifers (325 ± 25 kg, 16 ± 0.6 months of age) and three Jersey heifers (250 ± 25 kg and 13 ± 0.6 months of age). The animals were previously identified using necklaces and earrings to facilitate observation from a distance and data collection. However, as in each paddock there was only one animal from each Latin square (Holstein cows; Jersey cows; Holstein heifers; and Jersey heifers), identification by the difference in sizes was easily accomplished.

The animals were kept in paddocks of *Cynodon plectostachyus* pasture (17% protein and 53% neutral detergent fiber) of similar areas (approximately 2780 m²), where the systems to be tested were installed. The lactating cows were milked twice daily, at approximately 6 am and 3 pm, then fed with silage (8% crude protein and 50% neutral detergent fiber) and concentrate (26% crude protein and 10% neutral detergent fiber) and released back into the paddocks. The heifers were fed on pasture with silage (8% crude protein and 50% neutral detergent fiber) and total concentrate (25% crude protein and 15% neutral detergent fiber) while the cows were milked, so that they did not interfere with the heifers' feed intake.

Design and experimental treatments

The experimental design consisted of four (3x3) Latin squares (the Latin square referring to Holstein cows, Jersey cows, Holstein heifers and Jersey heifers) all run in the same time, in a 3x2x2 factorial arrangement comprising three treatments (sprinklers + artificial shade; showers + artificial shade; and artificial shade); two breeds (Holstein and Jersey); and two physiological stages (lactating cows and puberty heifers) with three experimental periods of 14 days (11 days for adaptation and 3 days for measurement of environmental conditions, physiological and behavioral parameters, and the frequency of use of the cooling systems).

The systems were (Figure 1): treatment with sprinklers + artificial shade (Tspr), in paddock 1; treatment with showers + artificial shade (Tsho), in paddock 2; and treatment with artificial shade (Tas), in paddock 3. All paddocks had the same artificial shading system at one end, comprising eucalyptus beams in which iron-based structures were fixed (3.5 m tall in total) with synthetic fabric (artificial shade) providing 80% solar retention, which guaranteed a shaded area of 16 m² (4x4). The sprinkler systems and showers were installed in two of the paddocks on

iron structures of 8 m² (4x2 m) on a cement base. Access to sprinklers and showers was possible freely on all four sides of the structure. Both systems were powered by a 10,000-liter water tank and a 2.5 horsepower electric water pump. When the animals passed or positioned themselves under the systems, Intelbrás presence sensors (model IVP 3000 PET) sent information to a relay (electromechanical switch) that opened the valves, releasing water to the sprinklers and showers. The sprinkler system had six volcano sprinklers with a flow rate of 8 liters/minute. The shower system had 6 simple showers with a flow rate of 12 liters/minute. When the animals left the sensors' range, the relays closed the water valves, ceasing the release of water into the systems.

Environmental conditions

Table 1 summarizes the environmental conditions collected during the experiment. We measured: air temperature (T; °C), relative humidity (RH; %) and solar radiation (R; W/m²) by a digital Thermo hygrometer with an anemometer and in the FEI weather station, every half hour during the collection days. With the data obtained, the Temperature and Humidity index (THI) was calculated:

$$THI = T + 0.36 \times Tdp + 41.2$$

where: T is the air temperature (°C) and Tdp the dew point temperature (°C) (Thom, 1959).

Physiological parameters

Physiological parameters such as respiratory rate (RR; breaths/min) and coat surface temperature (CS; °C) were measured every half hour on the sample collection days from 9 am to 6:30 pm, except at the time of milking, in all animals. The RR was obtained by counting the flank movements for one minute, and the coat surface temperature (CS; °C) was measured using a thermal camera (Fluke Ti100 Infrared Thermal Imaging Camera), taking a measurement approximately one meter away from the animals.

Behavior

The behavioral patterns of each animal were analyzed every half hour on the sample collection days from 9 am to 6:30 pm, except at the time of milking, in all animals by trained observers who took notes on specific worksheets. Behaviors were classified as: grazing (Gra) (the animals were considered to be eating if feed grass was being ingested or could be seen in the mouth); ruminating (Rumi) (defined as chewing movements without fresh feed in the mouth, regurgitation of feed or both); standing idle (SI) (the animals were considered to be standing idle if standing without performing other activities); lying idle (LI) (the animals were considered to be lying idle if their flank was in contact with the ground); and grooming (Groo) (characterized by intentional contact by the animal with objects, itself or another animal).

Duration and frequency of use

The frequency and duration of use of the systems were recorded continuously 24 h/day for 3 days in each period using video cameras (HDCVI Intelbrás 720p) installed in each paddock. All cameras were connected to a digital video recorder with surveillance software (Intelbrás® DVR 3016).

The frequency of use of sprinkler and shower systems was defined as the number of visits to the systems and consequently, activation of these systems in response to the animal being positioned within the range of the sensors for more than 1 second. The frequency of use of artificial shading was determined visually by trained evaluators during filming and required the animal to be in the shaded area for more than 1 second. The duration of use of the systems was measured by trained evaluators as the difference between entry to and exit from the systems, be they sprinklers, showers, or artificial shading.

The data obtained were analyzed in the following ways:

- Systems: use of sprinkler + artificial shading, in paddock 1; shower + artificial shading, in paddock 2; and only artificial shading, in paddock 3.
- Comparison between the structures of the same paddock: sprinkling vs. artificial shading, in paddock 1; shower vs. artificial shading, in paddock 2; artificial shading in paddock 3.
- Time of day: 9 am to 11 am; 12 pm to 3 pm; and 4 pm to 6 pm.

Statistical analysis

The data were analyzed using the MIXED procedure of the SAS (Statistical Analysis System, 9.3) and when there were interactions between the factors, Fisher's least significant difference test (LSD) was used to identify the interaction.

Behavior, duration of use and frequency of use were used in model 1:

$$Y_{ijklmn} = \mu + S_i + A_{j:i} + P_k + T_l + BR_m + AG_n + T \times BR_{lm} + T \times AG_{ln} + e_{ijklmn}$$

where $p_k \approx N(0, \sigma_p^2)$, $a_l \approx N(0, \sigma_a^2)$ and $e_{ijkl} \approx N(0, \sigma_e^2)$, and where Y_{ijkl} is the observed value; μ is the general mean; S_i is the fixed effect of animal within a square; $A_{j:i}$ is the random effect of the animal within each latin square; P_k is the experimental period fixed effect; T_l is the treatment (l=1 and 3) fixed effect; BR_m is the breed effect (m=1 and 2); AG_n is the age group (n=1 and 2) fixed effect; $T \times BR_{lm}$ is the interaction between treatment and breed fixed effect; $T \times AG_{ln}$ is the interaction between treatment and age group fixed effect; e_{ijklmn} is the residual error; N indicates a normal distribution; and σ_p^2 , σ_a^2 and σ_e^2 are the variances associated with random effects associated with period and animal, and residual variance, respectively.

The duration of use and frequency of use data were used in model 2:

$$Y_{ijklmn} = \mu + S_i + A_{j:i} + P_k + T_l + H_m + T \times H_{lm} + e_{ijklm}$$

where $p_k \approx N(0, \sigma_p^2)$, $a_l \approx N(0, \sigma_a^2)$ and $e_{ijkl} \approx N(0, \sigma_e^2)$, and Y_{ijkl} is the observed value; μ is the general mean; S_i is the animal fixed effect within a square; $A_{j:i}$ is the random effect of the animal within each latin square; P_k is the experimental period fixed effect; T_l is the treatment (l=1 and 3) fixed effect; H_m is the hours (n = 1 from 9 am to 11 am, n = 2 from 12 to 3 pm, n = 3 from 4 pm to 6 pm) fixed effect; $T \times H_{lm}$ is the hours x treatment interaction; P_m is the period (l=1 and 2) fixed effect; a_n is the animal fixed effect; e_{ijklm} is the residual error; N indicates a normal distribution; and σ_p^2 , σ_a^2 and σ_e^2 are the variances associated with random effects associated with period and animal, and residual variance, respectively.

Comparisons between THI, respiratory rate and coat temperature were made through linear regression adjustment and Pearson's correlation coefficient (r). The adjustment adequacy was evaluated by the determination coefficient (R^2). The level of significance adopted was 5% ($P < 0.05$).

3. Results

Environmental conditions

The environmental conditions analyzed during the experimental period are shown in Table 1. The mean air temperature was 26 °C. The RH during the experimental period was 74%; the average radiation was 338.2 (W/m²) and the THI was 73.4.

Behavior

The treatments affected standing idle and grazing behaviors ($P < 0.05$). Animals with access to water treatments (sprinklers and showers) spent more time standing idle than the animals provided with artificial shade (184, 188, and 156 min, respectively). Animals with access to showers spent more time grazing when compared to those with access to sprinklers and artificial shade (118, 109, and 108 min, respectively) (Table 2).

There was a breed effect on the behavioral activities of lying idle, ruminating, and grooming ($P < 0.05$) (Table 2). Jersey cows spent more time lying idle (64 vs. 53 min) and ruminating (111 vs. 109 min) during the hours observed than Holstein cows whereas the latter spent more time grooming than Jersey cows (28 vs. 23 min, respectively).

The age group and the interactions between treatment x breed and treatment x age group did not influence the behavioral patterns analyzed ($P > 0.05$).

Duration and frequency of use

Significant differences were found concerning the frequency and duration of use of the systems by the animals ($P < 0.05$) (Table 3). The animals with access to sprinklers and showers spent more time using these systems than the animals in the artificial shade group (184, 178m and

68 min, respectively), and consequently, the frequency of use of these resources was also higher (7, 7, and 1 visits, respectively).

The duration and frequency of use of the systems were affected by the age group ($P < 0.05$). Cows used (205 min) and sought out (7 visits) the systems considerably more than the heifers (82 min and 3 visits).

Significant effects were found for the interaction between the treatment and age group on the duration of use ($P < 0.0001$). Cows used the sprinkler (270 min) and shower systems (268 min) for similar amounts of time, and for longer than heifers used the same systems (97 and 89 min, respectively).

There was an interaction between treatment and age group on the frequency of use of the systems ($P < 0.0001$). Cows sought out the sprinklers (9 visits) and showers (10 visits) more times than heifers for the same systems (5 and 4 visits, respectively) and showed a lower frequency of demand for shading, and this did not differ between breeds (1 visit for cows and 1 visit for heifers).

The time of day influenced the duration of use of the systems during the morning (9 to 11 am), afternoon (12 to 3 pm) and late afternoon (4 to 6 pm) ($P < 0.05$) (Figure 3). The animals used for the shade system (59 min) for a longer period than the sprinkler system (35 min) and showers (21 min) during the morning; however, the frequency of use in the morning did not differ between treatments ($P > 0.005$) (Figure 3). During the afternoon, the animals used and sought out the sprinkler system (41 min and 2 visits, respectively) and showers (51 min and 2 visits, respectively) substantially more than the shade system (6 min and 0.2 visits, respectively). During the late afternoon, the animals used the sprinkler (37 min) and shower systems (32 min) more than the shade system (2 min); however, the time of day did not influence the frequency of use the systems, being influenced only by treatments, since the sprinkler (2 visits) and shower (2 visits) treatments were sought out more often than the artificial shade system (0.1 visit).

Physiological parameters

RR and CS showed a high and significant correlation coefficient ($P < 0.05$) with the THI (Figure 4) in all treatments. The linear correlation coefficient between the THI and CS for artificial shading, sprinklers, and showers was $R^2 = 0.8572$, $R^2 = 0.7886$, and $R^2 = 0.6672$,

respectively. The linear correlation coefficient between THI and the RR was $R^2 = 0.7902$ for artificial shading, $R^2 = 0.6286$ for showers, and $R^2 = 0.6822$ for sprinklers.

4. Discussion

Environmental conditions

The average air temperature was 26 °C, a value considered above the thermal comfort zone for Holstein dairy cattle, which is 24 °C (Martello et al., 2004), but below the critical limit of Jersey cows (28 °C) (Nascimento et al., 2019). The RH was 74%, a value considered above the desired 60 to 70% at which evaporative thermolysis between the animal and the environment is not harmed (Ferro et al., 2010). Due to the high air temperature and the relative humidity of the air, the THI values were high (73.4) and considered dangerous to animals, especially for high-yielding cows, with significant milk losses occurring (Zimbelman et al., 2009).

Behavioural parameters

Standing idle was the activity in which the animals spent most of their time (Table 2). The treatments that used water (sprinklers and showers) recorded the highest values of standing idle, a circumstance clarified by the fact that the animals were idle when using the systems in most cases.

The rumination and lying idle behaviors in the present experiment lasted longest in Jersey cows. One of the factors that may be related to the longer ruminating time is the fact that these animals have a smaller mouth than Holsteins, so they spend longer grazing and consequently ruminating (Aikman et al., 2008). The increase in ruminating time and lying idle is also due to the greater adaptability of these animals to tropical climates, mainly due to their skin pigmentation, the size and density of their hair and their higher sweating capacity, which gives them higher tolerance to heat (Nascimento et al., 2019). Similarly, Aikman et al. (2008) reported that Jersey cows spent more time grazing and ruminating than Holstein cows because they have smaller mouths, so they require a larger number of mouthfuls to ingest an equal volume of feed.

Grazing was the second most common activity. The animals exposed to the shower system spent the most time grazing. This may have been influenced by the benefits provided by the showers, including higher heat dissipation and a reduction in the coat surface temperature and respiratory rate (Figures 4a and 4b), bringing greater comfort to the animals and thus allowing them to graze for longer.

Grooming was the behavior performed the least frequently by animals and is characterized by contact, which can be coordinated or not, of short or long duration, initiated by the animal with objects, itself (the act of licking) or another animal (Alfredo et al., 2013). Holstein cows performed grooming more frequently than Jersey cows, a fact that can be explained by the greater tendency to use the systems by the Holstein cows ($P = 0.0876$) (Table 3), since we observed that the behavior was mostly carried out on the iron structures where the systems were installed, showing that the systems also functioned as a form of environmental enrichment.

Duration and frequency of the systems use

When we analyzed the duration and frequency of use of the systems (systems + artificial shade) we found that the animals spent more time using and seeking out the sprinkler + artificial shade system (184 min) or the shower + artificial shade system (178 min) than the artificial shade system (68 min). This preference can be attributed to the greater efficiency in the dissipation of heat by evaporation, improving the welfare of the animals, especially those raised on pastures.

