

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Efeitos da suplementação estratégica com metionina protegida da degradação
ruminal sob parâmetros fisiológicos e produtivos de vacas Nelore**

Vinicius de Souza Izquierdo

Pelotas, 2021

Vinicius de Souza Izquierdo

Efeitos da suplementação estratégica com metionina protegida da degradação ruminal sob parâmetros fisiológicos e produtivos de vacas Nelore

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Marcio Nunes Corrêa

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Schmitt

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

I98e Izquierdo, Vinicius de Souza

Efeitos da suplementação estratégica com metionina protegida da degradação ruminal sob parâmetros fisiológicos e produtivos de vacas Nelore / Vinicius de Souza Izquierdo ; Marcio Nunes Corrêa, orientador ; Eduardo Schmitt, coorientador. — Pelotas, 2021.

40 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Estresse térmico. 2. Termorregulação. 3. Bovinocultura de corte. 4. Metionina. 5. Nutrição. I. Corrêa, Marcio Nunes, orient. II. Schmitt, Eduardo, coorient. III. Título.

CDD : 636.213

Vinicius de Souza Izquierdo

Efeitos da suplementação estratégica com metionina protegida da degradação
ruminal sob parâmetros fisiológicos e produtivos de vacas Nelore

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em
Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária,
Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 25/02/2021

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcio Nunes Corrêa (Orientador)
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Vinicius Coitinho Tabeleão
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Carla Joice Härter
Doutora em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”

Dr. Antônio Amaral Barbosa
Doutor em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

**Dedico este trabalho aos meus pais, Heliney e Cândia, por todo amor e apoio
em todas as minhas decisões**

Agradecimentos

Em primeiro lugar a Deus, por abençoar a minha trajetória e colocar pessoas especiais, tornando-a mais tranquila e proveitosa.

Aos meus pais, Heliney e Cândida, pelo incentivo e suporte na busca dos meus sonhos. À minha irmã, pelo exemplo de veterinária e de pessoa, sempre com uma palavra confortante e acolhedora, não importando a distância

À Luiza, pela parceria e cuidado ao longo destes anos, participando das conquistas e desafios ao longo deles, entendendo a ausência em vários momentos, e sobretudo, me incentivando a ser um profissional e uma pessoa melhor.

Aos meus avós, Helio e Neita, pelo exemplo de família e valorização das raízes. Ao Cauê, pela amizade e conversas, fazendo enxergar algumas situações sob outra ótica, mas acima de tudo, por junto a minha irmã me dar o melhor presente que poderia receber, a minha afilhada Maria Isabel.

A minha família e amigos pelo apoio nos meus objetivos, parceria nas horas de festa e compreensão nas ausências. Obrigado, sem vocês nada seria possível.

Ao Professor Marcio Nunes Corrêa, por ter aceitado ser meu orientador nesta etapa, pelo aprendizado adquirido e experiências compartilhadas, pelas orientações e amizade.

Ao Professor Eduardo Schmitt, pela confiança, amizade e ensinamentos durante todo o período, mas sobretudo durante os dois experimentos, me desafiando e fazendo crescer e me encantar ainda mais pela pesquisa.

Aos colegas do Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), pela parceria e suporte ao longo destes dois anos.

E por último, mas não menos importante, ao Bernardo, ao Matheus e à Jordani, por terem sido meus braços direito e esquerdo nos experimentos a campo, tornando as rotinas mais leve e descontraídas, vocês foram fundamentais nos experimentos.

“Success consists of going from failure to failure without loss of enthusiasm”
(Winston Churchill)

Resumo

IZQUIERDO, Vinicius de Souza. **Efeitos da suplementação estratégica com metionina protegida da degradação ruminal sob parâmetros fisiológicos e produtivos de vacas Nelore.** 2021. 40f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

A dificuldade de controle de altos índices de temperatura e umidade em sistemas de criação de bovinos à pasto pode influenciar na eficiência produtiva e reprodutiva destes animais, exigindo estratégias que atenuem estes efeitos. Baseado nisso esta dissertação teve por objetivo avaliar os efeitos da suplementação de metionina protegida da degradação ruminal (MPDR) em alguns parâmetros fisiológicos e produtivos de vacas Nelore. Foram utilizadas 563 vacas Nelore multíparas, divididas em dois grupos com três repetições cada, grupo controle (GC) e grupo metionina (GM), os dois eram mantidos em pastagens de gramíneas tropicais, com acesso a suplementação mineral, e o GM tinha acrescido a suplementação 3g de MPDR para cada 100g de suplemento. O período de suplementação foi de 77 dias, iniciando 31 antes do dia 0 do protocolo de inseminação artificial em tempo fixo, até o diagnóstico de gestação. No dia 0 do protocolo, junto com o dispositivo intravaginal de progesterona, foi colocado um termômetro, em 142 animais, que aferiu a temperatura vaginal a cada 30 minutos durante 8 dias, a taxa de prenhez foi calculada pelo número de vacas prenhes/vacas inseminadas. A suplementação com MPDR não alterou a taxa de prenhez (GC = 64,83% vs. GM = 60,01%) e causou uma modulação na temperatura interna (mediana GC = 39,63°C vs. GM = 39,38°C) nos momentos em que houve um aumento da temperatura ambiental. Em conclusão, 3g de metionina protegida da degradação ruminal modula a temperatura interna de vacas Nelore submetidas a ambientes com altas temperaturas e umidade, mas não afeta a taxa de prenhez.

Palavras-chave: estresse térmico; termorregulação; bovinocultura de corte; metionina; nutrição.

Abstract

IZQUIERDO, Vinicius de Souza. **Strategical supplementation effects with rumen-protected methionine on physiological and productive parameters of Nelore cows**. 2021. 40p. Dissertation (Master degree in Sciences) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

The difficult to control high temperature and humidity index on bovines raised on pasture can affect the productive and reproductive efficiency of these animals, being necessary strategies to mitigate these effects. The aim of this dissertation was to evaluate the effects of rumen-protected methionine (RPM) supplementation on physiological and productive parameters of Nelore cows. On the study was used 563 multiparous Nelore cows, divided on two groups with three repetitions each, the control group (CG) and methionine group (MG), both were kept on tropical pastures with access to mineral supplementation, the MG had added to its supplementation 3g of RPM to 100g of supplement. The supplementation period was 77 days, 31 before the d0 of the fixed-time artificial insemination (FTAI) protocol, 11 during the protocol, and 35 until the pregnancy diagnosis. On protocol d0, accoupled to the intravaginal dispositive of progesterone, was put a datalogger on 142 animals, that measured the vaginal temperature each 30 minutes for eight days, the pregnancy rate was calculated by the number of pregnant cows/inseminated cows. The RPM supplementation did not affect the pregnancy rate (CG = 64.83% vs. MG = 60.01%) and had modulated the internal temperature (median CG = 39.63°C vs. MG = 39.38°C) in the moments that the environmental temperature increased. In conclusion, 3g of rumen-protected methionine modulate the internal temperature of Nelore cows submitted to high temperatures and humidity environments, but do not affect the pregnancy rate.

Keywords: heat stress; thermoregulation; beef cows; methionine; nutrition.

Lista de Figuras

Figure 1	Percentage of internal temperatures records from control and methionine group over 39.3°C (replicate 1).....	33
Figure 2	Percentage of internal temperatures records from control and methionine group over 39.3°C (replicate 3).....	33
Figure 3	Percentage of internal temperatures records from control and methionine group over 39.3°C (replicate 3).....	34

Lista de Tabelas

Table 1	Supplement intake, forage allowance, treetop area and minimum, average, and maximum THI of the control group and the methionine group during the three repetitions.....	31
Table 2	Body weight and body condition score distribution of CG and MG cows determined on d0.....	31
Table 3	Daily rainfall level, THI thresholds, and sensitivity and specificity of ROC curves of the control and methionine groups during the days of the replicates.....	32
Table 4	Conception rates determined 35 days after the artificial insemination of the control group and methionine group during the three replicates.....	33

Lista de Abreviaturas e Siglas

AT	Ambient Temperature
AU	Animal Unit
AUC	Area Under the Curve
BCS	Body Condition Score
CG	Control Group
DM	Dry Matter
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ET	Estresse Térmico
FTAI	Fixed-Time Artificial Insemination
GC	Grupo Controle
GM	Grupo Metionina
GPX	Glutathione Peroxidase
GRX	Glutarredoxina
HS	Heat Stress
HSP	Heat Shock Protein
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IT	Internal Temperature
ITU	Índice de Temperatura e Umidade
MDA	Malondialdeído
MET	Methionine

MG	Methionine Group
MPDR	Metionina Protegida da Degradação Ruminal
N	Number
PPD	Post-Partum Days
PT	Physiological Temperature
REP	Repetition
RH	Relative Humidity
ROC	Receiver Operating Characteristics
RPM	Rumen-Protected Methionine
SOD	Superóxido Dismutase
THI	Temperature-Humidity Index
TS	Thermal Stress
UCP 1	Uncoupling Protein 1

Sumário

1 Introdução.....	14
2 Revisão da Literatura.....	15
3 Artigo 1.....	20
4 Considerações Finais.....	35
Referências.....	36
Anexos.....	40

1 Introdução

O rebanho mundial bovino tem previsão de chegar a 1 bilhão de cabeças no ano de 2021, sendo o Brasil o segundo país com o maior número de cabeças, atrás somente da Índia, e o maior rebanho comercial com aproximadamente 244 milhões de animais no ano de 2020 (USDA, 2021). Entre os estados brasileiros, o estado do Pará é o quarto maior produtor, com estoque de 20,9 milhões de cabeça, e possui o primeiro e o quinto município com maior número de animais, São Félix do Xingú e Marabá, com 2,2 e 1,1 milhões de cabeça, respectivamente (IBGE, 2019). Além do grande estoque de bovinos, o Brasil é um dos maiores produtores de bezerros do mundo, com produção de mais de 51 milhões de bezerros em 2020, e crescimento de 2,0%/ano nos últimos dois anos (USDA, 2021), mostrando a importância do sistema de cria dentro da pecuária nacional.

