

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(CLÍNICA E REPRODUÇÃO ANIMAL)

LILIAN DOS SANTOS RIBEIRO

SUPLEMENTAÇÃO COM CROMO ORGÂNICO NA DIETA DE VACAS
GIROLANDO SOB ESTRESSE CALÓRICO EM CÂMARA CLIMÁTICA

Niterói, RJ

2020

LILIAN DOS SANTOS RIBEIRO

SUPLEMENTAÇÃO COM CROMO ORGÂNICO NA DIETA DE VACAS
GIROLANDO SOB ESTRESSE CALÓRICO EM CÂMARA CLIMÁTICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Orientador:

PROF. DR. FELIPE ZANDONADI BRANDÃO

Coorientadores:

DR. BRUNO CAMPOS DE CARVALHO

PROF. DR. RODOLPHO DE ALMEIDA TORRES FILHO

Niterói, RJ

2020

LILIAN DOS SANTOS RIBEIRO

SUPLEMENTAÇÃO COM CROMO ORGÂNICO NA DIETA DE VACAS
GIROLANDO SOB ESTRESSE CALÓRICO EM CÂMARA CLIMÁTICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Aprovada em 17 de fevereiro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão – UFF – Orientador

Prof^a. Dra. Joanna Maria Gonçalves de Souza-Fabjan – UFF

Dr. Eduardo Kenji Nunes Arashiro – UFF

Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo – Embrapa Gado de Leite

Prof. Dr. Marco Roberto Bourg de Mello – UFRRJ

Niterói, RJ

2020

Dedico esta tese aos meus pais e à minha amada irmã

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pela condução e amparo nessa caminhada. Saber que sou amada por Ele e confiar nos seus planos traz sabor especial à vida.

Aos meus pais, **Joel e Cida**, por priorizarem o investimento em educação de qualidade para mim e para a minha irmã, abrindo mão de sonhos pessoais para que nós duas tivéssemos todas as condições de realizarmos os nossos, sempre presentes e nos apoiando em todas as nossas escolhas. Pai, todas as minhas vitórias também são suas. Mãe, um amor tão forte que transcende e está sempre me guiando.

À minha irmã **Lidiana**, que é meu amor e porto seguro para todas as horas, meu exemplo e orgulho.

Ao meu marido **Rodrigo**, pelo amor, carinho, apoio e compreensão indispensáveis para a conclusão dessa etapa. Dividir a vida com você é um presente!

Aos meus afilhados, filhos do coração, **Laura e Miguel**, que me proporcionam a vivência de um amor puro e me trazem a responsabilidade de ser exemplo.

À Universidade Federal Fluminense, à Embrapa Gado de Leite e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Ao meu orientador **Felipe Brandão** e ao meu coorientador **Bruno Carvalho**, pela oportunidade do doutorado, pelos ensinamentos e generosidade em dividi-los, também pela confiança depositada no cumprimento do trabalho. Agradeço também a sensibilidade e empatia que tiveram no momento que mais precisei de apoio, nunca esquecerei.

Aos meus eternos orientadores, **Rodolpho e Carla**, pelo carinho, amizade e apoio de sempre.

Aos estagiários e funcionários da Embrapa Gado de Leite que me auxiliaram grandemente na etapa de campo e análises laboratoriais. A ajuda de vocês foi essencial. Foram momentos de muito aprendizado e de muita diversão.

Aos amigos e colegas de pós-graduação, que dividiram as alegrias e angústias do caminho, em especial, à **Diana Lemos, Gustavo Torres e Luciano Carvalheira**. Vocês foram essenciais para o desenvolvimento do trabalho e para que eu chegasse ao fim desta etapa. Agradeço a amizade, parceria e doação ao experimento. De fato, quem tem amigos...

Aos demais amigos, pela torcida, pelos “empurrões” em momentos de desânimo e todas as experiências que somente um “bom e velho amigo” pode proporcionar.

Aos familiares que torcem e apoiam toda a minha trajetória pessoal e profissional.

Finalmente, com muito respeito, agradeço também aos animais que participaram deste experimento e outros mais. Eles são fundamentais para a ciência e para o desenvolvimento da espécie humana.

Muito obrigada!

*“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais
difícil da vida de alguém.”*

Dalai Lama

RESUMO

É sabido que as condições do ambiente nos trópicos causam grandes prejuízos econômicos à produção animal, impactando na produção de leite e o desempenho reprodutivo. O presente estudo teve como objetivo avaliar a suplementação com cromo orgânico na dieta de vacas Girolando em lactação sob estresse calórico em parâmetros produtivos, reprodutivos e metabólicos. Trinta e seis vacas Girolando em lactação foram submetidas a dois ensaios sequenciais. No ensaio 1 (ambiente termoneutro) foi avaliado o efeito da suplementação com cromo (0 vs. 0,50 mg/kg de matéria seca). No ensaio 2 as vacas foram alimentadas com as mesmas dietas, porém foram divididas em três condições ambientais: condições de estresse calórico em câmara climática, alimentadas *ad libitum* (HS); ambiente termoneutro, alimentadas *ad libitum* (TN); ambiente termoneutro, *pair-fed* (PF). A suplementação com cromo orgânico não alterou o consumo de matéria seca, a produção de leite nem os parâmetros reprodutivos avaliados neste estudo. Sob condições termoneutras, a suplementação com cromo não afetou os parâmetros metabólicos avaliados. Durante o estresse calórico, a suplementação com cromo diminuiu as concentrações de glicose no plasma ($61,17 \pm 1,90$ vs. $67,11 \pm 1,90$ mg/dL) e aumentou a relação insulina: glicose ($0,39 \pm 0,04$ vs. $0,27 \pm 0,04$). Vacas alimentadas com a dieta controle no grupo HS apresentaram valores mais altos de temperatura vaginal ($39,40 \pm 0,10$ °C) do que as vacas dos grupos TN e PF ($38,89 \pm 0,10$ °C e $38,85 \pm 0,11$ °C, respectivamente). No entanto, as vacas suplementadas sob estresse calórico mantiveram a mesma temperatura vaginal que as vacas em condições termoneutras. Comparando as duas dietas na condição HS, as expressões gênicas hepáticas do transportador de glicose 2 (GLUT2), glicose-6-fosfatase (G6Pase) e receptor de hormônio de crescimento (rGH) foram *downregulated* ($P < 0,05$) nas vacas suplementadas com cromo orgânico em comparação com as vacas alimentadas com a dieta controle. Para as vacas alimentadas com a dieta controle, a expressão de GLUT2 foi *upregulated* ($P < 0,05$) no grupo HS e o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1) foi *downregulated* ($P < 0,05$) no grupo PF em comparação com o grupo TN. Não foram observadas diferenças na abundância relativa de GLUT2, fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), G6Pase, rGH e transcritos de IGF1 entre as diferentes condições ambientais para vacas suplementadas. Em conclusão, a suplementação de cromo melhorou o metabolismo da glicose e impediu o aumento da temperatura vaginal sob condições de estresse calórico. Além disso, o estresse calórico causou alterações na expressão gênica relacionadas ao metabolismo da glicose no fígado, e o cromo orgânico apresentou capacidade de modulação sobre o metabolismo da glicose em animais sob estresse calórico.

Palavras-chave: expressão gênica, gado mestiço, glicose, metabolismo, produção de leite

ABSTRACT

Environmental conditions in tropics are known to cause major economic damage to livestock production, impacting milk production, and reproductive performance. This study aimed to evaluate the supplementation with organic chromium in the diet of lactating Girolando cows submitted to heat stress in productive, reproductive, and metabolic parameters. Thirty-six lactating Girolando cows were subjected to two sequential trials. In trial 1 (thermoneutral environment), the effect of chromium supplementation was evaluated (0 vs. 0.50 mg/kg of dry matter). In trial 2, the cows were fed the same diets, but they were divided into three environmental conditions: heat stress condition in a climatic chamber, fed *ad libitum* (HS); thermoneutral environment, fed *ad libitum* (TN); and thermoneutral environment, pair-fed (PF). Supplementation with organic chromium did not alter the dry matter intake, milk production or reproductive parameters evaluated in this study. Under thermoneutral condition, chromium supplementation did not affect the metabolic parameters evaluated. During heat stress, chromium supplementation decreased plasma glucose levels (61.17 ± 1.90 vs. 67.11 ± 1.90 mg/dL) and increased insulin: glucose ratio (0.39 ± 0.04 vs. 0.27 ± 0.04). Cows fed with the control diet in HS group had higher values of vaginal temperature (39.40 ± 0.10 °C) than cows in groups TN and PF (38.89 ± 0.10 °C and 38.85 ± 0.11 °C, respectively). However, supplemented cows under heat stress maintained the same vaginal temperature as cows under thermoneutral condition. Comparing the two diets in HS condition, the expressions of glucose transporter 2 (GLUT2), glucose-6-phosphatase (G6Pase), and growth hormone receptor (GHR) were downregulated ($P < 0.05$) in the cows supplemented with organic chromium compared to the cows fed the control diet. GLUT2 expression was upregulated ($P < 0.05$) in the HS group and insulin-like growth factor 1 (IGF1) was downregulated ($P < 0.05$) in the PF group compared to the TN group for the cows fed the control diet. No differences were observed in the relative abundance of GLUT2, phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), G6Pase, GHR and transcripts of IGF1 among the different environmental conditions for supplemented cows. In conclusion, chromium supplementation improved glucose metabolism and prevented vaginal temperature increase under heat stress condition. Additionally, heat stress caused alterations in gene expression related to glucose metabolism in the liver, and organic chromium presented a modulation capacity over the glucose metabolism of animals under heat stress condition.

Keywords: gene expression, crossbred cattle, glucose, metabolism, milk production

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 ESTRESSE CALÓRICO.....	17
2.2 IMPACTOS DO ESTRESSE CALÓRICO NO CONSUMO DE MATÉRIA SECA, PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE.....	20
2.3 IMPACTOS DO ESTRESSE CALÓRICO NA REPRODUÇÃO.....	23
2.4 IMPACTOS DO ESTRESSE CALÓRICO NO METABOLISMO.....	25
2.5 SUPLEMENTAÇÃO COM CROMO ORGÂNICO.....	28
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
3. HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	40
4. OBJETIVOS.....	41
4.1 GERAL.....	41
4.2 ESPECÍFICOS	41
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
5.1 ENSAIO 1 – AMBIENTE TERMONEUTRO	42
5.2 ENSAIO 2- ESTRESSE CALÓRICO.....	43
5.3 ANÁLISES LABORATORIAIS.....	43
5.4 <i>OVUM PICK UP</i> (OPU), AVALIAÇÕES FOLICULARES E OOCITÁRIAS	44
5.5 BIÓPSIA HEPÁTICA.....	45
5.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	45
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
6. CAPÍTULO 1.....	49
7. CAPÍTULO 2.....	69
8. CONCLUSÕES.....	82
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
10. ANEXO.....	94

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1. Effect of chromium supplementation on dry matter intake, milk yield, milk composition, and metabolic parameters of Girolando cows in trial 1 (thermoneutral environment).

Table 2. Effect of chromium supplementation on reproductive parameters of Girolando cows in trial 1 (thermoneutral environment).

Table 3. Dry matter intake, milk yield, milk composition, and metabolic parameters of Girolando cows in trial 2 (heat stress).

Table 4. Reproductive parameters of Girolando cows in trial 2 (heat stress).

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figure 1. The experimental design of two sequential trials with lactating Girolando cows supplemented with chromium. OPU, ovum pick up; DFD, diameter of the dominant follicle; Cr+, diet with chromium; Cr-, control diet; HS, group under heat stress conditions in a climatic chamber; TN, group in a thermoneutral environment; PF, pair-fed group in a thermoneutral environment.

Figure 2. Variation of the metabolic parameters of lactating Girolando cows. A: plasma glucose concentration (mg/dL) of lactating Girolando cows supplemented with chromium under heat stress conditions. B: Insulin: glucose ratio of lactating Girolando cows supplemented with chromium under heat stress conditions. Cr+, diet with chromium; Cr-, control diet; HS, group under heat stress conditions in a climatic chamber; TN, group in a thermoneutral environment; PF, pair-fed group in a thermoneutral environment. Asterisks (*) indicate a significant difference ($P < 0.05$).

Figure 3. Variation in the vaginal temperature according to times of day of lactating Girolando cows supplemented with chromium under heat stress conditions. Cr+, diet with chromium; Cr-, control diet; HS, group under heat stress conditions in a climatic chamber; TN, group in a thermoneutral environment; PF, pair-fed group in a thermoneutral environment. (X) in axis show when heat stress began and ended.

CAPÍTULO 2

Figure 1. Relative expression levels of GLUT2, PEPCK, G6Pase, rGH, and IGF1 in the hepatic tissues of lactating Girolando cows under heat stress conditions in a climatic chamber. (**) downregulated ($P < 0.05$). GLUT2: glucose transporter 2; PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase; G6Pase: glucose 6-phosphatase; rGH: growth hormone receptor; IGF1: insulin-like growth factor 1.

Figure 2. Relative expression levels of GLUT2, PEPCK, G6Pase, rGH, and IGF1 in the hepatic tissues of lactating Girolando cows fed, A: A control diet. B: A diet supplemented with organic chromium (0.50 mg Cr kg⁻¹ dry matter). (*) upregulated; (**) downregulated ($P < 0.05$). GLUT2: glucose transporter 2; PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase; G6Pase: glucose 6-phosphatase; rGH: growth hormone receptor; IGF1: insulin-like growth factor 1. TN: thermoneutral environment with feeding *ad libitum*; HS: heat stress conditions in a climatic chamber with feeding *ad libitum*; PF: pair-fed group in a thermoneutral environment.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem; <i>Percentage</i>
°C	Grau Celsius; <i>Degree Celsius</i>
g	Aceleração da gravidade; <i>Gravity acceleration</i>
μU	Microunidades; <i>Micro units</i>
AGNE	Ácido graxo não esterificado
ANOVA	Análise de variância; <i>Variance analysis</i>
BAX	<i>BCL2 associated X protein</i>
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BEN	Balanço energético negativo
BHBA	Beta hidroxibutirato
bST	Somatotropina recombinante bovina
Ca	Cálcio; <i>Calcium</i>
Capes	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CC	Câmara climática; <i>Climatic chamber</i>
cDNA	DNA complementar; <i>Complementary DNA</i>
cm	Centímetro; <i>Centimeter</i>
CMS	Consumo de matéria seca
COC	Complexo cumulus oócito; <i>Cumulus oocyte complex</i>
CP	<i>Crude Protein</i>
Cr	Cromo; <i>Chromium</i>
DF	<i>Dominant follicle</i>
DFD	Diâmetro do folículo dominante; <i>Diameter of dominant follicle</i>
DM	<i>Dry matter</i>
DMI	<i>Dry matter intake</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico; <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxirribonuclease; <i>Deoxyribonuclease</i>
dUTP	Desoxiuridina trifosfato; <i>Deoxyuridine triphosphate</i>
EC	<i>Environmental condition</i>
ECM	<i>Energy ccorrected milk</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético; <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EUA	Estados Unidos da América
Fig	<i>Figure</i>
G	Gauge
G6Pase	Glicose-6-fosfatase; <i>Glucose-6-phosphatase</i>
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GH	<i>Growth hormone</i>
GLUT	Transportador de glicose; <i>Glucose transporter</i>
GLUT2	Transportador de glicose 2; <i>Glucose transporter 2</i>
GTF	Fator de tolerância a glicose; <i>Glucose tolerance factor</i>
HS	<i>Heat stress</i>
HSF1	Fator de choque térmico 1
HSP	Proteína de choque térmico
HxZ	Holandês x Zebu
IDF	<i>International Dairy Federation</i>
IGF1	<i>Insulin growth factor 1</i>
IPCC	International Painel Climatic Change

ITU	Índice de temperatura e umidade
K	Potássio; <i>Potassium</i>
kg	Quilograma; <i>Kilogram</i>
L	Litro; <i>Liter</i>
LH	Hormônio luteinizante
LPS	Lipopolissacarídeo
Mcal	Megacaloria; <i>Megacalorie</i>
mg	Miligrama; <i>Milligram</i>
mL	Mililitro; <i>Milliliter</i>
mm	Milímetro; <i>Millimeter</i>
mRNA	RNA mensageiro; <i>Messenger RNA</i>
MS	Matéria seca
MY	<i>Milk yield</i>
NRC	<i>Nutrient Requirements of Dairy Cattle</i>
ns	Não significativo
Obs	Observação
OPU	<i>Ovum pick up</i>
P	Fósforo; <i>Phosphorus</i>
PC	Piruvato carboxilase;
PCR	Reação em cadeia da polimerase; <i>Polymerase chain reaction</i>
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase; <i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>
PF	<i>Pair-fed</i>
QR	<i>Relative quantification of differential expression</i>
rGH	Receptor de hormônio de crescimento; <i>Growth hormone receptor</i>
RIA	Radioimunoensaio; <i>Radioimmunoassay</i>
RNA	Ácido ribonucleico; <i>Ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto; <i>Revolutions per minute</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
THI	<i>Temperature and humidity index</i>
TMR	<i>Total Mixed Ration</i>
TN	Termoneutro; <i>Thermoneutral</i>
TUNEL	Teste da marcação de extremidade terminal dUTP mediada por desoxinucleotidil transferase; <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick and labeling</i>
UFF	Universidade Federal Fluminense
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
USA	<i>United States of America</i>
vs.	Versus
VT	<i>Vaginal temperature</i>
YWHAZ	Tirosina 3-monooxigenase /triptofano 5-monooxigenase proteína de ativação zeta ; <i>Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta</i>

1. INTRODUÇÃO

A carne e o leite bovinos estão entre os principais alimentos de origem animal do agronegócio brasileiro e entre os principais componentes da alimentação da população mundial. O consumo de produtos lácteos tem crescido, principalmente, em países em desenvolvimento (SIQUEIRA et al., 2012) e esses estão localizados nas regiões mais quentes do planeta. Entretanto, a produção de leite e de carne é fortemente influenciada pelas condições ambientais. Para expressar o máximo desempenho, os animais devem estar em uma zona de temperatura de conforto, na qual usem minimamente mecanismos de regulação da temperatura corpórea e, portanto, tenham gasto energético mínimo para esse fim.

Estações quentes e úmidas ou elevações atípicas da temperatura e umidade são as principais causas do estresse calórico na pecuária. Tais condições podem ser agravadas por uma mudança climática global. Portanto, o aquecimento climático poderá contribuir para acentuar ainda mais o efeito da temperatura na redução da produtividade de rebanhos bovinos (THORNTON et al., 2009; NARDONE et al., 2010), principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, que já são afetadas pelo calor excessivo, e onde se localiza a maior parte do rebanho bovino. O Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (*Intergovernmental Panel on Climate Change* – IPCC, 2014) indicou que as temperaturas globais subiriam entre 1,8 e 4 °C até o final do século XXI.

Para driblar os desafios impostos pelo clima tropical à produção de leite, a utilização do gado mestiço Europeu x Zebu é uma alternativa, uma vez que, assim, consegue-se aliar o potencial produtivo do gado europeu especializado com os fatores de resistência do gado zebu, resultando em animais com melhor desempenho em características econômicas importantes. A produção de leite a partir de vacas Girolando (Holandês x Gir) representa 80% do leite produzido no Brasil (SILVA et al., 2019).

O estresse calórico determina redução na ingestão de alimentos, o que interfere na produtividade de forma direta, mas há também mudanças no metabolismo energético as quais estão relacionados com variação na produtividade animal (RHOADS et al., 2009; BAUMGARD et al., 2011; RHOADS et al., 2011). O estresse calórico também impacta a fisiologia ovariana, alterando a dominância

folicular (BADINGA et al., 1993; WOLFENSON et al., 1995), fatores bioquímicos e hormonais do fluido folicular (WISE et al., 1988; DE RENSIS; SCARAMUZZI, 2003; SHEHAB-EL-DEEN et al., 2010), resultando em menor viabilidade do oócito, com comprometimento da capacidade de fertilização e, havendo fertilização, em desenvolvimento anormal dos embriões (ROTH; HANSEN, 2004; HANSEN, 2007; HANSEN, 2009).

Várias estratégias para reduzir os efeitos negativos do estresse calórico podem ser trabalhadas, dentre elas, o manejo nutricional. Além do aumento da densidade energética da dieta, que já vem sendo discutido há algum tempo como forma de compensar a redução no consumo, há outras alternativas como a suplementação com monensina (BAUMGARD et al., 2011); uso de bST (OLIVEIRA NETO et al., 2001); suplementação com K (WEST, 2002), entre outras.

A suplementação com cromo pode resultar no aumento da produtividade através da melhoria do consumo de matéria seca, produção de leite, parâmetros reprodutivos e funções imunológicas dos animais sob estresse calórico (AN-QIANG et al., 2009; SOLTAN, 2010; BIN-JUMAH et al., 2020). A suplementação com cromo pode também melhorar a tolerância térmica e a produtividade de animais estressados pelo calor, melhorando o status antioxidante e potencializando a ação da insulina (RHOADS et al., 2013; KESHRI et al., 2019). Considerando que as condições ambientais afetam a produção de leite no território brasileiro, que é essencialmente de clima tropical, onde as vacas sofrem condições de estresse calórico com temperatura e umidade elevadas durante a maior parte do ano, é importante aumentar o conhecimento sobre o uso de cromo na dieta de vacas em condições de estresse calórico, especialmente vacas Girolando, para que o desempenho possa ser mantido em ambientes tropicais mais rústicos e variáveis (CANAZA-CAYO et al., 2014).

Diante da complexidade dos eventos que afetam a produtividade animal, o presente estudo teve como objetivo avaliar a suplementação com cromo orgânico na dieta de vacas Girolando em lactação sob estresse calórico em parâmetros produtivos, reprodutivos e metabólicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESTRESSE CALÓRICO

A zona de conforto térmico, que é a faixa de temperatura ambiente na qual o animal não demonstra qualquer sinal de desconforto térmico, de forma geral, situa-se entre 5 °C e 25 °C (YOUSEF, 1985) para bovinos, podendo alcançar limite superior de até 27 °C (FUQUAY, 1981; ARMSTRONG, 1994). Essa faixa é variável de acordo com a raça e nível de produção. Porém, deve-se levar em consideração também a umidade relativa do ar para determinar a zona de termoneutralidade. Assim, o estresse calórico é resultado da combinação entre temperatura e umidade, sendo que tal combinação pode ser predita pelo índice de temperatura e umidade (ITU), o qual representa as condições de conforto térmico do ambiente avaliado (THOM, 1959).

Um ambiente é considerado confortável quando o animal está em equilíbrio térmico com ele, ou seja, o calor produzido pelo metabolismo animal (termogênese) é perdido para o meio ambiente (termólise) sem prejuízo apreciável ao seu rendimento. Quando isso não ocorre, caracteriza-se estresse por calor, ou calórico, e o uso de artifícios capazes de manter o equilíbrio térmico entre o animal e o ambiente faz-se necessário (PIRES; CAMPOS, 2003). Quando a temperatura ambiente e outras condições ambientais criam uma situação abaixo ou acima dos respectivos limiares, a eficiência é comprometida pois os nutrientes são desviados para manter a eutermia, pois a temperatura corporal segura se torna a prioridade em detrimento da síntese do produto (leite, carne, etc.) (BAUMGARD et al., 2015).

A perda de calor para o ambiente se dá inicialmente por radiação, seguida da convecção e depois por condução. Quando os meios primários não evaporativos de resfriamento se tornam menos eficazes com o aumento da temperatura ambiente, o animal torna-se cada vez mais dependente do resfriamento evaporativo na forma de suor e ofego. O aumento da umidade relativa compromete o resfriamento evaporativo, de modo que, em ambientes quentes e úmidos, comuns no verão, a vaca leiteira não consegue dissipar o calor corporal de forma suficiente para evitar o aumento da temperatura corporal (WEST, 2003). Quando os mecanismos

fisiológicos de controle da temperatura não são eficientes o animal entra em estado de hipertermia (BERMAN, 2005).

Os mecanismos para regulação da temperatura corporal, os quais dependem energia, resultam em redução da produção de leite e baixas taxas de concepção, ocasionando perdas econômicas significativas para o produtor, as quais podem ser reduzidas mediante a implementação de práticas nutricionais e modificações ambientais (PIRES, 2006).

Os distúrbios mais comumente observados em animais em estresse calórico são a redução de consumo de alimentos e da taxa metabólica, aumento da temperatura retal e da frequência respiratória, aumento do consumo de água, alterações das concentrações hormonais, aumento da sudorese e alterações das necessidades de manutenção (PIRES, 2006). A temperatura retal é um bom indicador de estresse calórico e pode ser utilizada na previsão do prejuízo causado na produção de vacas leiteiras (SPIERS et al., 2004).