Figure 2 shows the comparison between the structures within the same paddock (sprinkling vs. artificial shading, in paddock 1; shower vs. artificial shading, in paddock 2; artificial shading in paddock 3). It is possible to perceive the preference for systems with water over artificial shade in the same paddock. This leads us to understand and respect the behavior and the expression of free choice of animals for systems that provide them with the most comfort and consequently best welfare. However, these behaviors varied according to the time of day (Figure 3). The animals started using the systems at 9 am (25 °C and 78% humidity) with the frequency of use for sprinkler, shower, and artificial shade systems being similar, but with a longer duration of use of the artificial shade system until 11 am (28.7 °C and 70.76% humidity)

when the temperature was cooler. After 11 am, the frequency and duration of use was higher for sprinkler and shower systems than for artificial shade, and this behavior continued until 4 pm (32 °C and 61% humidity). It was also noticed that, from 2 pm to 3 pm, the animals did not seek out the artificial shade system. This shows us the animals' preference for systems that use water at times when the air temperature is higher. After 5 pm (32.04 °C and 61% humidity), there was a decrease in the duration of use of the sprinkler and shower systems, but use remained higher than that of the artificial shade system. The demand for the systems ceased after 6 pm and there was no use overnight.

The positioning of the animals in the systems presented specific characteristics. In the sprinkler system, the animals positioned themselves so that the droplets fell on most of their body, preferably on the back. In the shower system, the animals positioned themselves so that the water flow reached the flanks and pelvic region, with a preference for the left side, where the rumen is located, and where there would consequently be greater heat generation. In the artificial shade system, the animals presented stereotyped movements, stamping their hooves and moving their tails repeatedly in response to the water released by the sensors, so the use of artificial shade was also influenced as a false idea to trigger them.

There was also variation in the duration and frequency of use of treatments according to age group, since cows used the systems for longer and sought them out more times than heifers. We believe there are two possible explanations for this. The first assumes that cows were dominant over heifers (submissive). Dominance in many cases is established by the competition for resources, often being the product of aggression among animals, and thus determining which animals will have access to the resource (Val-Laillet et al., 2008). The second possibility comes from the fact that cows are more sensitive to heat than heifers since milk production increases metabolic heat (Azevêdo and Alves, 2009).

Physiological parameters

There was an increase in the coat surface temperature and respiratory rate with the THI in all treatments (Figures 4a and 4b). However, although increased, the coat surface temperature

and respiratory rate in the sprinkler and shower treatments increased the least and were within the normal range. This shows that even though the THI was high and considered harmful for animals, the systems mitigated the adverse effects of the climate and the stress conditions, illustrating the benefits that the water systems brought to animal comfort and welfare (Chen et al., 2016, 2015), as water has a high caloric capacity and high latent heat of vaporization, thus decreasing elevated temperatures efficiently and favoring greater exchange of heat between the skin and the environment (National Research Council – NRC, 2010).

Conclusion

In conclusion, dairy cows preferred to use sprinklers or showers over artificial shade in ambient conditions. These systems were more efficient at reducing the heat load and led to better behavioral and physiological parameters. The preference for shade over sprinklers or showers was more marked during the morning (9 am to 11 am), but as temperature and humidity increased the preference for systems that use water was higher and almost exclusive, especially in the case of lactating and Holstein cows because they are more thermosensitive animals.

Acknowledgments

This study was funded in part by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel – Brazil (CAPES) - Finance Code 001”, National Institute of Science and Technology of Dairy Production Chain (INCT-LEITE/UEL-PR), Londrina, Paraná, Brazil (CNPq – INCT-Leite, grant number 465725/2014-7) in Brasilia, DF, Brazil, Araucaria Foundation, Curitiba, Paraná, CNPq – “Projeto Universal”/2016, proc. 405689/2016-0, and and CNPq – “Projeto Universal”/2016, proc. 405689/2016-0.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest and this document is their original research work.

Animal welfare statement

The authors confirm that the ethical policies of the journal, as noted on the journal's author guidelines page, have been adhered to experimental procedures performed in the current study were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals, through Protocol Ceua N°. 2255190718, of the State University of Maringá (Maringá, Paraná, Brazil).

Authors' contributions

KLGY conceived and designed the experiment. KLGY, GTS and JCD performed the research. KLGY, BGLS and JACO conducted the experiment. KLGY, MRS, MF and BGLS collected the samples and data. KLGY and JACO performed the statistical analysis. KLGY and GTS wrote the manuscript. All authors performed experiments, read, and approved the final manuscript.

References

- Aikman, P.C., Reynolds, C.K., Beever, D.E., 2008. Diet Digestibility , Rate of Passage , and Eating and Rumination Behavior of Jersey and Holstein Cows. *J. Dairy Sci.* 91, 1103-1114. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0724>
- Alfredo, J., Agudelo, B., Augusto, S., Quadros, F. De, Carlos, L., Machado, P., Ag, E., 2013. Scratching , cleaning and social bonding : grooming and their biological meaning in ruminants. *Rev. CES Med. Vet. y Zootec.* 8, 120–131.
- Azevêdo, D.M.M.R., Alves, A.A., 2009. *Bioclimatologia aplicada à produção de bovinos leiteiros nos tópicos.*, 1º Edição. ed, Embrapa Meio-Norte. Teresina.
- Bernabucci, U., Biffani, S., Buggiotti, L., Vitali, A., Lacetera, N., Nardone, A., 2014. The effects of heat stress in Italian Holstein dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 97, 471–486. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6611>
- Chen, J.M., Schütz, K.E., Tucker, C.B., 2016. Cooling cows efficiently with water spray : Behavioral , physiological , and production responses to sprinklers at the feed bunk. *J. Dairy Sci.* 99, 4607–4618. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10714>

- Chen, J.M., Schütz, K.E., Tucker, C.B., 2015. Cooling cows efficiently with sprinklers : Physiological responses to water spray. *J. Dairy Sci.* 98, 6925–6938. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9434>
- Ferro, F.R. de A., Neto, C.C.C., Filho, M. da R.T., Ferri, S.T.S., Montaldo, Y.C., 2010. Efeito Do Estresse Calórico No Desempenho Reprodutivo de vacas leiteiras. *Rev. Verde* 5, 1–25.
- Igono, O., Johnson, D., Steevens, J., Hainen, A., Shanklin, D., 1988. Effect of season on milk temperature, milk growth hormone, prolactin, and somatic cell count of lactating cattle. *bio Meteorology* 32, 194–200. <https://doi.org/10.1007/bf01045279>
- Kamal, R., Dutt, T., Patel, M., Dey, A., Bharti, P.K., 2018. Heat stress and effect of shade materials on hormonal and behavior response of dairy cattle : a review. *Trop. Anim. Health Prod.* 50, 701-706.
- Kaufman, J.D., Saxton, A.M., Rius, A.G., 2018. Short communication : Relationships among temperature-humidity index with rectal , udder surface , and vaginal temperatures in lactating dairy cows experiencing heat stress. *J. Dairy Sci.* 101, 6424–6429. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13799>
- Legrand, A., Schütz, K.E., Tucker, C.B., 2011. Using water to cool cattle : Behavioral and physiological changes associated with voluntary use of cow showers. *J. Dairy Sci.* 94, 3376-3386. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3901>
- Martello, L.S., Júnior, H.S., Silva, S. da L. e, Titto, E.A.L., 2004. Respostas fisiológicas e produtivas de vacas holandesas em lactação submetidas a diferentes ambientes. *Rev. Bras. Zootec.* 33, 181-191. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S1519-99402013000300016>
- Nascimento, S.T., Sandro, A., Maia, C., França, V. De, Fonsêca, C., Cardoso, C., Nascimento, N., Carvalho, M.D. De, Pinheiro, G., 2019. Physiological responses and thermal equilibrium of Jersey dairy cows in tropical environment. *Int. J. Biometeorol.* 1-10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00484-019-01734-w> SPECIAL
- National Research Council – NRC., 2010. Nutrient requirements of dairy cattle: Seventh Revised Edition. Viçosa. <https://doi.org/10.17226/9825>
- Schütz, K.E., Rogers, A.R., Cox, N.R., Webster, J.R., Tucker, C.B., 2011. Dairy cattle prefer shade over sprinklers: Effects on behavior and physiology. *J. Dairy Sci.* 94, 273–283. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3608>
- Staples, C.R., Thatcher, W.W., 2011. Stress in Dairy Animals: Heat Stress: Effects on Milk Production and Composition. *Encycl. Dairy Sci.* Second Ed. 561–566. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00467-2>
- Tao, S., Bubolz, J.W., do Amaral, B.C., Thompson, I.M., Hayen, M.J., Johnson, S.E., Dahl, G.E., 2011. Effect of heat stress during the dry period on mammary gland development. *J. Dairy Sci.* 94, 5976–5986. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4329>
- Thom, E.C., 1959. The Discomfort Index. *Weatherwise* 12, 57–61. <https://doi.org/10.1080/00431672.1959.9926960>
- Tucker, C.B., Rogers, A.R., Schu, K.E., 2008. Effect of solar radiation on dairy cattle behaviour , use of shade and body temperature in a pasture-based system. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 109, 141–154. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2007.03.015>
- Val-Laillet, D., Passillé, A.M. de, Rushen, J., von Keyserlingk, M.A.G., 2008. The concept of social dominance and the social distribution of feeding-related displacements between cows. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 111, 158–172. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2007.06.001>

- Wolfenson, D., Roth, Z., 2018. Impact of heat stress on cow reproduction and fertility. *Anim. Front.* 9, 32–38. <https://doi.org/10.1093/af/vfy027>
- Zimbelman, R.B., Rhoads, R.P., Collier, R.J., Duff, G.C., 2009. A re-evaluation of the impact of temperature humidity index (THI) and black globe humidity index (BGHI) on milk production in high producing dairy cows. *Proc. ...* 158–169.

Tables

Table 1- Meteorological data collected during the experimental period

Variables	Mean
Air Temperature (°C)	26
Relative Humidity (%)	74.07
Radiation (W/m ²)	338.22
THI ¹	73.40

¹ temperature and humidity index

Table 2- Duration (minutes) of behavioral activities in relation to different pasture heat stress reduction systems.

	Treatments			Breed		Age group		S.E.M
	Sprinkler	Shower	As ¹	Holstein	Jersey	Cows ²	Heifers ³	
Standing idle	183.75 ^a	187.92 ^a	156.12 ^b	190.83	159.28	176.39	177.22	0.096
Lying idle	48.74	59.17	67.94	53.06 ^b	63.54 ^a	32.77	83.89	0.537
Grazing	108.74 ^b	117.50 ^a	107.92 ^b	99.72	123.04	106.66	116.11	0.736
Ruminating	119.16	92.50	118.33	108.88 ^b	111.11 ^a	147.77	72.22	0.089
Grooming	19.71	25.41	30.42	27.50 ^a	22.77 ^b	16.55	33.89	0.344
<i>P</i> value								
	<i>P</i> Treatment	<i>P</i> Breed	<i>P</i> Age group	<i>P</i> Treat* Breed		<i>P</i> Treat* Age group		
Standing idle	0.0364	0.8845	0.1992	0.7009		0.9453		
Lying idle	0.4256	0.0006	0.9968	0.9441		0.1581		
Grazing	0.0435	0.4022	0.3989	0.3259		0.9145		
Ruminating	0.7979	<0.0001	0.2037	0.3596		0.9451		
Grooming	0.4341	0.0006	0.1829	0.6617		0.9123		

¹artificial shade; ²lactating cows; ³pubescent heifers. Means followed by the same letter on the line do not differ from each other by the Tukey test, $P < 0.05$

Table 3- Duration (minutes) and frequency of use of pasture heat stress reduction systems.

	Treatments			Breed		Age group		S.E.M
	Sprinkler	Shower	As ¹	Holstein	Jersey	Cows ²	Heifers ³	
Duration	183.50 ^a	178.25 ^a	67.5 ^b	160.00	121.33	204.67 ^a	81.67 ^b	11.062
Frequency of use	6.57 ^a	7.0 ^a	1.17 ^b	5.56	4.39	6.57 ^a	3.37 ^b	0.280
<i>P</i> value								
	<i>P</i> Treatment	<i>P</i> Breed	<i>P</i> Age group	<i>P</i> Treat* Br ⁴	<i>P</i> Treat* Ag ⁵			
Duration	<0.0001	0.0876	0.0004	0.1849	<0.0001			
Frequency of use	<0.0001	0.290	0.013	0.0566	<0.0001			

¹artificial shade; ²lactating cows; ³pubescent heifers; ⁴Breed; ⁵Age group. Means followed by the same letter on the line do not differ from each other by the Tukey test, $P < 0.05$

Table 4- Treatment x breed and treatment x age interactions on duration (minutes) and frequency of system use.

	Age group					
	Pubescent heifers			Lactating cows		
	Sprinkler	Shower	Artificial shade	Sprinkler	Shower	Artificial shade
Duration	97 ^b	89 ^b	59 ^b	270 ^a	268 ^a	76 ^b
Frequency of use	5.0 ^B	3.94 ^{BC}	1.17 ^C	8.50 ^A	10.06 ^A	1.17 ^C

Means followed by the same letter on the line do not differ from each other by the Tukey test, $P < 0.05$. Upper case letters for treatment x age group interaction line, and lowercase letters for treatment x age interaction line.

Table 5- Respiratory rate (mov.min⁻¹) and coat surface temperature (°C) evaluated in different treatments.