O sistema de cria possui diversas variáveis que podem influenciar os resultados esperados, como fatores ambientais, nutricionais, genéticos e sanitários (Walsh et al., 2011; Sá Filho et al., 2009), e é preciso destacar a importância das condições climáticas na reprodução bovina em decorrência de algumas características desta espécie. Os bovinos são classificados como homeotérmicos, o que significa que sua temperatura corporal possui uma faixa de variação pequena, e alguns dos mecanismos utilizados para a geração e/ou perda de calor é através de trocas entre o animal e o ambiente. Esta termorregulação é prejudicada quando os animais estão submetidos a ambientes com altas temperaturas e umidades, através da diminuição da convecção e evaporação, podendo resultar em um aumento na temperatura corpórea dos animais além dos parâmetros fisiológicos, e ocasionar inúmeras respostas no organismo, o que é classificado como estresse térmico (ET; Johnson, 2018).

Cada vez mais são necessárias estratégias para amenizar o ET, visto que a temperatura global está em constante aumento, sendo o ano de 2019 o segundo mais quente em que se há registro, com aproximadamente 1,1°C a mais do que o período pré-industrial (WMO, 2020), este aquecimento possui forte impacto na reprodução, tanto de vacas de corte quanto de leite (Hansen and Fuquay, 2020), através de uma piora na qualidade do oócito, embrião e, por consequência, diminuição da taxa de prenhez (Amundson et al., 2006).

2 Revisão da Literatura

O estresse é classificado como um evento ou uma condição que é capaz de gerar uma tensão, ou esforço excessivo em um sistema biológico, por meio de agentes estressores que possuem variadas naturezas, podendo ser de origem infecciosa, ambiental ou social (Collier et al., 2017). Os estresses causados pelo ambiente que mais acometem bovinos são os estresses térmicos, tanto o causado pelo frio, quanto pelo calor, sendo o segundo de maior importância em locais com clima tropical, como o Brasil, devido a prejuízos causados nos índices produtivos (Oliveira et al., 2019; Abdelnour et al., 2019).

Quando os animais estão expostos a agentes estressantes, estes produzem respostas para se proteger e minimizar os efeitos no organismo, sendo estas respostas divididas em dois tipos, de acordo com o período de exposição, a resposta ao estresse térmico agudo, em que os animais estão expostos por um período breve, e resposta ao estresse térmico crônico, onde o período de exposição a situações estressantes pode variar de dias até meses (Abdelnour et al., 2019; Miller-Cushon et al., 2019). Collier et al. (2017) descreve que a principal diferença entre os tipos de resposta, é que a resposta aguda é controlada pelo sistema nervoso autônomo, através da liberação de glicocorticoides e catecolaminas capazes de alterar o metabolismo, enquanto a resposta crônica é guiada pelo sistema endócrino, associado a alterações populacionais dos receptores, alterando a sensibilidade dos tecidos a marcadores homeostáticos, causando um novo estado fisiológico.

Animais sob situações de ET, independente se agudo ou crônico, iniciam variadas respostas celulares e moleculares, e em decorrência da exposição ao estresse calórico, há o início de uma superprodução de metais de transição, através de um aumento na taxa de ferro liberado da ferritina. O desequilíbrio entre prótons e elétrons acarreta um mal funcionamento da cadeia respiratória mitocondrial, além de que, estes metais podem doar elétrons para o oxigênio, formando diversos tipos de espécies reativas de oxigênio (ERO). A mitocôndria é a principal fonte celular de

ERO, e os principais são o superóxido, peróxido de hidrogênio e o peroxinitrito (Slimen et al., 2015; Abdelnour et al., 2019; Cadenas, 2018).

O aumento das espécies reativas de oxigênio é uma das maneiras que o ET causa o estresse oxidativo, o outro caminho é através da alteração da atividade enzimática antioxidante. O estresse calórico causa uma diminuição na ação das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e glutarredoxina (GRX) e na tentativa de combater o estresse oxidativo há um aumento na concentração plasmática da enzima superóxido dismutase (SOD) e do biomarcador malondialdeído (MDA; Slimen et al., 2015; Abdelnour et al., 2019).

Além da resposta mitocondrial, o ET causa alterações na resposta celular, através da modulação das reações metabólicas, alterações na fluidez e estabilidade de membrana, ativando, ainda, os mecanismos de necrose e apoptose celular (Slimen et al., 2015; Abdelnour et al., 2019). Em resposta aos danos celulares o organismo inicia a produção das proteínas do choque térmico (HSP), que são proteínas sintetizadas intracelularmente, e possuem o objetivo de tentar inibir a agregação de células e proteínas desnaturadas. As HSPs são classificadas de acordo com os seus pesos moleculares, sendo a HSP70 e a HSP90, as duas proteínas mais produzidas e com maiores respostas frente ao estresse calórico (Hooper et al., 2018; Pires et al., 2019).

Quando há elevação da temperatura corporal diversas funções ficam comprometidas, principalmente quando se trata da reprodução, em que a hipertermia dos testículos e do ambiente em que os oócitos se encontram, pode causar prejuízos aos gametas masculinos e/ou femininos (Hansen, 2004). Buscando reverter esta hipertermia, o organismo aumenta a expressão destas HSPs, pois além da proteção celular, estas são capazes de auxiliar na diminuição da temperatura corporal, através do aumento da frequência respiratória e por isso manter a ingestão de alimentos adequada (Abdelnour et al., 2019). Devido a capacidade citoprotetora e termorregulatória, a HSP70 está sendo estudada e apontada como um potencial marcador genético para a termorresistência (Hassan et al., 2019).

Em decorrência destas alterações celulares e moleculares, o metabolismo dos bovinos sofre diferentes impactos do estresse calórico, ocorrendo uma diminuição da ingestão de alimento e alteração no comportamento alimentar (Miller-Cushon et al., 2019), há diminuição na quantidade e qualidade do leite (Guo et al., 2018), alterações na qualidade de carcaça (Zhang et al., 2020), diminuição na taxa

de prenhez de vacas leiteiras (Cook et al., 2007) e de corte (Amundson et al., 2006), e quando o ET acomete vacas prenhes há alterações na performance e imunidade da progênie futura (Dahl et al., 2016; Rhoads 2020).

Na tentativa de excluir os efeitos decorrentes da redução da ingesta alimentar causada pelo estresse térmico, foram realizados diversos estudos alimentando os animais em pares, onde os animais em situações termoneutras ingeriram a mesma quantidade de alimento que os animais em ET. Em um estudo realizado por Baumgard e Rhoads (2013) foi possível observar que animais em estresse calórico reduziram a produção de leite, e isto ocorreu em decorrência de uma menor lipomobilização após a redução alimentar, pois estes animais ao invés de utilizarem ácidos graxos não esterificados como fonte de energia, utilizaram tecido muscular através do fornecimento de aminoácidos. Em um estudo de Koch et al. (2019) foi observado que o estresse térmico também causa diminuição na integridade da membrana intestinal de bovinos, causando um acúmulo de células de defesa no intestino delgado destes animais.

Em relação a reprodução, o ET diminui a quantidade de animais com ciclo estral de 21 dias, tornando-o mais curto, e estes apresentam maiores taxas de co-dominância folicular (Torres-Júnior et al., 2008), além de diminuir a duração e expressão do cio, aumentando o risco de não observação para 80% (Hansen & Fuquay, 2020). O macho também sofre com os efeitos do estresse calórico, através de alterações na cromatina, diminuição da concentração e motilidade espermática (Rahman et al., 2018; Hansen & Fuquay, 2020) e diminuição na quantidade de antioxidantes no plasma seminal, sendo os touros jovens mais suscetíveis ao ET quando comparados com animais mais velhos (Morrel, 2020). As altas temperaturas no momento da ovulação e implantação do embrião também são prejudiciais, visto que o resfriamento do folículo próximo a ovulação possui correlação positiva com o potencial de prenhez (López-Gatius & Hunter, 2020), e que vacas leiteiras expostas ao ET chegam a ter a taxa de concepção ao primeiro serviço menor que 10%, com o desenvolvimento embrionário os efeitos vão diminuindo, pois o embrião adquire resistência ao estresse calórico a partir do estágio de mórula (Hansen & Fuquay, 2020).

A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) é uma das biotécnicas reprodutivas mais utilizadas mundialmente, e o número de animais submetidos vem crescendo anualmente no Brasil (Sartori et al., 2016). A IATF é uma estratégia

comprovada para melhorar os ganhos genéticos, melhorar a eficiência reprodutiva de rebanhos de corte, diminuir o manejo, visto que não há necessidade de observação de cio, além de concentrar a parição e o desmame dos bezerros (Baruselli et al., 2017). A biotécnica ocorre geralmente nos períodos com incidência de temperaturas elevadas, pois é o período em que há uma maior oferta de pastagens (Pessoa et al., 2018). Pensando em manter os benefícios citados, e em amenizar os prejuízos causados pelo estresse térmico, é necessário o uso de estratégias para mitigar os efeitos do ET em vacas de corte, principalmente nas submetidas a IATF.