Vacas gestantes e lactantes sob estresse calórico são mais suscetíveis a distúrbios metabólicos devido às altas demandas nutricionais por conta do crescimento fetal e lactação (DE RENSIS et al., 2015) e, por isso, há aumento nas exigências de manutenção para dissipação de calor. O estresse calórico no final da gestação também já apontou para redução significativa na produção de leite na lactação subsequente (TAO et al., 2011; TAO et al., 2012). No estudo de Tao e Dahl (2013) vacas mantidas sem equipamentos de resfriamento evaporativo durante todo o período seco no verão, comparadas com aquelas mantidas com equipamento de resfriamento evaporativo, apresentaram redução de 4 a 5 kg/dia durante toda a lactação subsequente, sugerindo que o estresse calórico durante o período seco altera a função mamária por reduzir a disponibilidade de nutrientes para a glândula, influenciando o seu desenvolvimento por reduzir a proliferação das células mamárias, impactando na sua função na lactação subsequente.

Vacas de elevado potencial genético para produção de leite são mais sensíveis aos efeitos do estresse calórico do que aquelas de menor produção, pois em condições climáticas estressantes têm o seu consumo alimentar reduzido, não sendo atendidas suas necessidades nutricionais, implicando, conseqüentemente, em queda na produção. Dessa forma, a zona de neutralidade térmica muda para temperaturas menores com a alta produção de leite, elevado consumo de alimentos

e aumento da produção de calor metabólico (COPPOCK et al., 1982; SILVA; SOUZA JUNIOR, 2013).

O fato de haver uma variação genética na termotolerância entre bovinos de raças diferentes permite estabelecer cruzamentos para se produzir animais mais tolerantes ao calor. Cruzamentos de animais taurinos com zebuínos são comuns, gerando animais cruzados mais termotolerantes, porém menos produtivos. Bovinos mestiços de cruzamentos da raça Holandês (*Bos taurus taurus*) com raças zebuínas, principalmente a raça Gir (*Bos taurus indicus*), têm sido a principal fonte da produção de leite nas regiões mais quentes do Brasil. Isso se deve a maior tolerância ao calor desses animais devido à heterose e complementariedade (VASCONCELLOS et al., 2003). Desses cruzamentos surgiu a raça sintética Girolando, sendo estabelecido como animais puros os de composição genética $\frac{5}{8}$ Holandês e $\frac{3}{8}$ Gir, mas atualmente ainda abrange outras composições, de $\frac{1}{4}$ Holandês a $\frac{7}{8}$ Holandês.

Em bovinos de raças de origem europeia de alta produção, valores de ITU acima de 72 são indicadores de estresse calórico e valores acima de 89 indicam estresse calórico severo (ARMSTRONG, 1994). Em animais mestiços Holandês x Zebu (HxZ), estima-se que ITU acima de 79 indique estresse calórico, valor superior ao de gado de origem europeia devido à maior termotolerância do animal zebuíno, o qual contribui na sua composição genética. Com base na temperatura retal, foram estimados valores críticos superiores de ITU iguais a 80, 77 e 75 para os grupos genéticos $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$ e $\frac{7}{8}$ HxZ, respectivamente. Considerando-se a frequência respiratória, os valores críticos superiores de ITU estimados para os referidos grupos genéticos foram 79, 77 e 76, respectivamente. Com base na temperatura de superfície, estimou-se valor crítico superior de ITU igual a 79 para os três grupos genéticos estudados. Nesse estudo as vacas do grupo genético $\frac{1}{2}$ HxZ demonstraram maior tolerância ao calor que as $\frac{7}{8}$ HxZ, enquanto as $\frac{3}{4}$ HxZ situaram-se em posição intermediária (AZEVEDO et al., 2005).

A seleção genética para tolerância ao calor pode ser possível, mas a seleção contínua para maior desempenho em ambientes em que não haja o desafio para tolerância ao calor resultará em maior suscetibilidade ao estresse calórico. Manter o desempenho da vaca em condições climáticas quentes e úmidas no futuro, provavelmente exigirá que o melhoramento genético inclua a seleção para tolerância

ao calor ou a identificação de características genéticas que aumentem a tolerância ao calor, incluindo trabalhos de seleção genômica (WEST, 2003; GARNER et al., 2016).

A diferença entre as raças é resultado de uma melhor regulação sistêmica da temperatura corpórea pelos zebuínos (PAULA-LOPES et al., 2013), mas também deve envolver características celulares, como mostrado em experimentos em condições de cultivo em que oócitos e/ou embriões obtidos de animais zebuínos são mais tolerantes sob condições de choque térmico induzido *in vitro* quando comparados com aqueles obtidos de taurinos (RIVERA; HANSEN, 2001; SILVA et al., 2013).

2.2 IMPACTOS DO ESTRESSE CALÓRICO NO CONSUMO DE MATÉRIA SECA, PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

Os efeitos do estresse calórico em vacas produtoras de leite têm sido demonstrados pela alteração no desempenho produtivo. St-Pierre et al. (2003) estudaram o prejuízo econômico causado pelo estresse calórico na produção animal nos Estados Unidos da América (EUA) e relataram a perda de até 2072 kg de leite por ano por vaca, totalizando o prejuízo de 879 milhões de dólares ao ano.

A queda na produção de leite pode variar de 10% a 35% quando o ITU ultrapassa o limite de tolerância e é explicada, em parte, pela redução do consumo de matéria seca (CMS) pelos animais. O consumo reduzido durante o estresse calórico é uma resposta altamente conservada entre as espécies e representa, presumivelmente, uma tentativa de diminuir a produção de calor metabólico (BAUMGARD; RHOADS, 2012).

Vacas lactantes tornam-se estressadas pelo calor quando as condições excedem o ITU de 72 (ARMSTRONG, 1994). No entanto, experimentos indicam que a produção de leite começa a diminuir em um ITU de 68 (WHEELLOCK et al., 2010). West (2003) cita uma redução no CMS em 850 gramas a cada 1 °C de aumento da temperatura acima da zona de termoneutralidade das vacas. No estudo de Bouraoui et al. (2002), comparando vacas mantidas no ITU de 68 (primavera) com vacas sob ITU de 78 (verão), a produção de leite diminuiu 21% e o CMS 9,6% no verão. Estes

demonstraram que a produção de leite diminuiu 0,41 kg por vaca por dia para cada ponto de aumento no valor de ITU acima de 69.

A aquisição de nutrientes e energia potencialmente absorvíveis pelo animal em estresse calórico é afetada negativamente pela redução no CMS e, provavelmente, pela redução do fluxo sanguíneo e absorção de nutrientes no trato digestivo. Por outro lado, é afetado positivamente pela digestibilidade levemente aumentada devido ao maior tempo de retenção no intestino. Entretanto, as influências negativas da redução da ingestão e absorção de nutrientes superam o pequeno aumento na digestibilidade, resultando na menor disponibilidade de nutrientes totais para o animal em estresse calórico (BEEDE; COLLIER, 1986).

Nos estudos que avaliaram a produção de leite de vacas submetidas a estresse calórico e vacas alimentadas de forma restrita (ambiente termoneutro porém com a alimentação restrita de acordo com o grupo estressado pelo calor-grupo *pair-fed*), observou-se que a redução no consumo foi responsável por cerca de 35 a 50% da redução observada na produção de leite (RHOADS et al., 2009; WHEELLOCK et al., 2010).

Os mecanismos que contribuem para as perdas na produção de leite em vacas estressadas pelo calor envolvem vários sistemas, incluindo modificações hormonais que implicam em alteração de atividades anabólicas e catabólicas, alterações nas células epiteliais da glândula mamária e redução da disponibilidade de precursores da síntese de leite. O estresse calórico aumenta a captação de glicose pelos tecidos periféricos, com prejuízo para a captação da glândula mamária, limitando assim a disponibilidade de glicose para a síntese de lactose na glândula mamária (WHEELLOCK et al., 2010; TAO et al., 2018).

Quando comparadas as produções de vacas Jersey no sul da África em duas regiões: ITU 72-83 e ITU 75-87, as vacas mantidas na região com maior ITU apresentaram menor produção média de leite até os 21 dias pós-parto e menores porcentagem de proteína e gordura no leite. O ITU entre 72 e 83 também caracteriza estresse calórico para vacas *Bos taurus taurus*, indicando que os efeitos na produção e composição de leite se agravam com o aumento da intensidade de estresse calórico (KEKANA et al., 2018).

No estudo de Baumgard et al. (2011), as vacas submetidas ao estresse calórico apresentaram redução da porcentagem de lactose no leite por conta da

disponibilidade limitada de glicose na glândula mamária. Rhoads et al. (2009) identificaram redução na proteína do leite das vacas sob estresse calórico em comparação ao grupo *pair-fed*, o que pode ser explicado pela maior metabolização de proteína para suprir o déficit energético por meio de gliconeogênese. Cowley et al. (2015) discutem que a redução na concentração de proteína no leite de vacas estressadas pelo calor é resultado da regulação negativa específica da atividade sintética de proteína mamária gerada pelo declínio na síntese de proteína microbiana ruminal e pelo aumento na utilização de aminoácidos para a gliconeogênese.

Com relação à porcentagem de gordura no leite, os resultados dos estudos são contraditórios. Bouraoui et al. (2002) e Bernabucci et al. (2015) observaram redução no percentual de gordura do leite durante o verão. Já Hammami et al. (2015) não observaram diferença nessa característica, enquanto Smith et al. (2013) e Garner et al. (2016) observaram aumento no percentual de gordura no leite de vacas sob estresse calórico. Uma possível explicação para a variação entre os resultados de teores de gordura observados no leite de vacas em situações de estresse calórico seria a variação no consumo de forrageiras pelos animais. O menor consumo de volumosos provoca uma alteração na relação acetato/propionato, resultado da inadequada ingestão de fibras na dieta, insuficiente para função normal do rúmen. Assim, nos estudos em que os animais são alimentados com *total mixed ration* (TMR), a depressão na porcentagem de gordura no leite não ocorre, pois há ingestão da quantidade de fibra pretendida, adequada para a fermentação ruminal (BOURAOUI et al., 2002).

O estágio da lactação é um fator importante para a severidade das perdas decorrentes do estresse calórico. Os animais no estágio médio da lactação são, na maioria das vezes, mais sensíveis ao calor em comparação com os em estágio inicial ou final de lactação. As condições nutricionais e metabólicas das vacas leiteiras nos diferentes estágios da lactação podem explicar a maior sensibilidade de vacas leiteiras no estágio médio. A produção de leite das vacas em início de lactação é fortemente sustentada pela mobilização de tecidos de reserva com um menor consumo de ração, enquanto que a produção de leite das vacas no estágio médio é sustentada essencialmente pela ingestão de alimentos, a qual atinge um pico neste estágio. Como a utilização metabólica dos tecidos de reserva tem maior

eficiência em comparação com a utilização metabólica dos alimentos, as vacas em início de lactação produzem menos calor metabólico por kg de leite produzido (BERNABUCCI et al., 2010).

2.3 IMPACTOS DO ESTRESSE CALÓRICO NA REPRODUÇÃO

Uma das principais implicações do estresse calórico na cadeia produtiva do leite e carne bovina é a redução na fertilidade, resultando em baixas taxas de concepção e, conseqüentemente, em mais vacas vazias por mais tempo (DE RENSIS; SCARAMUZZI, 2003). A cada falha na concepção, são 21 dias a mais no intervalo de partos, reduzindo a produção de leite e a quantidade de crias durante a vida útil do animal, ou seja, diminuindo a sua produtividade.

O estresse calórico influencia na fisiologia ovariana, aumentando a incidência de anestro e ovulações silenciosas (GWAZDAUSKAS et al., 1981), bem como acarreta inibição da dominância folicular (BADINGA et al., 1993; WOLFENSON et al., 1995). Também é observada redução da atividade de monta e duração do estro (THATCHER; COLLIER, 1986). O estresse calórico reduz o grau de dominância do folículo selecionado e isso pode levar a uma redução da capacidade esteroidogênica das células da teca e da granulosa, diminuindo as concentrações de estradiol no sangue (DE RENSIS; SCARAMUZZI, 2003) e reduzindo a concentração plasmática do hormônio luteinizante (LH) (WISE et al., 1988). As concentrações plasmáticas de progesterona podem estar aumentadas ou diminuídas, dependendo se o estresse calórico é agudo ou crônico e do estado metabólico do animal (DE RENSIS; SCARAMUZZI, 2003).

Alterações metabólicas no fluido folicular do folículo dominante relacionadas ao estresse calórico podem comprometer a competência do oócito, prejudicando a capacidade de desenvolvimento do oócito e a qualidade das células da granulosa. A qualidade do oócito está intimamente relacionada com o ambiente em que ele se encontra, causando impacto negativo significativo na reprodução das vacas expostas ao estresse calórico no período pós-parto. Durante o estresse calórico, são observadas menores concentrações de glicose, IGF1 e colesterol (SHEHAB-EL-DEEN et al., 2009; SHEHAB-EL-DEEN et al., 2010), e maiores concentrações de

uréia e ácido graxo não-esterificado (AGNE) no fluido folicular (SHEHAB-EL-DEEN et al., 2010).

Alterações induzidas pelo calor em pequenos folículos antrais podem ser expressas posteriormente com o comprometimento da maturação e da capacidade de desenvolvimento do oócito ovulatório (ROTH, 2017). Os folículos das vacas sob estresse calórico tendem a resultar na produção de oócitos com menor capacidade de fertilização e, havendo fertilização, em desenvolvimento anormal dos embriões (HANSEN, 2007).

Ocorre uma mudança no perfil de expressão de alguns genes quando os oócitos são submetidos ao estresse calórico, *in vivo* ou *in vitro*. Em resposta ao estresse calórico, ocorrem anomalias na função celular, que incluem inibição geral da síntese de proteínas, defeitos na estrutura e função das proteínas, alterações morfológicas devido a rearranjos do citoesqueleto, alterações na dinâmica da fluidez da membrana celular e redução na proliferação celular (SONNA et al., 2002). Essas anomalias determinam em uma rápida indução de proteção celular com aumento de transcrição dos genes de proteínas de choque térmico (HSPs) por intermédio do fator de choque térmico 1 (HSF1) no intuito de proteger a célula (COLLIER et al., 2008; SILVA et al., 2013). A ativação deste sistema parece ser iniciada quando a temperatura de superfície da pele excede 35 °C e os mecanismos para perda de calor por evaporação são ativados (COLLIER et al., 2008).

A apoptose, morte programada, é um mecanismo de controle de qualidade celular que pode ser estimulado pelo estresse calórico, eliminando as células danificadas, não funcionais ou anormais. Um dos processos que pode estar envolvido na redução da competência oocitária em situações de estresse calórico é a apoptose (ROTH; HANSEN, 2004). A proteína *B-cell CLL/lymphoma 2* (BCL2) previne a apoptose mantendo a sobrevivência celular, já a *BCL2 associated X protein* (BAX) é pró-apoptose (YANG et al., 2002). Dessa forma, o balanço entre a expressão desses genes define a direção do processo de morte celular programada. Ao ser observado o aumento da expressão de BAX, acompanhado do aumento de BCL2, sugere-se que esteja ocorrendo neutralização do mecanismo molecular de apoptose (BRAGANÇA et al., 2018).

O estresse calórico (também chamado de choque térmico nas condições *in vitro*) durante a maturação dos oócitos e no desenvolvimento embrionário inicial

resulta em redução na viabilidade do desenvolvimento embrionário (EDWARDS; HANSEN, 1997; RIVERA; HANSEN, 2001). Foi demonstrado em condições *in vitro* que o estresse calórico (41 °C por 12-14 h ou 43 °C por 45 a 60 min) durante a maturação dos oócitos e no desenvolvimento embrionário inicial resulta em redução na viabilidade do desenvolvimento embrionário, com menor número de blastocistos e blastocistos expandidos (EDWARDS; HANSEN, 1997; RIVERA; HANSEN, 2001; SILVA et al., 2013). Em estudo *in vivo*, o estresse calórico aumentou a incidência de embriões retardados (≤ 16 células) e o número de embriões classificados como de qualidade razoável a ruim (PUTNEY et al., 1989).

A resistência ao calor diminui entre a fase de oócito a fase embrionária de duas células nos bovinos (EDWARD; HANSEN, 1997), o que pode ser devido à perda das células do *cumulus* (que exercem proteção) na fecundação. Oócitos e embriões nos estágios iniciais de desenvolvimento (entre zero e três dias pós-fecundação) são as estruturas mais susceptíveis às elevações de temperatura (JU, 2005). A maior taxa de prenhez observada em vacas receptoras (embriões oriundos de novilhas superovuladas e mantidas em sombra após inseminadas) comparadas com vacas inseminadas indica que o embrião bovino é sensível ao estresse calórico sofrido pela mãe durante os primeiros sete dias após o estro. A transferência de embriões contornou esse período de sensibilidade embrionária e pode ser uma alternativa à inseminação artificial para contornar parcialmente a infertilidade induzida por estresse calórico em bovinos (PUTNEY et al., 1989).

2.4 IMPACTOS DO ESTRESSE CALÓRICO NO METABOLISMO

Vacas no período inicial de lactação entram em um estado fisiológico de déficit energético uma vez que há aumento substancial do seu requerimento para manutenção da produção de leite. Porém, a ausência do aumento do CMS no mesmo patamar cria um estado de balanço energético negativo (BEN). Nessas situações, ocorrem alterações no metabolismo de carboidratos e lipídios que garantem a partição de nutrientes derivados de dieta para a glândula mamária, e muitas dessas alterações são mediadas pela somatotropina endógena (GH), que naturalmente aumenta durante os períodos de BEN (BAUMGARD; RHOADS, 2013; BAUMGARD et al., 2015).

Uma resposta clássica é a redução na insulina circulante associada a uma redução na sensibilidade sistêmica à insulina, para que haja redução da captação de glicose pelos tecidos sistêmicos, priorizando a utilização de glicose pela glândula mamária. A redução na ação da insulina ativa a lipólise adiposa, levando à mobilização de AGNE (BAUMAN; CURRIE, 1980), o qual é uma fonte significativa de energia bem como de precursores para a síntese da gordura do leite.

Porém, quando tratamos de vacas sob estresse calórico, apesar do fato de apresentarem reduções acentuadas no consumo de alimentos, elas não mobilizam o tecido adiposo (RHOADS et al., 2009; WHEELLOCK et al., 2010). Já o hormônio insulina apresenta maior concentração plasmática nos animais em estresse calórico, mesmo havendo baixa concentração de glicose (WHEELLOCK et al., 2010; BAUMGARD et al., 2011). Portanto, parece ocorrer uma mudança no metabolismo pós-absortivo apesar de estarem em um estado energético negativo similar às vacas em início de lactação (RHOADS et al., 2013).

Em resposta ao aumento da temperatura interna, os animais sob estresse calórico apresentam aumento da vasodilatação periférica, resultando na redução no fluxo sanguíneo nos órgãos internos. Essa hipóxia na mucosa intestinal reduz a seletividade das células epiteliais e provocam uma inflamação com liberação de lipopolissacarídeos de membrana (LPS), os quais agem sobre as células β -pancreáticas, tornando-as mais sensíveis à presença da glicose, aumentando a liberação de insulina e, conseqüentemente, reduzindo a mobilização de lipídios (WALDRON et al., 2006; CERF-BENSUSSAN; GABORIAU-ROUTHIAU, 2010; PEARCE et al., 2013), uma vez que a insulina é um hormônio antilipolítico. Dessa forma, a ausência da mobilização do tecido adiposo em vacas sob estresse calórico é, em parte, explicada pelo aumento da circulação de insulina (O'BRIEN et al., 2010; WHEELLOCK et al., 2010).

O aumento da ação da insulina também pode explicar o aumento nas taxas de utilização de glicose (WHEELLOCK et al., 2010), uma estratégia para minimizar a produção de calor metabólico (BAUMGARD; RHOADS, 2013). Observa-se que vacas sob estresse calórico apresentam maior metabolismo periférico da glicose, ao contrário do que ocorre em vacas em início de lactação e em BEN, quando a glicose é priorizada para a glândula mamária. Essa alteração metabólica sinaliza uma estratégia de maior dissipação de calor nos tecidos periféricos (RHOADS et al.,

2009). Essa perda de calor por evaporação é regulada por fatores ambientais, como velocidade do ar, temperatura ambiente e umidade relativa do ar, bem como por fatores do animal, como densidade e função das glândulas sudoríparas, características do pelame e fluxo sanguíneo na epiderme.

O aumento da utilização de glicose extramamária reduz o suprimento da mesma para a glândula mamária. Assim, a glândula mamária pode não receber quantidades adequadas de glicose, reduzindo a produção de lactose mamária e, consequentemente, a produção de leite, visto que a lactose é o principal osmorregulador que determina o volume total do leite. Este pode ser um mecanismo primário responsável por reduções adicionais na produção de leite além da porção explicada pela diminuição do consumo de ração (BAUMGARD et al., 2015).

Durante o estresse calórico, a mudança do metabolismo de glicose não é restrita aos tecidos periféricos (músculo esquelético e tecido adiposo), ela envolve o fígado (BERNABUCCI et al., 2010; BAUMGARD et al., 2011), local primário de produção de glicose em ruminantes (COLLIER et al., 2008). Tais mudanças afetam diretamente a capacidade do fígado de coordenar o fluxo de nutrientes para o organismo, alterando vias metabólicas fundamentais, como a gliconeogênese (RHOADS et al., 2011).

Vacas sob estresse calórico apresentam menores concentrações plasmáticas de GH. Como o GH estimula a mobilização de lipídios e inibe a ação da insulina, sua baixa concentração favorece o aumento de insulina e a redução de AGNE (RHOADS et al., 2010). Desta forma, limita a oferta energética e iniciam os processos para fornecer glicose para o organismo, como glicogenólise e gliconeogênese (RHOADS et al., 2011).

O IGF1 produzido no fígado, sob estímulo do GH, é importante para a síntese láctea em gado de leite. Investigando se a resposta hepática do GH é alterada com a temperatura ambiente, Rhoads et al. (2010) avaliaram a expressão gênica de receptores de GH em condição de estresse por calor e observaram que, independente da redução do consumo de alimento, ocorre diminuição da abundância do receptor de GH (rGH). A abundância de mRNA de IGF1 foi menor no estresse calórico e em animais subalimentados, desta forma, o GH hepático tem responsividade reduzida (em termos da expressão do gene IGF1) e parece ter envolvidos mecanismos associados a redução no consumo de alimentos. A redução

na abundância de receptores hepáticos de GH pode servir para alterar outros processos hepáticos dependentes de GH, como a regulação da gliconeogênese (COLLIER et al., 2008; RHOADS et al., 2011).

Examinando a expressão hepática de genes chave para a gliconeogênese, constatou-se que a restrição alimentar em condições termoneutras estimularam a expressão de fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e piruvato carboxilase (PC). Já em estresse calórico, houve aumento da PC, mas a PEPCK permaneceu inalterada (WHEELLOCK et al., 2006). No estudo de Rhoads et al. (2011) também foi observada mudança no perfil de enzimas hepáticas gliconeogênicas com aparente dependência do plano nutricional. A abundância de PEPCK aumentou durante a restrição alimentar, mas não foi afetada pelo estresse calórico ou administração de somatotropina bovina recombinante (bST). Já a PC teve a expressão aumentada durante a restrição alimentar e durante o estresse calórico, porém diminuiu com a administração de bST. Já a expressão de IGF1 aumentou após a administração de bST, tanto em estresse calórico quanto em alimentação restrita, indicando que o fígado é capaz de responder ao GH. Portanto, a falta de um efeito positivo do bST na expressão dos genes gliconeogênicos é decorrente de outros fatores, sendo possível que o BEN associado ao estresse calórico e subnutrição pode ter causado regulação diferencial nas vias de sinalização do GH, resultando em atividade gliconeogênica GH-dependente alterada.

2.5 SUPLEMENTAÇÃO COM CROMO ORGÂNICO

O cromo (Cr) em seu estado trivalente (Cr^{3+}) é o mais estável, sendo a forma mais comum presente nos alimentos, já o estado hexavalente (Cr^{6+}) apresenta a melhor taxa de absorção, porém é altamente tóxico. As fontes orgânicas possuem melhor biodisponibilidade e absorção como o cromo-L-metionina, complexo de cromo com ácido nicotínico, picolinato de cromo, e levedura de cromo. A fonte inorgânica mais comum é o cloreto de cromo, apresentando menor absorção e menor atividade biológica, sendo utilizado basicamente marcador em estudos de digestibilidade. A forma biologicamente ativa do Cr é um composto chamado fator de tolerância à glicose (GTF), sendo constituído por um átomo de Cr^{3+} , ácido nicotínico e aminoácidos, possivelmente glicina, cisteína e ácido glutâmico. O átomo de Cr^{3+} é

o núcleo do GTF, o que o torna ativo (OLIVEIRA; SOARES FILHO, 2005; CONDÉ et al., 2014).