	Treatments			Breed		Age group		S.E.M
	Sprinkler	Shower	As ¹	Holstein	Jersey	Cows ²	Heifers ³	
Respiratory rate	64.83 ^a	66.14 ^a	75.22 ^b	65.70	71.62	66.11	71.50	1.0873
Hair coat surface ⁶	34.85 ^a	34.62 ^a	35.48 ^b	34.67	35.26	34.50	35.52	0.1499
<i>P</i> value								
	<i>P</i> Treatment	<i>P</i> Breed	<i>P</i> Age group	<i>P</i> Treat* Br ⁴	<i>P</i> Treat* Ag ⁵			
Respiratory rate	<0.0001	0.0528	0.0732	0.1483	0.6363			
Hair coat surface ⁶	<0.0001	0.1150	0.0537	0.1074	0.0843			

¹artificial shade; ²lactating cows; ³pubescent heifers; ⁴Breed; ⁵Age group; ⁶Hair coat surface temperature. Means followed by the same letter on the line do not differ from each other by the Tukey test, $P < 0.05$

Figures captions

Figure 1- (a) Sprinkling + natural shade; (b) showers + natural shade; and (c) artificial shade

Figure 2- (a) Duration in minutes of using the systems in isolation and the artificial shade in each system; (b) Frequency of using the systems in isolation and the artificial shade in each system

Figure 3- (a) Influence of duration (minutes) of use of sprinkler, shower, and artificial shade systems; (b) Influence of frequency of use of sprinkler, shower, and artificial shade systems

Figure 4- (a) Regression analysis of hair coat surface temperature ($^{\circ}\text{C}$) of animals subjected to THI sprinkler + artificial shade, shower + artificial shade and artificial shade systems; (b) Regression analysis of respiratory rate (mov. Min^{-1}) of animals subjected to THI sprinkler + artificial shade, shower + artificial shade and artificial shade systems

Figures

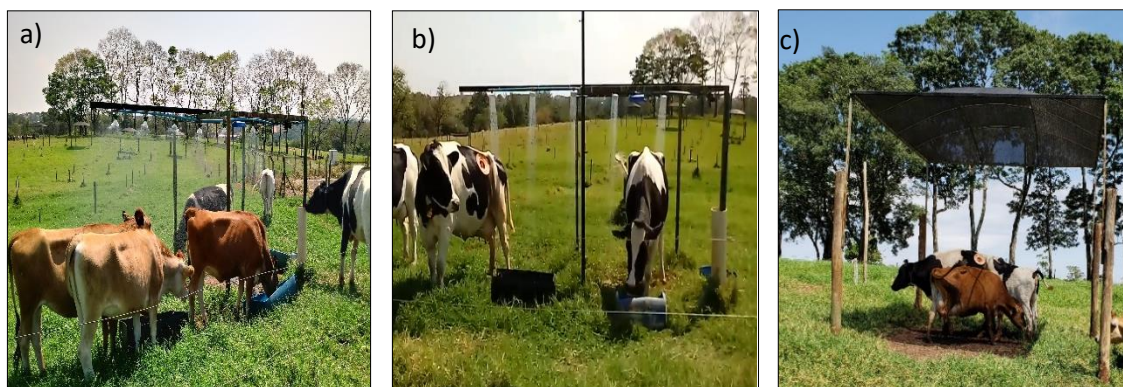


Figure 1-(a) Sprinkling + natural shade; (b) Showers + natural shade; and (c) Artificial shade

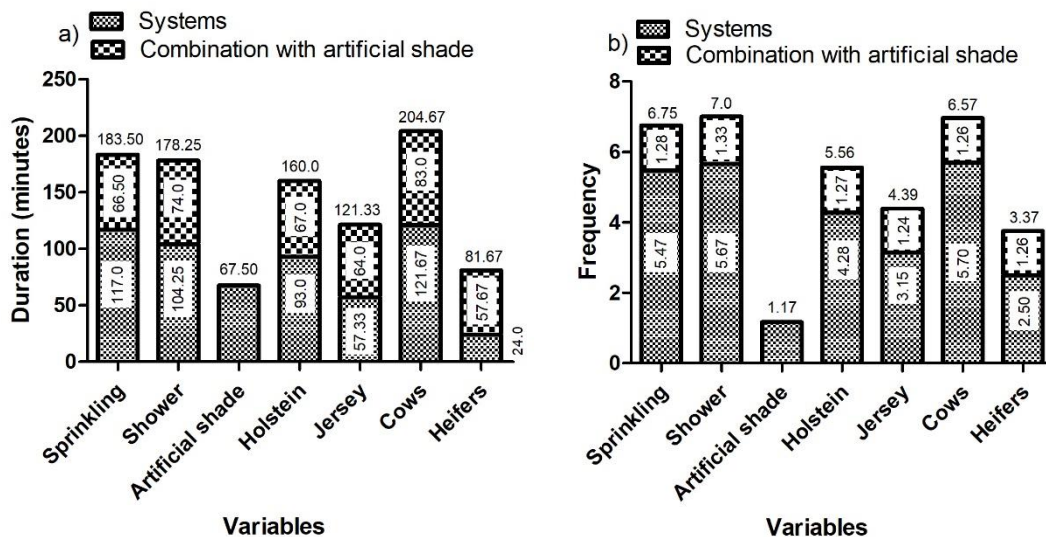


Figure 2- (a) Duration in minutes of using the systems in isolation and the artificial shade in each system; (b) Frequency of using the systems in isolation and the artificial shade in each system

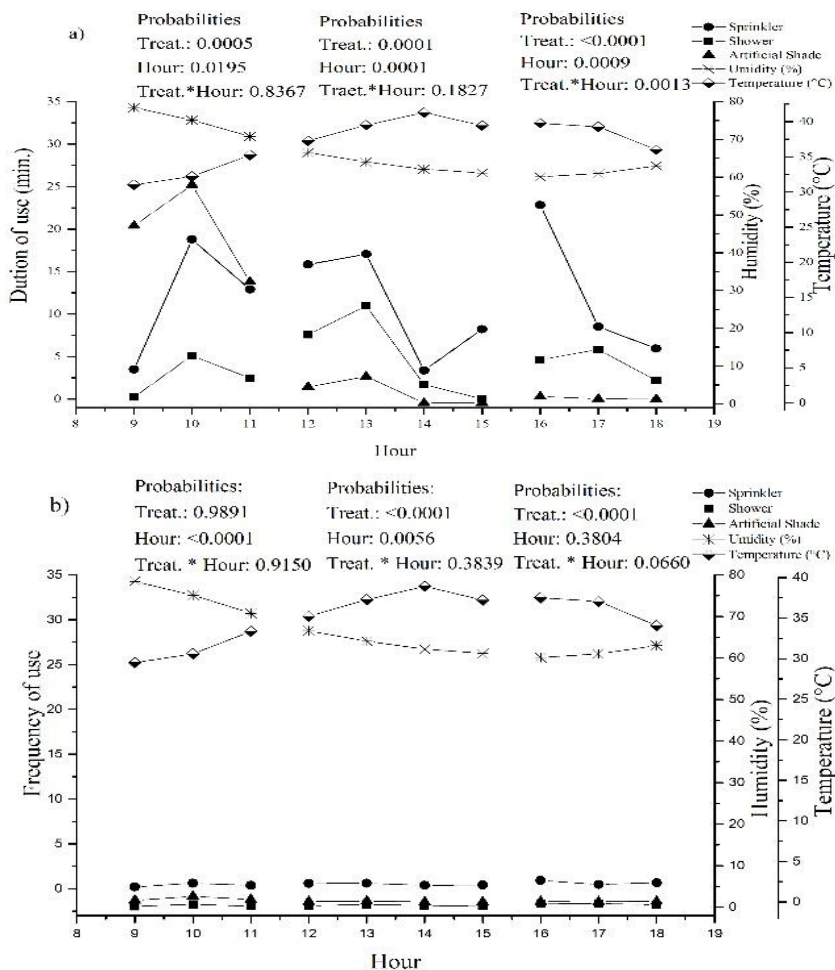


Figure 3-(a) Influence of duration (minutes) of use of sprinkler, shower and artificial shade systems; (b) Influence of frequency of use of sprinkler, shower and artificial shade systems

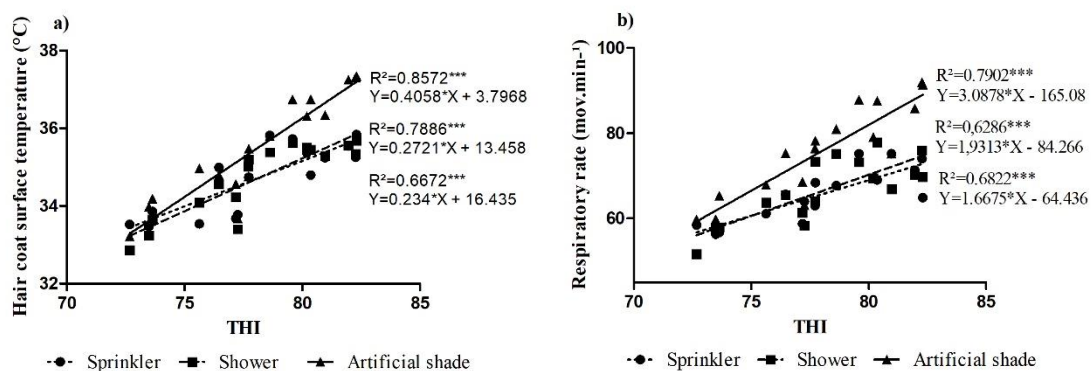


Figure 4- (a) Regression analysis of hair coat surface temperature (°C) of animals subjected to THI sprinkler + artificial shade, shower + artificial shade and artificial shade systems; (b) Regression analysis of respiratory rate (mov. Min⁻¹) of animals subjected

Highlights

- 1- Thermal stress can influence the physiological and behavioral parameters of animals, inferring their behavior and welfare.
- 2- We aimed to develop thermal stress mitigation systems for animals raised on pasture.
- 3- The animals sought and used the water systems (sprinkler and shower) more often than the artificial shade system, presenting better behavioral and physiological parameters.
- 4- Temperature and humidity influenced the demand for systems.

Summary

Thermal stress of animals raised on pasture

Yamada.

Abstract- Thermal stress is intense among the tropics and affects the physiological, productive, and reproductive parameters of animals. Therefore, we created devices to reduce thermal stress in pastures, with the hypothesis that the systems would improve the physiological, productive, and reproductive parameters of animals, providing more comfort and welfare to the animals and greater profitability for the producer.

II. *In-vitro* production of dairy cow and heifer embryos is influenced by pasture heat-stress-reduction systems

(Journal of dairy science)

ABSTRACT

We evaluated the influences of three pasture heat-stress-reducing systems on *in-vitro* parameters of Holstein and Jersey cows and heifers. The experiment was conducted at the Iguatemi Experimental Farm from October to November 2018. Twelve animals were used, three Holstein cows (600 ± 30 kg of body weight and average milk yield 27 ± 3.5 kg day⁻¹ in lactation stage between the third and fourth month), three Jersey cows (370 ± 11 kg of body weight and average milk yield 11 ± 1.5 kg day⁻¹ in lactation stage between the fifth and seventh month), three heifers Holstein (325 ± 25 kg of body weight and 16 ± 0.6 months of age) and three Jersey heifers (250 ± 25 kg of body weight and 13 ± 0.6 months of age), distributed in four 3×3 Latin squares in a $3 \times 2 \times 2$ factorial arrangement with three treatments (artificial shade + sprinkler system; artificial shade + shower system; and artificial shade (control)), two breeds (Holstein and Jersey), and two physiological stages (cows and heifers). We determined climatic data (air temperature,

relative humidity, solar radiation, wind speed, globe temperature, and Heat Load Index (HLI)), physiological parameters (respiratory rate, coat surface temperature, and rectal temperature), and *in-vitro* parameters (oocyte and embryonic aspects). The results allow us to conclude that the sprinkler + artificial shade and showers + artificial shade treatments provided better values for respiration rate and coat surface temperature, but all systems were efficient in maintaining rectal temperature. Sprinkler systems and showers had a higher positive impact on the number of total oocytes and viable oocytes. It is evident that the use of these resources associated with *in-vitro* embryo production is a strategy to be considered for greater success in this sector.

Keywords: Cattle; Thermal stress; Production; Reproduction; *In-vitro* production

INTRODUCTION

The combination of high air temperature with high humidity is one of the main causes of the deleterious effects of thermal stress on the productive and reproductive indices of dairy cows. This occurs especially in those with high yields (Dash et al., 2016; Dikmen and Hansen, 2009; Wolfenson and Roth, 2018) and raised in tropical countries (Liu et al., 2017).

The inability to dissipate excess body heat results in decreased food intake (which can be reduced by up to 40%) (Staples and Thatcher, 2011), rumination and consequently in absorption and nutrients, causing hormonal changes that lead to decreased milk production and quality (Bernabucci et al., 2014).

The reproductive aspects are affected at all levels of the process due to the decrease of specific hormones. There is a decrease in GnRH, gonadotropin-releasing hormone, which influences the release of luteinizing hormone (LH) and follicle-

stimulating hormone (FSH), which have a close correlation, resulting in smaller follicles, often infertile due to nuclear and cytoplasmic changes, affecting the organization of the cytoskeleton and microtubulins and preventing the progression of the metaphase II phase. This results in reduced maturation and can affect numerous follicular waves (Wolfenson and Roth, 2018).

Thermal stress also decreases embryonic development as it diverts blood flow from the uterus to the periphery of the body, also diverting nutrients intended for the embryo (Wolfenson and Roth, 2018). The early embryonic phases (morula-blastula) are more sensitive to thermal stress, since the morula-stage embryo does not yet have its genome activated and does not produce HSP70, the protein responsible for providing resistance of the embryo to thermal stress (Ferro et al., 2010).

In this context, an important aspect to be analyzed is the need for new technologies, concerning environmental, genetic, and embryonic reproduction programs with the aim at minimizing the effects of thermal stress on animals.

Thus, the objective of this study was to analyze the influence of heat stress-reducing systems on *in vitro* parameters of dairy cows and heifers of different breeds (Holstein and Jersey) as well as on physiological stages (lactating cows and puberty heifers). We tested the hypothesis that thermal stress-reducing systems increase animal welfare, resulting in benefits in reproductive aspects.

MATERIAL AND METHODS

Locality and duration

The experiment was carried out from October to November 2018, spring in the southern hemisphere, at the Iguatemi Experimental Farm (FEI) of the State University of Maringá (UEM). Maturation, fertilization, and cultivation of embryos were performed at

the Reproduction Biotechnology Center - BIOTEC at the UNICESUMAR Farm (Maringá Higher Education Center), Maringá, PR.

Climate

The weather of the region is classified as subtropical humid mesothermal (Cfa), according to the Köppen classification, with hot summers and centralized rainfall in this period. The average temperature during the experimental period was 26 °C and no rain was observed.

Animals and management

Twelve animals were used and distributed to a pasture of *Cynodon plectostachyus* in three experimental paddocks with 2,780 m². Of these animals, six were lactating cows, three Holstein cows (600 ± 30 kg of body weight, 53 ± 11 months of age, and average milk production of 27 ± 3.5 kg day⁻¹ in the lactation stage between the third and fourth month), and three Jersey cows (370 ± 11 kg of body weight, 40 ± 6 months of age, and average milk production of 11 ± 1.5 kg day⁻¹ in the lactation stage between the fifth and seventh month). There were also six pubescent heifers: three Holstein heifers (325 ± 25 kg of body weight and 16 ± 0.6 months of age) and three Jersey heifers (250 ± 25 kg of body weight and 13 ± 0.6 months of age).

The cows were milked twice a day, at 6 a.m. and 3 p.m., soon after being fed, and then released at the appropriate paddocks. The heifers were fed on pasture during this period. The feeding of the animals (cows and heifers) was the same as that usually provided in the FEI throughout the experiment (Table 1), but the diets met the nutritional requirements of each animal category and the physiological stage in which they were found.