A utilização de estratégias para atenuar os efeitos do estresse calórico pode ocorrer de várias formas, sendo elas através do manejo, instalações ou estratégias nutricionais. A radiação solar direta é prejudicial aos animais, e pode ser facilmente amenizada através da utilização de sombras, de forma natural como a utilização de árvores, ou artificial, através da construção de sombrites, sempre preconizando pelo fornecimento de área sombreada correto para que não haja disputa entre os animais (Brown-Brandl et al., 2005; Renaudeau et al., 2011; Oliveira et al., 2019; Edwards-Callaway et al., 2020). O uso de estratégias nutricionais para mitigar os efeitos do ET vem crescendo nos últimos anos, Colombo et al. (2019) mostraram que o uso de um alimento imunomodulatório para bovinos em terminação foi capaz de diminuir a temperatura vaginal, apesar de não mostrar resposta nas variáveis produtivas. Em um estudo realizado por Dominguez et al. (2020) a suplementação com metionina protegida da degradação ruminal (MPDR) causou uma diminuição da temperatura vaginal nos períodos com altos valores do índice de temperatura e umidade (ITU), com os animais suplementados possuindo maior ganho médio diário e uma tendência a terem folículos maiores que os animais não suplementados.

O uso de metionina em outras espécies como uma estratégia para atenuar o ET é amplamente utilizado, em codornas em situação de estresse calórico a suplementação com metionina causou uma diminuição da expressão da proteína desacopladora 1 (UCP1; Del Vesco et al., 2014), assim como em frangos de corte a sua suplementação elevou a expressão da glutatona sintetase (Del Vesco et al., 2015). Hasek et al. (2010) observou que em ratos em situação de restrição dietética de metionina, houve um aumento na expressão de UCP 1, das taxas de respiração celular, e por consequência um aumento da temperatura corporal.

A MPDR em bovinos leiteiros já tem o seu uso comprovado, com melhoras na produção de leite (Vyas & Erdman, 2009), diminuição da inflamação e do estresse oxidativo (Batistel et al., 2018) e manutenção dos níveis de proteína e gordura do leite em condições de estresse (Pate et al., 2020). Em bovinos de corte a utilização de MPDR vem sendo estudada, sendo avaliado o seu uso em situações de estresse, como o condicionamento dos animais pré transporte, mostrando que a sua suplementação afeta a produção de ERO, e aumenta a metilação do DNA (Alfaro et al., 2020), Lopes et al. (2019) verificou que a suplementação de MPDR não afeta a resposta humoral entre novilhas vacinadas, e Dominguez et al. (2020) avaliou a suplementação sob os parâmetros reprodutivos de novilhas Brangus.

O estresse calórico causa perdas financeiras significativas, no ano de 2003 St-Pierre et al. estimaram que o ET causou um prejuízo de mais de U\$370 milhões na indústria da carne, somente nos Estados Unidos da América. Embora o ET cause prejuízos econômicos, há a necessidade de verificar como o investimento com a tecnologia escolhida pode ser retornado para o produtor. Pensando nisto foi realizado um cálculo de retorno de investimento da suplementação com MPDR (Smartamine[®] M, Adisseo, Antony, França), com a dose diária de 3g/vaca, em um período de suplementação de 77 dias, 31 antes do protocolo de IATF, 11 durante o protocolo e 35 entre a inseminação e o diagnóstico de gestação, em um exemplo para um rebanho com 100 vacas de cria, utilizando a cotação do CEPEA (2021), do dia 15 de janeiro de 2021 para padronizar os valores de bezerro, em dólares, e peso médio bezerro, em Kg, para o estado do Mato Grosso do Sul.

O custo da suplementação por vaca/dia é de U\$0,045, com um total de U\$4,50 para o rebanho/dia e U\$346,50 para o rebanho durante todo o período de suplementação. Considerando o peso corporal a desmama de 205,17Kg, o valor por Kg de bezerro é U\$2,39, e o bezerro custa U\$490,74, sendo necessário 0,71% a mais de bezerras nascidos para que a suplementação com Smartamine[®] tenha os seus custos igualados a receita, e a partir disto aumentar o retorno para os produtores.

3 Artigo

Rumen-protected methionine modulates the body temperature of Nelore cows in hot and humid environments

Autores

Vinicius de Souza Izquierdo, Bernardo da Silva Menezes, Edgard Gonçalves Malaguez, Fernanda Lopes, Fabricio Molina Pereira, Cassio Cassal Brauner, Francisco Augusto Burket Del Pino, Viviane Rohrig Rabassa, Josiane de Oliveira Feijó, Antônio Amaral Barbosa, Eduardo Schmitt, Marcio Nunes Corrêa

Submetido à revista Tropical Animal Health and Production

1 **Rumen-protected methionine modulates the body temperature of Nelore cows in**
2 **hot and humid environments**

3
4 Vinicius de Souza Izquierdo ^{a*}, Bernardo da Silva Menezes ^a, Edgard Gonçalves
5 Malaguez ^a, Fernanda Lopes ^b, Fabricio Molina Pereira ^c, Cassio Cassal Brauner ^a,
6 Francisco Augusto Burket Del Pino ^a, Viviane Rohrig Rabassa ^a, Josiane de Oliveira Feijó
7 ^a, Antônio Amaral Barbosa ^a, Eduardo Schmitt ^a, Marcio Nunes Corrêa ^a.

8 ^a *Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), Universidade Federal*
9 *de Pelotas, CEP: 96010-610, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil*

10
11 ^b *Adisseo Brasil, CEP: 05804-900, São Paulo, São Paulo, Brazil*

12
13 ^c *Molina Assessoria Pecuária, CEP: 68502-370, Marabá, Pará, Brazil*

14
15 **ABSTRACT**

16
17 The adverse impacts of global climate on livestock production systems require the
18 implementation of mitigating strategies. The aim of this study was to evaluate the
19 effects of dietary supplementation of rumen-protected methionine (RPM) on the body
20 temperature and conception rate of Nelore cows exposed to high temperature and
21 humidity index (THI) values. A total of 563 multiparous Nelore cows were divided in
22 two treatments, with three replicates each, the control group (CG) and methionine
23 group (MG). Both groups were kept on tropical pastures and received a mineral
24 supplement. The MG group was supplemented with 3 g RPM/100g of supplement for
25 77 days. On FTAI protocol d0, a datalogger was coupled to the intravaginal
26 progesterone device of 142 animals to record vaginal temperature every 30 minutes
27 for eight days. Conception rate was calculated as the number of pregnant
28 cows/inseminated cows. RPM supplementation did not affect the conception rate (CG
29 = 64.36% vs. MG = 58.19%, P>0.05), but MG cows had lower vaginal temperature
30 compared with CG cows (median CG = 39.63°C vs. MG = 39.38°C, P<0.0001) in
31 moments with high THI values. In conclusion, the supplementation of rumen-protected
32 methionine modulates the internal body temperature and changes the critical THI
33 threshold of Nelore cows submitted to high-THI environments, but does not affect
34 conception rate.

35
36 **1. Introduction**

37 The global temperature has continuously increased in the last decades. In 2019 the
38 global average temperature was 1.1° C higher than during the pre-industrial period,

39 and the second warmest year on record (WMO, 2020). Livestock directly suffer the
40 impacts of global warming, causing heat stress (HS) in particular. Heat stress negatively
41 affects milk yield, worse meat quality, both male and female reproductive
42 performance, as well as physiological functions (Less et al., 2019; Zhang et al., 2020;
43 Guo et al., 2018; Rahman et al., 2018. López-Gatius and Hunter, 2020).

44 Nelore cattle and its crosses account for almost 80% of the Brazilian herd (Carvalho et
45 al., 2014). Their thermoregulatory mechanisms and cell resistance to high
46 temperatures (Hansen, 2004) are required for the production of grazing beef cattle in
47 tropical regions, where HS imposes a significant limitation for cattle production in this
48 environment (Oliveira et al., 2019).

49 During the last few decades, the parameters used to measure HS in the environment
50 and in animals include the temperature-humidity index (THI), respiratory and heart
51 rate monitoring, and internal body temperature (IT) control (Dikmen and Hansen,
52 2009; Kaufman et al., 2018; Ji et al., 2020). These tools aids producers in making
53 decisions as to the strategic timing and actions to mitigate HS, such as providing
54 shaded areas for cattle grazing on pastures or in feedlots (Grandin, 2016; Van Laer et
55 al., 2014). Nutritional strategies, including the dietary supplementation of vitamin E,
56 methionine, and betaine, are also applied to alleviate HS effects, thereby improving
57 cattle production and reproduction performance (Zhang et al., 2020; Negrón-Pérez, et
58 al., 2019).

59 Methionine (MET) is an essential amino acid, that is, it is not produce endogenously,
60 and therefore, must be supplied by the diet. Studies in rats submitted to dietary
61 methionine restriction showed several metabolic changes, such as increases in body
62 temperature, cell respiration rate, and expression of the uncoupling protein 1 (UCP 1;
63 Patil et al., 2015; Hasek et al., 2010).

64 The benefits of rumen-protected methionine (RPM) were proven in dairy cows by the
65 increase in milk yield and quality (Vyas and Erdman, 2009). In beef cows, RPM lowered
66 IT and increased BW and follicle size of Brangus heifers (Dominguez et al., 2020), and
67 reduced stress during transportation (Alfaro et al., 2020). Studies have also shown that
68 the supplementation of beef cow diets with a methionine hydroxy analogue increased
69 pre-weaning growth (Palmer et al., 2020) and changed muscle gene expression (Liu et
70 al., 2020) of their offspring.