A concentração de cromo na maioria dos alimentos destinados para ruminantes é baixa. As concentrações médias de Cr nos grãos de cereais não processados são inferiores a 0,05 mg/kg de MS, já as forragens colhidas possuem maiores concentrações, com médias de Cr variando de 0,155 mg/kg para feno de capim a 0,522 mg/ g para feno de alfafa (SPEARS et al., 2017).

O cromo participa da homeostase glicêmica pela regulação da ação do hormônio insulina. Ele atua como um cofator, melhorando a eficiência da insulina, mais especificamente, com o estímulo da captação de glicose pelas células de tecidos-alvo, porém não constitui um substituto do hormônio. Assim, quando em presença de cromo em forma fisiologicamente ativa, as concentrações de insulina necessárias ao metabolismo são menores (CONDÉ et al., 2014).

O aumento da concentração plasmática de glicose ocasiona a liberação rápida de insulina e um movimento de cromo do plasma para as células dependentes de insulina. A insulina liga-se a subunidade α externa do receptor de insulina transmembrana na célula, causando uma mudança de conformação, ativando a função da tirosina quinase do receptor. Esta alteração no receptor de insulina desencadeia uma série de reações de fosforilação em cascata para que ocorra a translocação dos transportadores de glicose (GLUTs) para a membrana plasmática. O aumento da concentração sérica de insulina provoca outra situação concomitante a mobilização do cromo mediada pela transferrina, que é a mobilização de receptores de transferrina a partir de vesículas intracelulares para se a membrana. Assim, a transferrina saturada com cromo liga-se a seus respectivos receptores e o complexo formado é endocitado. O pH ácido do citoplasma promove a digestão do complexo Cr-transferrina e ocorre a liberação do cromo. Quatro íons de Cr^{3+} unem-se à apocromodulina (sem Cr^{3+}) formando a cromodulina, a qual é uma forma ativa. Então a cromodulina liga-se ao sítio ativo no receptor insulínico, completando a ativação do mesmo e amplificando o sinal da insulina (VINCENT, 2000; GOMES et al., 2005; PECHOVA; PAVLATA, 2007).

A exigência nutricional de cromo aumenta durante períodos de estresse. A deficiência experimental de cromo resulta no aparecimento dos seguintes sintomas: hiperglicemia durante o jejum, alteração na tolerância à glicose, concentrações

elevadas de insulina circulante, glicosúria, elevação do colesterol e triglicerídeos plasmáticos, decréscimo na capacidade da insulina se ligar à célula e decréscimo no número de receptores da insulina (CONDÉ et al., 2014). Uma vez que o uso de glicose predomina durante o estresse calórico, a suplementação com cromo pode melhorar a tolerância térmica e a produtividade de animais estressados pelo calor, melhorando o status antioxidante e potencializando a ação da insulina (RHOADS et al., 2013; KESHRI et al., 2019). A suplementação com cromo pode resultar no aumento da produtividade através da melhoria da ingestão de ração, taxa de crescimento, qualidade da carcaça, parâmetros reprodutivos e funções imunológicas dos animais sob estresse calórico (BIN-JUMAH et al., 2020).

A suplementação de cromo na dieta tem apresentado bons resultados com aumento do CMS, produção de leite e aumento da porcentagem de gordura e lactose no leite (HAYIRLI et al., 2001; AL-SAIADY et al., 2004; AN-QIANG et al., 2009; SOLTAN, 2010). Ele pode potencializar a ação da insulina e melhorar a tolerância à glicose (KESHRI et al., 2019). O cromo melhorou o metabolismo energético determinando menores concentrações plasmáticas de AGNE, BHBA e acúmulo de triglicerídeos do fígado, bem como maiores concentrações séricas de insulina no pré-parto, aumentando a tolerância a glicose e responsividade à insulina no pós-parto, resultando em melhoria do desempenho e produção durante o período periparturiente (HAYIRLI et al., 2001; SADRI et al., 2012). Também é observado aumento das concentrações séricas de IGF1 e glicose, assim como diminuição das concentrações de cortisol, uréia e AGNE (HAYIRLI et al., 2001; VASQUEZ; HERRERA, 2003; AL-SAIADY et al., 2004; SUMNER et al., 2007; AN-QIANG et al., 2009; SOLTAN, 2010; NIKKHAH et al., 2011; KAFILZADEH et al., 2012).

A suplementação com cromo mostra uma tendência no sentido de melhorar o desempenho reprodutivo como indicado pela redução da porcentagem de vacas acíclicas no pós-parto, redução no número de dias ao primeiro serviço e aumento da porcentagem de vacas prenhes aos 28 dias, o que pode ser atribuído à redução da mobilização de tecido corporal no pós-parto com redução de AGNE bem como a melhora no sistema imune e provável redução de incidência de infecção uterina no pós-parto (SOLTAN, 2010; KAFILZADEH et al., 2012). Porém, Leiva et al. (2018) não observaram diferença no número de oócitos viáveis coletados e embriões produzidos entre vacas alimentadas com dieta controle e suplementada com cromo.

A suplementação com cromo em vacas sob estresse calórico pode melhorar o desempenho reprodutivo aliviando os danos mediados pela insulina no folículo e seu complexo cumulus-oócito, reduzindo os efeitos deletérios de dietas muito ricas em concentrado na qualidade oocitária, e possui também ação anti-inflamatória (LEIVA et al., 2017; NEGRÓN-PEREZ et al., 2019).

Não é bem definida a concentração tóxica de Cr para ruminantes, mas pode ser presumido esse efeito em doses elevadas de suplementação, sendo observado efeito quadrático em variáveis como CMS e produção e composição de leite (HAYIRLI et al., 2001; NIKKHAH et al. 2011). Em doses maiores que 0,10 mg/kg^{0,75} não se observa o efeito esperado na redução da lipólise e aumento da gliconeogênese hepática (HAYIRLI et al., 2001). A EFSA (2020) considera o nível máximo recomendado de cerca de 0,4 mg Cr /kg de alimento completo. Os EUA permitem que seja utilizado até 0,50 mg de Cr /kg de MS sob a forma propionato de Cr como suplemento na dieta para bovinos desde 2009 (SPEARS et al., 2017).

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SAIADY, M. Y.; AL-SHAIKH, M. A.; AL-MUFARREJ, S. Y.; ALSHOWEIMI, T. A.; MOGAWER, H. H.; DIRRAR, A. Effect of chelated chromium supplementation on lactation performance and blood parameters of Holstein cows under heat stress. *Animal Feed Science and Technology*, v. 117, p. 223-233, 2004.

AN-QIANG, L.; ZHI-SHENG, W., AN-GUO, Z. Effect of chromium picolinate supplementation on early lactation performance, rectal temperatures, respiration rates and plasma biochemical response of Holstein cows under heat stress. *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 8, p. 940-945, 2009.

ARMSTRONG, D. Heat stress interaction with shade and cooling. *Journal of Dairy Science*, v. 77, n. 7, p. 2044-2050, 1994.

AZEVEDO, M. D.; PIRES, M. D. F. Á.; SATURNINO, H. M.; LANA, Â. M. Q.; SAMPAIO, I. B. M.; MONTEIRO, J. B. N.; MORATO, L. E. Estimation of upper critical levels of the temperature-humidity index for ½, ¾ e 7/8 lactating Holstein-Zebu dairy cows. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 34, n. 6, p. 2000-2008, 2005.

BADINGA, L.; THATCHER, W.; DIAZ, T.; DROST, M.; WOLFENSON, D. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. *Theriogenology*, v. 39, n. 4, p. 797-810, 1993.

- BAUMAN, D. E.; CURRIE, W. B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of Dairy Science*, v.63, p.1514-1529, 1980.
- BAUMGARD, L. H.; RHOADS, R. P. Ruminant Nutrition Symposium: ruminant production and metabolic responses to heat stress. *Journal of Animal Science*, v.90, p.1855–1865, 2012.
- BAUMGARD, L. H.; RHOADS, R. P. Effects of Heat Stress on Postabsorptive Metabolism and Energetics. *Annual Review of Animal Bioscience*, v. 1, p. 311–337, 2013.
- BAUMGARD, L. H.; KEATING, P. A.; ROSS, J. W.; RHOADS, R. P. Effects of heat stress on the immune system, metabolism and nutrient partitioning: implications on reproductive success. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 39, n. 1, p. 173-183, 2015.
- BAUMGARD, L. H.; WHEELLOCK, J. B.; SANDERS, S. R.; MOORE, C. E.; GREEN H. B.; WALDRON, M. R.; RHOADS, R. P. Postabsorptive carbohydrate adaptations to heat stress and monensin supplementation in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v. 94, p. 5620-5633, 2011.
- BEEDE, D. K.; COLLIER, R. J. Potential nutritional strategies for intensively managed cattle during thermal stress. *Journal of Animal Science*, v. 62, p. 543-555, 1986.
- BERMAN, A. Estimates of heat stress relief needs for Holstein dairy cows. *Journal of Animal Science*, v.83, p. 1377-1384, 2005.
- BERNABUCCI, U.; BASIRICÒ, L. MORERA, P.; DIPASQUALE, D.; VITALI, A.; CAPPELLI, F. P.; CALAMARI, L. Effect of summer season on milk protein fractions in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v. 98, p. 1815–1824, 2015.
- BERNABUCCI, U.; LACETERA, N.; BAUMGARD, L. H.; RHOADS, R. P.; RONCHI, B.; NARDONE, A. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *Animal*, v.4, p. 1167-1183, 2010.
- BIN-JUMAH, M.; ABD EL-HACK, M. E.; ABDELNOUR, S. A.; HENDY, Y. A.; GHANEM, H. A.; ALSAFY, S. A.; KHAFAGA, A. F.; NORELDIN, A. E.; SHAHEEN, H.; SAMAK, D.; MOMENAH, M. A.; ALLAM, A. A.; ALKAHTANE, A. A.; ALKAHTANI, S.; ABDEL-DAIM, M. M.; ALEYA, L. Potential use of chromium to combat thermal stress in animals: A review, *Science of the Total Environment*, v. 707, 2019.
- BOURAOUI, R.; LAHMAR, M.; MAJDOUB, A.; DJEMALI, M.; BELYEA, R. The relationship of temperature-humidity index with milk production of dairy cows in a Mediterranean climate. *Animal Research*, v. 51, p.479–491, 2002.

- BRAGANÇA, G. M.; BATISTA, R. I. T. P.; SOUZA-FABJAN, J. M. G.; ALFRADIQUE, V. A. P.; ARASHIRO, E. K. N.; COSENTINO, I. O.; PINTO, P. H. N.; CAMARGO, L. S. A.; DA FONSECA, J. F.; BRANDÃO, F. Z. Dose and administration protocol for FSH used for ovarian stimulation affect gene expression in sheep cumulus-oocyte complexes. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 30, p. 1234-1244, 2018.
- CERF-BENSUSSAN, N.; GABORIAU-ROUTHIAU, V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nature Reviews Immunology*, v. 10, p. 735-44, 2010.
- COLLIER, R. J.; COLLIER, J. L.; RHOADS, R. P.; BAUMGARD, L. H. Genes involved in the bovine heat stress response. *Journal of Dairy Science*, v. 91, p. 445–54, 2008.
- CONDÉ, M. S.; PENA, S. M.; ROCHA JÚNIOR, C. M.; HOMEM, B. G. C.; DEMARTINI, G. P.; SILVA, A. B. Minerais quelatados na nutrição de suínos. *Revista Eletrônica Nutritime*, v. 11, n. 4, p. 3547-3565, 2014.
- COPPOCK, C. E.; GRANT, P. A.; PORTZER, S. J. Lactating dairy cow responses to dietary sodium, chloride, bicarbonate during hot weather. *Journal of Dairy Science*, v. 65, p. 566-576, 1982.
- COWLEY, F. C.; BARBER, D. G.; HOULIHAN, A. V.; POPPI, D. P. Immediate and residual effects of heat stress and restricted intake on milk protein and casein composition and energy metabolism. *Journal of Dairy Science*, v. 98, p. 2356-2368, 2015.
- DE RENSIS, F.; GARCIA-ISPIERTO, I.; LÓPEZ-GATIUS, F. Seasonal heat stress: Clinical implications and hormone treatments for the fertility of dairy cows. *Theriogenology*, v. 84, p. 659–666, 2015.
- DE RENSIS, F.; SCARAMUZZI, R. J. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow—a review. *Theriogenology*, v. 60, p.1139–1151, 2003.
- EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Molecular Reproduction and Development*, v. 46, n. 2, p. 138-145, 1997.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2020. Scientific Opinion on the safety and efficacy of Availa®Cr (chromium chelate of DL-methionine) as a feed additive for dairy cows. *EFSA Journal*, v. 18, 26 pp.
- FUQUAY, J. Heat stress as it affects animal production. *Journal of Animal Science*, v. 52, n. 1, p. 164-174, 1981.
- GARNER, J. B.; DOUGLAS, M.; WILLIAMS, R. S. O.; WALES, W. J.; NGUYEN, T. T. T.; HAYES, B. J. Genomic selection improves heat tolerance in dairy cattle. *Nature Scientific Reports*, v. 6, p. 1–8, 2016.

- GOMES, M. R.; ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. Considerações sobre cromo, insulina e exercício físico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 11, p. 262-266, 2005.
- GWAZDAUSKAS, F.; THATCHER, W.; KIDDY, C.; PAAPE, M.; WILCOX, C. Hormonal patterns during heat stress following PGF2 α -tham salt induced luteal regression in heifers. *Theriogenology*, v. 16, n. 3, p. 271-285, 1981.
- HAMMAMI, H.; VANDENPLAS, J.; VANROBAYS, M. L.; REKIK, B.; BASTIN, C.; GENGLER, N. Genetic analysis of heat stress effects on yield traits, udder health, and fatty acids of Walloon Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v. 98, p. 1–13, 2015.
- HANSEN, P. J. Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. *Theriogenology*, v. 68(S1), p. S242–S249, 2007.
- HANSEN, P. J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 364, p. 3341–3350, 2009.
- HAYIRLI, A. D.; BREMMER, D. R.; BERTICS, S. J.; SOCKA, M. T.; GRUMMER, R. R. Effect of chromium supplementation on production and metabolic parameters in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 84, p. 1218–1230, 2001.
- IPCC, 2014: Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp.
- JU, J. C. Cellular responses of oocytes and embryos under thermal stress: hints to molecular signaling. *Animal Reproduction*, v.2, n.2, p.79-90, 2005.
- KAFILZADEH, F.; SHABANKAREH, H. K.; TARGHIBI, M. R. Effect of chromium supplementation on productive and reproductive performances and some metabolic parameters in late gestation and early lactation of dairy cows. *Biological Trace Element Research*, v. 149, p. 42-49, 2012.
- KEKANA, T. W.; NHERERA-CHOKUDAMUKENGELA, F. V.; MUYYA, M. C.; MANYAMA, K. M.; LEHLOENYA, K. C. Milk production and blood metabolites of dairy cattle as influenced by thermal-humidity index. *Tropical Animal and Health Production*, v. 50, p. 921–924, 2018.
- KESHRI, A.; ROY, D.; SIDHU, V. K.; KUMAR, M.; KUSHWAHA, R.; VASWANI, S.; KUMARI L. V.; SONAM, D.; PRAKASH, A.; CHOUDHURY, S. Impact of different chromium sources on physiological responses, blood biochemicals and endocrine status of heat stress in dairy calves. *Biological Rhythm Research*, 2019.

- LEIVA, T.; COOKE, R. F.; BRANDÃO, A. P.; BERTIN, R. B.; COLOMBO, E. A.; MIRANDA, V. F. B.; LOURENÇO, L. A. C.; RODRIGUES, S. M. B.; VASCONCELOS, J. L. M. Effects of supplemental calcium salts of palm oil and chromium-propionate on insulin sensitivity and productive and reproductive traits of mid- to late lactating Holstein × Gir dairy cows consuming excessive energy. *Journal of Dairy Science*, v. 101, p. 491–504, 2018.
- LEIVA, T.; COOKE, R. F.; BRANDAO, A. P.; PARDELLI, U.; RODRIGUES, R. O.; CORRA, F. N.; VASCONCELOS, J. L. Effects of concentrate type and chromium propionate on insulin sensitivity, productive and reproductive parameters of lactating dairy cows consuming excessive energy. *Animal*, v. 11, p. 436–444, 2017.
- NARDONE, A.; RONCHI, B.; LACETERA, N.; RANIERI, M. S.; BERNABUCCI, U. Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems. *Livestock Science*, v. 130, n. 1, p. 57-69, 2010.
- NEGRÓN-PÉREZ, V. M.; FAUSNACHT, D. W.; RHOADS, M. L. Invited review: Management strategies capable of improving the reproductive performance of heat-stressed dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 102, 2019.
- NIKKHAH, A.; MIRZAEI, M.; KHORVASH, M.; RAHMANI, H. R.; GHORBANI, G. R. Chromium improves production and alters metabolism of early lactation cows in summer. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 95, p. 81–89, 2011.
- O'BRIEN, M. D.; RHOADS, R. P.; SANDERS, S. R.; DUFF, G. C.; BAUMGARD, L. H. Metabolic adaptations to heat stress in growing cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 38, p. 86–94, 2010.
- OLIVEIRA, D. J. C.; SOARES FILHO, C. V. S. Suplementação com cromo para ruminantes. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, v. 8, p. 71-77, 2005.
- OLIVEIRA NETO, J. B.; MOURA, A. A. A.; NEIVA, J. N. M.; GUILHERMINA, M. M. Indicadores de Estresse calórico e Utilização da Somatotropina Bovina (bST) em Vacas Leiteiras Mestiças (*Bos taurus* x *Bos indicus*) no Semi-Árido do Nordeste. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 30, p.360-367, 2001.
- PAULA-LOPES, F.; LIMA, R.; SATRAPA, R.; BARROS, C. Physiology and Endocrinology Symposium: Influence of cattle genotype (*Bos indicus* vs. *Bos taurus*) on oocyte and preimplantation embryo resistance to increased temperature. *Journal of Animal Science*, v. 91, n. 3, p. 1143-1153, 2013.
- PEARCE, S. C.; MANI, V.; BODDICKER, R. L.; JOHNSON, J. S.; WEBER, T. E.; ROSS, J. W.; RHOADS, R. P.; BAUMGARD, L. H.; GABLER, N. K. Heat stress reduces intestinal barrier integrity and favors intestinal glucose transport in growing pigs. *Plos One*, v.8, p. 1-9, 2013.
- PECHOVA, A.; PAVLATA, L. Chromium as an essential nutrient: a review. *Veterinary medicine*, v. 52, p. 1–18, 2007.

PIRES, M. F. A. Manejo nutricional para evitar estresse calórico. Comunicado Técnico 52. Embrapa, 2006.

PIRES, M. F. A.; CAMPOS, A. T. Relação dos dados climáticos com desempenho animal. In: RESENDE, H.; CAMPOS, A. T.; PIRES, M. F. A. (Ed.). Dados climáticos e sua utilização na atividade leiteira. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003. p. 103-114.

PUTNEY, D. J.; MULLINS, S.; THATCHER, W. W., DROST, M.; GROSS, T. S. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. *Animal Reproduction Science*, v. 19, p. 37-51, 1989.

RHOADS, M. L.; KIM, J. W.; COLLIER, R. J.; CROOKER, B. A.; BOISCLAIR, Y. R.; BAUMGARD, L. H.; RHOADS, R. P. Effect of heat stress and nutrition on lactating Holstein cows: II. Aspects of hepatic growth hormone responsiveness. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 170–179, 2010.

RHOADS, M. L.; RHOADS, R. P.; VAN BAALE, M. J.; COLLIER, R. J.; SANDERS, S. R.; SHWARTZ, W. J.; BAUMGARD, L. H. Effects of a supplemental yeast culture on heat-stressed lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v. 92, p.935-942, 2009.

RHOADS, R. P.; BAUMGARD, L. H.; SUAGEE, J. K.; SANDERS, S. R. Nutritional Interventions to Alleviate the Negative Consequences of Heat Stress. *Advances in Nutrition*, v. 4, p. 267–276, 2013.

RHOADS, R. P.; LA NOCE, A. J; WHEELLOCK, J. B.; BAUMGARD L. H. Short Communication: Alterations in expression of gluconeogenic genes during heat stress and exogenous bovine somatotropin administration. *Journal of Dairy Science*, v. 94, p. 1917-1921, 2011.

RIVERA, R.; HANSEN, P. Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. *Reproduction*, v. 121, n. 1, p. 107-115, 2001.

ROTH Z. Effect of Heat Stress on Reproduction in Dairy Cows: Insights into the Cellular and Molecular Responses of the Oocyte. *Annual Review of Animal Bioscience*, v.5, p. 151-170, 2017.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biology of Reproduction*, v. 71, p. 1898–1906, 2004.

SADRI, H.; GHORBANI, G. R.; RAHMANI, H. R.; SAMIE, A. H.; KHORVASH, M.; BRUCKMAIER, R. M. Chromium supplementation and substitution of barley grain with corn: Effects on performance and lactation in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 92, p. 5411-5418, 2009.

- SADRI, H.; RAHMANI, H. R.; KHORVASH, M.; GHORBANI, G. R.; BRUCKMAIER, R. M. Chromium supplementation and substitution of barley grain with corn: Effects on metabolite and hormonal responses in periparturient dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 96, p. 220–227, 2012.
- SHEHAB-EL-DEEN, M. A.; LEROY, J. L.; FADEL, M.; SALEH, S.; MAES, D.; VAN SOOM, A. Biochemical changes in the follicular fluid of the dominant follicle of high producing dairy cows exposed to heat stress early post-partum. *Animal Reproduction Science*, v. 117, n. 3, p. 189-200, 2010.
- SHEHAB-EL-DEEN, M. A.; LEROY, J. L.; MAES, D.; VAN SOOM, A. Cryotolerance of bovine blastocysts is affected by oocyte maturation in media containing palmitic or stearic acid. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 44, p. 140-142, 2009.
- SILVA, C.; SARTORELLI, E.; CASTILHO, A.; SATRAPA, R.; PUELKER, R.; RAZZA, E.; TICIANELLI, J.; EDUARDO, H.; LOUREIRO, B.; BARROS, C. Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced in vitro. *Theriogenology*, v. 79, n. 2, p. 351-357, 2013.
- SILVA, M. V. G. B.; MARTINS, M. F.; GONÇALVES, G. S.; PANETTO, J. C. DO C.; PAIVA, L. DE C.; MACHADO, M. A.; REIS, D. R. de L.; FERREIRA JUNIOR, E.; CEMBRANELLI, M. DE A. R., 2019. Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando – Sumário de Touros – Resultado do Teste de Progenie - Junho/2019. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite. 68p.
- SILVA, T. P. D.; SOUSA JUNIOR, S. C. Produção de leite de vacas submetidas a diferentes períodos de exposição à radiação solar no sul do Piauí. *Agrarian*, v. 6, p. 320-325, 2013.
- SIQUEIRA, K. B.; PINHO, M. C.; MERCÊS, E. D. S. O consumo de leite em números. *Panorama do Leite*, v. 65, p. 5-7, 2012.
- SMITH, D. L.; SMITH, T.; RUDE, B. J.; WARD, S. H. Short communication: Comparison of the effects of heat stress on milk and component yields and somatic cell score in Holstein and Jersey cows. *Journal of Dairy Science*, v. 96, p. 3028-3033, 2013.
- SOLTAN, M. A. Effect of dietary chromium supplementation on productive and reproductive performance of early lactating dairy cows under heat stress. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 94, p. 264-272, 2010.
- SONNA, L. A.; FUJITA, J.; GAFFIN, S. L.; LILLY, C. M. Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *Journal of Applied Physiology*, v. 92, p.1725–1742, 2002.
- SPEARS, J. W.; LLOYD, K. E.; KRAFKA, K. Chromium concentrations in ruminant feed ingredients. *Journal of Dairy Science*, v. 100, p 3584-3590, 2017.