Treatments and experimental design

The animals were distributed in four 3 x 3 Latin squares, in a 3 x 2 x 2 factorial arrangement, with three types of treatments (sprinkling + artificial shade, shower + artificial shade, and artificial shade), two breeds (Holstein and Jersey), and two physiological stages (lactating cows and pubescent heifers). Each experimental period lasted for 14 days (long), of which 11 days were for adaptation and 3 days for milk collection and the collection of climatic and reproductive data (follicular aspiration on the last day).

The experiment tested the influence of three different thermal stress-reducing systems (Figures 1, 2 and 3) and their association on the production and reproduction of animals, being them: sprinkling + artificial shade (Tspr); showers + artificial shade (Tsho); and artificial shade (Tas).

The experiment tested the influences of three different thermal stress-reducing systems (Figs. 1, 2 and 3) and their association with the production and reproduction of animals, namely: sprinkling + artificial shade (Tspr); showers + artificial shade (Tsho); and artificial shade (Tas). The systems were fed by a 10,000-L water tank and a 2.5-hp irrigation bomb, which sent water to the systems through the polyethylene pipes that were fixed to the iron structures. The systems were activated when the animals passed through the presence sensors attached to the iron structures

Environmental Measurements

Meteorological data included ambient air temperature (T; °C), relative humidity (RH; %), black globe temperature (BGT; °C), solar radiation (R; W m²), and wind speed (WS; m s⁻¹). The data were measured by a digital thermo hygrometer with an anemometer

and by the FEI weather station at 30-min intervals during the collection days. Based on the obtained data, the Heat Load Index (HLI) was determined:

$$\text{HLI} = 8.62 + (0.38\text{RH}) + (1.55\text{BGT}) - (0.5\text{WS}) + [e^{2.4-\text{WS}}],$$

where RH = relative humidity (%), BGT = black globe temperature (°C), and WS = wind speed (m s⁻¹) (Gaughan et al., 2008).

Quality and milk yield data

The daily milk yield (MY, kg) was measured in the morning and afternoon, for 4 days (8 consecutive milking sessions), in the milk collecting system, and fat corrected milk (kg/day) was calculated according to the NRC (2001) using the equation:

$$\text{FCM4\%} = (0.4 \times \text{MY, kg}) + (15 \times \text{F, kg})$$

Fat (F), total solids (TS), protein (PROT), lactose (LAC), and somatic cell count (SCC) [which was transformed into somatic cell score (SCE) on a logarithmic scale because it does not follow a normal curve] were measured at the Mesorregional Center of Excellence in Milk Technology of the FEI, using EKOMILK[®] equipment and Somatic Cells Analyzerekomilkscan[®].

Physiological parameters

The rectal temperature (RT; °C) was recorded manually between 9 a.m. and 3 p.m., using a digital thermometer inserted into the rectum of the animals. The respiratory rate (RR; breaths/min⁻¹) was measured every 30 minutes from 9 a.m. to 6:30 p.m., except at the time of milking, and was obtained by counting the movements of the flank for 1 minute. The temperature of the coat surface (CS; °C) was determined using a thermal

camera (Fluke Ti100 Infrared Thermal Imaging Camera) and measured approximately 1 meter away from the animals every 30 minutes from 9 a.m. to 6:30 p.m.

In-vitro production

None of the experimental animals was submitted to hormonal induction for estrous synchronization or superovulation. Follicular aspiration was performed on random days of the estrous cycle.

Follicular aspiration

The animals received caudal epidural anesthesia (4 mL of 2% lidocaine hydrochloride). After anesthesia, the transducer (5 MHz UST 974-5 micro convex transducer) was inserted into the vaginal sac of the animals, and the ovaries were visualized using an ultrasound scanner (Aloka SSD-500). Then, the visible follicles were aspirated by 18G needles (Cook VBOAS 1855) and a suction line (Cook VBOA 18 L) for 50-mL falcon tubes. A solution with 2% fetal bovine serum, 98.0% DMPBS-FLUSH (Nutricell), and 25 IU/mL sodium heparin were used to wash materials such as needles and Falcon tubes.

Washing and selection of oocytes

The aspirated follicles were washed (embryo collection filter (EmCom[®])) with the same washing solution as the materials. The precipitated oocytes were transferred to 100-mm Petri dishes, where they were counted and classified. The oocytes were analyzed morphologically and classified as viable according to the number of layers of cells of the cumulus complex. They were classified as quality 1, 2, 3, oocytes without cumulus, naked, expanded, degenerated, and atresia (Lonergan et al., 1994). Only grade 1, 2, or 3

oocytes were classified as viable. Soon after, they were washed in MIV-T solution (Nutricell) and transported to the commercial laboratory in cryotubes with maturation solution at 35°C.

In-vitro maturation

In the laboratory, the viable oocytes were washed three times in TCM-199 with Earles salts (Gibco®), glutamine (Sigma®), and NaHCO₃ (Mallinckrodt®), supplemented with 10% fetal bovine serum (SFB) (Cultilab®), 50 µg/mL of gentamicin (Sigma®), 22 µg/mL pyruvate (Biochemical®), 50 µg LH/mL (Bioniche®), 0.5 µg FSH/mL (Bioniche®), and 1 µg estradiol/mL (Sigma®), and placed in an oven for 24 h (in micro-drops of mineral oil coated with maturation medium) at 38.5°C and 5% CO₂ atmosphere.

In-vitro fertilization

After 24 h, the mature oocytes were washed three times in 100 µl TALP medium supplemented with 10 µg/mL heparin (Sigma®), 22 µl/mL pyruvate (Biochemical®), 50 µg/mL gentamicin (Sigma®), bovine serum albumin-BSA (without fatty acids) (Sigma®), PHE solution (2 µM penicillin) (Sigma®), 1 µM hypotaurine (Sigma®), and 0.25 µM epinephrine (Sigma®).

For the selection of the spermatozoa, the mobile fraction of the semen from the departure of the same bull of the Holstein breed was thawed in a water bath at 35°C and separated by a discontinuous gradient of Percoll at 45 and 90% for 4 min at 6,000 rpm. Soon after, the spermatozoa were stored in micro-drops, where they remained for 30 min until the transference of the oocytes (10 oocytes/drop), where they were kept for 22-24 h at a constant temperature of 38.5°C and an atmosphere of 5% CO₂ in air.

In-vitro culture

After fertilization (18 h), the zygotes were cultivated in Synthetic Oviduct Fluid (SOF) supplemented with 5% fetal bovine serum (Cultilab®) in a controlled atmosphere with CO₂/N₂/O₂ gases. After 7 days (D7), the embryo production rate was analyzed, and the embryos were returned to the greenhouse until day 10 (D10) for determination of the hatching rate.

Statistical analysis

The data were analyzed using the MIXED procedure of SAS (Statistical Analysis System, 9.3). When there were interactions between the factors, the statistical analysis was performed using Fisher's least significant difference test (LSD) to disrupt the interaction.

The physiological data were analyzed according to the following model:

$$Y_{ijklmno} = \mu + S_i + A_{j:i} + P_k + T_l + BR_m + AG_n + SE_o + T \times BR_{lm} + T \times AG_{ln} + e_{ijklmno};$$

with $p_k \approx N(0, \sigma_p^2)$, $a_l \approx N(0, \sigma_a^2)$, and $e_{ijkl} \approx N(0, \sigma_e^2)$, where Y_{ijkl} is the observed value, μ is the general mean, S_i is the fixed effect of the animal within the square, $A_{j:i}$ is the random effect of the animal within each Latin square, P_k is the fixed effect of the experimental period, T_l is the fixed effect of the treatment ($l = 1$ and 3), BR_m is the effect of breed ($m = 1$ and 2), AG_n is the fixed effect of the age group ($n = 1$ and 2), SE_o is the effect fixed of the season ($o = 1$ and 2), $T \times BR_{lm}$ is the fixed effect of the interaction between treatment and breed, $T \times AG_{ln}$ is the fixed effect of the interaction between treatment and age group, $e_{ijklmno}$ is the residual error, N indicates normal distribution,

and σ_p^2 , σ_a^2 e σ_e^2 are the variances associated with random effects associated with period and animal and with residual variance, respectively

The reproduction data was according to the following model:

$$Y_{ijklmno} = \mu + Si + Aj:i + Pk + Tl + BRm + AG + T \times BRlm + T \times AGln \\ + e_{ijklmno}$$

with $p_k \approx N(0, \sigma_p^2)$, $a_l \approx N(0, \sigma_a^2)$, and $e_{ijkl} \approx N(0, \sigma_e^2)$, where Y_{ijkl} is the observed value, μ is the general mean, Si is the fixed effect of the animal within the square, $Aj:i$ is the random effect of the animal within each Latin square, Pk is the fixed effect of the experimental period, T_l is the fixed effect of the treatment ($l = 1$ and 3), BRm is the effect of breed ($m = 1$ and 2), AG_n is the fixed effect of the age group ($n = 1$ and 2), $T \times BRlm$ is the fixed effect of the interaction between treatment and breed, $T \times AGlm$ is the fixed effect of the interaction between treatment and age group, $e_{ijklmno}$ is the residual error, N indicates normal distribution, and σ_p^2 , σ_a^2 e σ_e^2 are the variances associated with random effects associated with period and animal and with residual variance, respectively.

The productive and qualitative data was according to the following model:

$$Y_{ijklmno} = \mu + Si + Aj:i + Pk + Tl + BRm + T \times BRlm + e_{ijklmno}$$

With $p_k \approx N(0, \sigma_p^2)$, $a_l \approx N(0, \sigma_a^2)$ e $e_{ijkl} \approx N(0, \sigma_e^2)$, where Y_{ijkl} is the observed value; μ is the general mean; Si fixed effect of animal within in square; $Aj:i$ random effect of the animal within each latin square; Pk fixed effect of experimental period; T_l is the fixed effect of Treatment ($l= 1$ and 3); BRm is the effect of Breed ($m=1$ and 2); $T \times BRlm$ is the fixed effect of the interaction between treatment and breed; $e_{ijklmno}$ is the residual error;

N indicates normal distribution; and σ_p^2 , σ_a^2 e σ_e^2 are the variances associated with random effects associated with period and animal, and residual variance, respectively.

The graphics were made using the GraphPad PRISM 8.0 software. The data were submitted to linear regression and Pearson's correlation coefficient (r) analysis. The adequacy of the adjustment was assessed by the coefficient of determination (R^2). The level of significance adopted was 5%.

RESULTS

Meteorological parameters

The air temperature and, consequently, the incidence of solar radiation during the night (22°C and 12.1 W/m², respectively) and the morning (27.4°C and 587.1 W/m²) were lower than the values found for these climatic variables in the afternoon (31.5°C and 870.5 W/m²). Air humidity was higher in the nocturnal (79.8%) and diurnal (73.8%) periods than in the afternoon (62.5%) periods. Wind speed was higher in the morning (1.46 m/s⁻¹) when compared to the afternoon (1.15 m/s⁻¹) and night (1.18 m/s⁻¹). Due to the high incidence of solar radiation and, consequently, air temperature associated with low air movement, the values for temperature of the black globe and HLI were high, with 39.6°C and 98.24 in the afternoon and 37.6°C and 97.69 in the morning (Table 2).

Physiological parameters

The period influenced the values of RR, CS, and RT ($P < 0.05$), with lower values found in the morning (66.19 breaths min⁻¹; 34.55°C and 38.27°C respectively) and higher values in the afternoon (71.28 breaths min⁻¹; 35.42°C and 39.01°C, respectively).

Breed, age group, and interactions analyzed did not influence RR and CS values ($P > 0.05$). The treatments influenced RR and CS values ($P < 0.05$); RR values were lower

and similar for sprinkler and shower values (64.83 and 66.1 breaths min^{-1} respectively) when compared to artificial shade (75.22 breaths min^{-1}). These patterns were also found for CS, where sprinkler and shower treatments had lower and similar values (34.86 and 34.62°C, respectively) when compared to artificial shade treatment (35.48°C).

The RT affected the age group ($P < 0.05$), with heifers (38.66°C) presenting higher means than cows (38.45°C). No significant RT values were found for treatment, breed, and interactions ($P > 0.05$).

The parameters RR, CS, and RT presented positive and significant correlation coefficients ($P < 0.0001$) with the Heat Load Index (HLI) (Figs. 4, 5, and 6) across all treatments. The correlation between HLI and RT for sprinkler and shower treatments was low and not significant ($P > 0.0001$). The linear correlation coefficients between HLI and CS for artificial shading, sprinkling, and showers were $R^2 = 0.5428$, 0.4344, and 0.4684, respectively. The linear correlation coefficients between HLI and RR were $R^2 = 0.5613$ for artificial shading, $R^2 = 0.6120$ for showers, and $R^2 = 0.3803$ for sprinkling. The linear correlation coefficients between HLI and RT were $R^2 = 0.9393$ for artificial shade, $R^2 = 0.1872$ for showers, and $R^2 = 0.0657$ for sprinkling.

In-vitro production parameters

There was an effect of the treatments on the number of aspirated oocytes and the number of viable oocytes ($P < 0.05$). The animals submitted to sprinkler and shower treatments presented a higher number of oocytes (16.0 and 15.08, respectively) and of viable oocytes (12.50 and 12.92, respectively) compared to animals subjected to artificial shadow (10.75 and 9.0 oocytes, respectively). No significant differences ($P > 0.05$) were found for the breed, age group, and the interaction between treatment x age group on the reproductive aspects analyzed.

There was a significant interaction of the systems for the breeds on hatching ($P = 0.024$). The Holstein animals submitted to the sprinkler (1.50) and shower (1.17) systems presented higher values, which did not differ from the hatching values for the Jersey animals' artificial shade system (1.0). These results differed from the shade systems of the Holstein (0.67) and the sprinkler (0.50) and shower (0.67) systems for the Jersey animals.

Quality and milk yield

There were no differences in milk yield, its components or SCE in the different treatments ($P > 0.05$), and no effect was found for treatment x breed interaction on milk yield ($P > 0.05$).

There was an effect of the breed on the overall yield, F, PROT, and TS ($P < 0.05$). The Holstein cows produced more milk ($23.94 \text{ kg day}^{-1}$), a higher FCM4% ($20.39 \text{ kg day}^{-1}$) and a higher somatic cell score (5.64) than the Jersey cows ($12.04 \text{ kg day}^{-1}$, $13.12 \text{ kg day}^{-1}$ and 4.52 respectively). Jersey cows presented higher values of F (4.65%), PROT (3.99%) and TS (14.25%) than Holstein cows (3.03, 3.25 and 11.68%, respectively).

DISCUSSION

Physiological parameters

The RR, CS, and RT values were lower in the morning compared to the afternoon period (Table 3), which was due to the milder air temperature and radiation in the night and morning periods (Table 2). This favored heat dissipation of the animals (Chen et al., 2015; Spiers et al., 2018), providing more comfort.