71 The aim of this study was to evaluate the effects of the supplementation with rumen-
72 protected methionine on the vaginal temperature and conception rates of Nelore cows
73 exposed to high THI values.

74

75 **2. Material and methods**

76 The experiment was conducted on a commercial beef farm, located in São Domingos
77 do Araguaia, PA, Brazil (5° 31' 39" S, 48° 49' 18" W), between November 2019 and
78 March 2020.

79 All animals were cared according to experimental protocols approved by Animal
80 Experimentation Ethics Committee of the Federal University of Pelotas (UFPEL), under
81 protocol number 5069.

82 2.1 Animals and supplementation

83 On d-31 before d0 of the fixed-time artificial insemination (FTAI) protocol, 562
84 multiparous lactating Nelore (*Bos indicus*) cows were stratified according to their post-
85 partum days (PPD) into two treatments in three different moments, the first replicate
86 started in November, the second in December and the third in January, and then
87 distributed in different paddocks of cultivated tropical pastures (*Brachiaria*
88 *decumbens*, *Brachiaria humidicola*, and *Panicum maximum*), and were offered a
89 mineral salt supplement *ad libitum* at an expected supplement intake of
90 100g/head/day on both groups.

91 The paddocks were distributed on all the farm fields and they had different sizes, with
92 an average of 31.12 ± 10.47 hectare of size. The days that each replicate was kept in
93 each paddock were according to the farm management, with an average of 17.77 ± 7.94
94 days.

95 Cows randomly assigned to two treatments, with three replicates each. The Control
96 Group (CG; n= 275) received the mineral salt with no methionine, whereas in the
97 Methionine Group (MG; n= 287), the mineral salt was supplemented with rumen-
98 protected methionine (Smartamine[®] M, Adisseo, Antony, France) at the dose 3g RPM/
99 100g of mineral salt. Smartamine[®] M contains 75% DL-Met, which is physically
100 protected by a pH-sensitive coating, and 80% Met bioavailability (Ordway et al., 2009).
101 Therefore, the MG cows were supplemented with 1.8g metabolizable MET for each 3g
102 of Smartamine[®].

103 The supplement was provided twice weekly. Before the supplement was distributed,
104 supplement residues in the feeder were weighed, and 5-g sample of the residue was
105 collected and analyzed for dry matter (DM) content for the calculation of daily
106 supplement intake. Average daily supplement intake is shown in Table 1.

107 Cows were supplemented until d46, when pregnancy diagnosis was made, totaling 77
108 days of supplementation, that is, cows were supplemented for 31d before the FTAI
109 protocol, 11d during the FTAI, and 35d between FTAI and pregnancy diagnosis. The
110 distribution of animals among the repetitions were the following: CG1 n=85, MG1 n=
111 100; CG2 n= 97, MG2 n= 100; CG3 n= 93, MG3 n= 87.

112 2.2 Forage allowance

113 Forage allowance was evaluated on the day the cows were introduced in each
114 paddock. The double sampling method of NRPH (2003) was used to applied estimate
115 forage mass and the results were expressed in kilograms DM/hectare (kg DM/ha).
116 Forage allowance per animal unit (AU)per day was calculated as total forage mass

117 divided by the number of AU and number of days the cows grazed in each paddock.
118 The results are expressed in kg DM*AU⁻¹/d and shown in Table 1.

119 2.3 Environmental parameters

120 Environmental temperature (ET; °C) and relative humidity (RH; %) data were collected
121 every 30 minutes using a datalogger (Hygrochron[®] DS 1923; Ibutton[®], *Thermochron*,
122 Whitewater, USA), with ±0.5°C accuracy in the range of -10°C to +65°C, and RH range
123 of 0-100%. The datalogger was placed near the experimental areas.

124 Temperature-humidity index (THI) was calculated according to the equation described
125 by Dikmen and Hansen (2009):

$$126 \text{ THI} = (1.8 * \text{ET} + 32) - [(0.55 - 0.0055 * \text{RH}) * (1.8 * \text{ET} - 26)].$$

127 2.4 FTAI protocol and pregnancy diagnosis

128 All cows were submitted to an identical FTAI protocol and managed as a single group.
129 Cows received 2.00 mg estradiol benzoate IM (Gonadiol[®]; Zoetis; São Paulo, Brazil) and
130 an intravaginal implant with 1.90 mg progesterone (CIDR[®]; Zoetis; São Paulo, Brazil) on
131 d0. Nine days later (d9), after implant withdrawal, cows were injected by IM route with
132 0.48 mg cloprostenol sodium (Estron[®]; Agener União; São Paulo, Brazil), 300 IU equine
133 chorionic gonadotropin (Novormon[®]; Zoetis; São Paulo, Brazil), and 1.0 mg estradiol
134 cypionate (E.C.P.[®]; Zoetis; São Paulo, Brazil).

135 Artificial insemination was performed on d11 by a single inseminator. Semen was
136 randomly distributed among to the cows according to the farm's management.
137 Pregnancy diagnosis was performed 35 days after AI (d46) by ultrasound (DP-2200
138 Vet[®]; Mindray; Shenzhen, China) to calculate conception rates.

139 2.5 Body weight and body condition score

140 At the three replicates, all the cows were weighed on d0, and their BW used to
141 calculate animal load at each paddock, expressed in AU/ha. Body condition score (BCS)
142 was evaluated by a trained person on d0, using a 1-5 scale, where 1 is very lean and 5
143 is very fat (Lowman et al., 1973). Body weight and BCS distribution of the experimental
144 cows evaluated on d0 is shown in Table 2.

145 2.6 Vaginal temperature

146 Between d0 and d9 of the FTAI protocol, cows remained with the progesterone device,
147 to which a datalogger (*Thermochron*[®] DS 1921H, Ibutton[®], *Thermochron*, Whitewater,
148 USA) was attached to monitor vaginal temperature (VT) every 30 min, totaling 48
149 readings/d. The first and the last day (d0 and d9) were removed from the analyses as
150 cow handling may have influenced temperature readings. Therefore, VT was
151 monitored for a total of 8 days, and 384 readings/cow were obtained. VT was
152 measured in 142 cows (34 of CG1, 29 of MG1, 8 of CG2, 21 of MG2, 26 of CG3, and 24
153 of MG3). In total, 54,528 VT records were obtained in all the three replicates of each
154 treatment.

155 Vaginal temperatures were classified as thermal stress (TS) when $>39.3^{\circ}\text{C}$ and as
156 physiological temperatures (PT) when $\leq 39.3^{\circ}\text{C}$, according to Du Preez (2000) and then
157 based on that calculated the critical THI threshold per day.

158 2.7 Shade measurements

159 Shade area was calculated based on treetop area measurements using a program that
160 shows a satellite view of the pastures (Auravant[®], Buenos Aires, Argentina). All treetop
161 areas were measured per paddock, and the results are expressed in m^2/AU .

162 2.8 Statistical analyses

163 Data was analyzed according to completely randomized design with two treatments
164 (CG vs. MG), three replicates (Rep1, Rep2 and Rep3), and the individual was as
165 experimental unit.

166 The statistical analyses were performed using the JMP 15 software (SAS Institute Inc.
167 Cary, NC, USA). All variables were tested for normality by the Shapiro-Wilk test, except
168 for temperature variables, which were submitted to the Anderson-Darling test due to
169 sample size. Conception rates were analyzed by the Chi-square test. Treetop area was
170 evaluated by two-way analysis of variance (ANOVA) without replication.

171 Vaginal temperature results were submitted to the non-parametric Kruskal Wallis test
172 to determine if the distribution of the samples is similar, Mann-Whitney test to
173 determine VT frequency score is equal between groups, and independent-samples
174 median test to verify if the median is equal between treatments. To evaluate if cows
175 with TS vaginal temperature ($>39.3^{\circ}\text{C}$; Du Preez, 2000) could be discriminated as a
176 function of THI, Receiver Operating Characteristics (ROC) plots were built, and the area
177 under the curve (AUC) was calculated for each day, at 5% of significance level to
178 determine the critical THI threshold for each group per replicate per day.

179 **3. Results**

180 Minimum, average, maximum THI values recorded per replicate are shown in Table 1.
181 The highest and lowest THI values were obtained in Rep3 (72.76 and 83.28,
182 respectively). The treetop area did not differ between the paddocks ($P>0.05$; Table 1).
183 The daily incidence of rain is shown in Table 3.

184 According to independent-sample median test, lower median VT was determined in
185 MG1 compared with CG1 ($P=0.015$), and in MG2 and MG3 compared with CG2 and
186 CG3, respectively ($P>0.0001$). Both in the Mann-Whitney and in the Kruskal-Wallis
187 tests, MG ranked lower than CG in all replicates ($P<0.0001$).

188 Considering that each replicate presented different environmental conditions, ROC
189 curves were realized per replicate per day.

190 Replicate 1

191 Higher critical THI thresholds were observed on d3 and d8, and lower on d1 in MG
192 compared with CG, whereas there were no THI threshold differences between
193 treatments on the other days evaluated (Table 3). As a result of THI thresholds

194 differences on d1, d3, and d8, MG cows were exposed longer to THI above their critical
195 threshold on d1, and CG cows on d3 and 8.

196 The number of CG cows with VT indicative of heat stress (>39.3°C) was higher
197 compared with that of the MG cows (Figure 1) on six out of the eight days evaluated.
198 Moreover, 100% of CG cows showed VT >39.3°C on d3 and d4, whereas this
199 proportion was not reached in MG cows in any of days.