- SPIERS, D. E.; SPAIN, J. N.; SAMPSON, J. D.; RHOADS, R. P. Use of physiological parameters to predict milk yield and feed intake in heat-stressed dairy cows. *Journal of Thermal Biology*, v. 29, p. 759–764, 2004.
- ST-PIERRE, N. R.; COBANOV, B.; SCHNITKEY, G. Economic losses from heat stress by US livestock industries. *Journal of Dairy Science*, v. 86, p. 52–77, 2003.
- SUMNER, J. M.; VALDEZ, F.; MCNAMARA, J. P. Effects of Chromium Propionate on Response to an Intravenous Glucose Tolerance Test in Growing Holstein Heifers. *Journal of Dairy Science*, v. 90, p. 3467–3474, 2007.
- TAO, S.; BUBOLZ, J. W.; DO AMARAL, B. C.; THOMPSON, I. M.; HAYEN, M. J.; JOHNSON, S. E.; DAHL, G. E. Effect of heat stress during the dry period on mammary gland development. *Journal of Dairy Science*, v. 94, p. 5976–5986, 2011.
- TAO, S.; DAHL, G. E. Heat stress effects during late gestation on dry cows and their calves. *Journal of Dairy Science*, v.96, p. 1-15, 2013.
- TAO, S.; ORELLANA, R. M.; WENG, X.; MARINS, T. N.; DAHL, G. E.; BERNARD, J. K. Symposium review: The influences of heat stress on bovine mammary gland function. *Journal of Dairy Science*, v.101, p. 5642-5654, 2018.
- TAO, S.; THOMPSON, I. M.; MONTEIRO, A. P. A.; HAYEN, M. J.; YOUNG, L. J.; DAHL, G. E. Effect of cooling heat-stressed dairy cows during the dry period on insulin response. *Journal of Dairy Science*, v.95, p. 5035-5046, 2012.
- THATCHER, W.; COLLIER, R. Effects of climate on bovine reproduction. In: *Current Therapy in Theriogenology*, v. 2, p. 301-309, 1986.
- THOM, E. C. The discomfort index. *Weatherwes*, v. 12, p. 57-60, 1959.
- THORNTON, P.; VAN DE STEEG, J.; NOTENBAERT, A.; HERRERO, M. The impacts of climate change on livestock and livestock systems in developing countries: A review of what we know and what we need to know. *Agricultural Systems*, v. 101, n. 3, p. 113-127, 2009.
- VASCONCELLOS, B. F.; PÁDUA, J. T.; MUÑOZ, M. F. C.; TONHATI, H. Efeitos genéticos e ambientais sobre a produção de leite, o intervalo de partos e a duração da lactação em um rebanho leiteiro com animais mestiços, no Brasil. *Revista Universitária Rural: Série Ciências da Vida*, v. 23, p. 39-45, 2003.
- VASQUEZ, E. F. A.; HERRERA, A. P. N. Concentração plasmática de cortisol, uréia, cálcio e fósforo em vacas de corte mantidas a pasto suplementadas com levedura de cromo durante a estação de monta. *Ciência Rural*, v. 33, p. 743-747, 2003.
- VINCENT, J. B. The biochemistry of chromium. *The Journal of Nutrition*, v.130, p.715– 718, 2000.

- WALDRON, M. R.; KULICK, A. E.; BELL, A. W., OVERTON, T. R. Acute experimental mastitis is not causal toward the development of energy-related metabolic disorders in early postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. 596-610, 2006.
- WEST, J. W. Physiological effects of heat stress on production and reproduction. In: TRI-STATE DAIRY NUTRITION CONFERENCE, 2002, Fort Wayne. Proceedings...Fort Wayne: Eastridge, M.D., 2002. p.1-9.
- WEST, J. W. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 86, p. 2131-2144, 2003.
- WHEELOCK, J. B.; RHOADS, R. P.; VANBAALE, M. J.; SANDERS, S. R.; BAUMGARD, L. H. Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 644-655, 2010.
- WHEELOCK, J. B.; SANDERS, S. R.; SHWARTZ, G.; HERNANDEZ, L. L.; BAKER, S. H.; MCFADDEN, J. W.; ODENS, L. J.; BURGOS, R.; HARTMAN, S. R.; JOHNSON, R. M.; JONES, B. E.; COLLIER, R. J.; RHOADS, R. P.; VANBAALE, M. J.; BAUMGARD, L. H. Effects of heat stress and rbST on production parameters and glucose homeostasis. *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. 290 (Abstr.), 2006.
- WISE, M.; ARMSTRONG, D.; HUBER, J.; HUNTER, R.; WIERSMA, F. Hormonal alterations in the lactating dairy cow in response to thermal stress. *Journal of Dairy Science*, v. 71, n. 9, p. 2480-2485, 1988.
- WOLFENSON, D.; THATCHER, W.; BADINGA, L.; SAVIO, J.; MEIDAN, R.; LEW, B.; BRAW-TAL, R.; BERMAN, A. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biology of Reproduction*, v. 52, n. 5, p. 1106-1113, 1995.
- YANG, B.; JOHNSON, T. S.; THOMAS, G. H.; WATSON, P. F.; WAGNER, B.; FURNESS, P. N.; EL NAHAS, A. M. A shift in the Bax/Bcl-2 balance may activate caspase-3 and modulate apoptosis in experimental glomerulonephritis. *Kidney International*, v. 62, p. 1301-1313, 2002.
- YOUSEF, M. K. Stress Physiology in Livestock. Boca Raton: CRC Press Inc., 1985.

3. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

A suplementação com cromo orgânico na dieta de vacas sob estresse calórico:

- Aumenta a produção de leite e as porcentagens de gordura e proteína no leite;
- Tem efeito positivo no crescimento dos folículos e qualidade dos oócitos, reduzindo a apoptose celular induzida pelo estresse;
- Modula a expressão de genes relacionados ao metabolismo de glicose e gliconeogênese no fígado.

4. OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar a suplementação com cromo orgânico na dieta para mitigação dos efeitos do estresse calórico sobre características produtivas, reprodutivas e metabólicas de vacas Girolando em lactação.

4.2 ESPECÍFICOS

- Determinar o consumo de matéria de seca, a produção e composição do leite de vacas Girolando sob estresse calórico suplementadas com cromo orgânico na dieta;
- Observar a população folicular, taxa de crescimento do folículo dominante, diâmetro do folículo dominante e qualidade morfológica dos oócitos de vacas Girolando sob estresse calórico suplementadas com cromo orgânico na dieta;
- Estimar a apoptose de oócitos de vacas Girolando sob estresse calórico suplementadas com cromo orgânico na dieta;
- Avaliar o perfil de expressão de genes relacionados ao metabolismo de glicose, *growth hormone* (GH) e *insulin-like growth factor 1* (IGF1) no fígado de vacas Girolando sob estresse calórico suplementadas com cromo orgânico na dieta.

5. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Campo Experimental José Henrique Bruschi da Embrapa Gado de Leite, localizado em Coronel Pacheco, Minas Gerais, Brasil, no período de inverno de 2017 (junho a setembro). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite (Protocolo 07/2015 - anexo), Brasil, e seguiu os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

Trinta e seis vacas $\frac{3}{4}$ Girolando com média de $71,3 \pm 15,3$ dias em lactação, peso médio de 509 ± 61 kg e escore médio de condição corporal de $3,5 \pm 0,2$ (escala 1 a 5; EDMONSON et al., 1989) foram submetidas a dois ensaios sequenciais.

As dietas foram formuladas usando o AMTS Cattle Pro® (Agricultural Modeling and Training Systems LLC, New York, USA), de acordo com os requisitos nutricionais para vacas que produzem 25 kg de leite / dia (NRC, 2001). As dietas foram baseadas em silagem de milho, milho moído, farelo de soja e mistura mineral suplementada ou não com tripicolinato de cromo (Tecnutri, Montes Claros, Brasil) oferecidas em TMR: 42% de matéria seca (MS), 12,39% proteína bruta, 33,44% fibra em detergente neutro, 0,57% Ca, 0,46% P e 1,71 Mcal/kg de energia líquida com base na MS.

5.1 ENSAIO 1- AMBIENTE TERMONEUTRO

Os animais foram alojados em *free-stall* com cochos eletrônicos (Intergado®, Minas Gerais, Brasil) em ambiente termoneutro com um ITU médio de 68. Após um período de 14 dias para adaptação a dieta, as vacas foram alocadas aleatoriamente em um de dois grupos: dieta controle ou dieta suplementada com cromo (0,50 mg Cr/kg MS) (SADRI et al., 2009). Alimentos e água foram fornecidos *ad libitum* por 11 dias.

5.2 ENSAIO 2- ESTRESSE CALÓRICO

Após o período em ambiente termoneutro, as vacas foram mantidas na mesma dieta anterior, porém divididas em três condições ambientais: condições de estresse calórico em câmara climática com um ITU médio de 85 por oito horas por dia, entre as ordenhas, e alimentadas *ad libitum* (HS); ambiente termoneutro em *free-stall* com ITU médio de 68 com alimentação *ad libitum* (TN); e grupo *pair-fed* em ambiente termoneutro em *free-stall* com ITU médio de 68 (PF). O ITU de 85 foi definido com temperatura do ar a 34 °C e 60% de umidade. Esses animais foram mantidos nessa condição por 11 dias.

A dieta oferecida às vacas *pair-fed* foi a quantidade média consumida no dia anterior pelas vacas estressadas em câmara climática. O grupo PF foi utilizado para isolar o efeito da redução do CMS em animais estressados pelo calor. A câmara climática oferecia uma capacidade limitada em termos de número de animais; portanto, os testes foram realizados em duas fases, com 18 animais em cada uma, para atingir a quantidade necessária de repetições de dados. Assim, avaliamos o efeito da suplementação de cromo em três condições ambientais, totalizando seis grupos contemporâneos com seis animais cada.

A temperatura vaginal foi mensurada usando data loggers (iButton®, Whitewater, EUA) acoplados às hastes de plástico dispositivos intravaginais. As medidas foram realizadas seis vezes por dia: 7:30, 9:00, 12:00, 15:00, 17:00 e 19:00.

5.3 ANÁLISES LABORATORIAIS

Os restos alimentares foram mensurados diariamente e o CMS foi determinado (SILVA; QUEIROZ, 2002). As vacas foram ordenhadas duas vezes por dia, às 06:00 e 16:00, e a produção de leite foi medida diariamente. As amostras de leite foram coletadas semanalmente durante quatro ordenhas consecutivas para determinar a composição do leite (IDF, 2000). A produção de leite corrigida para energia foi calculada de acordo com Sjaunja et al. (1990). As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa coccígea a vácuo em tubos de 5 mL contendo EDTA (Vacutainer®, BD, Juiz de Fora, Brasil). As amostras de sangue foram

centrifugadas a 800 x g por 15 minutos e o plasma foi armazenado a -20 °C até a análise. As concentrações de glicose, uréia e insulina foram determinadas. A glicose foi determinada por uma reação colorimétrica de ponto final (Glucose Pap Liquiform®, Labtest, Minas Gerais, Brasil). A uréia foi determinada por reação enzimática e fotometria ultravioleta (Ureia UV Liquiform®, Labtest, Minas Gerais, Brasil). As análises foram realizadas com kits comerciais com sistema de leitura monocromática automática (Labmax Premium 240®, Labtest Diagnostica, Minas Gerais, Brasil), enquanto a concentração de insulina foi determinada por radioimunoensaio (RIA) com kits comerciais (Porcine Insulin® da Millipore, Missouri, EUA). A sensibilidade à insulina foi de 1,611 µU/mL, e o coeficiente intra-ensaio foi de 12%.

5.4 OVUM PICK UP (OPU), AVALIAÇÕES FOLICULARES E OOCITÁRIAS

As vacas foram submetidas à *ovum pick up* (OPU) e a recuperação dos complexos *cumulus* oócitos (COC) ocorreu no terceiro dia de cada ensaio. A sincronização da emergência das ondas foliculares e a coleta de COO foram realizadas por aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom, de acordo com Santos et al. (2018). Os COC foram avaliados de acordo com a qualidade morfológica e classificados como viáveis ou não viáveis, com base nas características citoplasmáticas dos oócitos e no número de camadas celulares do *cumulus* (FERREIRA et al., 2011). Os oócitos viáveis foram transportados em tubos de 1,5 mL contendo solução salina TCM199 Earle com soro fetal de bezerro a 10% em um transportador de oócitos (WTA®, São Paulo, Brasil) a 37 °C para o laboratório para maturação *in vitro* (meio TCM199 Earle com soro fetal de bezerro a 10%, em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ em ar, com uma temperatura de 38,5°C por 24 h). Quatro dias (96 h) após a coleta do COC, o maior diâmetro folicular foi avaliado por meio de duas medidas perpendiculares no eixo dos dois maiores folículos presentes, sendo reavaliados após 24 h (120 h após a coleta de oócitos) para determinar o diâmetro do folículo dominante (DFD) e a taxa de crescimento folicular de acordo com Santos et al. (2018).

Foi realizado o teste da marcação de extremidade terminal dUTP mediada por desoxinucleotidil transferase (TUNEL) (ROTH; HANSEN, 2004) para identificar a fragmentação de DNA.

5.5 BIÓPSIA HEPÁTICA

O tecido hepático foi coletado por procedimento cirúrgico no último dia do Ensaio 2. Após a tricotomia local e assepsia com álcool 70%, foi realizada a anestesia local utilizando 5 mL de lidocaína a 2% e uma pequena incisão com bisturi no ponto de introdução da agulha de biópsia hepática no 11º espaço intercostal direito, aproximadamente 20 cm abaixo da linha do dorso, no cruzamento de uma linha imaginária entre a tuberosidade externa do íleo e a escápula e outra linha perpendicular ao 11º espaço intercostal, ponto no qual corresponde à posição topográfica do lobo direito do fígado. A agulha de biópsia foi introduzida no fígado por acesso percutâneo.

Foi utilizada a agulha do modelo 14 G x 20 cm junta a cânula para biópsia hepática com empunhadura plástica modelo de disparo semi-automático (Biomedical®). O tecido foi acondicionado em microtubos (livre de RNase e DNase), com 200 µL de RNA Later (Ambion®), segundo a recomendação do fabricante. A amostra foi mantida refrigerada *overnight*, posteriormente foi drenado o excesso de RNA Later e a amostra foi armazenada em freezer à temperatura de -80 °C para posterior análise da expressão gênica.

5.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

Para avaliar a abundância de mRNA que codificam o metabolismo hepático da glicose, o transportador de glicose 2 (GLUT2), a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), a glicose-6-fosfatase (G6Pase), o receptor de hormônio de crescimento (rGH) e os transcritos do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1) foram utilizados como calibradores para comparar o status metabólico entre os tratamentos, uma vez que são indicadores da abundância de mRNAs que codificam o metabolismo hepático da glicose.

O RNA total foi extraído com o uso do reagente TRIzol™ (Invitrogen) na taxa de 1 mL para 100 mg de tecido. O tecido foi triturado (tecido + reagente TRIzol™) com ULTRA-TURRAX® básico T10 até a dissociação completa. Subsequentemente, 100 µL de clorofórmio foram adicionados e a mistura foi homogeneizada e incubada por três minutos. As amostras foram então centrifugadas por 15 minutos a 12000 x g / 4 °C. A fase líquida foi coletada e transferida para um tubo limpo, com a adição de 500 µL de isopropanol em cada tubo, e incubada por 10 minutos. As amostras foram homogeneizadas por inversão e depois centrifugadas por 10 minutos a 12000 x g / 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado em 1 mL de etanol a 75%. O material foi novamente centrifugado a 7500 x g por cinco minutos e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi seco por cinco minutos e depois suspenso em 50 µL de água ultrapura sem RNase. A concentração total de RNA foi medida usando o espectrofotômetro ND-100 (NanoDrop Products). A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose.

Posteriormente, a transcrição reversa foi realizada utilizando o kit Superscript III (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação relativa por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real (qPCR) foi realizada em triplicado utilizando SYBR green disponível comercialmente. As reações (20 µL) foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante, usando o kit SYBR green (Power Up SYBR Green; Invitrogen), 3,3 ng de cDNA, água livre de nuclease e iniciadores específicos para cada reação. Os primers para os seguintes genes foram projetados: GLUT2 (NM_001103222.1; *forward*: 5'-ACAAGCCTGGGAGATCCAAC-3'; *reverse*: 5'-CCCAAGCAACCCTCCAAAGA-3'; temperatura de anelamento: 54 °C), PEPCK (NM_174737.2; *forward*: 5'-CAAGGATGGGGAGCCTTGTG-3'; *reverse*: 5'-CCTCGTAGACCAGAGGGACA-3'; temperatura de anelamento: 55 °C), G6Pase (NM_001076124.2; *forward*: 5'-ATGTTGTGGTTGGGATTCTGG-3'; *reverse*: 5'-CACCTTCGCTTGGCTTTCTC-3'; temperatura de anelamento: 52 °C), rGH (NM_176608.1; *forward*: 5'-GGTATGGATCTCTGGCAGCTG-3'; *reverse*: 5'-TCTGACAAGGAAAGCTGGTGTG-3'; temperatura de anelamento: 55 °C), IGF1 (NM_001077828.1; *forward*: 5'-TTGGTGGATGCTCTCCAGTTC-3'; *reverse*: 5'-GCACTCATCCACGATTCCTGT-3'; temperatura de anelamento: 54 °C), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH; U85042; *forward*: 5'-GTCTTCACTACCATGGAGAAGG-3'; *reverse*: 5'-

TCATGGATGACCTTGGCCAG-3'; temperatura de anelamento: 51 °C), e tirosina 3-monooxigenase /triptofano 5-monooxigenase proteína de ativação zeta (YWHAZ; NM_174814.2; *forward*: 5'-GCAAAGACGGAAGGTGCTG-3'; *reverse*: 5'-CCTCAGCCAAGTAGCGGTA-3'; temperatura de anelamento: 52 °C).

O cDNA modelo foi desnaturado a 95 °C por 15 segundos em 40 ciclos, na temperatura de anelamento do gene específico por 15 segundos e com alongamento a 72 °C por um minuto. Após cada execução da PCR, foi realizada uma análise da curva de fusão para confirmar que um único produto específico foi gerado. Os controles sem modelo, compreendendo a mistura de reação de PCR sem um modelo de DNA, também foram executados com cada iniciador para confirmar a ausência de contaminação. Dados de fluorescência verde foram adquiridos durante a etapa de extensão. A expressão de cada gene alvo foi normalizada usando a média geométrica dos valores obtidos para transcritos de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e tirosina 3-monooxigenase /triptofano 5-monooxigenase proteína de ativação zeta (YWHAZ) (genes endógenos). Os controles negativos foram reações sem adição de ácido nucleico.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

No Ensaio 1, para as variáveis CMS, produção e composição do leite e parâmetros metabólicos, um modelo linear misto ANOVA (PROC MIXED) foi utilizado para avaliar os efeitos da dieta, dia de coleta, interação dieta e dia de coleta, efeito aleatório de animal e fase (bloco). A produção de leite do primeiro dia de coleta foi utilizada como covariável para os parâmetros produtivos. Para a variável temperatura vaginal, foi utilizado um modelo linear misto avaliando os efeitos da dieta, dia da coleta, interação dieta e dia de coleta, hora do dia e efeito aleatório de animal e fase (bloco). Para parâmetros reprodutivos quantitativos, foi utilizado um modelo linear misto avaliando o efeito da dieta, efeito aleatório de animal e fase (bloco). As médias de quadrados mínimos foram comparadas pelo teste de Tukey.

No Ensaio 2, para as variáveis CMS, produção e composição do leite e parâmetros metabólicos, um modelo linear misto foi aplicado para avaliar os efeitos da dieta, condição ambiental, interação dieta e condição ambiental, interação dieta

com o dia da coleta, efeito aleatório de animal e fase (bloco). A média de produção do primeiro Ensaio (ambiente termoneutro) foi utilizada como covariável para os parâmetros produtivos. Para a temperatura vaginal, um método linear misto modelo foi utilizado para avaliar os efeitos da dieta, condição ambiental, interação dieta e condição ambiental e interação condição ambiental e hora do dia, juntamente com uma interação tripla de dieta, condição ambiental e hora do dia, efeito aleatório de animal e fase (bloco). Para parâmetros reprodutivos quantitativos, foi utilizado um modelo linear misto avaliando o efeito da dieta, condição ambiental, interação dieta e condição ambiental, efeito aleatório de animal e fase (bloco). As médias de quadrados mínimos foram comparadas pelo teste de Tukey.

Parâmetros reprodutivos qualitativos (ensaio de TUNEL e resultados da qualidade do oócito) foram analisados pelo teste do qui-quadrado. As análises estatísticas foram realizadas usando o SAS for Windows versão 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC), considerando $p \leq 0,05$ o nível de significância.

A eficiência dos primers foi calculada utilizando o programa LinRegPCR® e utilizado para quantificação. Os resultados do grupo endógeno de referência e controle foram analisados pelo software REST®, também considerando $p \leq 0,05$ o nível de significância.

6. CAPÍTULO 1

Chromium supplementation improves glucose metabolism and vaginal temperature regulation in Girolando cows under heat stress conditions in a climatic chamber

Suplementação com cromo orgânico melhora o metabolismo de glicose e regulação da temperatura vaginal em vacas Girolando sob estresse calórico em câmara climática

Artigo publicado no periódico: Tropical Animal Health and Production

Aceito em: Dezembro de 2019; **DOI:** 10.1007/s11250-019-02173-w

Qualis: B1 – Medicina Veterinária

Chromium supplementation improves glucose metabolism and vaginal temperature regulation in Girolando cows under heat stress conditions in a climatic chamber

Lilian dos Santos Ribeiro¹; Felipe Zandonadi Brandão¹; Luciano de Rezende Carvalheira²; Túlio José de Freitas Goes¹; Rodolpho de Almeida Torres Filho¹; Carolina Capobiango Romano Quintão³; Maria de Fátima Ávila Pires³; Luiz Sérgio de Almeida Camargo³; Bruno Campos de Carvalho³

¹ Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, 24230-340, Brazil

² Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-901 Brazil

³ Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais, 36038-330, Brazil

Corresponding author: Email: lilianribeiro91@hotmail.com; bruno.carvalho@embrapa.br

Abstract. This study aimed to evaluate chromium supplementation on productive, reproductive, and metabolic parameters at lactating Girolando cows subjected to heat stress conditions in a climatic chamber. Thirty-six lactating Girolando cows were subjected to two sequential trials. In trial 1 (thermoneutral environment), the effect of chromium supplementation was evaluated (0 vs. 0.50 mg/kg of dry matter). In trial 2, the cows were fed the same diets, but they were divided into three environmental conditions: heat stress conditions in climatic chamber, fed *ad libitum* (HS); thermoneutral environment, fed *ad libitum* (TN); and thermoneutral environment, pair-fed (PF). In thermoneutral conditions, chromium supplementation did not affect productive or metabolic parameters, although supplemented cows had lower viability of oocytes ($65.11 \pm 0.08\%$ vs. $76.86 \pm 0.08\%$). During heat stress, chromium supplementation lowered plasma glucose levels (61.17 ± 1.90 vs. 67.11 ± 1.90 mg/dL), and increased the insulin:glucose ratio (0.39 ± 0.04 vs. 0.27 ± 0.04). Cows fed the control diet in the HS group had higher vaginal temperature values (39.40 ± 0.10 °C) than the cows in the TN group and PF group (38.89 ± 0.10 °C and 38.85 ± 0.11 °C, respectively). However, supplemented cows heat-stressed maintained the same vaginal temperature as cows in thermoneutral conditions. In conclusion, chromium supplementation improved glucose metabolism and prevented body temperature increases under heat stress conditions.

Keywords: Dairy cattle; Milk composition; Reproduction; Metabolism; Insulin; Glucose

Introduction

Hot and humid seasons or atypical elevations in temperature and humidity are the major causes of heat stress in livestock. When ambient temperature and other environmental conditions create a situation outside of the thresholds of thermal comfort for livestock, nutrients are spent to maintain homeothermy, prioritizing a safe body temperature over production (Baumgard et al. 2015).

In comparison with their unstressed counterparts, heat stressed cows have higher peripheral glucose metabolism; this serves as a strategy for increased heat dissipation, but it impacts the mammary gland by reducing glucose availability for lactose synthesis (Baumgard et al. 2011; Tao et al. 2018). The reduction in milk production can range from 10% to 35% when the temperature and average humidity index (THI) exceeds the tolerance limit, which is partly explained by the reduction in dry matter intake (DMI) (Baumgard and Rhoads 2012). The reduction of productivity and efficiency of nutrient utilization in heat-stressed dairy cattle is mediated by physiological and molecular alterations, such as changes in energy metabolism, which have been implicated as an important cause of variation in animal productivity (Baumgard et al. 2011; Ríus 2019). The composition of milk from cows under heat stress also changes, showing a reduction in the percentages of lactose and protein (Rhoads et al. 2009; Baumgard et al. 2011) and changes in the percentage of fat; however, there are contradictory results among studies (Bernabucci et al. 2015; Garner et al. 2016). Heat-induced alterations in small antral follicles can be expressed later as compromised maturation and reduced developmental capacity of the ovulating oocyte (Roth 2017). Heat stress may cause reversible or irreversible cellular damage. Apoptosis, a mechanism of cellular quality control, can be stimulated by heat stress to eliminate damaged or abnormal cells. This is one of the processes that may be involved in reducing oocyte competence in heat stress conditions (Roth and Hansen 2004).