It was noticed that RR and CS increased with the increase in HLI (Figs. 4 and 5), showing high correlations, with HLI being responsible for 56.13% of the increase in RR

for the treatment with artificial shade, 61.20% for showers, and 38.03% for sprinkling. The correlation occurred in HLI with CS, in which the meteorological variations of this index influenced 54.28% for the increase of CS in the artificial shade system, 46.84% for showers, and 43.44% for sprinklers. However, (despite the high correlation between HLI, RR, and CS), sprinkler and shower systems showed lower and similar values for RR (64.83 and 66.14 breaths min^{-1} , respectively) and CS (34.85 and 34.62°C) in relation to artificial shade (75.22 breaths min^{-1} and 35.48°C) (Table 3). The treatment with artificial shade resulted in values above the average reference values for RR of 60 breaths min^{-1} , and for CS from 31.6 to 34.7°C (Martello et al., 2004), indicating that the sprinkler systems and showers were more efficient in maintaining the homeothermy of the animals due to greater thermolysis.

On the other hand, the use of such systems did not result in significant differences in RT, although there was a high correlation of the HLI with the RT for the artificial shade system (93.93%) and low correlations with the animals submitted to the shower systems (18.72%) and sprinkler (6.57%), showing that all treatments obtained values within the reference range (between 38.1 and 39.1°C) (West et al., 2003). This fact may be the result of the greater heat dissipation of the animals (Veissier et al., 2018; Wankar and Yadav, 2018) through the increase in RR, showing that all systems contributed to the maintenance of rectal temperature, with RT being one of the main indices for assessing the adaptability of animals (Silva et al., 2012).

The RT in the group of heifers was higher (38.82°C) than that in the group of cows (38.45°C), albeit within the normal reference values. The rectal temperature can vary due to breed, physiological stage, age, and time of day when the temperature is measured. We assume that in our experiment, the highest temperature found for the group of heifers was due to a shorter time and frequency of use of the systems. This also justifies the trends

obtained in the age group analyses for RR ($P = 0.051$) and CS ($P = 0.089$), because under normal conditions, the group of cows would present higher RT values due to the greater metabolism, generating greater endogenous heat (Azevêdo and Alves, 2009).

In-vitro production

The total number of oocytes recovered in the sprinkler and shower treatments was greater than the number of oocytes collected from the animals subjected to the artificial shade treatment. This leads us to infer that the animals in the latter group were more thermally stressed. Thermal stress affects the follicular cell function, reducing the quality and quantity of oocytes due to changes in the follicular wave, harming antral and subsequent follicles (Rocha et al., 2012). Thus, the results obtained demonstrate that the use of systems that minimize thermal stress increases the quantity and quality of oocytes.

The number of viable oocytes showed the same behavior, namely oocytes from the spray and shower treatments showed greater viability when compared to those of the artificial shade treatment. These findings reflect that the thermoregulatory mechanisms (CS and RR) acted as a barrier against the deleterious impact of thermal stress on oocyte parameters in sprinkler and shower treatments. In such systems, thermoregulation of the animals was improved, and there was no interference in quantity and viability of oocytes, which can have an impact on the number of embryos produced. However, when analyzing the percentage of oocyte viability found in previous studies, the values were above the expected average ($> 60\%$) (Carneiro et al., 2019) in all tested systems.

The number of embryos and the hatching rate were not affected by the treatments. This result is due to the increase in RR and decrease in CS, which enabled the maintenance of RT and the use of *in-vitro* reproduction. *In-vitro* reproduction decreases embryonic loss because the cultivation, maturation, and fertilization of oocytes are carried

out in a controlled environment. Thus, it confers greater embryonic development (Hansen, 2007). It can be concluded that the use of sprinkler and showers systems, associated with artificial shade, in tropical pasture environments is a good alternative when used prior to reproductive protocols, as these conferred greater oocyte quantity and viability; in addition, *in-vitro* production grants a more suitable environment in the later phases, thereby increasing the success of the technique.

We found an interaction between treatments x breed on hatching. The Holstein animals showed higher and similar hatching values for the spray (1.50) and shower (1.17) treatments compared to the artificial shade treatment (0.67). As a result, employing water systems facilitates embryonic hatching, and this approach, in conjunction with *in-vitro* production for less heat-resistant animals (Holstein animals), is a good alternative for greater success of the technique. These results did not differ from those of the group of Jersey cows subjected to artificial shade (1.00), which differed from the spray (0.50) and shower (0.67) results from the Jersey group of animals and were similar to those obtained for the Holstein cows in the shade system (0.67). The superiority of the Jersey animals in the artificial shade system (1.00) can be explained by the lower tendency of these animals to use these systems, showing greater endurance and tolerance to thermal stress. Consequently, we assume that the use of the artificial shade system alone, for Jersey animals, would be sufficient to minimize the deleterious effects of thermal stress on the reproductive parameters of this breed.

Dairy parameters

Fluctuations in the levels of protein, fat, lactose, and, consequently, total solids during heat stress are in most cases due to the variation in food intake (Staples et al., 2011; Cowley et al., 2015), and there was no evidence of this during the experiment. It thus

appears that the three systems analyzed provided thermal comfort to the animals, resulting in the maintenance of milk production and composition.

MY and FCM4% were higher in Holstein cows, whereas the percentage of fat, protein and total solids was higher in Jersey cows. Such results are inherent to the breeds themselves. Holstein cows produce more milk than Jersey cows and Jersey cows produce milk with a higher fat and protein content, and, consequently, total solids when compared to Holstein cows, as they present higher feed conversion, use diets with high fiber and protein in a more efficient way, and also have high heritability for these characteristics (Aikman et al., 2008).

CONCLUSION

The animals submitted to sprinkler + artificial shade and shower + artificial shade treatments presented lower values of respiratory rate and hair coat surface temperature, demonstrating that these treatments were efficient strategies in reducing thermal stress, resulting in greater comfort for the animals. However, all treatments were efficient in maintaining homeostasis because there was no increase in rectal temperature, an important parameter in maintaining homeothermy. As a result, there was the maintenance of milk yield and quality in all treatments analyzed, the only statistically significant results being consequences of the racial standards analyzed.

The oocyte parameters presented better results for the sprinkling systems + artificial shade and shower + artificial shade, showing that, in tropical environments, they are good alternatives to pasture and that the association of these with the *in-vitro* production of embryos is a strategy to be considered for providing a better environment in all phases of the reproductive process.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed in part by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel – Brazil (CAPES) - Finance Code 001”, National Institute of Science and Technology of Dairy Production Chain (INCT-LEITE/UEL-PR), Londrina, Paraná, Brazil (CNPq – INCT-Leite, grant number 465725/2014-7) in Brasília, DF, Brazil, Araucaria Foundation, Curitiba, Paraná, CNPq – “Projeto Universal”/2016, proc. 405689/2016-0, and and CNPq – “Projeto Universal”/2016, proc. 405689/2016-0.

STATEMENT OF ANIMAL

All experimental procedures were conducted according to protocols approved by the Ethics Committee for the Use of Animals in Experimentation of the State University of Maringá, PR, protocol n° 2255190718.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest and this document is their original research work.

REFERENCES

- Aikman, P.C., C.K. Reynolds, and D.E. Beever. 2008. Diet Digestibility , Rate of Passage , and Eating and Rumination Behavior of Jersey and Holstein Cows. *J. Dairy Sci.* 91:1103-1114. doi:10.3168/jds.2007-0724.
- Avendaño-Reyes, L., F.D. Álvarez-Valenzuela, A. Correa-Calderón, A. Algándar-Sandoval, E. Rodríguez-González, R. Pérez-Velázquez, U. Macías-Cruz, R. Díaz-Molina, P.H. Robinson, and J.G. Fadel. 2010. Comparison of three cooling management systems to reduce heat stress in lactating Holstein cows during hot and dry ambient conditions. *Livest. Sci.* 132:48–52. doi:10.1016/j.livsci.2010.04.020.
- Azevêdo, D.M.M.R., and A.A. Alves. 2009. *Bioclimatologia Aplicada à Produção de Bovinos Leiteiros Nos Tópicos*. 1º Edição. Teresina.
- Bernabucci, U., S. Biffani, L. Buggiotti, A. Vitali, N. Lacetera, and A. Nardone. 2014. The effects of heat stress in Italian Holstein dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 97:471–486. doi:10.3168/jds.2013-6611.
- Carneiro, I. de M.B., P.A.B. Ana Lúcia Almeida Santana, R.S. dos S. Laura Nicole Filipin da Costa, Gabriel Cândido Oliveira Silva, L.F. Rocha, and L.P. Barbosa.

2019. Oócitos bovinos : influência das estações do ano e maturação in vitro em meio enriquecido com quercetina. *Magistra* 30:134–142.
- Chen, J.M., K.E. Schütz, and C.B. Tucker. 2015. Cooling cows efficiently with sprinklers : Physiological responses to water spray. *J. Dairy Sci.* 98:6925–6938. doi:10.3168/jds.2015-9434.
- Cowley, F.C., D.G. Barber, A.V. Houlihan, and D.P. Poppi. 2015. Immediate and residual effects of heat stress and restricted intake on milk protein and casein composition and energy metabolism. *J. Dairy Sci.* 98:2356–2368. doi:10.3168/jds.2014-8442.
- Dash, S., A.K. Chakravarty, A. Singh, A. Upadhyay, M. Singh, and S. Yousuf. 2016. Effect of heat stress on reproductive performances of dairy cattle and buffaloes: A review. *Vet. World* 9:235–244. doi:10.14202/vetworld.2016.235-244.
- Dikmen, S., and P.J. Hansen. 2009. Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment?. *J. Dairy Sci.* 92:109–116. doi:10.3168/jds.2008-1370.
- Ferro, F.R. de A., C.C.C. Neto, M. da R.T. Filho, S.T.S. Ferri, and Y.C. Montaldo. 2010. Efeito Do Estresse Calórico No Desempenho Reprodutivo de vacas leiteiras.. *Rev. Verde* 5:1–25.
- Gaughan, J.B., T.L. Mader, S.M. Holt, and A. Lisle. 2008. A new heat load index for feedlot cattle.. *J. Anim. Sci.* 86:226-234. doi:10.2527/jas.2007-0305.
- Hansen, P.J. 2007. Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. *Theriogenology* 12:9–18. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.04.008.
- Liu, Z., V. Ezernieks, J. Wang, N.W. Arachchillage, J.B. Garner, and W.J. Wales. 2017. Heat Stress in Dairy Cattle Alters Lipid Composition of Milk. *Sci. Rep.* 7:961. doi:10.1038/s41598-017-01120-9.
- Lonergan, P., P. Monaghan, D. Rizos, M.P. Boland, and I. Gordon. 1994. Effect of Follicle Size on Bovine Oocyte Quality and Developmental Competence Following Maturation , Fertilization , and Culture In Vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 53:48–53.
- Martello, L.S., H.S. Júnior, S. da L. e Silva, and E.A.L. Titto. 2004. Respostas fisiológicas e produtivas de vacas holandesas em lactação submetidas a diferentes ambientes.. *Rev. Bras. Zootec.* 33:181-191. doi:http://dx.doi.org/10.1590/S1519-99402013000300016.
- Rocha, D.R., M.G.F. Salles, A.A.A.N. Moura, and A.A. Araújo. 2012. Impacto do estresse térmico na reprodução da fêmea bovina. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 1:18–24.
- Silanikove, N. 2000. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. *Livest. Prod. Sci.* 67:1–18. doi:10.1016/S0301-6226(00)00162-7.
- Silva, T.P.D. e, R.G. de Oliveira, S.C.S. Júnior, and K.R. dos Santos. 2012. Efeito da exposição à radiação solar sobre parâmetros fisiológicos e estimativa do declínio na produção de leite de vacas mestiças (Holandês X Gir) no sul do estado do Piauí. *Comun. Sci.* 3:299–305.

- Spiers, D.E., J.N. Spain, M.R. Ellersieck, and M.C. Lucy. 2018. Strategic application of convective cooling to maximize the thermal gradient and reduce heat stress response in dairy cows.. J. Dairy Sci. 1-15. doi:10.3168/jds.2017-14283.
- Staples, C.R., and W.W. Thatcher. 2011. Stress in Dairy Animals: Heat Stress: Effects on Milk Production and Composition. Encycl. Dairy Sci. Second Ed. 561–566. doi:10.1016/B978-0-12-374407-4.00467-2.
- Veissier, I., E. Van laer, R. Palme, C.P.H. Moons, B. Ampe, B. Sonck, S. Andanson, and F.A.M. Tuytens. 2018. Heat stress in cows at pasture and benefit of shade in a temperate climate region. Int. J. Biometeorol. 62:585–595. doi:10.1007/s00484-017-1468-0.
- Wankar, A.K., and B. Yadav. 2018. Thermoregulatory Responses in Buffaloes during Heat Stress. Physio- Metabolic, Nutrient Utilization and Endocrine Scenario. Lap Lambert Academic Publishing.
- West, J.W., B.G. Mullinix, and J.K. Bernard. 2003. Effects of hot, humid weather on milk temperature, dry matter intake, and milk yield of lactating dairy cows.. J. Dairy Sci. 86:232–242. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73602-9.
- Wolfenson, D., and Z. Roth. 2018. Impact of heat stress on cow reproduction and fertility. Anim. Front. 9:32–38. doi:10.1093/af/vfy027.

TABLES

Table 1- Average dry matter (DM), mineral matter (MM), organic matter (OM), crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF) and ether extract (EE) of pasture, feed and silage supplied to lactating cows and pubescent heifers.

	Ingredients	Pasture ¹	Ration	Silage
Lactating cows	DM (%)	20.65	89.39	30.33
	MM (%)	9.12	10.30	4.30
	OM (%)	90.88	89.70	95.7
	CP (%)	17.68	26.19	8.07
	NDF (%)	53.77	10.30	50.38
	EE (%)	3.50	2.79	3.00
Pubescent heifers	DM (%)	20.65	89.48	30.33
	MM (%)	9.12	10.63	4.3
	OM (%)	90.88	89.37	95.7
	CP (%)	17.68	25.73	8.07
	NDF (%)	53.77	15.86	50.38
	EE (%)	3.50	2.93	3.00

¹pasture of *Cynodon plectostachyus*

Table 2- Meteorological data collected during the experimental period.