200 Replicate 2

201 Higher critical THI thresholds were observed on d1, d3, and d7, and lower on d2, d4,
202 d5, and d8 in MG compared with CG, whereas no differences were detected on d6
203 (Table 3). MG cows were exposed longer to THI above their critical thresholds on d2,
204 d4, d5, and d8, and lower on d1, d3 and d7 than CG cows.

205 Compared with the CG, the number of MG cows with VT >39.3°C was lower during the
206 evaluated days, except for d2, which was higher than CG (Figure 2).

207 Replicate 3

208 Higher critical THI threshold values were calculated for MG than for CG on d1 and d8,
209 and for CG compared with MG on d3 and d4, while no differences were observed on
210 d2, d5, d6, and d7 (Table 3). MG was exposed longer to THI above the threshold on d 3
211 and d4 and CG on d1 and d8.

212 A higher percentage of MG cows with VT >39.3°C was recorded on d5 and d6
213 compared with CG, representing differences of 0.17% and 0.58%, respectively,
214 whereas on the other days evaluated, the opposite was observed (Figure 3).

215 No conception rate (Table 4) differences were detected between treatments or among
216 replicates ($P>0.05$).

217

218 Discussion

219 Supplement intake results showed that the intake of 3g of Smartamine®/head/d was
220 ensured for MG cows. Considering that Smartamine® contains 76% DL-methionine, and
221 that 80% of DL-methionine is absorbable (Ordway et al., 2009), MG cows possibly
222 absorbed at least 1.8g MET in the small intestine.

223 The efficiency of maintaining constant body temperature in cattle is influenced by
224 environmental temperature and humidity changes. Cattle lose body heat primarily by
225 evaporation, and in high-THI environments, this mechanism is not highly effective,
226 increasing heat load, which results in heat stress (Almeida et al., 2020). The THI values
227 obtained in the present experiment indicate the cows were under moderate to high
228 HS. Studies demonstrated that pregnancy rate is reduced when Nelore cows as
229 exposed when $THI>75.7$ (Cordeiro et al., 2019) and when *Bos taurus* beef cows are
230 maintained at $THI>73$ (Amundson et al., 2006). Our study showed that, the THI
231 threshold value for vaginal temperature of Nelore cows is higher, with values higher
232 than 80 in some days, than those mentioned in studies on pregnancy rate.

233 Lower VT was recorded in the MG cows, as preciously determined by Dominguez et al.
234 (2020) in Brangus heifers fed 4g RPM. This result may be explained by the regulation of
235 thermogenin (UCP-1), a thermogenic protein, by methionine. Rats fed a methionine-
236 restricted diet showed higher UCP-1 expression and higher body temperature than
237 those not submitted to methionine restriction (Hasek et al., 2010).

238 In the present study, only in 20.83% of the days the MG had greater number of VT
239 records over PT than CG, and in 29.17% of the days the MG had a greater number of
240 cows with VT over PT, demonstrating that RPM effectively controlled VT in cows in HS
241 environments.

242 Shade is an important tool to mitigate HS effects, and different shade types affect
243 cattle internal body temperature (Oliveira et al., 2019). Shade influences physiological
244 parameters, such body core temperature and respiration rate of unshaded animals
245 exposed to THI values ≥ 78 (Brown-Brandl et al., 2005). Although treetop area was not
246 statistically different among paddocks, it was numerically larger in CG1, CG2 and MG3
247 compared with MG1, MG2 and CG3, respectively, which may have reduced the heat
248 challenge on those cows. The measured treetop area was larger than the minimum
249 recommended for grazing cattle, Armstrong (1994) determined at least 5.6m²/cows
250 reared in hot and wet environments, while Van Laer et al. (2014) recommended
251 3.28m² of lying space at shade for 700-kg beef cows. It should be mentioned, however,
252 that shade is more effective to mitigate heat stress in environments with high
253 temperature and low humidity than when both temperature and humidity are high
254 (Renaudeau et al., 2011), such as the conditions of our experiment.

255 We expected pregnancy rate improvement with RPM supplementation because
256 previous studies from our group showed that Brangus heifers supplemented with RPM
257 had larger follicles those not supplemented (Dominguez et al., 2020), and Toledo et al.
258 (2017) observed that feeding RPM increased embryo diameter and volume in
259 multiparous Holstein cows. One of the factors that may explain the lack of pregnancy
260 rate differences between treatments was the high number cows with low BCS on d0 of
261 the FTAI protocol, which was ≤ 2.5 in more than 35% of the cows of all replicates.
262 Pfeifer et al. (2017) mentioned that cows with moderate to good BCS ($2.75 \leq \text{BCS} \leq$
263 4.25) tend to be more fertile than those outside this interval. In addition, D'Occhio et
264 al. (2018) verified that, compared with cows with 3.0-3.5 BCS, those with 2.0-2.5 BCS
265 have lower insulin and glucose blood levels, which have a direct impact on cow
266 reproduction.

267 **Conclusion**

268 The supplementation of 3 g of rumen-protected methionine modulates the body
269 temperature and changes the critical THI threshold of Nelore cows submitted to high-
270 THI environments, but does affect pregnancy rate.

271 **References**

272 Alfaro G.F.; Novak T.E.; Rodning S.P.; Moisés S.J. (2020) Preconditioning beef cattle for
273 long-duration transportation stress with rumen-protected methionine
274 supplementation: A nutrigenetics study. PLoS ONE 15(7): e0235481.

275 Almeida, J.V.N., Marques, L.R., Marques, T.C., Guimarães, K.C.; Leão, K.M. Influence of
276 thermal stress on the productive and reproductive aspects of cattle – Review.
277 Research, Society and Development, Vargem Grande Paulista- SP, v.9, n.7, p.1-29,
278 2020.

279 Amundson, J.L.; Mader, T.L.; Rasby, R.J.; Hu, Q.S. Environmental effects on pregnancy
280 rate in beef cattle. Journal of Animal Science, v.84, p.3415-3420, 2006.

281 Armstrong, D.V. Heat stress interaction with shade and cooling. Journal of Dairy
282 Science, Amsterdam, v.7, p.2044-2050, 1994.

283 Brown-Brandl, T.M.; Eigenberg, R.A.; Nienaber, J.A.; Hahn, G.L. Dynamic Response
284 Indicators of Heat Stress in Shaded and Non-shaded Feedlot Cattle, Part 1: Analyses of
285 Indicators. Biosystems Engineering, vo.90 (4), p451-462 (2005).

286 Carvalho M.E.; Gasparin G.; Poleti M.D.; Rosa A.F.; Balieiro J.C.C.; Labate C.A.; Nassu
287 R.T.; Tullio R.R.; Regitano L.C.A.; Mourão G.B.; Coutinho L.L. (2014) Heat shock and
288 structural proteins associated with meat tenderness in Nelore beef cattle, a *Bos*
289 *indicus* breed. Meat Sci 96:1318–1324. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.11.014>

290 Cordeiro, A.L.L.; Satrapa, R.A.; Gregianini, H.A.G.; Gregianini, J.T.F.; Maia, G.F.N.;
291 Landim-Alvarenga, F.C. Influence of temperature-humidity index on conception rate of
292 Nelore embryos produced in vitro in northern Brazil. Tropical Animal Health and
293 Production, 2019

294 Dikmen, S.; Hansen, P.J. Is the temperature-humidity index the best indicator of heat
295 stress in lactating dairy cows in a subtropical environment? Journal of Dairy Science,
296 Amsterdam, v.92, p.109-116, 2009.

297 D'Occhio MJ, Baruselli PS, Campanile G, Influence of nutrition, body condition, and
298 metabolic status on reproduction in female beef cattle: A review, Theriogenology
299 (2018).

300 Dominguez, J.H.; Lopes, M.G.; Machado, F.A.; Santos, E.; Lopes, F.; Feijó, J.O.; Brauner,
301 C.C.; Rabassa, V.R.; Corrêa, M.N.; Del Pino, F.A.B.; Schmitt, E. Body Temperature and
302 Reproductive Performance of Beef Heifers Supplemented with Rumen Protected
303 Methionine. Journal of Agricultural Studies, v.8, p.601-615, 2020.

304 Du Preez, J.H. Parameters for the determination and evaluation of heat stress in dairy
305 cattle in South Africa. Journal of Veterinary Research, Puławy- Polônia, v.67, p. 263-
306 271, 2000.

307 Grandin, T. Evaluation of the welfare of cattle housed in outdoor feedlot pens.
308 Veterinary and Animal Science, v.1, p.23-28, 2016.

309 Guo, J.; Gao, S.; Quan S.; Zhang, Y.; Bu, D.; Wang, J. Blood amino acids profile
310 responding to heat stress in dairy cows. *Asia-Australas J Anim Sci* 31, no. 1, 47-53
311 (2018).

312 Hansen, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress.
313 *Animal Reproduction Science* 82-83, 349-360 (2004).

314 Hasek, B.E.; Stewart, L.K.; Henagan, T.M.; Boudreau, A.; Lenard, N.R.; Black, C.; Shin, J.;
315 Huypens, P.; Malloy, V.L.; Plaisance, E.P.; Krajcik, R.A.; Orentreich, N.; Gettys, T.W.
316 Dietary methionine restriction enhances metabolic flexibility and increases uncoupled
317 respiration in both fed and fasted states. *American Journal of Physiology*, v.299, p.728-
318 739, 2010.

