

Enfriamiento al inicio de verano para mitigar el estrés por calor en vacas Holstein del noroeste de México

Cooling at the summer onset to mitigate the heat stress in Holstein cows from the northwest Mexico

José Clemente Leyva-Corona^a, Milton G. Thomas^b, Gonzalo Rincón^c, Juan F. Medrano^c, Abelardo Correa-Calderón^d, Leonel Avendaño-Reyes^d, Dennis M. Hallford^e, Fernando Rivera-Acuña^a, Pablo Luna-Nevárez^a

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la respuesta fisiológica, endócrina y productiva en vacas lactantes sometidas a varias series de enfriamiento artificial al inicio de verano (junio a julio de 2011). Se asignaron 14 vacas Holstein multiparas a uno de dos tratamientos: enfriamiento (E) antes de la ordeña (0700 y 1700 h) y enfriamiento adicional (EA) cada 2 h de 0700 a 1700 h en el corral de espera a la ordeña. Se midió la producción de leche (PL), niveles de prolactina (PRL) e IGF1, mientras que la temperatura rectal y frecuencia respiratoria fueron registradas y consideradas como indicadores fisiológicos de estrés por calor. La temperatura ambiental y humedad relativa también fueron registradas y utilizadas para calcular el índice de temperatura-humedad (ITH). Los indicadores de estrés calórico mostraron una interacción significativa ($P<0.001$) entre tratamiento y tiempo/semana, los cuales fueron menores con EA (-3.8 respiraciones por minuto y -0.2 °C) sólo durante las semanas 6 y 7. Los niveles séricos de PRL fueron mayores bajo enfriamiento adicional (EA: 35.1 vs E: 29.4 ng/ml; $P=0.004$), mientras que los de IGF1 solo variaron a través de las semanas de muestreo ($P=0.014$). La PL se incrementó ($P<0.05$) en EA durante las semanas 6 (+3.1 kg/día) y 7 (+3.1 kg/día). Se concluye que la mayor frecuencia de baños mitigó la condición de estrés calórico al inicio de verano, permitiéndole a la vaca expresar un mejor desempeño productivo al final del estudio, ya que dicho efecto dependió de la variable tiempo/semana.

PALABRAS CLAVE: Enfriamiento, IGF1, Producción, Prolactina.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the physiological, endocrine and productive response in lactating dairy cows under several series of artificial cooling at the beginning of the summer (June to July, 2011). Fourteen multiparous Holstein cows were assigned in one of two treatments: Cooling (C) before milking (0700 and 1700 h) and additional cooling (AC) each 2 h (from 0700 to 1700h) in the holding pen of the milking parlor. Milk yield (MY), and serum levels of prolactin (PRL) and IGF1 were measured. Rectal temperature and respiratory rate were registered and included as physiological markers of heat stress. Ambient temperature and relative humidity were also collected and used to calculate temperature-humidity index (THI). Both markers of heat stress showed a significant interaction ($P<0.001$) between treatment and time/week, which were lower in AC treatment (-3.8 breaths per minute and -0.2 °C) during wk 6 and 7. Serum levels of PRL were higher under additional cooling (AC: 35.1 vs C: 29.4 ng/ml; $P=0.004$), while IGF1 serum levels showed variation only through the sampling weeks ($P=0.014$). The MY increased ($P<0.05$) in AC only during wk 6 (+3.1 kg/d) and 7 (+3.1 kg/d). It was concluded that additional cooling at the beginning of the summer reduced heat stress in dairy cows allowing a better productive performance at the end of the study because such effect relied on the variable time/week.

KEY WORDS: Cooling, IGF1, Performance, Prolactin.

Recibido el 14 de julio de 2015. Aceptado el 26 de agosto de 2015.

^a Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias del Instituto Tecnológico de Sonora. Calle 5 de Febrero 818 Sur, Colonia Centro, Cd. Obregón, Sonora, México. C.P. 85134. pluna@itson.edu.mx. Correspondencia al último autor.

^b Department of Animal Science, Colorado State University, CO. 80523. USA.

^c Department of Animal Science, University of California, Davis CA. 95616. USA.

^d Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Baja California. México.

^e Department of Animal Science, New Mexico State University, USA.

Proyecto financiado por el programa UC-Mexus CONACYT (Convocatoria 2010).