Chromium enhances the function of insulin, acting as a cofactor and increasing its efficiency, which helps cells to absorb glucose. Chromium has been shown to improve energy metabolism and increase glucose tolerance and insulin responsiveness, which increases milk production, DMI, and plasma

concentrations of glucose and decreases insulin and urea concentrations (Nikkhah et al. 2011; Kafilzadeh et al. 2012). Chromium supplementation may improve thermal tolerance or production in heat-stressed animals, avoid mobilizing body reserve and weight loss during pregnancy, and promote growth and immunity (Alhidary et al. 2018; Liu et al. 2017; Rhoads et al. 2013). Thus, it is important to increase knowledge on the use of chromium in the diet of cows under heat stress conditions, especially for Girolando (Holstein × Gyr) cows, so that performance can be maintained in tropical environments that are more rustic and variable (Canaza-Cayo et al. 2014). These characteristics affect milk production in Brazilian territory, which is essentially a tropical climate, where cows experience heat stress conditions with elevated temperature and humidity for the majority of the year.

It is necessary to increase knowledge on the impacts of heat stress on crossbred cows and to identify management measures capable of mitigating these effects. To our knowledge, this study is the first to evaluate organic chromium supplementation on the diet of Girolando cows under heat stress conditions. The objective of this study was to evaluate chromium supplementation on diet related to heat stress conditions in a climatic chamber on different parameters (intake, production, metabolism, and reproduction) in lactating Girolando cows.

Material and Methods

The present study was conducted at Campo Experimental José Henrique Bruschi of Embrapa Gado de Leite, located at Coronel Pacheco, Minas Gerais, Brazil. The study has been approved by the Comitê de Ética em Uso de Animais of Embrapa Gado de Leite (Protocol 07/2015), Brazil, and it follows the ethical principles of Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Thirty-six $\frac{3}{4}$ Girolando cows with an average of 71.3 ± 15.3 days in milk, an average weight of 509 ± 61 kg, and an average body condition score of 3.5 ± 0.2 (scale 1 to 5; Edmonson et al. 1989) were subjected to two sequential trials (Fig. 1).

The diets were formulated using AMTS Cattle Pro (Agricultural Modeling and Training Systems LLC, New York, USA) according to nutritional requirements for

cows producing 25 kg of milk/day (NRC, 2001). The diets were based on corn silage, grounded corn, soybean meal, and a mineral mixture that was supplemented or not with chromium tripicolinate (Tecnutri, Montes Claros, Brazil) offered in total mixed ration (TMR): 42% dry matter (DM), 12.39% CP, 33.44% Neutral detergent fiber, 0.57% Ca, 0.46% P, and 1.71 Mcal/kg net energy based on DM.

Trial 1: Thermoneutral environment

The animals were housed in a free-stall barn equipped with electronic feed bins (Intergado®, Minas Gerais, Brazil) in a thermoneutral environment. After a diet adaptation period of 14 days, the cows were randomly allocated to one of two groups: a control diet or chromium-supplemented diet (0.50 mg Cr/kg DM). Feed and water were provided *ad libitum* for 11 days.

Trial 2: Heat stress

Following the thermoneutral environment period, the cows were divided into three environmental conditions (EC): heat stress conditions in climatic chamber with a temperature and average humidity index (THI) of 85 for 8 h per day between milkings, fed *ad libitum* (HS); thermoneutral environment with an average THI of 68 in a free stall, fed *ad libitum* (TN); and pair-fed group in a thermoneutral environment with an average THI of 68 in a free stall (PF). Heat stress sets to a THI of 85 with an air temperature at 34 °C and 60% humidity. These animals were maintained in this condition for 11 days. The diet offered to pair-fed cows had an allowance to the average amount consumed by heat-stressed cows on the previous day. The PF group was used to isolate the effect of DMI reduction in heat-stressed animals.

The climatic chamber offered a limited capacity in terms of number of animals, so the trials were carried out in two phases with 18 animals in each to achieve the necessary amount of data replicates. Thus, we evaluated the effect of chromium supplementation on three environmental conditions, totaling six contemporaneous groups with six animals each (Fig. 1).

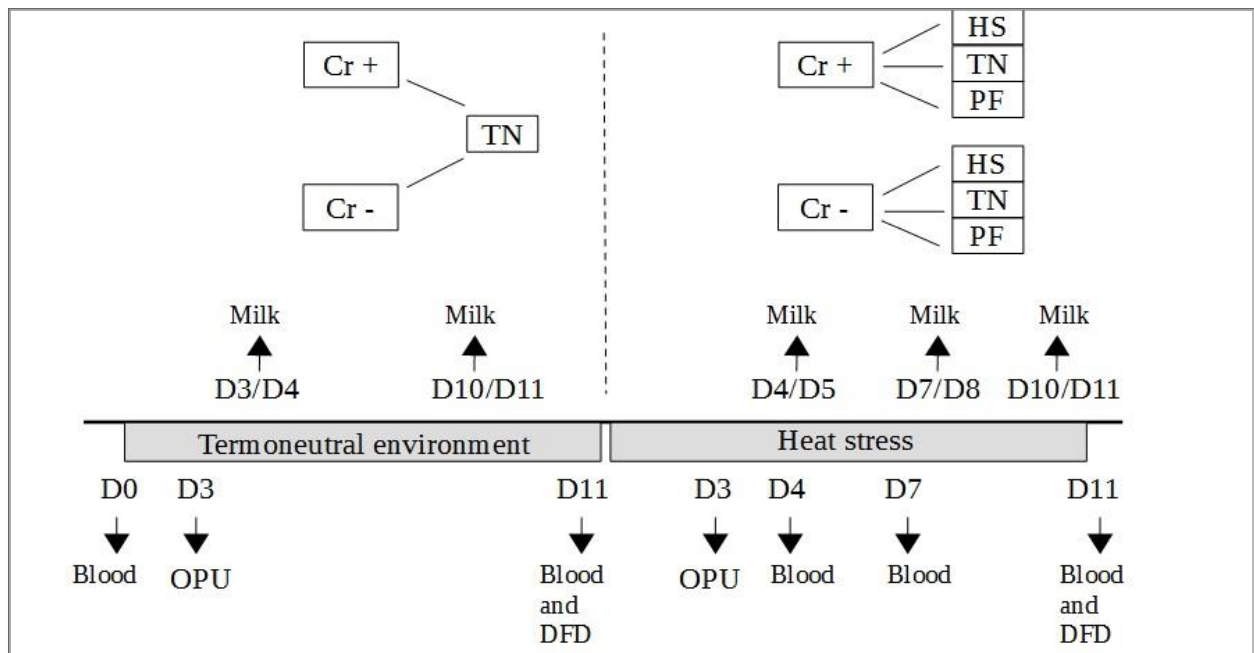


Figure 1. Scheme for the experimental design of two sequential trials with lactating Girolando cows supplemented with chromium. OPU: “ovum pick up”; DFD: diameter of the dominant follicle; Cr+: diet with chromium; Cr-: control diet; HS: group under heat stress conditions in a climatic chamber; TN: group in a thermoneutral environment; PF: pair-fed group in a thermoneutral environment.

Animal handling

The feed refusals were measured daily, and DMI was determined (Silva and Queiroz 2002). The cows were milked twice daily at 06:00 and 16:00, and milk yield (MY) was measured daily. Milk samples were collected weekly during four consecutive milkings to determine milk composition (IDF 2000), according to the schedule in Fig. 1. Energy-corrected milk was calculated according to Sjaunja et al. (1990). According to the schedule shown in Fig. 1, blood samples were collected by a coccygeal venipuncture in 5-mL evacuated tubes containing EDTA (Vacutainer®, BD, Juiz de Fora, Brazil). Blood samples were centrifuged at 800×g for 15 min, and plasma was stored at – 20 °C until analysis. Concentrations of glucose, urea, and insulin were determined. Glucose was determined by an endpoint colorimetric reaction (Glucose Pap Liquiform®, Labtest, Minas Gerais, Brazil). Urea was determined by an enzymatic reaction and ultraviolet photometry (Ureia UV Liquiform®, Labtest, Minas Gerais, Brazil). The analyses were performed using commercial kits with an automatic monochromatic reading system

(Labmax Premium 240®, Labtest Diagnostica, Minas Gerais, Brazil), while the insulin concentration was determined by radioimmunoassay (RIA) with commercial kits (Millipore's Porcine Insulin®, Missouri, USA). The insulin sensitivity was 1.611 µU/mL, and the intra-assay coefficients were 12%.

The cows were submitted to ovum pick-up (OPU), and recovery of *cumulus* oocyte complexes (COC) occurred on the third day of each trial. Synchronization of follicular wave emergence and oocyte collection was performed by ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration, according to Santos et al. (2018). The COC were evaluated according to morphological quality and were classified as viable or nonviable based on the cytoplasmic characteristics of oocytes and the number of *cumulus* cell layers (Ferreira et al. 2011). The viable oocytes were transported in 1.5 mL tubes containing TCM 199 Earle's salt solution with 10% fetal calf serum in an oocyte transporter (WTA®, São Paulo, Brazil) at 37 °C to the laboratory for *in vitro* maturation. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) test was performed (Roth and Hansen 2004) to determine DNA fragmentation. Four days (96 h) after the COC collection, the major follicle diameter was evaluated by means of two perpendicular measurements in the axis of the follicle, and they were remeasured after 24 h (120 h after the oocyte collection) to determine the dominant follicle diameter (DFD) and growth rate (Santos et al. 2018).

The vaginal temperature was measured using data loggers (iButton®, Whitewater, USA) coupled to the stems of plastic intravaginal devices. The measurements were taken six times per day: 7:30, 9:00, 12:00, 15:00, 17:00, and 19:00.

Statistical analysis

In trial 1, for variables DMI, MY, milk composition, and metabolic parameters, a mixed linear model ANOVA (PROC MIXED) was applied to evaluate the effects of diet, day of collection, diet and day of collection interaction, and random effect of animal and phase (block). The MY of first collection was used as a covariable for productive parameters. For the variable vaginal temperature, a mixed linear model was used to evaluate the effects of diet, day of collection, diet and day of collection interaction, time of day, and random effect of each individual

animal and phase (block). For quantitative reproductive parameters on the effect of diet and random effects of animal and phase (block), a linear mixed model was used. Least square means were compared using Tukey's test.

In trial 2, for the variables DMI and MY, milk composition, and metabolic parameters, a mixed linear model was applied to evaluate the effects of diet, EC, diet and EC interaction, diet and day of collection interaction, and random effects of animal and phase (block). The averaged MY of the first trial (thermoneutral environment) was used as a covariable for productive parameters. For vaginal temperature, a mixed linear model was used to evaluate the effects of diet, EC, diet and EC interaction, and EC and time of day interaction, together with a triple interaction of diet, EC and time of day interaction, and random effect of animal and phase (block). For quantitative reproductive parameters on the effect of diet, EC, diet and EC interaction, and random effects on animal and phase (block), a linear mixed model was considered. Least square means were compared using Tukey's test.

Qualitative reproductive parameters (TUNEL assay and oocyte quality results) were analyzed by chi-squared test. A *P*-value equal to or less than 0.05 was considered significant. Statistical analyses were performed using SAS for Windows version 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Results

Trial 1- Thermoneutral environment

Chromium supplementation had no effect on either production or metabolic parameters (Table 1). DMI and milk urea nitrogen showed daily variation, presenting higher mean values at the end of the trial ($P < 0.01$). The plasma concentrations of urea and glucose had a significant effect on the day of collection ($P < 0.05$; Table 1), presenting lower mean values on the first day. The plasma concentration of glucose was 62.99 ± 1.36 mg/dL at the first collection, while in the second collection, it was 66.71 ± 0.86 mg/dL. The plasma urea concentration ranged from 19.59 ± 0.90 to 21.53 ± 0.65 mg/dL in the first and second collections, respectively. Moreover, the plasma urea concentration was significantly affected by the diet and day of collection interaction ($P < 0.01$). In the

first collection, cows fed the control diet had lower plasma urea concentrations than cows supplemented with chromium (17.52 ± 1.34 vs. 21.66 ± 1.21 mg/dL), and for cows fed the control diet, there was a significant increase between collections, as there was a higher value in the second collection (21.91 ± 0.90 mg/dL). However, supplemented cows were unaffected by days of collection.

The number of viable oocytes was unaffected by the diet offered (Table 2). The cows supplemented with chromium had a higher percentage of TUNEL-positive oocytes than those fed the control diet (59.38% vs. 40.62%). No significant difference was observed in the follicular population, and there was a mean of 15.21 ± 0.55 follicles.

The vaginal temperature (VT) was not significantly affected by the diet offered or on the day of collection or the interaction between the two ($P>0.05$), but there was variability based on the time of day when data was collected ($P<0.01$). The VT increased during the day, with no difference between the means for the first hours; there were higher values at 15:00, and they subsequently decreased (38.52 ± 0.20 , 38.78 ± 0.21 , 38.66 ± 0.19 , 39.28 ± 0.19 , 39.25 ± 0.19 , and 38.95 ± 0.19 °C at 7:30, 9:00, 12:00, 15:00, 17:00, and 19:00, respectively).

Table 1. Effect of chromium supplementation on dry matter intake, milk yield, milk composition and metabolic parameters of Girolando cows in a Trial 1 (Thermoneutral environment).

	Diet			<i>P</i> -value		
	Cr+	Cr-	SEM	Diet	Day of collection	Diet*Day of collection
Production parameters						
DMI (kg)	19.35	19.22	0.14	0.35	< 0.01	0.10
MY (kg)	20.88	20.50	1.06	0.44	0.56	0.88
ECM (kg)	21.44	22.10	0.94	0.52	0.49	0.50
Fat in milk (%)	4.31	4.36	0.14	0.96	0.94	0.26
Protein in milk (%)	3.30	3.39	0.06	0.23	0.14	0.88
Lactose in milk (%)	4.61	4.53	0.03	0.73	0.71	0.46
Milk urea nitrogen (mg/dL)	9.57	9.09	0.47	0.97	< 0.01	0.51
Metabolic parameters						
Urea (mg/dL)	21.41	19.71	1.28	0.19	0.04	< 0.01
Insulin (μU/mL)	17.08	19.68	2.05	0.21	0.39	0.21
Glucose (mg/dL)	64.78	64.92	1.66	0.94	0.02	0.63
Insulin: Glucose	0.27	0.31	0.03	0.18	0.10	0.17

Cr+: diet with chromium; Cr-: control diet; SEM: standard error of mean; DMI: dry matter intake; MY: milk yield; ECM: energy corrected milk. Values of *P* in boldface indicate a significant difference (*P*<0.05).

Table 2. Effect of chromium supplementation on reproductive parameters of Girolando cows in a Trial 1 (Thermoneutral environment).

	Diet			<i>P</i> -value
	Cr+	Cr-	SEM	Diet
DF growth rate (mm/day)	1.28	1.45	0.96	0.62
DDF (mm)	10.88	11.04	1.90	0.80
Number of viable oocytes	4.9	6.1	0.82	0.15

Cr+: diet with chromium; Cr-: control diet; SEM: standard error of the mean; DF: dominant follicle; DDF: diameter of dominant follicle.

Trial 2- Heat stress

Supplementary chromium had no effect on either production or metabolic parameters (Table 3). The DMI and milk urea nitrogen had an effect of days of collection ($P < 0.01$; Table 3), presenting higher values at the beginning and end of trial. Fat in milk was significantly affected by diet and EC interaction ($P = 0.01$; Table 3). For supplemented cows, HS cows had a higher percentage of fat in milk than cows in the PF group ($5.04 \pm 0.01\%$ vs. $5.00 \pm 0.01\%$). Comparing PF groups among diets, supplemented cows had a lower percentage of fat in milk than those receiving the control diet ($5.00 \pm 0.01\%$ vs. $5.04 \pm 0.01\%$).

The plasma urea concentration was affected by EC ($P = 0.01$; Table 3). Cows in the HS group had lower urea plasma concentration than those in the PF group (21.47 ± 0.98 vs. 25.75 ± 0.98 mg/dL). All evaluated metabolic parameters were affected by the day of collection ($P < 0.05$; Table 3). Plasma glucose and insulin:glucose ratio were significantly affected by the diet and EC interaction ($P < 0.05$; Table 3). The cows maintained in HS conditions and supplemented with chromium had lower plasma glucose concentration than those fed the control diet under the same stress conditions (61.17 ± 1.90 vs. 67.11 ± 1.90 mg/dL) (Fig. 2a), and the chromium group had higher insulin:glucose ratio (0.39 ± 0.04 vs. 0.27 ± 0.04). Moreover, supplemented cows in HS conditions had higher insulin:glucose ratio than the other supplemented cows (0.39 ± 0.04 , 0.23 ± 0.04 , and 0.23 ± 0.04 for HS, TN, and PF, respectively) (Fig. 2b). Plasma insulin and the insulin:glucose ratio were significantly affected by the diet and day of collection interaction ($P < 0.05$; Table 3). Supplemented cows had no difference in plasma insulin concentration among days of collection (16.16 ± 1.78 , 17.92 ± 1.78 , and 19.69 ± 1.78 for first, second, and third collection, respectively). However, cows fed the control diet had higher plasma insulin concentration at the second collection (16.34 ± 1.78 , 22.09 ± 1.78 , and 15.98 ± 1.78 for the first, second, and third collection, respectively). This same effect was observed for the insulin:glucose ratio.

Reproductive parameters were unaffected by treatments in trial 2 (Table 4). The follicular population mean was 14.62 ± 0.55 follicles. Additionally, no significant difference was observed in the TUNEL test results.

The VT was affected by EC, diet and EC interaction, and EC and time of day interaction ($P < 0.05$) and varied with the time of day ($P < 0.01$). Overall, cows in

the HS group had higher mean VT at 12:00 and 15:00 ($P < 0.05$) than TN and PF groups. Figure 3 shows the effect of HS in cows not given chromium. Supplemented cows had no difference between EC. However, cows fed the control diet in the HS condition had higher mean VT (39.40 ± 0.10 °C) than those in the TN and PF (38.90 ± 0.10 °C and 38.85 ± 0.11 °C, respectively). Supplemented cows under the HS condition had lower VT at 19:00 than the cows fed control diet in same stress condition ($P < 0.05$).

Table 3. Dry matter intake, milk yield, milk composition and metabolic parameters of Girolando cows in a Trial 2 (Heat stress).

	Diet			P-value				
	Cr+	Cr-	SEM	Diet	EC	Day of collection	Diet* EC	Diet*Day of collection
Production parameters								
DMI (kg)	18.47	18.16	0.22	0.15	0.08	< 0.01	0.29	0.16
MY (kg)	21.95	20.85	1.32	0.41	0.31	0.86	0.78	0.96
ECM (kg)	23.89	23.04	1.23	0.49	0.16	0.76	0.31	0.45
Fat in milk (%)	5.02	5.02	0.01	0.94	0.42	0.62	0.01	0.23
Protein in milk (%)	3.75	3.75	0.00	0.21	0.63	0.73	0.25	0.66
Lactose in milk (%)	4.49	4.49	0.00	0.84	0.08	0.05	0.43	0.97
Milk urea nitrogen (mg/dL)	10.31	10.32	0.01	0.57	0.10	< 0.01	0.10	0.75
Metabolic parameters								
Urea (mg/dL)	23.44	24.17	1.14	0.53	0.01	0.01	0.06	0.18
Insulin (μ U/mL)	17.93	18.14	2.08	0.92	0.16	0.01	0.20	< 0.01
Glucose (mg/dL)	64.72	64.39	1.55	0.83	0.88	< 0.01	0.02	0.21
Insulin: Glucose	0.28	0.28	0.03	0.99	0.10	0.04	0.04	0.01

Cr+: diet with chromium; Cr-: control diet; SEM: standard error of mean; DMI: dry matter intake; MY: milk yield; ECM: energy-corrected milk; EC: environmental conditions. Values of *P* in boldface indicate a significant difference ($P < 0.05$).

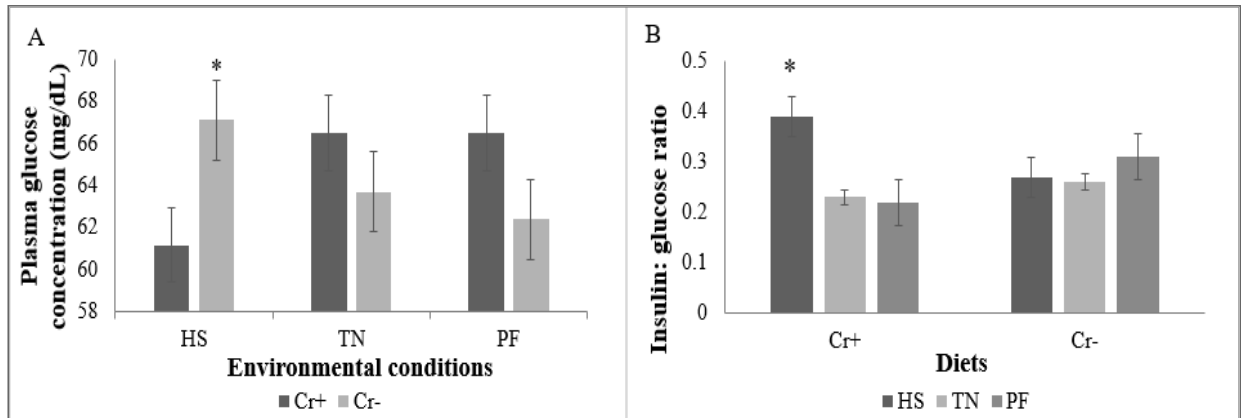


Figure 2. Variation of the metabolic parameters of lactating Girolando cows supplemented with chromium under heat stress conditions. A: Plasma glucose concentration (mg/dL) of lactating Girolando cows supplemented with chromium under heat stress conditions. B: Insulin:glucose ratio of lactating Girolando cows supplemented with chromium under heat stress conditions. Cr+: diet with chromium; Cr-: control diet; HS: group under heat stress conditions in a climatic chamber; TN: group in a thermoneutral environment; PF: pair-fed group in a thermoneutral environment. (*) indicate a significant difference ($P < 0.05$).

Table 4. Reproductive parameters of Girolando cows in a Trial 2 (Heat stress).

	Diet			P-value		
	Cr+	Cr-	SEM	Diet	EC	Diet*EC
DF growth rate (mm/day)	1.77	1.86	1.05	0.82	0.07	0.42
DFF (mm)	11.23	11.51	1.97	0.71	0.43	0.06
Number of viable oocytes	3.2	3.4	0.68	0.84	0.67	0.85

Cr+: diet with chromium; Cr-: control diet; SEM: standard error of the mean; DF: dominant follicle; DFF: diameter of the dominant follicle; EC: environmental conditions.

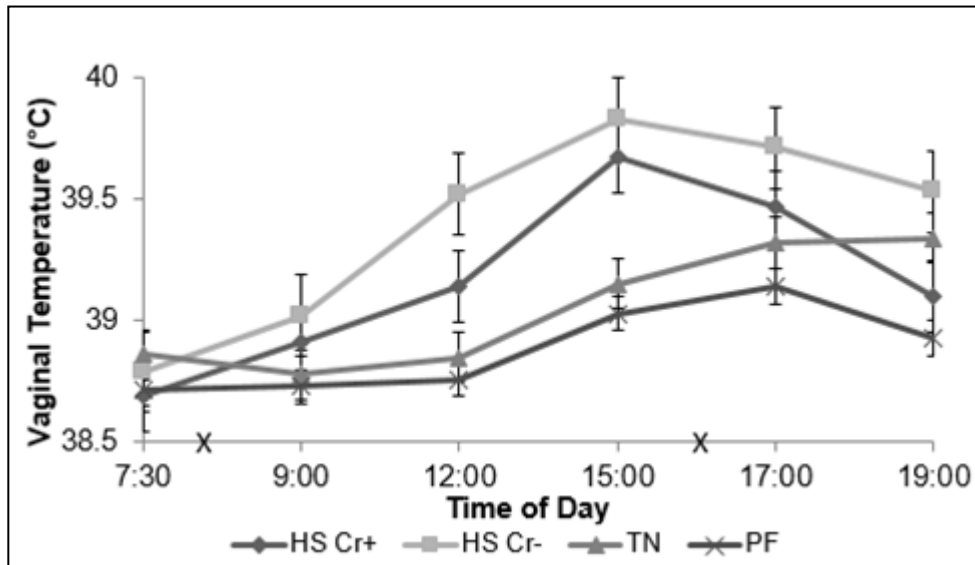


Figure 3. Variation in the vaginal temperature according to times of day of lactating Girolando cows supplemented with chromium under heat stress conditions. Cr+: diet with chromium; Cr-: control diet; HS: group under heat stress conditions in a climatic chamber; TN: group in a thermoneutral environment; PF: pair-fed group in a thermoneutral environment. (X) in axis show when heat stress began and ended.