Variable	Morning	Afternoon	Night	Mean
Air Temperature (°C)	27.4	31.5	22.2	26
Relative humidity (%)	73.8	62.5	79.8	74.1
Radiation (W/m ²)	587.1	870.5	12.1	338.2
Wind speed (m/s ⁻¹)	1.46	1.15	1.18	1.21
Black globe temperature (°C)	37.6	39.6	-	39.0
Heat load index (HLI)	97.69	98.24	-	98.31

Table 3- Respiratory rate (RR; movements/min⁻¹), hair coat surface temperature (CS; °C) and rectal temperature (RT; °C) evaluated in different treatments.

	Period			Treatments		Breed	Age group			S.E.M ¹³
	Mor ¹	Aft ²	Spr ³	Sho ⁴	As ⁵	Hol ⁶	Jer ⁷	Co ⁸	He ⁹	
RR	66.19 ^b	71.28 ^a	64.83 ^a	66.14 ^a	75.22 ^b	65.70	71.62	66.11	71.50	0.149
CS	34.55 ^b	35.42 ^a	34.85 ^a	34.62 ^a	35.48 ^b	34.67	35.26	34.50	35.52	0.149
RT	38.27 ^b	39.01 ^a	38.59	38.61	38.71	38.62	38.66	38.45 ^b	38.82 ^a	0.065
<i>P</i> value										
	RR				CS (°C)			RT (°C)		
<i>P</i> Per ¹⁰	<0.001				<0.001			<0.001		
<i>P</i> Treat ¹¹	<0.001				<0.001			0.289		
<i>P</i> Br ¹²	0.110				0.054			0.794		
<i>P</i> Ag	0.051				0.089			0.049		
<i>P</i> Treat*Br	0.072				0.114			0.565		
<i>P</i> Treat*Ag	0.098				0.532			0.401		
<i>P</i> Pe*Treat*br	0.445				0.934			0.448		
<i>P</i> Pe*Treat*Ag	0.633				0.246			0.763		

¹morning; ²afternoon; ³sprinkler+artificial shadow; ⁴shower+artificial shade; ⁵artificial shadow; ⁶Holsteins; ⁷Jersey; ⁸lactating cows; ⁹pubescent heifers; ¹⁰period; ¹¹treatment; ¹²breed; ¹³mean standard error Means followed by the same letter on the line do not differ from each other by the Tukey test, $P < 0.05$

Table 4- Average total oocyte, viable oocytes, embryos and hatching in different treatments, breed, and age group.

	Treatments			Breed		Age group		S.E.M ¹
	Spr ²	Sho ³	As ⁴	Hol	Jer	Cow ⁷	Hei ⁸	
Total oocytes	16.00 ^a	15.08 ^a	10.75 ^b	19.56	8.33	12.94	14.94	2.009
Viable oocytes	12.50 ^a	12.92 ^a	9.00 ^b	16.11	6.83	10.94	12.00	1.710
%	78.1	85.64	83.7	82.72	82.0	84.5	80.3	
Embryo	1.75	1.58	1.08	1.78	1.17	1.78	1.17	0.202
%	14.0	12.26	12.04	11.03	17.07	16.24	9.72	
Hatching	1.00	0.92	0.83	1.11	0.72	1.06	0.78	0.164
%	57.14	57.89	76.92	62.50	61.90	59.38	66.67	
<i>P</i> value								
	Total oocytes	Viable oocytes		Embryo		Hatching		
<i>P</i> Treat	0.027	0.045		0.096		0.750		
<i>P</i> Br	0.181	0.191		0.183		0.505		
<i>P</i> Ag ⁹	0.802	0.876		0.470		0.632		
<i>P</i> Treat*br ¹⁰	0.104	0.058		0.219		0.024		
<i>P</i> Treat*Ag	0.254	0.635		0.230		0.519		

¹mean standard error; ²Sprinkler+artificial shadow; ³shower+artificial shade; ⁴artificial shadow; ⁵Holsteins; ⁶Jersey; ⁷lactating cows; ⁸pubescent heifers; ⁹age group; ¹⁰breed. Means followed by the same letter on the line do not differ from each other by the Tukey test, $P < 0.05$

Table 5- Developments of interactions treatment x breed over the hatching.

Breed	Treatments		Hatching
	Holstein	Sprinkler	
Shower		1.17 ^a	
Artificial shade		0.67 ^b	
Jersey	Sprinkler		0.50 ^b
	Shower		0.67 ^b
	Artificial shade		1.00 ^a

Means followed by the same letter in the column do not differ from each other by the Tukey test, $P < 0.05$.

Table 6- Milk Yield (kg/day) and milk composition (%) of Holstein and Jersey cows submitted to sprinkler, showers, and artificial shadow systems.

	Treatments			Breed		S.E.M ⁶	P value		
	Spr ¹	Sho ²	As ³	Hol ⁴	Jer ⁵		P Treat	P Br ⁷	P Treat*Br
Milk Yield	18.50	18.14	17.32	23.94 ^a	12.04 ^b	0.605	0.173	0.004	0.664
FCM (4%) ⁸	17.36	16.77	16.15	20.39 ^a	13.12 ^b	0.412	0.156	0.009	0.432
Fat	3.87	3.76	3.82	3.03 ^b	4.60 ^a	0.141	0.801	0.002	0.446
Protein	3.62	3.65	3.59	3.25 ^a	3.99 ^b	0.278	0.635	0.001	0.531
Lactose	4.67	4.67	4.70	4.67	4.69	0.199	0.790	0.639	0.636
Total Solids	13.05	12.88	12.97	11.68 ^b	14.25 ^a	0.133	0.778	0.001	0.638
SCE ⁹	5.24	4.68	5.32	5.64 ^a	4.52 ^b	0.266	0.258	0.251	0.249

¹Sprinkler+artificial shadow; ²shower+artificial shade; ³artificial shadow; ⁴Holsteins; ⁵Jersey; ⁶mean standard error; ⁷breed; ⁸fat corrected milk (kg/day); ⁹somatic cell score. Means followed by the same letter on the line do not differ from each other by the Tukey test, P <0.05

FIGURES



Figure 1- Sprinkler system + artificial shade (The sprinkler system was provided by an 8m² area structure and was composed of volcano sprinklers and had a flow rate of 8 liters / minute. The artificial shade system was provided by a structure of 3.5 meters high and an area of 16m², covered by artificial shading with 80% solar energy)



Figure 2- Shower system + artificial shade (the shower system was provided by a structure of 8 m² in area and consisted of showers with a flow rate of 12 liters/minute. The artificial sprinkler system was provided by a structure of 3.5 meters high and an area



Figure 3- Artificial shade system (provided by 3.5 meters high structure and area of 16m², covered by artificial shade with 80% solar

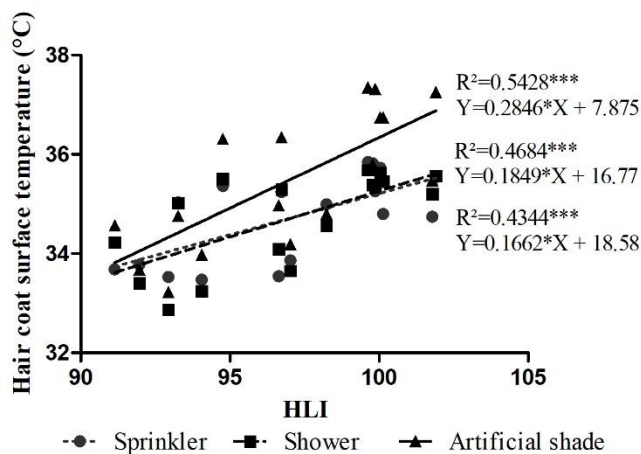


Figure 4- Regression analysis of the hair coat surface temperature (CS) animals subjected to spray systems, shower, and shading in relation to Heat Load Index.

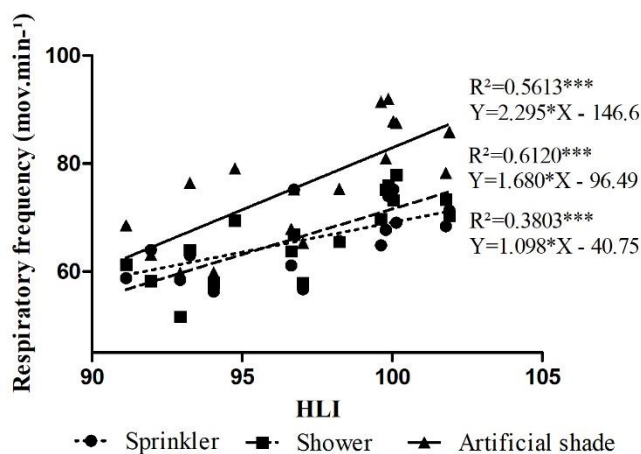


Figure 5- Regression analysis of the respiratory frequency (RR) animals subjected to spray systems, shower, and shading in relation to Heat Load Index.

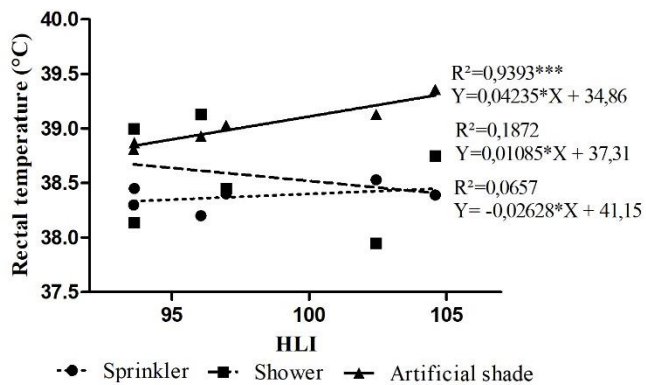


Figure 6- Regression analysis of the rectal temperature (RT) animals subjected to spray systems, shower, and shading in relation to Heat Load Index.

III. Influence of three heat stress reducing systems of animals grazing on hormonal, mineral, blood, and lipid biomarkers

(Journal of animal physiology and animal nutrition)

Acknowledgements

The authors would like to thank the Department of Animal Science and the Postgraduate Program in Animal Science of the Maringá State University for technical support.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the influence of different heat stress reducing systems namely: sprinkler + artificial shade, shower + artificial shade, and artificial shade, on the serum mineral (Na^+ , K^+ , Cl^-), hormonal (T_3 , T_4 , and cortisol), hematological, metabolite profiles, and milk production in lactating cows and pubertal heifers of Holstein and Jersey breeds. Concerning the animals, six were lactating cows: three Holstein cows with an average weight of 600 ± 30 kg, 53 ± 11 months of age, and average milk yield of 27 ± 3.5 kg day⁻¹ in lactation stage between the third and fourth months; and three Jersey cows with an average weight of 370 ± 11 kg, 40 ± 6 months of age, and average milk production of 11 ± 1.5 kg day⁻¹ in lactation stage between the fifth and seventh months. A further six animals were pubertal heifers: three Holstein heifers (325 ± 25 kg and 16 ± 0.6 months of age) and three Jersey heifers (250 ± 25 kg and 13 ± 0.6 months of age). These were distributed in four Latin squares 3×3 , in a $3 \times 2 \times 2$ factorial arrangement, being three treatments, two breeds, and two physiological stages. Blood samples were collected in all experimental periods by puncture of the coccygeal vein. The daily milk yield (MY, kg) was measured in the morning and afternoon, for 4 days (8 consecutive milking), in the milk collecting system. Treatments and age group influenced T_3 levels ($P < 0.05$). Na^+ , K^+ , hemoglobin, hematocrit, M.C.V, fat, protein, and total solids were influenced by breed ($P < 0.05$). Total cholesterol, HDL, triglycerides, glucose, and urea were influenced by age group ($P < 0.05$). The variations that

occurred were due to the breed patterns and the age groups analyzed and the results were within the normal range for dairy cattle.

Keywords: blood tests, cattle, heat stress, physiological marker

1. INTRODUCTION

Heat stress is one of the main problems in dairy cattle raised in a tropical environment, mainly on pasture where they may be exposed to adverse climatic conditions, and such stress can cause physiological (Kamal et al., 2018), milk quality and production (Bernabucci et al., 2014), mineral (Wankar et al., 2018), hormonal (Kamal et al., 2016; Carabaño et al., 2017) and blood changes (Dalcin et al., 2016).

Such changes can be used as biomarkers, i.e. biological indicators of the organism, as they may change in response to certain situations, in this case, to an adverse condition such as heat stress (Carabaño et al., 2017). Therefore, the study of heat stress biomarkers is of great importance for understanding the homeothermic process (Starling et al., 2005) and the development of mechanisms that may mitigate the deleterious effects of heat stress on animals.

One of the most efficient ways of reducing heat stress to animals is the use of water (Legrand et al., 2011) because it has high heat capacity and a high latent heat of vaporization (National Research Council – NRC, 2010). The use of evaporative adiabatic cooling systems (SARS) in facilities improves the welfare and comfort of the animals which leads to better physiological, behavioral and reproductive parameters (Wolfenson et al., 2018). The use of systems aimed at reducing thermal stress in intensive dairy systems, or in the milking parlor, has already been extensively studied and proved to be largely satisfactory (Legrand et al., 2009, 2011; Spiers et al., 2018). However, information on the use of evaporative adiabatic cooling systems on pasture remains scarce and would be of great importance for farmers, especially small farmers, who are not able to invest in intensive systems, and would improve knowledge of these new technologies and their influences on animals.

The objective of this work was to verify the influence of three heat-stress-reducing systems on hormonal, mineral, blood, and lipid biomarkers and the milk yield of cows and heifers of the Holstein and Jersey breeds raised on pasture in a tropical environment.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Location and climate

The experiment was conducted from October to November 2018, spring in the southern hemisphere, at the Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) of the State University of Maringá (UEM), located at latitude 23° 25' S, longitude 51° 57' W, and 550 meters of altitude. The climate according to the Köppen classification is Cfa, subtropical humid mesothermal with hot summers and rainfall mainly in the summer months. During the experimental period there was no rain and the average temperature was 26 °C.

2.2 Animals

Twelve animals were used in this experiment: three Holstein dairy cows with an average weight of 600 ± 30 kg, 53 ± 11 months of age, and an average milk yield of 27 ± 3.5 kg day⁻¹ between the third and fourth month of lactation, three Jersey dairy cows with an average weight of 370 ± 11 kg, 40 ± 6 months of age, and an average milk yield of 11 ± 1.5 kg day⁻¹ between the fifth and seventh month of lactation, three Holstein heifers with an average weight of 325 ± 25 kg and 16 ± 0.6 months of age and three Jersey heifers with an average weight of 250 ± 25 kg and 13 ± 0.6 months of age.

2.3 Animal management and feeding

The animals were distributed among three different treatments in paddocks of *Cynodon plectostachyus* pasture with an average area of 2,780 m². The lactating cows were milked twice a day, at 6 a.m. and 3 p.m., in a 4 x 1 herringbone milking parlor using a mechanical milking machine, then fed and released to the appropriate experimental paddocks. The heifers were fed at the time the cows were milked so that they had enough time to feed before the cows were returned to pasture (Table 1).