319 Ji, B.; Banhazi, T.; Perano, K.; Ghahramani, A.; Bowtell, L.; Wang, C.; Li, B. A review of
320 measuring, assessing and mitigating heat stress in dairy cattle, *Biosystems Engineering*,
321 <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2020.07.009> (2020)

322 Kaufman, J.D.; Saxton, A.M.; Ríus, A.G. Short communication: Relationships among
323 temperature-humidity index with rectal, udder surface, and vaginal temperatures in
324 lactating dairy cows experiencing heat stress. *Journal of Dairy Science*, Amsterdam,
325 v.101, p.6424-6429, 2018.

326 Lees, A. M.; Sejian, V.; Wallage, A. L.; Steel, C. C.; Mader, T. L.; Lees, J. C.; Gaughan, J. B.
327 2019. "The Impact of Heat Load on Cattle" *Animals* 9, no. 6: 322.

328 Liu, L.; Amorín, R.; Moriel, P.; DiLorenzo, N.; Lancaster, P.A.; Peñagaricano, F.
329 Differential network analysis of bovine muscle reveals changes in gene coexpression
330 patterns in response to changes in maternal nutrition. *BMC Genomics*, v. 21, 2020.

331 López-Gatius F.; Hunter R.H.F. Local cooling of the ovary and its implications for heat
332 stress effects on reproduction, *Theriogenology* (2020), doi: [https://doi.org/10.1016/](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.029)
333 [j.theriogenology.2020.03.029](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.029).

334 Lowman, B.G.; Scott, N.; Somerville, S., 1973. Condition scoring beef cattle. East of
335 Scotland College of Agriculture, 8.

336 NRPH, National Range and Pasture Handbook 2003

337 Negrón-Pérez, V.M.; Fausnacht, D.W.; Rhoads, M.L. Invited review: Management
338 strategies capable of improving the reproductive performance of heat-stressed dairy
339 cattle. *Journal of Dairy Science*, Amsterdam, v.102, p.10695-10710, 2019.

340 Oliveira, C.C.; Alves, F.V.; Martins, P.G.M.A.; Karvatte Junior, N.; Alves, G.F.; Almeida,
341 R.G.; Mastelaro, A.P.; Costa e Silva, E.V. Vaginal temperature as indicative of
342 thermoregulatory response in Nellore heifers under different microclimatic conditions.
343 *PLoS ONE*, v.10, 2019

344 Ordway, R. S.; Boucher, S.E.; Whitehouse, N.L.; Schwab, C.G.; Sloan, B.K. Effects of
345 providing two forms of supplemental methionine to periparturient Holstein dairy cows

346 on feed intake and lactational performance. *Journal of Dairy Science*, Amsterdam, v.92,
347 p.5154–5166, 2009.

348 Palmer, E.A.; Vedovatto, M.; Oliveira, R.A.; Gouvea, V.; Silva, H.M.; Vendramini, J.M.B.;
349 Moriel, P. Maternal supplement type and methionine hydroxy analogue fortification
350 effects on performance of BOS indicus-influenced beef cows and their offspring.
351 *Livestock Science*, v.240, 2020.

352 Patil, Y.N.; Dille, K.N.; Burk, D.H.; Cortez, C.C.; Gettys, T.W. Cellular and molecular
353 remodeling of inguinal adipose tissue mitochondria by dietary methionine restriction.
354 *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v.26, p.1235-1247, 2015.

355 Pfeifer, L.F.M.; Castro, N.A.; Neves, P.M.A.; Cestaro, J.P.; Siqueira, L.G.B. Development
356 and validation of an objective method for the assessment of body condition scores and
357 selection of beef cows for timed artificial insemination. *Livestock Science*, vo.197, p82-
358 87 (2017).

359 Rahman M.B.; Schellander K.; Luceño NúLlamas, Van Soom A. Heat stress responses in
360 spermatozoa: Mechanisms and consequences for cattle fertility, *Theriogenology*
361 (2018), doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.02.012

362 Renaudeau, D.; Collin, A.; Yahav, S.; Basilio, V.; Gourdine, J.L.; Collier, R.J. Adaptation to
363 hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. *The animal*
364 *consortium*, v.6, p. 707-728, 2011.

365 Toledo, M.Z.; Baez, G.M.; Garcia-Guerra, A.; Lobos, N.E.; Guenther, J.N.; Trevisol, E.;
366 Luchini, D.; Shaver, R.D.; Wiltbank, M.C. Effect of feeding rumen-protected methionine
367 on productive and reproductive performance of dairy cows. *PLoS ONE*, v.12, 2017.

368 Van Laer, E.; Moons, C.P.H.; Sonck, B.; Tuytens, F.A.M. Importance of outdoor shelter
369 for cattle in temperate climates. *Livestock science*, v.159, p. 87-101, 2014.

370 Vyas, D.; Erdman, R.A. Meta-analysis of milk protein yield responses to lysine and
371 methionine supplementation. *Journal of Dairy Science*, Amsterdam, v.92, p.5011-5018,
372 2009.

373 WMO - (World Meteorological Organization). WMO Statement on the State of the
374 Global Climate in 2019, n.1248, 2020.

375 Zhang M.; Dunshea, F.R.; Warner, R.D.; DiGiacomo K.; Osei-Amponsah, R.; Chauhan,
376 S.S. Impacts of heat stress on meat quality and strategies for amelioration: a review.
377 *Int J Biometeorol* 64, 1613–1628 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00484-020-01929-6>

Table 1. Supplement intake, forage allowance, treetop area and minimum, average, and maximum THI of the control group and the methionine group during the three repetitions

Replicate	Group	Supplement intake (g/head/d)	Forage mass (kg DM/AU/d)	Forage allowance (kg DM)/ha	Treetop area (m ² /AU)	Minimum THI	Average THI	Maximum THI
1	CG	91.18 ±8.70	96.02 ±16.49	3453.93 ±1309.58	397.38	74.73	78.12	82.98
	MG	99.45 ±8.25	64.29 ±23.33	3043.33 ±1242.82	99.32			
2	CG	114.98 ±8.47	45.80 ±20.20	3433.90 ±1634.65	371.03	74.14	78.29	82.68
	MG	98.53 ±8.70	59.30 ±16.49	3098.27 ±1846.28	110.53			
3	CG	101.21 ±11.13	58.94 ±20.20	2545.90 ±374.63	184.33	72.76	77.73	83.28
	MG	108.84 ±11.13	51.00 ±23.33	2327.33 ±425.18	345.14			

Note. Values expressed as means ± SD. Different letters in the same column indicate statistical difference (p <0.05)

Table 2. Body weight and body condition score distribution of CG and MG cows determined on d0.

Replicate	Group	Body weight (kg)	Body condition score (%)								
			1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	
1	CG	432.61 ±27.46	-	10.59	30.59	45.88	8.24	4.70	-	-	
	MG	437.59 ±19.59	-	10.00	36.00	39.00	13.00	2.00	-	-	
2	CG	448.70 ±18.86	-	6.19	39.18	41.24	8.25	5.14	-	-	
	MG	439.36 ±11.04	1.00	12.00	38.00	42.00	7.00	-	-	-	
3	CG	441.69 ±21.35	-	10.75	30.11	41.94	13.97	3.23	-	-	
	MG	462.16 ±23.16	-	2.30	33.33	44.83	13.79	4.60	-	1.15	

Note. Body weight values expressed as means ± SD. BCS expressed as % of the total number of cows per replicate

Table 3. Daily rainfall level, THI thresholds, and sensitivity and specificity of ROC curves of the control and methionine groups during the days of the replicates.

Replicate	Day	Rainfall	CG	MG
			THI Threshold (%Sensitivity/%Specificity)	THI Threshold (%Sensitivity/%Specificity)
1	1	-	80.67 (73.48/80.80)	80.14 (62.11/65.72)
1	2	10mm	78.17 (51.67/82.97)	78.17 (41.32/80.96)
1	3	-	78.40 (99.25/66.97)	79.71 (68.02/66.55)
1	4	-	80.48 (87.03/71.06)	80.48 (83.50/65.35)
1	5	6mm	79.32 (76.38/82.33)	79.32 (47.62/75.74)
1	6	-	78.11 (86.38/68.57)	78.11 (78.77/65.01)
1	7	6mm	75.17 (92.11/25.86)	75.17 (93.68/26.37)
1	8	12mm	75.97 (84.85/57.71)	77.75 (31.58/84.19)
2	1	9mm	76.12 (83.46/49.33)	76.28 (96.04/57.74)
2	2	-	79.78 (66.10/73.95)	79.65 (59.04/70.97)
2	3	-	78.94 (72.24/70.99)	79.26 (70.30/74.32)
2	4	-	80.28 (74.77/75.84)	79.78 (81.17/67.57)
2	5	-	80.28 (61.96/68.78)	80.21 (70.37/61.97)
2	6	45mm	79.65 (71.17/68.76)	79.65 (85.23/66.34)
2	7	-	76.66 (82.64/40.83)	79.65 (85.23/66.34)
2	8	30mm	77.33 (51.82/66.43)	76.77 (77.95/49.46)
3	1	-	79.19 (64.77/74.11)	79.25 (51.09/70.47)
3	2	72mm	77.14 (85.00/54.13)	77.14 (91.26/51.76)
3	3	22mm	76.02 (90.91/52.25)	75.87 (90.10/42.44)
3	4	-	80.28 (57.27/85.97)	77.28 (98.15/41.19)
3	5	20mm	76.93 (85.71/45.48)	76.93 (83.33/45.40)
3	6	-	76.77 (83.13/53.20)	76.77 (66.67/51.62)
3	7	9mm	77.39 (83.95/56.50)	77.39 (83.87/54.24)
3	8	11mm	79.58 (62.82/75.91)	80.75 (27.78/90.44)