Discussion

In a thermoneutral environment, there were no observed effects of supplementation with chromium on DMI, MY, or milk composition. The DMI increased over ensuing days of lactation, and milk urea nitrogen followed this increase, which was possibly due to a higher intake of crude protein. The plasma concentrations of glucose and urea were higher in the second collection, which was also due to a higher DMI (Doska et al. 2012; Henao-Velásquez et al. 2014). In the first collection, supplemented cows had higher plasma urea concentrations than cows fed the control diet. Targhibi et al. (2011) and Mousavi et al. (2019) observed no difference in this variable on dairy cows and dairy calves, respectively. However, Kegley et al. (2000) also observed increased serum urea concentrations in beef steers supplemented with chromium.

In the heat stress period, the effect of diet or EC on DMI, MY, and milk composition was not observed. DMI did not decrease with the induction of heat stress under these experimental conditions. In European herds of dairy cows, THI values above 72 are indicators of heat stress, and values above 89 indicate

severe heat stress (Armstrong 1994). Based on rectal temperature and respiratory rate values, a higher critical THI value of 77 was estimated for $\frac{3}{4}$ Holstein $\times$ Zebu, and considering the surface temperature, a higher critical THI value is 79 (Azevedo et al. 2005). Thus, it is possible that cows recovered overnight when a thermoneutral environment was maintained (THI 68) or even that THI 85 for 8 h daily was not sufficient to cause stress to the point of reducing intake and altering milk yield. Thus, no difference was observed in DMI between groups, including the PF group.

The cows maintained in HS conditions and supplemented with chromium had lower plasma glucose concentrations and higher insulin:glucose ratio than cows fed the control diet under the same stress conditions. It is observed that cows under heat stress conditions present higher peripheral glucose metabolism, which is a strategy for increasing heat dissipation in peripheral tissues (Rhoads et al. 2009). When in the presence of chromium in a physiologically active form, the insulin concentrations required for normal glucose metabolism are lower because chromium improves insulin efficiency in promoting glucose uptake by cells (Kafilzadeh et al. 2012; Condé et al. 2014). The cows supplemented with chromium had use of glucose optimized, which reduced plasma concentrations of glucose. Thus, even though the plasma concentration of insulin was not altered by diet, the cells improved glucose utilization. In this study, cows in the PF group supplemented with chromium had lower fat in milk than those fed the control diet under the same conditions. It is possible that the chromium supplementation allowed for better glucose utilization, maintaining insulin sensitivity and its antilipolytic characteristics, and reducing mobilization of nonesterified fatty acid (Bauman and Currie 1980), which is a significant source of energy as well as a precursor in the synthesis of milk fat. A significant increase in plasma insulin concentrations was observed between collection days at cows fed the control diet, whereas in the group of supplemented cows, there was no variation between days of collection. It is possible that optimizing the use of glucose by chromium allows for a lower variation of plasma insulin concentration.

No reproductive parameters studied were significantly affected by the EC and diet interaction. Apoptosis is a mechanism of cellular quality control that can be stimulated by heat stress to eliminate damaged, nonfunctional, or abnormal

cells. Apoptosis may be involved in reducing oocyte competence in situations of heat stress (Roth and Hansen 2004). It is possible that the acute heat stress imposed on Girolando cows was not sufficient to cause damage to oocytes, or that these animals were efficient enough for thermoregulation to protect the quality of oocytes. In the literature, there is scarce information on critical THI levels for crossbred cows (Azevedo et al. 2005; Fialho et al. 2018).

The cows fed the control diet under heat stress had a higher VT than the TN and PF groups. However, supplemented cows did not present differences between groups. This shows that supplemented cows had an improved ability to control body temperature under heat stress owing to a better peripheral glucose metabolism, allowing for greater heat dissipation in peripheral tissues (Rhoads et al. 2009, 2013). Furthermore, cows supplemented with chromium and kept in a climatic chamber had a lower VT at 19:00, showing that they had higher efficiency in heat loss after leaving the climatic chamber.

In conclusion, chromium supplementation improves glucose metabolism and prevents body temperature increases under heat stress conditions.

Acknowledgments. The authors thank the Universidade Federal Fluminense, Embrapa Gado de Leite, Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Funding information. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

Compliance with ethical standards. The study has been approved by the Comitê de Ética em Uso de Animais of Embrapa Gado de Leite (Protocol 07/2015), Brazil, and it follows the ethical principles of Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

Conflict of interest. The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Alhidary, I. A.; Alsofi, M. A.; Abdoun, K. A.; Samara, E. M.; Okab, A. B.; Al-Haidary, A. A., 2018. Influence of dietary chromium yeast supplementation on apparent trace elements metabolism in growing camel (*Camelus dromedarius*) reared under hot summer conditions, *Tropical Animal and Health Production*, 50, 519-524
- Armstrong, D. 1994. Heat stress interaction with shade and cooling, *Journal of Dairy Science*, v. 77, n. 7, p. 2044-2050
- Aschenbach, J. R.; Kristensen, N. B.; Donkin, S. S.; Hammon, H. M.; Penner, G. B., 2010. Gluconeogenesis in dairy cows: The secret of making sweet milk from sourdough, *IUBMB Life*, 62, 12, 869–877
- Azevedo, M.; Pires, M. F. A.; Saturnino, H. M. et al. 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, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 34, 6, 2000–2008
- Bauman, D. E., Currie, W. B., 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis, *Journal of Dairy Science*, 63, 514–1529
- Baumgard, L. H., Keating, P. A., Ross, J. W., Rhoads, R. P., 2015. Effects of heat stress on the immune system, metabolism and nutrient partitioning: implications on reproductive success, *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 39, 1, 173–183
- Baumgard, L. H., and Rhoads, R. P., 2012. Ruminant Nutrition Symposium: ruminant production and metabolic responses to heat stress, *Journal of Animal Science*, 90, 1855–1865
- Baumgard, L. H., Wheelock, J. B., Sanders, S. R., Moore, C. E., Green, H. B., Waldron, M. R., and Rhoads, R. P., 2011. Postabsorptive carbohydrate adaptations to heat stress and monensin supplementation in lactating Holstein cows, *Journal of Dairy Science*, 94, 5620–5633
- Bernabucci, U., Basiricò, L., Morera, P., Dipasquale, D., Vitali, A., Cappelli, F. P., and Calamari, L., 2015. Effect of summer season on milk protein fractions in Holstein cows, *Journal of Dairy Science*, 98, 1815–1824
- Canaza-Cayo, A. W., Lopes, P. S., Silva, M. V. G. B., Cobuci, J. A., Torres, R. A., Martins, M. F., and Arbex, W. A., 2014. Estrutura populacional da raça Girolando, *Ciência Rural*, 44, 11, 2072–2077
- Condé, M. S, Pena, S. M., Rocha Júnior, C. M., Homem, B. G. C., Demartini, G. P., and Silva, A. B, 2014. Minerais quelatados na nutrição de suínos, *Revista Eletrônica Nutritime*, 11, 4, 3547–3565

- Doska, M. C., Silva, D. F. F., Horst, J. A., Valloto, A. A., Junior, P. R., Almeida, R., 2012. Sources of variation in milk urea nitrogen in Paraná dairy cows, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41,692–697
- Edmonson, A. J., Lean, I. J., Weaver, L. D., Farver, T. and Webster, G., 1989. Body condition scoring chart of Holstein dairy cows, *Journal of Dairy Science*, 72, 68–78
- Ferreira, R. M., Ayres, H., Chiaratti, M. R., Ferraz, M. L., Araújo, A. B., Rodrigues, C. A., Watanabe, Y. F., Vireque, A. A., Joaquim, D. C., Smith, L. C., Meirelles, F. V., and Baruselli, P. S. 2011. The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts, *Journal of Dairy Science*, 94, 2383–2392
- 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 calórico agudo e crônico sobre a qualidade oocitária de bovinos de raças adaptadas, *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 70, 64-72
- Garner, J. B., Douglas, M., Williams, R. S. O., Wales, W. J., Nguyen, T. T. T., and Hayes, B. J., 2016. Genomic selection improves heat tolerance in dairy cattle, *Nature Scientific Report*, 6, 1–8
- Henao-Velásquez, A. F., O. D. Múnera-Bedoya, A. C. Herrera, J. H. Agudelo-Trujillo, M. F. Cerón-Muñoz., 2014. Lactose and milk urea nitrogen: fluctuations during lactation in Holstein cows, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 43, 479–484
- International Dairy Federation – IDF, 2000. Inventory of IDF/ISO/AOAC. International Adopted Methods of Analysis and Sampling for Milk and Milk Products. 6th ed., Brussels, Belgium. 350p
- Kafilzadeh, F., Shabankareh, H. K., and Targhibi, M. R., 2012. Effect of chromium supplementation on productive and reproductive performances and some metabolic parameters in late gestation and early lactation of dairy cows, *Biology Trace Element Research*, 149, 42–49
- Kegley E. B.; Galloway, D. L.; Fakler, T. M., 2000. Effect of dietary chromium –L-methionine on glucose metabolism of beef steers, *Journal of Animal Science*, 78, 3177-3183
- Liu, F.; Cottrell, J. J.; Collins, C. L.; Henman, D. J.; O'Halloran, K. S. B.; Dunshea, F. R., 2017. Supplementation of selenium, vitamin E, chromium and betaine above recommended levels improves lactating performance of sows over summer, *Tropical Animal and Health Production*, 49, 1461-1469
- Mousavi, F.; Karimi-Dehkordi, S.; Kargar, S.; Khosravi-Bakhtiari, M., 2019. Effects of dietary chromium supplementation on calf performance, metabolic hormones, oxidative status, and susceptibility to diarrhea and pneumonia, *Animal Feed Science and Technology*, 248, 95-105

- Nikkhah, A., Mirzaei, M., Khorvash, M., Rahmani, H. R., and Ghorbani, G. R., 2011. Chromium improves production and alters metabolism of early lactation cows in summer, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 95, 81–89
- National Research Council (NRC). 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Seventh Revised Edition*, 2001. Washington, DC: The National Academies
- Rhoads, M. L., Rhoads, R. P., Van Baale, M. J., Collier, R. J., Sanders, S. R., Shwartz, W. J., and Baumgard, L. H., 2009. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin, *Journal of Dairy Science*, 92, 1986–1997
- Rhoads, R. P., Baumgard, L. H., Suagee, J. K., and Sanders, S. R., 2013. Nutritional Interventions to Alleviate the Negative Consequences of Heat Stress, *Advances Nutrition*, 4, 267–276
- Ríus, A. G., 2019. INVITED REVIEW: Adaptations of protein and amino acid metabolism to heat stress in dairy cows and other livestock species, *Applied Animal Science*, 35, 39-48
- Roth Z., 2017. Effect of Heat Stress on Reproduction in Dairy Cows: Insights into the Cellular and Molecular Responses of the Oocyte, *Annual Review of Animal Bioscience*, 5, 151–170
- Roth, Z., and Hansen, P. J., 2004. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation, *Biology of Reproduction*, 71, 1898–1906
- Santos, G. B., Brandão, F. Z., Ribeiro, L. S., Arashiro, E. K. N., Grazia, J. G. V., Camargo, L. S. A., Machado, F. S., Varago, F. C., Otto, P. I., Carvalho, B. C., 2018. Metabolic, follicular and embryo production responses of postpartum crossbred Holstein × Gir dairy cows fed diets with different energy levels, *Animal Production Science*, v. 59, p. 1446-1453
- Silva, J. S., and Queiroz, A. C., 2002. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. 3ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 235p
- Sjaunja, L. O., Baevre, L., Junkkarinen, L., Pedersen, J., Setälä, J., 1990. A Nordic proposal for an energy corrected milk (ECM) formula. JCAR, 27th session, July 2–6, Paris, France, (EAAP Publication No 50, 1991), 156–157
- Tao, S., Orellana, R. M., Weng, X., Marins, T. N., Dahl, G. E., and Bernard, J. K., 2018. Symposium review: The influences of heat stress on bovine mammary gland function. *Journal of Dairy Science*, 101, 5642–5654
- Targhibi, M. R.; Kafilzadeh, F.; Karami Shabankareh, H., 2011. Chromium supplementation effects on serum nitrogen constituents of dairy cows in late gestation and early lactation, *Euphrates Journal of Agriculture Science*, 3:239–242

7. CAPÍTULO 2

Chromium supplementation modulates glucose metabolism in heat-stressed
Girolando dairy cows

*Suplementação com cromo modula o metabolismo de glicose de vacas Girolando
sob estresse térmico pelo calor*

Artigo publicado no periódico: Semina: Ciências Agrárias

Aceito em: Abril de 2020; **DOI:**

Qualis: B1 – Medicina Veterinária

Chromium supplementation modulates glucose metabolism in heat-stressed
Girolando dairy cows

Lilian dos Santos Ribeiro^{1}; Felipe Zandonadi Brandão²; Luciano de Rezende
Carvalho³; Diana Rangel de Lemos⁴; Gustavo Torres de Souza⁵; Ribrio Ivan
Tavares Pereira Batista⁶; Luiz Sérgio de Almeida Camargo⁷; Bruno Campos de
Carvalho⁷*

¹ Discente do Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, UFF, Niterói, RJ, Brasil. E-mail: lilianribeiro91@hotmail.com

² Prof. Dr., Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, UFF, Niterói, RJ, Brasil. E-mail: fzbrandao@id.uff.br

³ Discente do Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: lrcarvalho@gmail.com

⁴ Discente do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, MG, Brasil. E-mail: dianalemosvet@gmail.com

⁵ Discente do Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Juiz de Fora, MG, Brasil. E-mail: gustavotsouza@hotmail.com

⁶ Pesquisador de Pós-Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, UFF, Niterói, RJ, Brasil. E-mail: ribrio@yahoo.com.br

⁷ Pesquisadores, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil. E-mail: luiz.camargo@embrapa.br; bruno.carvalho@embrapa.br

* Author for correspondence

Abstract. The objective of this study was to evaluate the effects of dietary chromium supplementation on hepatic gene expression of lactating Girolando (Holstein x Gyr) cows under heat stress conditions in climatic chamber. Thirty-six $\frac{3}{4}$ Holstein x Gyr lactating cows were used, based on a 2x3 factorial scheme, to evaluate the effects of two diets (0 vs 0.50 mg of organic chromium kg⁻¹ dry matter) and three environmental conditions (ECs): heat stress conditions in climatic chamber with *ad libitum* feeding (HS), a thermoneutral environment with *ad libitum* feeding (TN), and a pair-fed group in a thermoneutral environment (PF). Under HS group, the expression levels of glucose transporter 2 (GLUT2), glucose-6-phosphatase (G6Pase), and growth hormone receptor (rGH) were downregulated ($P < 0.05$) in chromium-supplemented cows compared to those in cows fed the control diet. GLUT2 expression was upregulated ($P = 0.02$) in the HS group and insulin-like growth factor 1 (IGF1) was downregulated ($P < 0.01$) in the PF group in cows fed the control diet compared to the expression in the TN group. No differences were observed between the ECs in terms of relative abundances of GLUT2, phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), G6Pase, rGH, and IGF1 transcripts among the chromium-supplemented cows ($P > 0.05$). Heat stress caused changes in the expression of genes related to glucose metabolism, and organic chromium could modulate glucose metabolism in animals under heat stress conditions to some extent.

Keywords: Crossbred cows. Dairy cattle. Glucose metabolism. Liver biopsy.

Scientific communication

Dairy herds in tropical countries are often comprised of crossbred *Bos primigenius taurus* x *Bos primigenius indicus* cows in order to take advantage of heterosis and the characteristics of zebu breeds, such as resistance to heat (Camargo et al., 2007). Girolando cows (Holstein x Gyr) are the most commonly-used breed for milk production in Brazil, combining the productivity of the Holstein breed with the rusticity of the Gyr breed. Under heat stress, cows usually reduce their dry matter intake and exhibit higher insulin plasma concentrations, despite lower glucose concentrations (Wheelock, Rhoads, Van Baale, Sanders, & Baumgard, 2010; Baumgard et al., 2011). In an evaluation of cows subjected to heat stress and cows subjected to restricted feeding, it was observed that the reduction in consumption was only responsible for about 35 % of the observed reduction in milk production (M. L. Rhoads et al., 2010). This suggests that the ambient temperature affects milk production through mechanisms independent of reduction nutrient consumption (Baumgard et al., 2011). Even when cows under heat stress reduce their dry matter intake, they do not mobilize adipose tissue because insulin is an anti-lipolytic hormone (Wheelock et al., 2010). Therefore, there seems to be a change in post-absorptive metabolism even though the cows are in a negative energy state (R. P. Rhoads, Baumgard, Suagee, & Sanders, 2013). Changes in glucose metabolism involve the liver, thereby altering fundamental metabolic pathways such as gluconeogenesis (Baumgard et al., 2011).

Chromium is a mineral that acts as an insulin cofactor and increases cell efficiency in capturing glucose. Chromium is responsive to plasma insulin concentration; it forms a complex with apochromodulin, which is activated and, in turn, binds to the active site of the insulin receptor, completing the activation of the receptor and amplifying the insulin signal (Pechova & Pavlata, 2007). Thus, chromium supplementation may modulate glucose hepatic metabolism in heat-stressed animals due to its role in amplifying the insulin signal in cells and in subsequent events. The objective of this study was to evaluate the effects of dietary organic chromium supplementation on the expression profiles of genes related to the hepatic metabolism of glucose in lactating Girolando cows subjected to heat stress.

The present study was conducted at the José Henrique Bruschi experimental field of Embrapa Gado de Leite, located in Coronel Pacheco, Minas Gerais, Brazil. The study has been approved by the Comitê de Ética em Uso de Animais of Embrapa Gado de Leite (Protocol 07/2015) and follows the ethical principles of the National Council for Animal Experimentation Control. Thirty-six $\frac{3}{4}$ Holstein x Gyr cows that averaged 71.3 ± 15.3 days in milk, 509 ± 61 kg in body weight, body condition scores of 3.5 ± 0.2 (Edmonson, Lean, Weaver, Farver, & Webster, 1989) at the beginning of the trial, 21.4 ± 3.6 kg in milk production, and 19.2 ± 2.4 kg in dry matter intake were used in the trial. The diet was based on corn silage, ground corn, soybean meal, and a mineral mixture supplemented (or not) with chromium tripicolinate (TecNutri, Montes Claros, Brazil) offered in a total mixed ration (42 % dry matter and 12.39 % CP, 33.44 % NDF, 0.57 % Ca, 0.46 % P and 1.71 Mcal kg⁻¹ net energy based on dry matter), according to the nutritional requirements for cows producing 25 kg of milk day⁻¹ (NRC, 2001); water was provided *ad libitum*.

After a seven-day adaptation period to the installations, the cows were randomly allocated to the two diet groups in which the two diets, namely control and organic chromium supplementation (0.50 mg Cr kg⁻¹ dry matter) (Sadri et al., 2009), were offered *ad libitum* in a thermoneutral environment for 25 days. Subsequently, the cows were divided into three environmental condition (EC) groups: heat stress in a climatic chamber with a temperature and humidity index (THI) of 85 with an eight-hour gap between milkings and *ad libitum* feeding (HS); a thermoneutral environment with a THI of 68 in a free stall fed *ad libitum* (TN); and a pair-fed group in a thermoneutral environment with a THI of 68 in a free stall (PF). Thus, the effect of chromium supplementation under three environmental conditions could be evaluated, totaling six contemporaneous groups comprising six animals each. The climatic chamber could hold six animals, which were kept in individual stalls with access to the diet and water *ad libitum*. The chamber was set to THI 85, with a temperature of 34 °C and 60 % humidity. The HS group was maintained under these conditions for 11 days of the trial. The diet offered to the PF cows was adjusted daily according to the intake of the heat-stressed cows on the previous day. The PF group was used to isolate the effect of DMI reduction in heat-stressed animals. As the capacity of climatic chamber is only hold six animals at a time, the

trial was conducted in two phases with 18 animals per phase to achieve the necessary number of repetitions.

Hepatic tissue samples were collected through blind percutaneous needle biopsies (Tru-Cut semi-automatic biopsy needle, ProMedical, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil) under local anesthesia with 5 mL of 2 % lidocaine, at a point corresponding to the topographic position of the right lobe of the liver. Tissues were packed into microtubes (free of RNase and DNase) with 100 μ L of RNA Later (Ambion®), according to the manufacturer's recommendations. Samples were kept refrigerated overnight, after which the excess RNA Later was drained and samples were stored in a freezer at -80 °C.

Glucose transporter 2 (GLUT2), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), glucose-6-phosphatase (G6Pase), growth hormone receptor (rGH) and transcripts of insulin-like growth factor 1 (IGF1) were used as calibrators to compare metabolic status across treatments as they are indicators of the abundance of mRNA encoding hepatic glucose metabolism. Total RNA was extracted using TRIzol™ Reagent (Invitrogen) at a rate of 1 mL per 100 mg of tissue. Tissues were ground (tissue + TRIzol™ Reagent) with T 10 basic ULTRA-TURRAX® (IKA) until complete dissociation. Subsequently, 100 μ L of chloroform was added and the mixture was homogenized and incubated for three minutes. The samples were then centrifuged for 15 minutes at 12000 rpm/ 4 °C. The liquid phase was collected and transferred to a clean tube, after which 500 μ L isopropanol was added to each tube to be incubated for 10 minutes. Samples were homogenized by inversion and were then centrifuged for 10 minutes at 12000 rpm/ 4 °C. The supernatant was discarded, and the precipitate was washed in 1 mL of 75 % ethanol. The material was centrifuged again at 7500 rpm for five minutes, and the supernatant was discarded. The pellet was dried for five minutes and was then suspended in 50 μ L RNase-free ultrapure water. The total RNA concentration was measured using a ND-100 spectrophotometer (NanoDrop Products). The integrity of the RNA was evaluated by agarose gel electrophoresis.

Afterwards, reverse transcription was performed using Superscript III kits (Invitrogen), according to the manufacturer's recommendations. Relative quantification by real-time qPCR was performed in triplicate using a commercially available SYBR green. Reactions (20 μ L) were prepared according to the

manufacturer's instructions using SYBR green kits (Power Up SYBR Green; Invitrogen), 3.3 ng cDNA, nuclease-free water, and specific primers for each reaction. Primers for the following genes were designed: GLUT2 (accession number: NM_001103222.1; forward: 5'-ACAAGCCTGGGAGATCCAAC-3'; reverse: 5'-CCCAAGCAACCCTCCAAAGA-3'; annealing temperature: 54.0°C), PEPCK (accession number: NM_174737.2; forward: 5'-CAAGGATGGGGAGCCTTGTG-3'; reverse: 5'-CCTCGTAGACCAGAGGGACA-3'; annealing temperature: 55.0°C), G6Pase (accession number: NM_001076124.2; forward: 5'-ATGTTGTGGTTGGGATTCTGG-3'; reverse: 5'-CACCTTCGCTTGGCTTTCTC-3'; annealing temperature: 52.0°C), rGH (accession number: NM_176608.1; forward: 5'-GGTATGGATCTCTGGCAGCTG-3'; reverse: 5'-CTCTGACAAGGAAAGCTGGTGTG-3'; annealing temperature: 55.0°C), IGF1 (accession number: NM_001077828.1; forward: 5'-TTGGTGGATGCTCTCCAGTTC-3'; reverse: 5'-GCACTCATCCACGATTCCTGT-3'; annealing temperature: 54.0°C), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; accession number: U85042; forward: 5'-GTCTTCACTACCATGGAGAAGG-3'; reverse: 5'-TCATGGATGACCTTGGCCAG-3'; annealing temperature: 51.0°C), and tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta (YWHAZ; accession number: NM_174814.2; forward: 5'-GCAAAAGACGGAAGGTGCTG-3'; reverse: 5'-CCTCAGCCAAGTAGCGGTA-3'; annealing temperature: 52.0°C).