2.4 Treatments, experimental design, and installations

We adopted 4 Latin squares 3 x 3, in factorial arrangement 3 x 2 x 2, being three treatments (sprinkler + artificial shade, shower + artificial shade, and artificial shade); two breeds (Holstein and Jersey), and two physiological stages (lactating cows and pubertal heifers).

The different heat-stress-reducing systems were (Figure 1):

1. Sprinkler + artificial shade system.
2. Shower + artificial shade system.
3. Artificial shade.

The systems were activated when an animal passed through the presence sensors, which were connected to a relay that sent information to a water pump that pumped water to the systems. The systems consisted of a 10,000 L water tank, a 2.5 hp irrigation pump, polyethylene pipes to transport the water to each system and hydrometers to measure the flow of each system. The pipe arrays were fixed to iron structures, to which the animals had access from all sides.

To allow the animals to get used to the systems, a pre-adaptive phase was included in which troughs with feed were placed in front of each system to guide the animals to them and so encourage their usage. Each experimental period lasted 14 days. The 1st to the 11th days were for adaptation of the animals to the systems and groups, and the 12th to the 14th days were for sample collection

2.5 Weather parameters

Data on air temperature (T_a ; °C), relative humidity (RH; %), black globe temperature (T_{bg}; °C) and wind speed (WS; m/s⁻¹) were measured through the FEI weather station every half hour on the sample collection days. With the data obtained, the Heat Load Index (HLI) was determined:

$$HLI = 8.62 + (0.38RH) + (1.55T_{bg}) - (0.5WS) + [e^{2.4-WS}]$$

where: T_{bg}: black globe temperature °C; RH: relative humidity, %; WS: wind speed, m/s⁻¹ (Gaughan et al., 2008). The results obtained through the HLI have been classified into the following categories: precautionary up to 88; care from 89 to 91; extreme care from 92 to 95; and extreme danger above 95 (Gaughan et al., 2008).

2.6 Serum parameters

Blood samples were taken from all animals by a puncture in the coccygeal vein, once in each experimental period. The samples were stored in vacuolated tubes with the

appropriate coagulants until they were taken to the commercial laboratory in which the analyses were carried out. The hemogram was performed by the hemocytometer technique. The hematocrit levels were determined using the microhematocrit method. The hemoglobin levels were measured using acid hematin (Matos et al., 1995). The Na⁺, K⁺ and Cl⁻ ions were measured using the automated selective ion methodology (ISELAB; Drake Eletrônica e Comércio Ltda.- Brasil). Cortisol, T₃ and T₄ (8D15 ARCHITECT Cortisol Reagent Kit; 7K64 ARCHITECT Total T₃ Reagent Kit; 7K66 ARCHITECT Total T₄ Reagent Kit; Abbott Ireland Diagnostics Division, Lisnamuck, Ireland) were measured by chemiluminescence. Cholesterol, HDL, triglycerides, urea, and glucose (Slides CHOL VITROS; Slides dHDL VITROS; Slides TRIG VITROS; Slides BUN/UREA VITROS; Slides GLU VITROS; Ortho-Clinical Diagnostics, Rochester, USA) were measured by reflectance spectrometry.

2.7 Statistical analysis

The statistical analysis of the data was performed using the MIXED procedure of the SAS (Statistical Analysis System, 9.3) were evaluated according to the following model:

$$Y_{ijklmn} = \mu + S_i + A_{j:i} + P_k + T_l + BR_m + AG_n + T \times BR_{lm} + T \times AG_{ln} + e_{ijklmn}$$

with $p_k \approx N(0, \sigma_p^2)$, $a_l \approx N(0, \sigma_a^2)$ and $e_{ijkl} \approx N(0, \sigma_e^2)$, where Y_{ijkl} is the observed value; μ is the general mean; S_i is the fixed effect of the animal within a square; $A_{j:i}$ is the random effect of the treatment ($i = 1$ and 3); BR_m is the effect of breed ($m = 1$ and 2); AG_n is the fixed effect of the age group ($n = 1$ and 2); $T \times BR_{lm}$ is the fixed effect of the interaction between treatment and breed; $T \times AG_{ln}$ is the fixed effect of the interaction between treatment and age group; e_{ijklmn} is the residual error; N indicates a normal distribution; and σ_p^2 , σ_a^2 e σ_e^2 are the variances associated with the random effects associated with period and animal, and residual variance, respectively. When there were interactions between the factors, the statistical analysis was performed using the Fisher's least significant difference test (LSD) to disrupt the interaction.

3. RESULTS

3.1 Climatic parameters

The climatic parameters analyzed during the experimental period are shown in Table 2. The average air temperature was 27.4 °C in the morning and 31.5 °C in the afternoon. Air humidity averaged 73.8% in the morning and decreased during the afternoon to an average of 62.5%. The wind speed was higher in the morning (1.46 m/s⁻¹) when compared to the afternoon (1.15 m/s⁻¹). The average temperature of the black globe was 37.6 °C in the morning and 39.6 °C in the afternoon. The thermal load index showed little amplitude (0.55) between the two periods analyzed, with the morning values being 97.69 and the afternoon values being 98.24.

3.2 Hormonal parameters

The treatments influenced the levels of T₃ (P<0.05), with the shower and shade systems showing higher and similar values (99.51 and 96.28 µg/dL, respectively) in relation to the sprinkler treatment (89.20 µg/dL). The age group influenced the T₃ values (P<0.05) since heifers had higher levels (112.35 µg/dL) than cows (78.77 µg/dL). Breed did not influence T₃ levels (P>0.05).

There was a significant interaction (P=0.003) between the systems and breed regarding T₃ levels. Jersey cows had higher serum T₃ levels in the artificial shade (103.64 µg/dL) and shower systems (109.52 µg/dL) compared to Jersey cows in the sprinkler system (85.80 µg/dL), which in turn did not differ from the spray (91.16 µg/dL), shower (88.53 µg/dL) or artificial shade (88.37 µg/dL) systems for Holstein cows.

There was also a significant interaction between the systems and the age group regarding T₃ levels (P=0.050). The heifers had higher values of T₃ in the shower (121.24 µg/dL) and artificial shade (112.70 µg/dL) systems compared to the group of heifers exposed to the sprinkler system (103.12 µg/dL), which in turn differed from the sprinkler systems (76.72 µg/dL), shower (78.76 µg/dL) and artificial shade (80.82 µg/dL) for the lactating cows.

Treatment, breed, age group, and treatment x breed and treatment x age group interactions did not influence the hormonal levels of T₄ or cortisol (P>0.05).

3.3 Mineral parameters

There was no effect of treatments, age groups, and interactions on Na⁺, K⁺, and Cl⁻ levels (P>0.05). There was an effect of the breed on the levels of Na⁺ and K⁺ (P<0.05), as the Holstein breed animals had lower levels of Na⁺ and K⁺ (101.6 and 4.14 ng/mL respectively) than the Jersey animals (106.5 and 3.96 ng/mL, respectively).

3.4 Hematological parameters

The blood aspects analyzed were not influenced by the age group and the interaction between treatment and breed (P>0.05). There was an effect of the breed on the hemoglobin, hematocrit, and M.C.V levels (P<0.05), since the Jersey animals showed higher values (12.43 g/dL, 27.72%, and 46.29 μm^3 , respectively) than the Holstein animals (11.18 g/dL, 24.72%, and 46.29 μm^3 , respectively).

3.5 Metabolites

Glucose, total cholesterol, HDL, TG, and urea levels were not affected by treatments (P>0.05). The age group influenced the values of glucose (P=0.012), cholesterol (P=0.0002), HDL (P=0.001), TG (P=0.001), and urea (P=0.0001). It presented lower glucose and TG values for cows (69.44 and 14.72 mg/dL, respectively) than for heifers (77.72 and 21.83 mg/dL, respectively), and higher values of total cholesterol, HDL, and urea for cows (94.06, 56.89, and 26.89 mg/dL, respectively) than heifers (56.89, 42.89, and 25.57 mg/dL, respectively).

There was a significant interaction (P=0.021) between the systems and the breed regarding the levels of urea. The Jersey animals submitted to the showers (25.60 mg/dL) and artificial shade (29.78 mg/dL) systems showed higher values for urea levels in comparison to the Jersey animals treated with the sprinkler system (24.28 mg/dL), which did not differ from the urea levels of the sprinkler systems (20.42 mg/dL) and showers (20.38 mg/dL) of the Holstein group of animals, the shower system (20.38 mg/dL) from the Holstein group also being similar to the artificial shade system (17.72 $\mu\text{g/dL}$) of the animals in the same group.

4. DISCUSSION

4.1 Climate parameters

The average air temperature was higher in the afternoon (31.5 °C) than in the morning (27.4 °C) due to the higher incidence of solar radiation during the afternoon (Spiers et al., 2018). However, in both periods analyzed the air temperature was above the critical upper limit for Holstein cows (24 °C) (Martello et al., 2004) and Jersey cows (28 °C) (Nascimento et al., 2019) during lactation (Table 2).

The relative humidity of the air was higher in the morning (73%) than in the afternoon (62.5%). This was due to the lower incidence of solar radiation and, consequently, the lower air temperature (Spiers et al., 2018). Wind speed in both analyzed periods was considered below what is recommended as good for lactating cows (2.2 m/s), and would thus have impaired heat exchange by convection and evaporation (Hahn, 1985).

The high air temperature associated with high relative humidity and low wind speed caused the black globe temperature to be high both in the morning (37.6 °C) and in the afternoon (39.6 °C). Therefore, it resulted in very high thermal load index values in both periods of the day (97.69 in the morning and 98.24 in the afternoon), indicating that the environment was characterized as stressful to the animals (Gaughan et al., 2008).

4.2 Hormonal

There was an interaction between treatment x breed on T₃ levels. The highest levels were found for the Jersey cows in the shower system (109.52 µg/dL) and artificial shadow system (103.64 µg/dL) and lower levels for the Holstein cows, whose values were similar in all tested systems. These results are due to the higher degree of adaptability of the Jersey breed in comparison to the Holstein breed (Nascimento et al., 2019), as the latter decreases the production of thyroid hormones as an alternative to decreasing the production of endogenous heat as a mechanism for maintaining homeothermy (Morais et al., 2008). There was also an interaction between treatment x age group on T₃ such that heifers presented, in all tested systems, higher levels of T₃ than cows. These results can be attributed to two hypotheses, namely: The decrease in thyroid hormones in more thermosensitive animals, such as cows, can be attributed to the need to decrease the metabolic rate (Morais et al., 2008) and the higher demands for T₃ of heifers for their development, or the fact that heifers do not

produce milk, since thyroid hormones are excreted by the mammary gland (Cisse et al., 1991).

4.3 Mineral

The levels of Na⁺ and K⁺ were influenced by the breed. Jersey animals had a higher concentration of Na⁺ and K⁺ (106.5 and 4.29 ng/mL, respectively) than the Holstein animals (101.06 and 3.96 ng/mL, respectively). Such results may be due to higher adaptability in Jersey animals compared to Holstein animals, since animals less adapted to adverse climatic conditions lose more electrolytes via sweat (West, 2003).

4.4 Blood

The hemoglobin, hematocrit and mean corpuscular volume (M.C.V.) values were higher for Jersey cows than for Holstein cows. However, they were within the normal reference range of the consulted literature for both breeds. The differences found are probably related to the breed, which can be inferred in the variation of blood elements (Birgel et al., 2001) and in the level of production, since the greater specialization of the animal is related to lower erythrocyte levels and consequently to lower hematocrit levels (Campos et al., 2008).

4.5 Metabolites

Cholesterol levels were higher in cows compared to heifers. Such results are due to the increase in age, since cholesterol values gradually increase from 12 months of age and reach maximum values at 48 months (Pogliani et al., 2007). This increase is related to the higher nutritional demands of older animals, leading to greater lipid mobilization (Ruas et al., 2000).

HDL concentrations behaved in a similar way to cholesterol, being higher for cows compared to heifers. This is expected because HDL has a close connection with cholesterol and is the most abundant lipoprotein in the blood responsible for cholesterol transport (Pogliani et al., 2007). Triglyceride values were lower in cows than heifers, as a result of the higher triglyceride requirements of heifers for their development (National Research Council – NRC, 2010).

Heifers had higher glucose values than cows. This is due to the more reactive behavior of heifers when handling and collecting blood, which may have influenced the increase in serum glucose (Ruas et al., 2000) due to the increase in plasma cortisol (Du Preez, 2000).

Urea levels were affected by the age group. Cows had higher levels than heifers as there is a gradual increase in urea levels until 48 months when they stabilize (Gregory et al., 2004). Interactions between the systems and breed on the urea levels were observed: Jersey cows had higher serum levels in the shower and artificial shadow treatments and lower levels in the sprinkler treatment. These values did not differ from the urea levels of Holstein cows in the sprinkler and shower systems, and levels in the shower system did not differ from those in the artificial shadow system (in Holstein cows). These results lead us to believe that they are due to the protein level of the concentrate offered to the animals. So that there was no additional effect on the animals' stress indicators, the food already provided on the farm was not changed. As a result, Jersey cows were fed the same protein content as Holstein cows, and Jersey heifers were fed the same amount as Holstein heifers. However, Jersey cows are smaller and produce less milk than Holstein cows, so the protein requirement for them should be less. This may have favored the increase in urea in Jersey cows over Holstein cows.

5. CONCLUSION

The variations that occurred were due to the breeds and the age groups analyzed and the results were within the normal range for dairy cattle. Therefore, the three different thermal-stress-reducing systems tested were able to maintain the analyzed serum biomarkers.

Animal welfare statement

The authors confirm that the ethical policies of the journal, as noted on the journal's author guidelines page, have been adhered to. Experimental procedures performed in the current study were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals, through Protocol Ceua N°. 2255190718, of the State University of Maringá (Maringá, Paraná, Brazil).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest for current submitted manuscript.

Funding

This study was financed in part by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel – Brazil (CAPES) - Finance Code 001”, National Institute of Science and Technology of Dairy Production Chain (INCT-LEITE/UEL-PR), Londrina, Paraná, Brazil (CNPq – INCT-Leite, grant number 465725/2014-7) in Brasilia, DF, Brazil, Araucaria Foundation, Curitiba, Paraná and, CNPq – “Projeto Universal”/2016, proc. 405689/2016-0.