Table 4. Conception rates determined 35 days after the artificial insemination of the control group and methionine group during the three replicates

Repetition	1		2		3	
Group	CG	MG	CG	MG	CG	MG
Pregnancy Rate	63.53%	55.00%	61.86%	53.00%	67.74%	67.82%
	(54/85)	(55/100)	(60/97)	(53/100)	(63/93)	(59/87)

Note. Values expressed as percentage. Different letter in a line indicates statistical difference

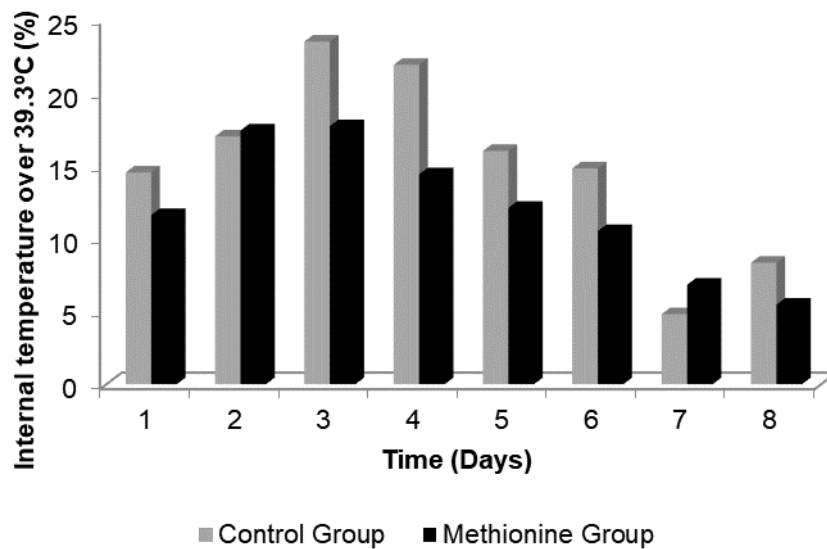


Figure 1. Percentage of internal temperatures records from control and methionine group over 39.3°C (replicate 1).

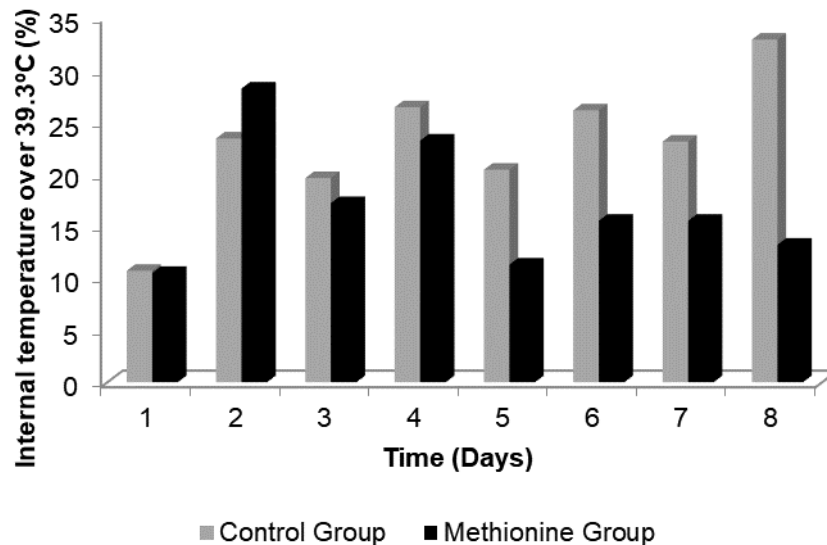


Figure 2. Percentage of internal temperatures records from control and methionine group over 39.3°C (replicate 2).

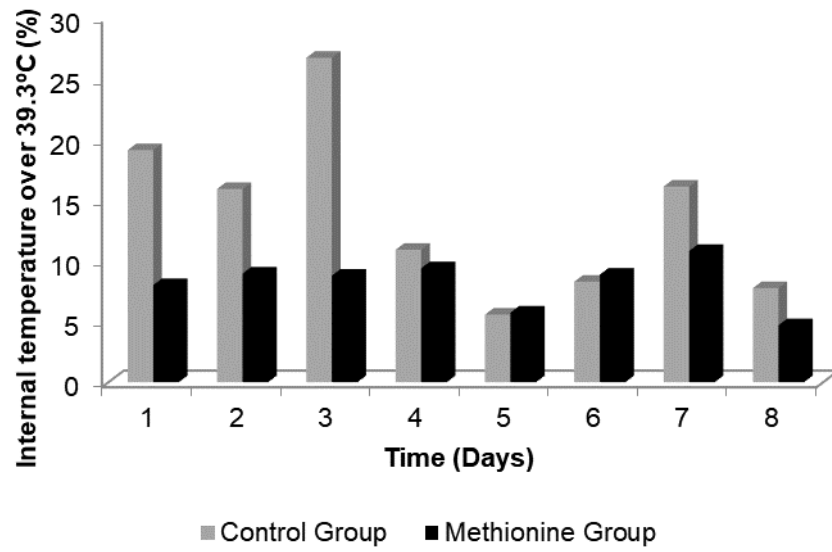


Figure 3. Percentage of internal temperatures records from control and methionine group over 39.3°C (replicate 3).

4 Considerações Finais

O uso da metionina protegida da degradação ruminal é uma importante alternativa para atenuar os efeitos causados pelo estresse térmico, através da redução da temperatura interna nos momentos de desafio. Apesar desta modulação da temperatura vaginal, não houve alteração nos parâmetros produtivos avaliados, sendo necessários mais estudos para entender melhor o mecanismo de ação da metionina em ruminantes, e seus possíveis efeitos na performance dos animais.

Referências

- ABDELNOUR, S.A.; EL-HACK, M.E.A.; KHAFAGA, A.F.; ARIF, M.; TAHA, A.E.; NORELDIN, A.E. Stress biomarkers and proteomics alteration to thermal stress in ruminants: A review. **Journal of Thermal Biology**, v.79, p.120-134, 2019.
- ALFARO G.F.; NOVAK T.E.; RODNING S.P.; MOISÁ S.J. Preconditioning beef cattle for long-duration transportation stress with rumen-protected methionine supplementation: A nutrigenetics study. **PLoS ONE**, v.15, n.7, 2020.
- AMUNDSON, J.L.; MADER, T.L.; RASBY, R.J.; HU, Q.S. Environmental effects on pregnancy rate in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.84, p.3415-3420, 2006.
- BARUSELLI, P.S.; FERREIRA, R.M.; COLLI, M.H.A.; ELLIFF, F.M.; SÁ FILHO, M.F.; VIEIRA, L.; FREITAS, B.G. Timed artificial insemination: current challenges and recent advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. **Proceedings of the 31st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society**, 2017.
- BATISTEL, F.; ARROYO, J.M.; GARCES, C.I.M.; TREVISI, E.; PARYS, C.; BALLOU, M.A.; CARDOSO, F.C.; LOOR, J.J. Ethyl-cellulose rumen-protected methionine alleviates inflammation and oxidative stress and improves neutrophil function during the periparturient period and early lactation in Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.101, N.1, p.480-490, 2018.
- BAUMGARD L.H, RHOADS R.P. Effects of heat stress on postabsorptive metabolism and energetics. **Annu. Rev. Anim. Biosci.** v.1, p.311–337, 2013.
- BROWN-BRANDL, T.M.; EIGENBERG, R.A.; NIENABER, J.A.; HAHN, G.L. Dynamic Response Indicators of Heat Stress in Shaded and Non-shaded Feedlot Cattle, Part 1: Analyses of Indicators. **Biosystems Engineering**, v.90, n.4, p451-462, 2005.
- CADENAS, S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. **BBA- Bioenergetics**, v.1859, p-940-950, 2018.
- CEPEA 2021. Indicador do bezerro ESALQ/BM&FBOVESPA – MATO GROSSO DO SUL. Disponível em: < <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/indicador/bezerro.aspx> > Acesso em: 15 de janeiro de 2021.
- COLLIER, R.J.; RENQUIST, B.J.; XIAO, Y. A 100-Year Review: Stress physiology including heat stress. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.10367-10380, 2017.
- COLOMBO, E.A.; COOKE, R.F.; MILLICAN, A.A.; SCHUBACH, K.M.; SCATOLIN, G.N.; RETT, B.; BRANDÃO, A.P. Supplementing an immunomodulatory feed ingredient to improve thermoregulation and performance of finishing beef cattle under heat stress conditions. **Journal of Animal Science**, v.97, n.10, p.4085-4092, 2019.
- COOK, N.B.; MENTINK, R.L.; BENNETT, T.B.; BURGI, K. The effect of heat stress and lameness on time budgets of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.1674-1682, 2007.

DAHL, G.E.; TAO, S.; MONTEIRO, A.P.A. Effects of late-gestation heat stress on immunity and performance of calves, **Journal of Dairy Science**, v.99, p.3193-3198, 2016.

DEL VESCO, A.P.; GASPARINO, E.; GRIESER, D.O.; ZANCANELA, V.; SOARES, M.A.M.; OLIVEIRA NETO, A.R. Effects of methionine supplementation on the expression of oxidative stress-related genes in acute heat stress-exposed broilers. **British Journal of Nutrition**, v.113, p549-559, 2015.

DEL VESCO, A.P.; GASPARINO, E.; ZANCANELA, V.; GRIESER, D.O.; GUIMARÃES, S.E.F.; NASCIMENTO, C.S.; VOLTOLINI, D.M.; CONSTANTIN, J.; GASPARIN, F.S. Acute heat stress and dietary methionine effects on IGF-I, GHR, and UCP mRNA expression in liver and muscle of quails. **Genetics and Molecular Research**, v.13, p7294-7303, 2014.