The template cDNA was denatured at 95 °C for 15 seconds for 40 cycles, at the gene-specific primer annealing temperature for 15 seconds, and for elongation at 72 °C for one minute. After each PCR run, a melting curve analysis was performed to confirm that a single specific product was generated. No-template controls (NTCs), comprising the PCR reaction mix without a DNA template, were also run with each primer to confirm the absence of contamination. Green fluorescence data were acquired during the extension step. The expression of each target gene was normalized using the geometric mean of the values obtained for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta (YWHAZ) transcripts (endogenous genes).

The efficiencies of the primers were tested using Lin-RegPCR software (Ramakers, Ruijter, Deprez, & Moorman, 2003) for each reaction. Relative quantification of differential expression (QR) was performed using REST software (Pfaffl, Horgan, & Dempfle, 2002) using the comparative threshold cycle method (Livak & Schmittgen, 2001) ($QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}$). To evaluate each expression level, one calibrator group was used as a comparison. Thus, the data obtained were expressed as 'N times' relative to the calibrator group; $P < 0.05$ was considered the level of significance.

Under HS, the levels of GLUT2, G6Pase, and rGH were downregulated (0.44 ± 0.42 , 0.46 ± 0.43 and 0.32 ± 0.27 , respectively, $P < 0.05$) in chromium-supplemented cows compared to the levels in cows fed the control diet (Figure 1). Under TN treatment, IGF1 expression was downregulated (0.09 ± 0.07 ; $P < 0.01$) in chromium-supplemented cows compared to that in cows fed the control diet. GLUT2 expression was upregulated (2.94 ± 3.78 ; $P = 0.02$) in the HS group compared to that in the TN group in cows fed the control diet. The expression of rGH was downregulated (0.24 ± 0.22 ; $P = 0.02$) in the PF group compared to that in heat-stressed cows, and IGF1 was downregulated (0.10 ± 0.09 ; $P < 0.01$) in the PF group compared to that in the TN group in cows fed the control diet (Figure 2A). However, no differences were observed in the relative abundances of GLUT2, PEPCK, G6Pase, rGH, and IGF1 transcripts among the different ECs in the chromium-supplemented cows ($P > 0.05$; Figure 2B).

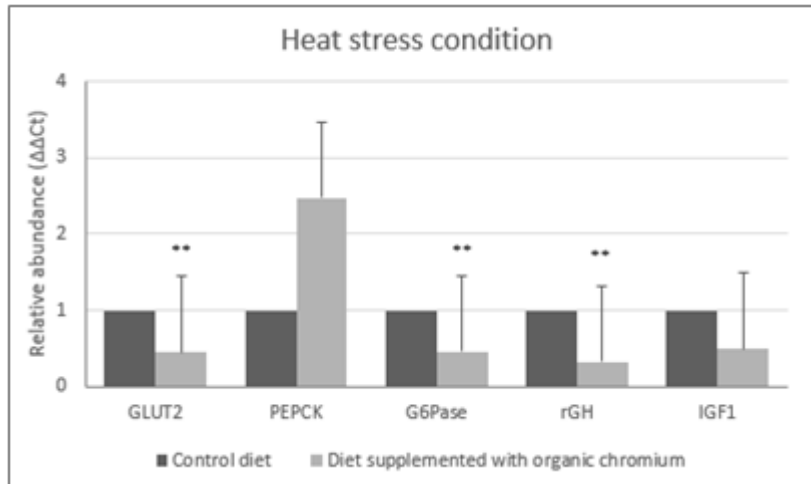


Figure 1. Relative expression levels of GLUT2, PEPCK, G6Pase, rGH, and IGF1 in the hepatic tissues of lactating Girolando cows under heat stress conditions in a climatic chamber. (**) downregulated ($P < 0.05$). GLUT2: glucose transporter 2; PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase; G6Pase: glucose 6-phosphatase; rGH: growth hormone receptor; IGF1: insulin-like growth factor 1.

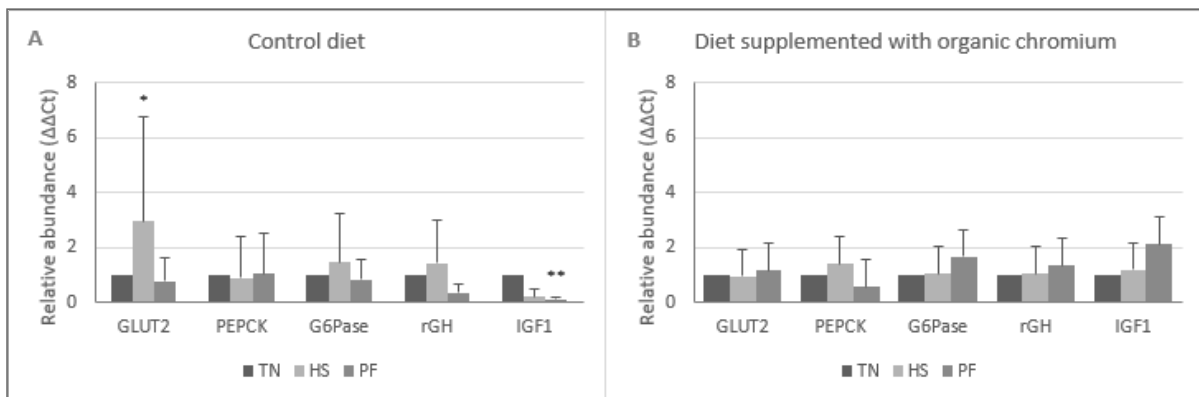


Figure 2. Relative expression levels of GLUT2, PEPCK, G6Pase, rGH, and IGF1 in the hepatic tissues of lactating Girolando cows fed, A: A control diet. B: A diet supplemented with organic chromium (0.50 mg Cr kg⁻¹ dry matter). (*) upregulated; (**) downregulated ($P < 0.05$). GLUT2: glucose transporter 2; PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase; G6Pase: glucose 6-phosphatase; rGH: growth hormone receptor; IGF1: insulin-like growth factor 1. TN: thermoneutral environment with feeding *ad libitum*; HS: heat stress conditions in a climatic chamber with feeding *ad libitum*; PF: pair-fed group in a thermoneutral environment.

Increasing selection pressure for milk production leads to increased metabolic heat being produced by cows during lactation, which aggravates heat stress in tropical regions. This illustrates the need to develop alternative strategies, potentially targeting metabolic adaptations designed to alleviate the negative effects of heat stress on dairy cattle production (Wheelock et al., 2010).

Cows under heat stress have higher peripheral glucose metabolism. This metabolic alteration signals a strategy of greater heat dissipation in the peripheral tissues. However, changes in glucose metabolism are not restricted to the peripheral tissues as they involve the liver (Baumgard et al., 2011), which is the primary site of glucose production in ruminants (Collier, Collier, Rhoads, & Baumgard, 2008). Thus, fundamental metabolic pathways are altered (R. P. Rhoads, La Noce, Wheelock, & Baumgard, 2011). Ruminants obtain a small part of their glucose directly from the diet, and rely on gluconeogenesis as a fundamental method of supplying extra-hepatic tissues with glucose. Under heat stress conditions, the cows exhibit lower plasma concentrations of growth hormone (GH), sub-regulation of rGH, and less IGF1 gene expression. IGF1 produced in the liver under GH stimulation is important for milk synthesis in dairy cattle, and GH stimulates lipid mobilization and inhibits the action of insulin. Hence, lower GH concentrations favor increased insulin concentrations (M. L. Rhoads et al., 2010). Insulin is an anti-lipolytic hormone, thus, it limits the energy supply and initiates processes that provide glucose to the body, such as glycogenolysis and gluconeogenesis (R. P. Rhoads et al., 2011).

The expression profiles of enzymes essential for gluconeogenesis change during a heat stress period in a manner that is apparently dependent on the nutritional plane (R. P. Rhoads et al., 2011). The abundance of PEPCK, an enzyme involved in the gluconeogenesis metabolic pathway, increased during feed restriction but was not affected by heat stress. The increased hepatic glucose output also originates from increased glycogenolysis. Glucose-6-phosphate is converted to glucose during the final steps of gluconeogenesis and glycogenolysis. This conversion, catalyzed by G6Pase, is an essential step in glucose homeostasis and only glucose, not glucose-6-phosphate, can leave the liver and enter the bloodstream, a process mediated by GLUT2 (Hah, Ryu, Lee, Jung, & Lachaal, 2002).

Under heat stress conditions, the abundances of GLUT2, G6Pase, and rGH mRNA were decreased in chromium-supplemented cows compared to those in cows fed the control diet. Increasing the plasma insulin concentration results in chromium moving from the plasma to insulin-dependent cells. Four Cr³⁺ ions join apochromodulin (without Cr³⁺), activating it as chromodulin, which binds to the

active site on the insulin receptor, completing its activation and amplifying the insulin signal (Pechova & Pavlata, 2007). The binding of insulin to its transmembrane receptor causes a conformational change which stimulates the translocation of glucose transporters to the plasma membrane. With the increase in efficiency of glucose uptake by cells caused by the organic chromium, supplemented cows have less of a need to activate gluconeogenesis and glycogenolysis pathways for glucose supply, which explains the lower G6Pase and GLUT2 mRNA abundances. Although they exhibited reduced rGH, the supplemented cows did not differ from non-supplemented cows in IGF1 mRNA abundance. Thus, IGF1 production via GH stimulation in the liver was not affected.

Under heat stress conditions, the increased insulin concentration (M. L. Rhoads et al., 2010), and anti-lipolytic action of insulin, stimulates the initiating the processes of generating glucose in the body, such as glycogenolysis and gluconeogenesis, and GLUT2 mediates the process of transporting glucose from the liver to the bloodstream. IGF1 mRNA abundance was downregulated in the PF group compared to that in the TN group in cows fed the control diet. Undernutrition affects the plasma concentration of IGF1 and can attenuate the IGF1 response to GH as well as affect the regulation of IGF1 normally ascribed to GH (Zulu, Nakao, & Sawamukai, 2002). The absence of changes in the mRNA expression of the studied genes in chromium-supplemented cows under different environmental conditions indicates that organic chromium affects glucose metabolism, or at least that it regulates the studied genes related to glucose metabolism at the mRNA level.

In conclusion, heat stress caused changes in the expression levels of genes related to glucose metabolism, and organic chromium was able to modulate glucose metabolism through the potentiation of insulin action in animals under heat stress conditions to some extent.

Acknowledgments

The authors thank the Universidade Federal Fluminense, Embrapa Gado de Leite, Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). This

study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
Nível Superior-Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

References

- Baumgard, L. H., Wheelock, J. B., Sanders, S. R., Moore, C. E., Green, H. B., Waldron, M. R., & Rhoads, R. P. (2011). Postabsorptive carbohydrate adaptations to heat stress and monensin supplementation in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 94(11), 5620-5633. doi: 10.3168/jds.2011-4462
- Camargo, L. S. A., Viana, J. H. M., Ramos, A. A., Serapião, R. V., Sa, F. de, Ferreira, A. M., Guimarães, M. F. M., & Vale, V. R. do, Fº. (2007). Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. *Theriogenology*, 68(4), 626-632. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.03.029
- Collier, R. J., Collier, J. L., Rhoads, R. P., & Baumgard, L. H. (2008). Genes involved in the bovine heat stress response. *Journal of Dairy Science*, 91(2), 445-454. doi: 10.3168/jds.2007-0540
- Edmonson, A. J., Lean, I. J., Weaver, L. D., Farver, T., & Webster, G. (1989). Body condition scoring chart of Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 72(1), 68-78. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(89)79081-0
- Hah, S. J., Ryu, J., Lee, W., Jung, C. Y., & Lachaal, M. (2002). The hepatocyte glucose-6-phosphatase subcomponent T3: Its relationship to GLUT2. *Biochimica et Biophysica*, 1564(1), 198-206. doi: 10.1016/S0005-2736(02)00450-9
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$. *Method. Methods*, 25(4), 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- National Research Council (NRC). 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Seventh Revised Edition, 2001. Washington, DC: The National Academies Press. doi: 10.17226/9825
- Pechova, A., & Pavlata, L. (2007). Chromium as an essential nutrient: a review. *Veterinary Medicine (Praha)*, 52(1), 1-18. doi: 10.17221/2010-VETMED
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002). Relative Expression Software Tool (REST©) for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), e36. doi: 10.1093/nar/30.9.e36
- Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H., & Moorman, A. F. M. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, 339(1), 62-66. doi: 10.1016/S0304-3940(02)01423-4

- 2201 Rhoads, M. L., Kim, J. W., Collier, R. J., Crooker, B. A., Boisclair, Y. R., Baumgard, L.
 2202 H., & Rhoads, R. P. (2010). Effect of heat stress and nutrition on lactating
 2203 Holstein cows: II. Aspects of hepatic growth hormone responsiveness. *Journal of*
 2204 *Dairy Science*, 93(1), 170-179. doi: 10.3168/jds.2009-246
- 2205 Rhoads, R. P., Baumgard, L. H., Suagee, J. K., & Sanders, S. R. (2013). Nutritional
 2206 interventions to alleviate the negative consequences of heat stress. *Advances in*
 2207 *Nutrition*, 4(3), 267-276. doi: 10.3945/an.112.003376
- 2208 Rhoads, R. P., La Noce, A. J., Wheelock, J. B., & Baumgard, L. H. (2011). Short
 2209 communication: alterations in expression of gluconeogenic genes during heat
 2210 stress and exogenous bovine somatotropin administration. *Journal of Dairy*
 2211 *Science*, 94(4), 1917-1921. doi: 10.3168/jds.2010-3722
- 2212 Sadri, H., Ghorbani, G. R., Rahmani, H. R., Samie, A. H., Khorvash, M., &
 2213 Bruckmaier, R. M. (2009). Chromium supplementation and substitution of barley
 2214 grain with corn: Effects on performance and lactation in periparturient dairy cows.
 2215 *Journal of Dairy Science*, 92(11), 5411-5418. doi: 10.3168/jds.2008-1877
- 2216 Wheelock, J. B., Rhoads, R. P., Van Baale, M. J., Sanders, S. R., & Baumgard, L. H.
 2217 (2010). Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows.
 2218 *Journal of Dairy Science*, 93(2), 644-655. doi: 10.3168/jds.2009-2295
- 2219 Zulu, V. C., Nakao, T., & Sawamukai, Y. (2002). Insulin-like growth factor- I as a
 2220 possible hormonal mediator of nutritional regulation of reproduction in cattle.
 2221 *Journal of Veterinary Medical Science*, 64(8), 657-665. doi: 10.1292/jvms.64.657
- 2222
- 2223

8. CONCLUSÕES DA TESE

A suplementação com cromo orgânico não altera a ingestão de matéria seca, a produção de leite ou os parâmetros reprodutivos avaliados neste estudo. A suplementação com cromo aprimora o metabolismo de glicose e previne o aumento da temperatura vaginal sob condições de estresse calórico. O estresse calórico causa mudanças na expressão de genes relacionados ao metabolismo de glicose no fígado e a suplementação com cromo mostra capacidade de modulação sobre o metabolismo da glicose em animais sob estresse calórico a partir da potencialização da ação da insulina.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALHIDARY, I. A.; ALSOFI, M. A.; ABDOUN, K. A.; SAMARA, E. M.; OKAB, A. B.; AL-HAIDARY, A. A. Influence of dietary chromium yeast supplementation on apparent trace elements metabolism in growing camel (*Camelus dromedarius*) reared under hot summer conditions. *Tropical Animal and Health Production*, v. 50, p. 519-524, 2018.
- AL-SAIADY, M. Y.; AL-SHAIKH, M. A.; AL-MUFARREJ, S. Y.; ALSHOWEIMI, T. A.; MOGAWER, H. H.; DIRRAR, A. Effect of chelated chromium supplementation on lactation performance and blood parameters of Holstein cows under heat stress. *Animal Feed Science and Technology*, v. 117, p. 223-233, 2004.
- AN-QIANG, L.; ZHI-SHENG, W., AN-GUO, Z. Effect of chromium picolinate supplementation on early lactation performance, rectal temperatures, respiration rates and plasma biochemical response of Holstein cows under heat stress. *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 8, p. 940-945, 2009.
- ARMSTRONG, D. Heat stress interaction with shade and cooling. *Journal of Dairy Science*, v. 77, n. 7, p. 2044-2050, 1994.
- ASCHENBACH, J. R.; KRISTENSEN, N. B.; DONKIN, S. S.; HAMMON, H. M.; PENNER, G. B. Gluconeogenesis in dairy cows: The secret of making sweet milk from sourdough. *IUBMB Life*, v. 62, n. 12, p. 869-877, 2010.
- AZEVEDO, M. D.; PIRES, M. D. F. Á.; SATURNINO, H. M.; LANA, Â. M. Q.; SAMPAIO, I. B. M.; MONTEIRO, J. B. N.; MORATO, L. E. Estimation of upper critical levels of the temperature-humidity index for 1/2, 3/4 e 7/8 lactating Holstein-Zebu dairy cows. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 34, n. 6, p. 2000-2008, 2005.
- BADINGA, L.; THATCHER, W.; DIAZ, T.; DROST, M.; WOLFENSON, D. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. *Theriogenology*, v. 39, n. 4, p. 797-810, 1993.
- BAUMAN, D. E.; CURRIE, W. B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of Dairy Science*, v.63, p.1514-1529, 1980.
- BAUMGARD, L. H.; KEATING, P. A.; ROSS, J. W.; RHOADS, R. P. Effects of heat stress on the immune system, metabolism and nutrient partitioning: implications on reproductive success. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 39, n. 1, p. 173-183, 2015.
- BAUMGARD, L. H.; RHOADS, R. P. Effects of Heat Stress on Postabsorptive Metabolism and Energetics. *Annual Review of Animal Bioscience*, v. 1, p. 311-337, 2013.

- BAUMGARD, L. H.; RHOADS, R. P. Ruminant Nutrition Symposium: ruminant production and metabolic responses to heat stress. *Journal of Animal Science*, v. 90, p.1855–1865, 2012.
- BAUMGARD, L. H.; WHEELLOCK, J. B.; SANDERS, S. R.; MOORE, C. E.; GREEN H. B.; WALDRON, M. R.; RHOADS, R. P. Postabsorptive carbohydrate adaptations to heat stress and monensin supplementation in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v. 94, p. 5620-5633, 2011.
- BEEDE, D. K.; COLLIER, R. J. Potential nutritional strategies for intensively managed cattle during thermal stress. *Journal of Animal Science*, v. 62, p. 543-555, 1986.
- BERMAN, A. Estimates of heat stress relief needs for Holstein dairy cows. *Journal of Animal Science*, v.83, p. 1377-1384, 2005.
- BERNABUCCI, U.; BASIRICÒ, L. MORERA, P.; DIPASQUALE, D.; VITALI, A.; CAPPELLI, F. P.; CALAMARI, L. Effect of summer season on milk protein fractions in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v. 98, p. 1815–1824, 2015.
- BERNABUCCI, U.; LACETERA, N.; BAUMGARD, L. H.; RHOADS, R. P.; RONCHI, B.; NARDONE, A. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *Animal*, v.4, p. 1167-1183, 2010.
- BIN-JUMAH, M.; ABD EL-HACK, M. E.; ABDELNOUR, S. A.; HENDY, Y. A.; GHANEM, H. A.; ALSAFY, S. A.; KHAFAGA, A. F.; NORELDIN, A. E.; SHAHEEN, H.; SAMAK, D.; MOMENAH, M. A.; ALLAM, A. A.; ALKAHTANE, A. A.; ALKAHTANI, S.; ABDEL-DAIM, M. M.; ALEYA, L. Potential use of chromium to combat thermal stress in animals: A review, *Science of the Total Environment*, v. 707, 2019.
- BOURAOUI, R.; LAHMAR, M.; MAJDOUB, A.; DJEMALI, M.; BELYEA, R. The relationship of temperature-humidity index with milk production of dairy cows in a Mediterranean climate. *Animal Research*, v. 51, p.479–491, 2002.
- BRAGANÇA, G. M.; BATISTA, R. I. T. P.; SOUZA-FABJAN, J. M. G.; ALFRADIQUE, V. A. P.; ARASHIRO, E. K. N.; COSENTINO, I. O.; PINTO, P. H. N.; CAMARGO, L. S. A.; DA FONSECA, J. F.; BRANDÃO, F. Z. Dose and administration protocol for FSH used for ovarian stimulation affect gene expression in sheep cumulus-oocyte complexes. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 30, p. 1234-1244, 2018.
- CAMARGO, L. S. A., VIANA, J. H. M., RAMOS, A. A., SERAPIÃO, R. V., DE SA, F., FERREIRA, A. M., GUIMARÃES, M. F. M., DO VALE FILHO, V. R. Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. *Theriogenology*, v. 68, p. 626-632, 2007.

- 2346 CANAZA-CAYO, A. W., LOPES, P. S., SILVA, M. V. G. B., COBUCI, J. A., TORRES,
2347 R. A., MARTINS, M. F., AND ARBEX, W. A. Estrutura populacional da raça
2348 Girolando, *Ciência Rural*, v. 44, n. 11, p. 2072–2077, 2014.
- 2349
2350 CERF-BENSUSSAN, N.; GABORIAU-ROUTHIAU, V. The immune system and the
2351 gut microbiota: friends or foes? *Nature Reviews Immunology*, v. 10, p. 735-44, 2010.
- 2352
2353 COLLIER, R. J.; COLLIER, J. L.; RHOADS, R. P.; BAUMGARD, L. H. Genes
2354 involved in the bovine heat stress response. *Journal of Dairy Science*, v. 91, p. 445–
2355 54, 2008.
- 2356
2357 CONDÉ, M. S; PENA, S. M.; ROCHA JÚNIOR, C. M.; HOMEM, B. G. C.;
2358 DEMARTINI, G. P.; SILVA, A. B. Minerais quelatados na nutrição de suínos. *Revista*
2359 *Eletrônica Nutritime*, v. 11, n. 4, p. 3547-3565, 2014.
- 2360
2361 COPPOCK, C. E.; GRANT, P. A.; PORTZER, S. J. Lactating dairy cow responses to
2362 dietary sodium, chloride, bicarbonate during hot weather. *Journal of Dairy Science*, v.
2363 65, p. 566-576, 1982.
- 2364
2365 COWLEY, F. C.; BARBER, D. G.; HOULIHAN, A. V.; POPPI, D. P. Immediate and
2366 residual effects of heat stress and restricted intake on milk protein and casein
2367 composition and energy metabolism. *Journal of Dairy Science*, v. 98, p. 2356-2368,
2368 2015.
- 2369
2370 DE RENSIS, F.; GARCIA-ISPIERTO, I.; LÓPEZ-GATIUS, F. Seasonal heat stress:
2371 Clinical implications and hormone treatments for the fertility of dairy cows.
2372 *Theriogenology*, v. 84, p. 659–666, 2015.
- 2373
2374 DE RENSIS, F.; SCARAMUZZI, R. J. Heat stress and seasonal effects on
2375 reproduction in the dairy cow—a review. *Theriogenology*, v. 60, p.1139–1151, 2003.
- 2376
2377 DOSKA, M. C., SILVA, D. F. F., HORST, J. A., VALLOTO, A. A., JUNIOR, P. R.,
2378 ALMEIDA, R. Sources of variation in milk urea nitrogen in Paraná dairy cows.
2379 *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 41, p. 692–697, 2012.
- 2380
2381 EDMONSON, A. J., LEAN, I. J., WEAVER, L. D., FARVER, T. AND WEBSTER, G.
2382 Body condition scoring chart of Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 72,
2383 p. 68–78, 1989.
- 2384
2385 EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Differential responses of bovine oocytes and
2386 preimplantation embryos to heat shock. *Molecular Reproduction and Development*, v.
2387 46, n. 2, p. 138-145, 1997.
- 2388
2389 European Food Safety Authority (EFSA). 2020. Scientific Opinion on the safety and
2390 efficacy of Availa®Cr (chromium chelate of DL-methionine) as a feed additive for dairy
2391 cows. *EFSA Journal*, v. 18, 26 pp.
- 2392
2393 FERREIRA, R. M., AYRES, H., CHIARATTI, M. R., FERRAZ, M. L., ARAÚJO, A. B.,
2394 RODRIGUES, C. A., WATANABE, Y. F., VIREQUE, A. A., JOAQUIM, D. C., SMITH,

- L. C., MEIRELLES, F. V., AND BARUSELLI, P. S. The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. *Journal of Dairy Science*, v. 94, p. 2383–2392, 2011.
- 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.; calórico agudo e crônico sobre a qualidade oocitária de bovinos de raças adaptadas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 70, p. 64-72, 2018.
- FUQUAY, J. Heat stress as it affects animal production. *Journal of Animal Science*, v. 52, n. 1, p. 164-174, 1981.
- GARNER, J. B.; DOUGLAS, M.; WILLIAMS, R. S. O.; WALES, W. J.; NGUYEN, T. T. T.; HAYES, B. J. Genomic selection improves heat tolerance in dairy cattle. *Nature Scientific Reports*, v. 6, p. 1–8, 2016.
- GOMES, M. R.; ROGERO, M. M.; TIRAPGUI, J. Considerações sobre cromo, insulina e exercício físico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 11, p. 262-266, 2005.
- GWAZDAUSKAS, F.; THATCHER, W.; KIDDY, C.; PAAPE, M.; WILCOX, C. Hormonal patterns during heat stress following PGF2 α -tham salt induced luteal regression in heifers. *Theriogenology*, v. 16, n. 3, p. 271-285, 1981.
- HAH, S. J., RYU, J., LEE, W., JUNG, C. Y., & LACHAAL, M. The hepatocyte glucose-6-phosphatase subcomponent T3: Its relationship to GLUT2. *Biochimica et Biophysica*, v. 1564, p. 198-206, 2002.
- HAMMAMI, H.; VANDENPLAS, J.; VANROBAYS, M. L.; REKIK, B.; BASTIN, C.; GENGLER, N. Genetic analysis of heat stress effects on yield traits, udder health, and fatty acids of Walloon Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v. 98, p. 1–13, 2015.
- HANSEN, P. J. Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. *Theriogenology*, v. 68(S1), p. S242–S249, 2007.
- HANSEN, P. J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 364, p. 3341–3350, 2009.
- HAYIRLI, A. D.; BREMMER, D. R.; BERTICS, S. J.; SOCKA, M. T.; GRUMMER, R. R. Effect of chromium supplementation on production and metabolic parameters in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 84, p. 1218–1230, 2001.
- HENAO-VELÁSQUEZ, A. F., O. D. MÚNERA-BEDOYA, A. C. HERRERA, J. H. AGUDELO-TRUJILLO, M. F. CERÓN-MUÑOZ. Lactose and milk urea nitrogen: fluctuations during lactation in Holstein cows. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 43, p. 479–484, 2014.