Authors’ contributions

KLGY conceived and designed the experiment. KLGY, GTS and JCD performed the research. KLGY and JACO conducted the experiment. KLGY, KVA, JCSL and JACO collected the samples and data. KLGY and JACO performed the statistical analysis. KLGY and GTS wrote the manuscript. All authors performed experiments, read, and approved the final manuscript.

References

- Birgel, E. H., D’Angelino, J. L., Benesi, F. J., & Birgel, E. H. (2001). Valores de referência do eritrograma de bovinos da raça Jersey criados no Estado de São Paulo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, *53*(2), 164–171. <https://doi.org/10.1590/s0102-09352001000200006>
- Campos, R., Lacerda, L. D. A., Terra, S. R., & González, F. H. D. (2008). Parâmetros hematológicos e níveis de cortisol plasmático em vacas leiteiras de alta produção no Sul do Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, *45*(5), 354-361. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2008.26676>
- Carabaño, M. J., Ramón, M., Díaz, C., Molina, A., Pérez-Guzmán, M. D., & Serradilla, J. M. (2017). Breeding and genetics symposium: Breeding for resilience to heat stress effects in dairy ruminants. A comprehensive review. *Journal of Animal Science*, *95*(4), 1813-1826. <https://doi.org/10.2527/jas2016.1114>
- Cisse, M., Chilliard, Y., Coxam, V., Davicco, M. J., & Remond, B. (1991). Slow Release Somatotropin in Dairy Heifers and Cows Fed Two Levels of Energy Concentrate. 2. Plasma Hormones and Metabolites. *Journal of Dairy Science*, *74*(4), 1382–1394.

[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78293-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78293-3)

- Dalcin, V. C., Fischer, V., Dos, D., Daltro, S., Priscila, E., Alfonzo, M., ... Mcmanus. (2016). Physiological parameters for thermal stress in dairy cattle. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 45(8), 458-465. <https://doi.org/10.1590/S1806-92902016000800006>
- Du Preez, J. H. (2000). Parameters for the determination and evaluation of heat stress in dairy cattle in South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 67(4), 263-271.
- Gaughan, J. B., Mader, T. L., Holt, S. M., & Lisle, A. (2008). A new heat load index for feedlot cattle. *Journal of Animal Science*, 86(1). Gaughan, J.B., Mader, T.L., Holt, S.M., Lisle, A., 2008. A new heat load index for feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 86, 226-234. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0305>, 226-234. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0305>
- Gregory, L., Birgel, E. J., D'angelo, J. L., Benesi, F. J., Araujo, W. P. D., & Birgel, E. H. (2004). Valores de referência dos teores séricos da ureia e creatinina em bovinos da raça jersey criados no estado de são paulo. Influência dos fatores etários, sexuais e da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos. *Arq. Inst. Biol*, 71(3), 339-345.
- Hahn, G. L. (1985). Management and housing of farm animals in hot environments. In *Stress physiology in livestock*. (II, pp. 151-174.). Boca Raton, Florida: Press, CRC.
- Kamal, R., Dutt, T., Patel, M., Dey, A., & Bharti, P. K. (2018). Heat stress and effect of shade materials on hormonal and behavior response of dairy cattle : a review. *Tropical Animal Health and Production*, 50, 701-706.
- Kamal, R., Dutt, T., Patel, M., Dey, A., Chandran, P. C., Bharti, P. K., & Barari, S. K. (2016). Behavioural, biochemical and hormonal responses of heat-stressed crossbred calves to different shade materials. *Journal of Applied Animal Research*, 44(1), 347-354. <https://doi.org/10.1080/09712119.2015.1074076>
- Legrand, A. L., von Keyserlingk, M. A. G., & Weary, D. M. (2009). Preference and usage of pasture versus free-stall housing by lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 92(8), 3651-3658. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1733>
- Legrand, A., Schütz, K. E., & Tucker, C. B. (2011). Using water to cool cattle : Behavioral and physiological changes associated with voluntary use of cow showers. *Journal of Dairy Science*, 94(7), 3376-3386. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3901>
- Martello, L. S., Júnior, H. S., Silva, S. da L. e, & Titto, E. A. L. (2004). Respostas fisiológicas e produtivas de vacas holandesas em lactação submetidas a diferentes ambientes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 33(1), 181-191. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S1519-99402013000300016>
- Matos, M. G. de, & Matos, P. (1995). "Hematologia clínica." *Laboratório clínico médico veterinário*. São Paulo: Atheneu.
- Morais, D., Maia, A., Silva, R., Vasconcelos, A., Lima, P., & Guilhermino, M. (2008). Variação anual de hormônios tireoideanos e características termorreguladoras de vacas leiteiras em ambiente quente. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37(84), 538-545. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982008000300020>

- Nascimento, S. T., Sandro, A., Maia, C., França, V. De, Fonsêca, C., Cardoso, C., ... Pinheiro, G. (2019). Physiological responses and thermal equilibrium of Jersey dairy cows in tropical environment. *International Journal of Biometeorology*, 1-10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00484-019-01734-w> SPECIAL
- National Research Council – NRC. (2010). *Nutrient requirements of dairy cattle: Seventh Revised Edition*. (2010. 269p. UFV, Ed.). Viçosa. <https://doi.org/10.17226/9825>
- Pogliani, F. C., & Birgel Junior, E. (2007). Valores de referencia do lipidograma de bovinos da raça holandesa, criados no estado de São Paulo. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 44(5), 373-383. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2007.26621>
- Ruas, J. R. M., Torres, C. A. A., Borges, L. E., Marcatti Neto, A., Silva Filho, J. M., Santos, M. D., & Carvalho, G. R. (2000). Concentrações Plasmáticas de Colesterol, Glicose e Uréia em Vacas Zebuínas, em Relação à Condição Corporal e ao Status Reprodutivo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 29(6), 2036-2042.
- Spiers, D. E., Spain, J. N., Eilersieck, M. R., & Lucy, M. C. (2018). Strategic application of convective cooling to maximize the thermal gradient and reduce heat stress response in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 1-15. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14283>
- Starling, J. M. C., Silva, R. G. da, Negrão, J. A., Maia, A. S. C., & Bueno, A. R. (2005). Seasonal Variation of Thyroid Hormones and Cortisol of Sheep in Tropical Environment. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 34(6), 2064-2073. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982005000600032>
- Wankar, A. K., & Yadav, B. (2018). *Thermoregulatory responses in buffaloes during heat stress. Physio- metabolic, nutrient utilization and endocrine scenario*. Lap Lambert Academic Publishing.
- West, J. W. (2003). Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 86(6), 2131-2144. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73803-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73803-X)
- Wolfenson, D., & Roth, Z. (2018). Impact of heat stress on cow reproduction and fertility. *Animal Frontiers*, 9(1), 32–38. <https://doi.org/10.1093/af/vfy027>

TABLES

Table 1- Average dry matter (DM), mineral matter (MM), organic matter (OM), crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF) and ether extract (EE) of pasture, feed and silage supplied to lactating cows and pubescent heifers.

	Ingredients	Pasture ¹	Ration	Silage
Lactating cows	DM (%)	20.65	89.39	30.33
	MM (%)	9.12	10.30	4.30
	OM (%)	90.88	89.70	95.7
	CP (%)	17.68	26.19	8.07
	NDF (%)	53.77	10.30	50.38
	EE (%)	3.50	2.79	3.00
Pubescent heifers	DM (%)	20.65	89.48	30.33
	MM (%)	9.12	10.63	4.3
	OM (%)	90.88	89.37	95.7
	CP (%)	17.68	25.73	8.07
	NDF (%)	53.77	15.86	50.38
	EE (%)	3.50	2.93	3.00

¹pasture of *Cynodon plectostachyus*.

Note: The bromatological analyses were performed at the Laboratory of Food Analysis and Animal Nutrition (LANA)

Table 2- Climatic variables measured during the experimental periods.

Variables	Morning	Afternoon	Amplitude
Temperature (°C)	27.4	31.5	4.1
Humidity (%)	73.8	62.5	11.3
Wind speed (m/s ⁻¹)	1.46	1.15	0.31
Black globe temperature (°C)	37.6	39.6	2.0
Heat load index (HLI)	97.69	98.24	0.55

Table 3- Average values of the concentrations of T₃ (µg/dL), T₄ (µg/dL), cortisol (µg/dL), Na⁺, K⁺ and Cl⁻ (ng/mL) in the different treatments (Treat), breeds (Br) and age groups (Ag).

	Treatments			Breeds		Age Group		SEM	<i>P value</i>				
	Sprinkler	Shower	Artificial Shade	Holstein	Jersey	Cows	Heifers		<i>P Treat</i>	<i>P Breed</i>	<i>P Ag</i>	<i>P Treat *</i> Br	<i>P Treat *</i> Ag
T ₃ ¹ (µg/dL)	89.20 ^b	99.51 ^a	96.38 ^a	89.35	99.66	78.77 ^b	112.35 ^a	2.6 41	.015	.075	.001	.003	.050
T ₄ ² (µg/dL)	3.67	3.91	3.87	3.87	3.77	3.53	4.10	0.132	.380	.888	.240	.338	.515
Cortisol (µg/dL)	1.01	1.13	1.23	1.21	1.07	0.78	1.43	0.084	.449	.860	.284	.725	.783
Na ⁺ (ng/mL)	102.42	102.08	106.83	101.06 ^b	106.50 ^a	105.28	102.28	4.663	.100	.009	.131	.610	.201
K ⁺ (ng /mL)	4.16	4.06	4.14	3.96 ^b	4.29 ^a	4.18	4.06	0.054	.292	.005	.071	.733	.376
Cl ⁻ (ng/mL)	101.83	102.79	103.46	102.11	103.56	102.11	103.00	0.604	.712	.061	.446	.600	.976

¹total triiodothyronine, ²total thyroxine. Averages followed by the same letter on the line do not differ between each other by Tukey's test, P<0.05. Note: Hormonal and mineral analyses were performed by the Teaching and Research Laboratory in Clinical Analysis, State University of Maringá.

Table 4- Breakdown of interaction between treatment x breed and treatment x age group for T₃.

		Treatment	T ₃ (µg / dL)
Breed	Holstein	Sprinkler	91.16 ^b
		Shower	88.53 ^b
		Artificial Shade	88.37 ^b
	Jersey	Sprinkler	85.80 ^b
		Shower	109.52 ^a
		Artificial Shade	103.64 ^a
Age group	Cows	Sprinkler	76.73 ^c
		Shower	78.76 ^c
		Artificial Shade	80.82 ^c
	Heifers	Sprinkler	103.12 ^b
		Shower	121.24 ^a
		Artificial Shade	112.70 ^a

Note: Averages followed by the same letters in the column do not differ between each other by Tukey's test, P<0.05.

Table 5- Average values of erythrogram and leukogram in different treatments (Treat), breeds (Br) and age groups (Ag)

	Treatment			Breed		Age Group		SEM	<i>P</i> value				
	Sprinkler	Shower	Artificial Shade	Holstein	Jersey	Cows	Heifers		<i>P</i> Treat	<i>P</i> Breed	<i>P</i> Ag	<i>P</i> Treat *	<i>P</i> Treat *
Red blood cells (x10 ⁶ /μL)	6.07	6.20	5.85	5.91	6.16	5.73	6.35	0.113	.515	.407	.059	1.000	.397
Hemoglobin (g/dL)	11.97	11.88	11.58	11.18 ^b	12.43 ^a	11.69	11.92	0.154	.430	.034	.653	.491	.564
Hematocrit %	26.50	26.25	25.92	24.72 ^b	27.72 ^a	25.83	26.61	0.356	.750	.018	.472	.384	.503
M.C.V ¹ (μm ³)	44.32	44.02	44.53	42.28 ^b	46.29 ^a	45.75	42.83	0.380	.488	.020	.069	.951	.341
MCHC (%) ²	45.08	45.28	44.68	45.18	44.84	45.18	44.84	0.328	.126	.518	.518	.322	.540
Leukocytes ³ (mm ³)	4.22	4.22	4.28	4.22	4.26	4.18	4.29	0.347	.381	.611	.205	.299	.164
Lymphocytes%	55.00	59.50	59.00	56.72	58.94	56.89	58.78	1,124	.235	.498	.563	.633	.211

¹M.C.V = mean corpuscular volume, ²MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration, ³leukocytes were transformed on a logarithmic basis. Averages followed by the same letter on the line do not differ between each other by Tukey's test, P <0.05.

Note: The erythrogram and the leucogram were performed by the Laboratory São Camilo veterinary unit.

Table 6- Average levels of cholesterol, HDL, triglycerides, glucose, and urea (mg/dL) according to the different treatments (Treat), breeds (Br) and age groups (Ag).

	Treatment			Breed		Age Group		SEM	<i>P value</i>				
	Sprinkler	Shower	Artificial Shade	Holstein	Jersey	Cows	Heifers		<i>P</i> Treat	<i>P</i> Breed	<i>P</i> Ag	<i>P</i> Treat * Br	<i>P</i> Treat * Ag
Total cholesterol	74.17	76.67	75.58	73.17	77.78	94.06 ^a	56.89 ^b	1.815	.742	.479	.0002	.256	.915
HDL ¹	57.67	59.83	60.08	57.61	60.78	75.50 ^a	42.89 ^b	1.808	.632	.637	.001	.460	.945
TG ²	16.83	18.67	19.33	16.83	19.72	14.72 ^b	21.83 ^a	0.463	.051	.083	.001	.054	.320
Glucose	73.42	73.92	71.92	76.17	70.00	68.44 ^b	77.72 ^a	0.892	.508	.065	.012	.355	.158
Urea	22.35	23.49	23.75	19.51 ^b	26.89 ^a	25.57 ^a	20.82 ^b	0.0001	.576	<.0001	.000	.021	.091

¹high density lipoprotein, ²triglycerides. Averages followed by the same letter on the line do not differ between each other by Tukey's test, $P < 0.05$. Note: The lipid metabolites, urea and glucose were performed by the Teaching and Research Laboratory in Clinical Analysis of the State University of Maringá

Table 7- Breakdown of treatment x breed interaction on urea in the blood.

		Treatment	Urea (mg/dL)
Breed	Holstein	Sprinkler	20.42 ^b
		Shower	20.38 ^{bc}
		Artificial Shade	17.72 ^c
	Jersey	Sprinkler	24.28 ^b
		Shower	25.60 ^a
		Artificial Shade	29.78 ^a

Averages followed by the same letter in the column do not differ between each other by Tukey's test, $P < 0.05$.

FIGURE LEGENDS

Figure 2- Sprinkler + artificial shade system.

Figure 2- Shower + artificial shade system.

Figure 3- Artificial shade system.

FIGURE



Figure 1- Sprinkler + artificial shade system.



Figure 2- Shower + artificial shade system.



Figure 3- Artificial shade system