DOMINGUEZ, J.H.; LOPES, M.G.; MACHADO, F.A.; SANTOS, E.; LOPES, F.; FEIJÓ, J.O.; BRAUNER, C.C.; RABASSA, V.R.; CORRÊA, M.N.; DEL PINO, F.A.B.; SCHMITT, E. Body temperature and reproductive performance of beef heifers supplemented with rumen protected methionine. **Journal of Agricultural Studies**, v.8, p.601-615, 2020.

EDWARDS-CALLAWAY, L.N.; CRAMER, M.C.; CADARET, C.N.; BIGLER, E.J.; ENGLE, T.E.; WAGNER, J.J.; CLARK, D.L. Impacts of shade on cattle well-being in the beef supply chain. **Journal of Animal Science**, v.99, n.2, 2020.

GUO, J.; GAO, S.; QUAN S.; ZHANG, Y.; BU, D.; WANG, J. Blood amino acids profile responding to heat stress in dairy cows. **Asia-Australas J Anim Sci**, v.31, n.1, p.47-53, 2018.

HANSEN, P. J., & FUQUAY, J. W. Stress in Dairy Animals-Heat Stress: Effects on Reproduction. in **Reference Module in Food Science**, 2020.

HANSEN, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science**, v.82, p.349-360, 2004.

HASEK, B.E.; STEWART, L.K.; HENAGAN, T.M.; BOUDREAU, A.; LENARD, N.R.; BLACK, C.; SHIN, J.; HUYPENS, P.; MALLOY, V.L.; PLAISANCE, E.P.; KRAJCIK, R.A.; ORENTREICH, N.; GETTYS, T.W. Dietary methionine restriction enhances metabolic flexibility and increases uncoupled respiration in both fed and fasted states. **American Journal of Physiology**, v.299, p.728-739, 2010.

HASSAN, F.; NAWAZ, A.; REHMAN, M.S.; ALI, M.A.; DILSHAD, S.M.R.; YANG, C. Prospects of HSP70 as a genetic marker for thermo-tolerance and immunomodulation in animals under climate change scenario. **Animal Nutrition**, v.5, p.340-350, 2019.

HOOPER, H.B.; TITTO, C.G.; GONELLA-DIAZA, A.M.; HENRIQUE, F.L.; PULIDO-RODRIGUEZ, L.F.; LONGO, A.L.S.; SANTOS, T.M.C.L.; GERALDO, A.C.A.P.M.; PEREIRA, A.M.F.; BINELLI, M.; BALIEIRO, J.C.C.; TITTO, E.A.L. Heat loss efficiency and HSPs gene expression of Nellore cows in tropical climate conditions. **International Journal of Biometeorology**, v.63, p.1475-1486, 2018.

IBGE, **Produção Pecuária Municipal 2019**, v.47, p1-8, 2019.

JOHNSON, J.S. Heat stress: impact on livestock well-being and productivity and mitigation strategies to alleviate the negative effects. **Animal Production Science**, v.58, p.1404–1413, 2018.

KOCH, F.; THOM, U.; ALBRECHT, E.; WEIKARD, R.; NOLTE, W.; KUHLA, B. KUEHN, C. Heat stress directly impairs gut integrity and recruits distinct immune cell populations into the bovine intestine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.116, n.21, p.10333-10338, 2019.

LOPES, M.G.; DOMINGUEZ, J.H.E.; PETER, C.M.; SANTOS, E.; RODRIGUES, P.A.; RODRIGUES, P.R.C.; PICOLY, T.; CORRÉA, M.N.; SCHMITT, E.; LIMA, M.; FISCHER, G. Humoral immune response in beef heifers supplemented with mineral salt with or without the addition of rumen-protected methionine. **Semina: Ciências Agrárias**, v.40, n,6, p.3057-3068, 2019.

LÓPEZ-GATIUS F.; HUNTER R.H.F. Local cooling of the ovary and its implications for heat stress effects on reproduction. **Theriogenology**, v.149, p.98-103, 2020.

MILLER-CUSHON, E.K.; DAYTON, A.M.; HORVATH, K.C.; MONTEIRO, A.P.A.; WENG, X.; TAO, S. Effects of acute and chronic heat stress on feed sorting behaviour of lactating dairy cows. **Animal**, v.13, n. 9, p.2044-2051, 2019.

MORREL, J.M. Heat stress and bull fertility. **Theriogenology**, v. 153, p.62-67, 2020.

OLIVEIRA, C.C.; ALVES, F.V.; MARTINS, P.G.M.A.; KARVATTE JUNIOR, N.; ALVES, G.F.; ALMEIDA, R.G.; MASTELARO, A.P.; COSTA E SILVA, E.V. Vaginal temperature as indicative of thermoregulatory response in Nelore heifers under different microclimatic conditions. **PLoS ONE**, v.10, 2019.

PATE, R.T.; LUCHINI, D.; MURPHY, M.R.; CARDOSO, F.C. Effects of rumen protected methionine on lactation performance and physiological parameters during a heat stress challenge in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.103, n.3, 2020.

PESSOA, G.A., MARTINI, A.P., FILHO, M.F.S., RUBIN, M.I.B. Resynchronization improves reproductive efficiency of suckled Bos taurus beef cows subjected to spring-summer or autumn-winter breeding season in South Brazil. **Theriogenology**, v.122, p.14-22, 2018.

PIRES, B.V.; STAFUZZA, N.B.; LIMA, S.B.G.P.N.P.; NEGRÃO, J.A.; PAZ, C.C.P. Differential expression of heat shock protein genes associated with heat stress in Nelore and Caracu beef cattle. **Livestock Science**, v.230, p103839, 2019.

RAHMAN M.B.; SCHELLANDER K.; LUCEÑO NÚLLAMAS, VAN SOOM A. Heat stress responses in spermatozoa: Mechanisms and consequences for cattle fertility. **Theriogenology**, v.113, p.102-112, 2018.

RENAUDEAU, D.; COLLIN, A.; YAHAV, S.; BASILIO, V.; GOURDINE, J.L.; COLLIER, R.J. Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. **The animal consortium**, v.6, p. 707-728, 2011.

RHOADS, M.L. Effects of periconceptional heat stress on primiparous and multiparous daughters of Holstein dairy cows. **Theriogenology**, v.150, p.458-463, 2020.

SÁ FILHO, O.G.; MENEGHETTI, M.; PERES, R.F.G.; LAMB, G.C.; VASCONCELOS, J.L.M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v.72, p.210-218, 2009.

SARTORI, R.; PRATA, A.B.; FIGUEIREDO, A.C.S.; SANCHES, B.V.; PONTES, G.C.S.; VIANA, J.H.M.; PONTES, J.H.; VASCONCELOS, J.L.M.; PEREIRA, M.H.C.; DODE, M.A.N.; MONTEIRO, P.L.J.; BARUSELLI, P.S. Update and overview on assisted reproductive technologies (ARTs) in Brazil. **Animal Reproduction**, v.13, n.3, p.300-312, 2016.

SLIMEN, I.B.; NAJAR, T.; GHRAM, A.; ABDERRABBA, M. Heat stress effects on livestock: molecular, cellular and metabolic aspects, a review. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.100, p.401-412, 2015.

ST-PIERRE, N.R.; COBANOV, B.; SCHNITKEY, G. Economic Losses from Heat Stress by US Livestock Industries. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.E52-E77, 2003.

TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; PIRES, M.F.A.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.; RAMOS, A.A.; FOLHADELLA I.M.; POLISSENI, J.; FREITAS, C.; CLEMENTE, C.A.A.; SÁ FILHO, M.F.; PAULA-LOPES, F.F.; BARUSELLI, P.S. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 69, p.155-166, 2008.

USDA (United States Department of Agriculture). **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**, 2021.

VYAS, D.; ERDMAN, R.A. Meta-analysis of milk protein yield responses to lysine and methionine supplementation. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.5011-5018, 2009.

WALSH, S.W.; WILLIAMS, E.J.; EVANS, A.C.O. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. **Animal Reproduction Science**, V.123, p.127-138, 2011.

WMO (World Meteorological Organization). **WMO Statement on the State of the Global Climate in 2019**, n.1248, 2020.

ZHANG, M.; DUNSHEA, F.R.; WARNER, R.D.; DIGIACOMO, K.; OSEI-AMPONSAH, R.; CHAUHAN, S.S. Impacts of heat stress on meat quality and strategies for amelioration: a review. **International Journal of Biometeorology**, v.64, p.1613-1628, 2020.

Anexos

Anexo I - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal

CEEA UFPel
Comissão de Ética em Experimentação Animal

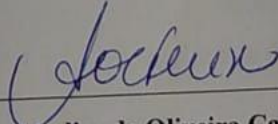
Pelotas, 22 de agosto de 2017

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Influência do fornecimento mineral com metionina protegida sobre o desempenho reprodutivo e o estresse térmico em novilhas e vacas de corte**” registrada com o nº 23110.005069/2017-34, sob a responsabilidade de **Francisco Del Pino** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 14/08/2017.

Finalidade	(X) Pesquisa	() Ensino
Vigência da autorização	01/11/2017 a 01/03/2019	
Espécie/linhagem/raça	Bovina/Brangus	
Nº de animais	108	
Idade	Acima de 15 meses	
Sexo	Fêmeas	
Origem	Estância Amaricá – São Gabriel/RS	

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.
Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 5069-2017).


M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da CEEA

Ciente em: 26 / 08