- 2444 INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION – IDF, 2000. Inventory of IDF/ISO/AOAC.
2445 International Adopted Methods of Analysis and Sampling for Milk and Milk Products.
2446 6th ed., Brussels, Belgium. 350p
2447
- 2448 IPCC, 2014: Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working
2449 Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on
2450 Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC,
2451 Geneva, Switzerland, 151 pp.
2452
- 2453 JU, J. C. Cellular responses of oocytes and embryos under thermal stress: hints to
2454 molecular signaling. *Animal Reproduction*, v.2, n.2, p.79-90, 2005.
2455
- 2456 KAFILZADEH, F.; SHABANKAREH, H. K.; TARGHIBI, M. R. Effect of chromium
2457 supplementation on productive and reproductive performances and some metabolic
2458 parameters in late gestation and early lactation of dairy cows. *Biological Trace
2459 Element Research*, v. 149, p. 42-49, 2012.
2460
- 2461 KEGLEY E. B.; GALLOWAY, D. L.; FAKLER, T. M. Effect of dietary chromium –L-
2462 methionine on glucose metabolism of beef steers. *Journal of Animal Science*, v. 78,
2463 p. 3177-3183, 2000.
2464
- 2465 KEKANA, T. W.; NHERERA-CHOKUDAMUKENGELA, F. V.; MU YA, M. C.;
2466 MANYAMA, K. M.; LEHLOENYA, K. C. Milk production and blood metabolites of
2467 dairy cattle as influenced by thermal-humidity index. *Tropical Animal and Health
2468 Production*, v. 50, p. 921–924, 2018.
2469
- 2470 KESHRI, A.; ROY, D.; SIDHU, V. K.; KUMAR, M.; KUSHWAHA, R.; VASWANI, S.;
2471 KUMARI L. V.; SONAM, D.; PRAKASH, A.; CHOUDHURY, S. Impact of different
2472 chromium sources on physiological responses, blood biochemicals and endocrine
2473 status of heat stress in dairy calves. *Biological Rhythm Research*, 2019.
- 2474 LEIVA, T.; COOKE, R. F.; BRANDÃO, A. P.; BERTIN, R. B.; COLOMBO, E. A.;
2475 MIRANDA, V. F. B.; LOURENÇO, L. A. C.; RODRIGUES, S. M. B.; VASCONCELOS,
2476 J. L. M. Effects of supplemental calcium salts of palm oil and chromium-propionate
2477 on insulin sensitivity and productive and reproductive traits of mid- to late lactating
2478 Holstein × Gir dairy cows consuming excessive energy. *Journal of Dairy Science*, v.
2479 101, p. 491–504, 2018.
2480
- 2481 LEIVA, T.; COOKE, R. F.; BRANDAO, A. P.; PARDELLI, U.; RODRIGUES, R. O.;
2482 CORRA, F. N.; VASCONCELOS, J. L. Effects of concentrate type and chromium
2483 propionate on insulin sensitivity, productive and reproductive parameters of lactating
2484 dairy cows consuming excessive energy. *Animal*, v. 11, p. 436–444, 2017.
2485
- 2486 LIU, F.; COTTRELL, J. J.; COLLINS, C. L.; HENMAN, D. J.; O'HALLORAN, K. S. B.;
2487 DUNSHEA, F. R. Supplementation of selenium, vitamin E, chromium and betaine
2488 above recommended levels improves lactating performance of sows over summer.
2489 *Tropical Animal and Health Production*, v. 49, p. 1461-1469, 2017.
2490

- 2491 LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using
2492 real time quantitative PCR and the $2\Delta\Delta C(T)$ Method. *Methods*, v. 25, p. 402-408,
2493 2001.
- 2494
- 2495 MOUSAVI, F.; KARIMI-DEHKORDI, S.; KARGAR, S.; KHOSRAVI-BAKHTIARI, M.
2496 Effects of dietary chromium supplementation on calf performance, metabolic
2497 hormones, oxidative status, and susceptibility to diarrhea and pneumonia. *Animal*
2498 *Feed Science and Technology*, v. 248, p. 95-105, 2019.
- 2499
- 2500 NARDONE, A.; RONCHI, B.; LACETERA, N.; RANIERI, M. S.; BERNABUCCI, U.
2501 Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock
2502 systems. *Livestock Science*, v. 130, n. 1, p. 57-69, 2010.
- 2503
- 2504 National Research Council. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Seventh
2505 Revised Edition, 2001. Washington, DC: The National Academies
- 2506
- 2507 NEGRÓN-PÉREZ, V. M.; FAUSNACHT, D. W.; RHOADS, M. L. Invited review:
2508 Management strategies capable of improving the reproductive performance of heat-
2509 stressed dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 102, 2019.
- 2510
- 2511 NIKKHAH, A.; MIRZAEI, M.; KHORVASH, M.; RAHMANI, H. R.; GHORBANI, G. R.
2512 Chromium improves production and alters metabolism of early lactation cows in
2513 summer. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 95, p. 81–89, 2011.
- 2514
- 2515 O'BRIEN, M. D.; RHOADS, R. P.; SANDERS, S. R.; DUFF, G. C.; BAUMGARD, L.
2516 H. Metabolic adaptations to heat stress in growing cattle. *Domestic Animal*
2517 *Endocrinology*, v. 38, p. 86–94, 2010.
- 2518
- 2519 OLIVEIRA, D. J. C.; SOARES FILHO, C. V. S. Suplementação com cromo para
2520 ruminantes. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, v. 8, p. 71-77,
2521 2005.
- 2522
- 2523 OLIVEIRA NETO, J. B.; MOURA, A. A. A.; NEIVA, J. N. M.; GUILHERMINA, M. M.
2524 Indicadores de Estresse calórico e Utilização da Somatotropina Bovina (bST) em
2525 Vacas Leiteiras Mestiças (*Bos taurus* x *Bos indicus*) no Semi-Árido do Nordeste.
2526 *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 30, p.360-367, 2001.
- 2527
- 2528 PAULA-LOPES, F.; LIMA, R.; SATRAPA, R.; BARROS, C. Physiology and
2529 Endocrinology Symposium: Influence of cattle genotype (*Bos indicus* vs. *Bos taurus*)
2530 on oocyte and preimplantation embryo resistance to increased temperature. *Journal*
2531 *of Animal Science*, v. 91, n. 3, p. 1143-1153, 2013.
- 2532
- 2533 PEARCE, S. C.; MANI, V.; BODDICKER, R. L.; JOHNSON, J. S.; WEBER, T. E.;
2534 ROSS, J. W.; RHOADS, R. P.; BAUMGARD, L. H.; GABLER, N. K. Heat stress
2535 reduces intestinal barrier integrity and favors intestinal glucose transport in growing
2536 pigs. *Plos One*, v.8, p. 1-9, 2013.
- 2537
- 2538 PECHOVA, A.; PAVLATA, L. Chromium as an essential nutrient: a review. *Veterinary*
2539 *medicine*, v. 52, p. 1–18, 2007.

2540 PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative Expression Software Tool
 2541 (REST©) for group wise comparison and statistical analysis of relative expression
 2542 results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 30(9): e36, 2002.

2543
 2544 PIRES, M. F. A.; CAMPOS, A. T. Relação dos dados climáticos com desempenho
 2545 animal. In: RESENDE, H.; CAMPOS, A. T.; PIRES, M. F. A. (Ed.). Dados climáticos
 2546 e sua utilização na atividade leiteira. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003. p.
 2547 103-114.

2548
 2549 PIRES, M. F. A. Manejo nutricional para evitar estresse calórico. Comunicado
 2550 Técnico 52. Embrapa, 2006.

2551
 2552 PUTNEY, D. J.; MULLINS, S.; THATCHER, W. W., DROST, M.; GROSS, T. S.
 2553 Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient
 2554 temperatures between the onset of estrus and insemination. *Animal Reproduction*
 2555 *Science*, v. 19, p. 37-51, 1989.

2556
 2557 RAMAKERS, C., RUIJTER, J. M., DEPREZ, R. H., MOORMAN, A. F. M.
 2558 Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR)
 2559 data. *Neuroscience Letters*, v. 339, p. 62-66, 2003.

2560
 2561 RHOADS, M. L.; KIM, J. W.; COLLIER, R. J.; CROOKER, B. A.; BOISCLAIR, Y. R.;
 2562 BAUMGARD, L. H.; RHOADS, R. P. Effect of heat stress and nutrition on lactating
 2563 Holstein cows: II. Aspects of hepatic growth hormone responsiveness. *Journal of*
 2564 *Dairy Science*, v. 93, p. 170–179, 2010.

2565
 2566 RHOADS, M. L.; RHOADS, R. P.; VAN BAAL, M. J.; COLLIER, R. J.; SANDERS,
 2567 S. R.; SHWARTZ, W. J.; BAUMGARD, L. H. Effects of a supplemental yeast culture
 2568 on heat-stressed lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v. 92, p.935-942,
 2569 2009.

2570
 2571 RHOADS, R. P.; BAUMGARD, L. H.; SUAGEE, J. K.; SANDERS, S. R. Nutritional
 2572 Interventions to Alleviate the Negative Consequences of Heat Stress. *Advances in*
 2573 *Nutrition*, v. 4, p. 267–276, 2013.

2574
 2575 RHOADS, R. P.; LA NOCE, A. J.; WHEELLOCK, J. B.; BAUMGARD L. H. Short
 2576 Communication: Alterations in expression of gluconeogenic genes during heat stress
 2577 and exogenous bovine somatotropin administration. *Journal of Dairy Science*, v. 94,
 2578 p. 1917-1921, 2011.

2579
 2580 RÍUS, A. G. INVITED REVIEW: Adaptations of protein and amino acid metabolism to
 2581 heat stress in dairy cows and other livestock species. *Applied Animal Science*, v. 35,
 2582 p. 39-48, 2019.

2583
 2584 RIVERA, R.; HANSEN, P. Development of cultured bovine embryos after exposure to
 2585 high temperatures in the physiological range. *Reproduction*, v. 121, n. 1, p. 107-115,
 2586 2001.

2587

ROTH Z. Effect of Heat Stress on Reproduction in Dairy Cows: Insights into the Cellular and Molecular Responses of the Oocyte. *Annual Review of Animal Bioscience*, v.5, p. 151-170, 2017.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biology of Reproduction*, v. 71, p. 1898–1906, 2004.

SADRI, H.; GHORBANI, G. R.; RAHMANI, H. R.; SAMIE, A. H.; KHORVASH, M.; BRUCKMAIER, R. M. Chromium supplementation and substitution of barley grain with corn: Effects on performance and lactation in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 92, p. 5411-5418, 2009.

SADRI, H.; RAHMANI, H. R.; KHORVASH, M.; GHORBANI, G. R.; BRUCKMAIER, R. M. Chromium supplementation and substitution of barley grain with corn: Effects on metabolite and hormonal responses in periparturient dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 96, p. 220–227, 2012.

SANTOS, G. B., BRANDÃO, F. Z., RIBEIRO, L. S., ARASHIRO, E. K. N., GRAZIA, J. G. V., CAMARGO, L. S. A., MACHADO, F. S., VARAGO, F. C., OTTO, P. I., CARVALHO, B. C. Metabolic, follicular and embryo production responses of postpartum crossbred Holstein × Gir dairy cows fed diets with different energy levels. *Animal Production Science*, v. 59, p. 1446-1453, 2018.

SHEHAB-EL-DEEN, M. A.; LEROY, J. L.; FADEL, M.; SALEH, S.; MAES, D.; VAN SOOM, A. Biochemical changes in the follicular fluid of the dominant follicle of high producing dairy cows exposed to heat stress early post-partum. *Animal Reproduction Science*, v. 117, n. 3, p. 189-200, 2010.

SHEHAB-EL-DEEN, M. A.; LEROY, J. L.; MAES, D.; VAN SOOM, A. Cryotolerance of bovine blastocysts is affected by oocyte maturation in media containing palmitic or stearic acid. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 44, p. 140-142, 2009.

SILVA, C.; SARTORELLI, E.; CASTILHO, A.; SATRAPA, R.; PUELKER, R.; RAZZA, E.; TICIANELLI, J.; EDUARDO, H.; LOUREIRO, B.; BARROS, C. Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced in vitro. *Theriogenology*, v. 79, n. 2, p. 351-357, 2013.

SILVA, J. S.; QUEIROZ, A. C., 2002. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. 3ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 235p

SILVA, M. V. G. B.; MARTINS, M. F.; GONÇALVES, G. S.; PANETTO, J. C. DO C.; PAIVA, L. DE C.; MACHADO, M. A.; REIS, D. R. de L.; FERREIRA JUNIOR, E.; CEMBRANELLI, M. DE A. R., 2019. Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando – Sumário de Touros – Resultado do Teste de Progenie - Junho/2019. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite. 68p.

- 2635 SILVA, T. P. D.; SOUSA JUNIOR, S. C. Produção de leite de vacas submetidas a
2636 diferentes períodos de exposição à radiação solar no sul do Piauí. *Agrarian*, v. 6, p.
2637 320-325, 2013.
- 2638
2639 SIQUEIRA, K. B.; PINHO, M. C.; MERCÊS, E. D. S. O consumo de leite em
2640 números. *Panorama do Leite*, v. 65, p. 5-7, 2012.
- 2641
2642 SJAUNJA, L. O., BAEVRE, L., JUNKKARINEN, L., PEDERSEN, J., SETALA, J. A
2643 Nordic proposal for an energy corrected milk (ECM) formula. *JCAR*, 27th session of
2644 ICRPMA, p. 156–157, 1990.
- 2645
2646 SMITH, D. L.; SMITH, T.; RUDE, B. J.; WARD, S. H. Short communication:
2647 Comparison of the effects of heat stress on milk and component yields and somatic
2648 cell score in Holstein and Jersey cows. *Journal of Dairy Science*, v. 96, p. 3028-3033,
2649 2013.
- 2650
2651 SOLTAN, M. A. Effect of dietary chromium supplementation on productive and
2652 reproductive performance of early lactating dairy cows under heat stress. *Journal of*
2653 *Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 94, p. 264-272, 2010.
- 2654
2655 SONNA, L. A.; FUJITA, J.; GAFFIN, S. L.; LILLY, C. M. Effects of heat and cold
2656 stress on mammalian gene expression. *Journal of Applied Physiology*, v. 92, p.1725–
2657 1742, 2002.
- 2658
2659 SPEARS, J. W.; LLOYD, K. E.; KRAFKA, K. Chromium concentrations in ruminant
2660 feed ingredients. *Journal of Dairy Science*, v. 100, p 3584-3590, 2017.
- 2661
2662 SPIERS, D. E.; SPAIN, J. N.; SAMPSON, J. D.; RHOADS, R. P. Use of physiological
2663 parameters to predict milk yield and feed intake in heat-stressed dairy cows. *Journal*
2664 *of Thermal Biology*, v. 29, p. 759–764, 2004.
- 2665
2666 ST-PIERRE, N. R.; COBANOV, B.; SCHNITKEY, G. Economic losses from heat
2667 stress by US livestock industries. *Journal of Dairy Science*, v. 86, p. 52–77, 2003.
- 2668
2669 SUMNER, J. M.; VALDEZ, F.; MCNAMARA, J. P. Effects of Chromium Propionate on
2670 Response to an Intravenous Glucose Tolerance Test in Growing Holstein Heifers.
2671 *Journal of Dairy Science*, v. 90, p. 3467–3474, 2007.
- 2672
2673 TAO, S.; BUBOLZ, J. W.; DO AMARAL, B. C.; THOMPSON, I. M.; HAYEN, M. J.;
2674 JOHNSON, S. E.; DAHL, G. E. Effect of heat stress during the dry period on
2675 mammary gland development. *Journal of Dairy Science*, v. 94, p. 5976–5986, 2011.
- 2676
2677 TAO, S.; DAHL, G. E. Heat stress effects during late gestation on dry cows and their
2678 calves. *Journal of Dairy Science*, v.96, p. 1-15, 2013.
- 2679
2680 TAO, S.; ORELLANA, R. M.; WENG, X.; MARINS, T. N.; DAHL, G. E.; BERNARD, J.
2681 K. Symposium review: The influences of heat stress on bovine mammary gland
2682 function. *Journal of Dairy Science*, v.101, p. 5642-5654, 2018.

- 2683 TAO, S.; THOMPSON, I. M.; MONTEIRO, A. P. A.; HAYEN, M. J.; YOUNG, L. J.;
2684 DAHL, G. E. Effect of cooling heat-stressed dairy cows during the dry period on
2685 insulin response. *Journal of Dairy Science*, v.95, p. 5035-5046, 2012.
- 2686
2687 TARGHIBI, M. R.; KAFILZADEH, F.; KARAMI SHABANKAREH, H. Chromium
2688 supplementation effects on serum nitrogen constituents of dairy cows in late
2689 gestation and early lactation. *Euphrates Journal of Agriculture Science*, v. 3(9), p.
2690 239–242, 2011.
- 2691
2692 THATCHER, W.; COLLIER, R. Effects of climate on bovine reproduction. In: *Current*
2693 *Therapy in Theriogenology*, v. 2, p. 301-309, 1986.
- 2694
2695 THOM, E. C. The discomfort index. *Weatherwes*, v. 12, p. 57-60, 1959.
- 2696
2697 THORNTON, P.; VAN DE STEEG, J.; NOTENBAERT, A.; HERRERO, M. The
2698 impacts of climate change on livestock and livestock systems in developing
2699 countries: A review of what we know and what we need to know. *Agricultural*
2700 *Systems*, v. 101, n. 3, p. 113-127, 2009.
- 2701
2702 VASCONCELLOS, B. F.; PÁDUA, J. T.; MUÑOZ, M. F. C.; TONHATI, H. Efeitos
2703 genéticos e ambientais sobre a produção de leite, o intervalo de partos e a duração
2704 da lactação em um rebanho leiteiro com animais mestiços, no Brasil. *Revista*
2705 *Universitária Rural: Série Ciências da Vida*, v. 23, p. 39-45, 2003.
- 2706
2707 VASQUEZ, E. F. A.; HERRERA, A. P. N. Concentração plasmática de cortisol, uréia,
2708 cálcio e fósforo em vacas de corte mantidas a pasto suplementadas com levedura
2709 de cromo durante a estação de monta. *Ciência Rural*, v. 33, p. 743-747, 2003.
- 2710
2711 VINCENT, J. B. The biochemistry of chromium. *The Journal of Nutrition*, v. 130,
2712 p.715– 718, 2000.
- 2713
2714 WALDRON, M. R.; KULICK, A. E.; BELL, A. W., OVERTON, T. R. Acute
2715 experimental mastitis is not causal toward the development of energy-related
2716 metabolic disorders in early postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 89,
2717 p. 596-610, 2006.
- 2718
2719 WEST, J. W. Physiological effects of heat stress on production and reproduction. In:
2720 TRI-STATE DAIRY NUTRITION CONFERENCE, 2002, Fort Wayne.
2721 Proceedings...Fort Wayne: Eastridge, M.D., 2002. p.1-9.
- 2722
2723 WEST, J. W. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *Journal of Dairy*
2724 *Science*, v. 86, p. 2131-2144, 2003.
- 2725
2726 WHEELOCK, J. B.; RHOADS, R. P.; VANBAALE, M. J.; SANDERS, S. R.;
2727 BAUMGARD, L. H. Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating
2728 Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 644-655, 2010.
- 2729
2730 WHEELOCK, J. B.; SANDERS, S. R.; SHWARTZ, G.; HERNANDEZ, L. L.; BAKER,
2731 S. H.; MCFADDEN, J. W.; ODENS, L. J.; BURGOS, R.; HARTMAN, S. R.;

- 2732 JOHNSON, R. M.; JONES, B. E.; COLLIER, R. J.; RHOADS, R. P.; VANBAALE, M.
2733 J.; BAUMGARD, L. H. Effects of heat stress and rbST on production parameters and
2734 glucose homeostasis. *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. 290 (Abstr.), 2006.
2735
- 2736 WISE, M.; ARMSTRONG, D.; HUBER, J.; HUNTER, R.; WIERSMA, F. Hormonal
2737 alterations in the lactating dairy cow in response to thermal stress. *Journal of Dairy*
2738 *Science*, v. 71, n. 9, p. 2480-2485, 1988.
2739
- 2740 WOLFENSON, D.; THATCHER, W.; BADINGA, L.; SAVIO, J.; MEIDAN, R.; LEW, B.;
2741 BRAW-TAL, R.; BERMAN, A. Effect of heat stress on follicular development during
2742 the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biology of Reproduction*, v. 52, n. 5, p.
2743 1106-1113, 1995.
2744
- 2745 YANG, B.; JOHNSON, T. S.; THOMAS, G. H.; WATSON, P. F.; WAGNER, B.;
2746 FURNESS, P. N.; EL NAHAS, A. M. A shift in the Bax/Bcl-2 balance may activate
2747 caspase-3 and modulate apoptosis in experimental glomerulonephritis. *Kidney*
2748 *International*, v. 62, p. 1301–1313, 2002.
2749
- 2750 YOUSEF, M. K. Stress Physiology in Livestock. Boca Raton: CRC Press Inc., 1985.
2751
- 2752 ZULU, V. C., NAKAO, T., & SAWAMUKAI, Y. Insulin-like growth factor- I as a
2753 possible hormonal mediator of nutritional regulation of reproduction in cattle. *Journal*
2754 *of Veterinay Medical Science*, v. 64, p. 657-665, 2002.

2755 **10. ANEXO**

2756

2757 Aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite

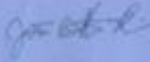


Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Identificação de marcadores moleculares de conforto térmico e estudo de estratégias para aumento do desempenho reprodutivo em gado de leite Girolando", Protocolo N°07/2015, sob a responsabilidade de **Luiz Sérgio de Almeida Camargo** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Gado de Leite, em reunião de **15/04/2015**.

Vigência do Projeto	De 01/07/2015 a 31/06/2019
Espécie/Linhagem	<i>Bos taurus</i> /Bovino
N° de Animais	1180
Peso/idade	± 450 Kg/ 3 a 10 anos
Sexo	Machos () Fêmeas (x)
Origem	Biotérios da Embrapa Gado de Leite (x) Frigorífico ()


João Batista Ribeiro
 Secretário Administrativo da CEUA/ EGL

Embrapa Gado de Leite
 Rua Engenheiro do Nascimento, 810 - Bairro Dona Beatriz - 26070-000 Juiz de Fora/MG
 Telefone: (32) 3311-7400 Fax: (32) 3311-7401 - cgel@cpa.embrapa.br

2758