INTRODUCCIÓN

En regiones cálidas como en el noroeste de México, la combinación de humedad y temperatura de verano fácilmente exceden los requerimientos térmicos del ganado Holstein^(1,2). Al salir de la zona termoneutral, la vaca activa un complejo sistema de ajustes endócrinos y metabólicos regulados por genes para mejorar las funciones celulares afectadas por el estrés calórico⁽³⁾, que finalmente comprometen la productividad del ganado lechero debido a que dichos ajustes implican un gasto energético asociado al incremento del ritmo respiratorio⁽⁴⁾.

La temperatura corporal del bovino oscila entre los 37.5 y los 38.9 °C en animales sanos bajo condiciones termoneutrales, pero en climas cálidos su incremento es el resultado de la carga de calor autogenerado y el proveniente del medio ambiente⁽⁵⁾. Esta hipertermia se ha correlacionado negativamente con el crecimiento, lactancia y fertilidad en ganado Holstein^(6,7). El tracto respiratorio es una ruta evaporativa de eliminación de calor y el animal incrementa su frecuencia respiratoria como un mecanismo regulador de la temperatura corporal en climas cálidos^(8,9).

Además de estar implicadas con el metabolismo energético, crecimiento, fertilidad, lactogénesis y desarrollo mamario, la prolactina e IGF1^(3,10,11), son hormonas relacionadas en el proceso de termorregulación en los rumiantes y el incremento de sus niveles en sangre son una respuesta sensible al ambiente cálido^(12,13,14).

El enfriamiento artificial es una alternativa para aminorar los efectos negativos de las altas temperaturas sobre la fisiología y productividad de la vaca lechera^(2,15), sin embargo, bajo condiciones de moderada a alta humedad la eficiencia de un sistema de enfriamiento de alta presión (nebulizadores) es limitado⁽⁸⁾. Por esta razón, mojar el pelaje y piel del animal combinado con ventilación forzada, favorece las

INTRODUCTION

In warm regions as northwest Mexico, the combination of humidity and temperature during summer exceeds thermal requirements of Holstein cattle^(1,2). Once the cows leave the thermoneutral zone, they activate a complex system of endocrine and metabolic adjustments, that is regulated by genes, to improve cellular functions affected by heat stress⁽³⁾, that finally compromises dairy cattle production due to such adjustments imply an energy consumption associated to the increase of respiration rate⁽⁴⁾.

Body temperature in cattle oscillates from 37.5 to 38.9 °C in healthy animals under thermoneutral conditions, but in warm climates its increase is a result of the self-generated and environmental heat load⁽⁵⁾. Such hyperthermia has been negatively correlated to growth, lactation and fertility in Holstein cattle^(6,7). The respiratory system is an evaporative pathway to eliminate body heat because the animal increases the respiratory rate as a regulatory mechanism of body temperature under warm climates^(8,9).

Prolactin and IGF1 are involved in energy metabolism, growth, fertility, lacto genesis and mammary development^(3,10,11). Moreover, such hormones are also related to the thermoregulatory process in ruminants, and its increases in blood levels is a sensitive response to a warm environment^(12,13,14).

Artificial cooling is an alternative to reduce negative effects from high temperatures on physiology and productivity of dairy cattle^(2,15); however, under moderate to high humidity conditions the efficiency of a high pressure cooling system (i.e., humidifiers) is limited⁽⁸⁾. Therefore, hair and skin soaking combined with forced ventilation help to reduce body heat through conductive and convective ways^(16,17,18).

Once that environmental humidity and temperature increase at the beginning of the summer in the Yaqui Valley, Sonora, the

pérdidas de calor por las vías conductivas y convectivas^(16,17,18).

Conforme aumenta la intensidad de la humedad y temperatura ambiental al inicio de verano en el valle del Yaqui, Sonora, la eficiencia productiva del ganado lactante disminuye debido a un clima gradualmente más adverso para esta zona lechera⁽¹⁹⁾. Incrementar la frecuencia de baños durante el día puede aminorar algunos indicadores fisiológicos de estrés calórico y evitar el descenso abrupto en la producción del ganado Holstein conforme empeoran las condiciones climáticas de verano. Por lo tanto, el objetivo del estudio fue evaluar la respuesta fisiológica, endócrina y productiva del ganado Holstein al someterlo a varias series de enfriamiento directo al inicio de verano.

MATERIAL Y METODOS

Localización experimental y animales en estudio

El estudio se realizó en la Unidad académica de investigación en producción lechera del Instituto Tecnológico de Sonora, ubicada en el Block 910 (N: 27°21' O: 109°54') del Valle del Yaqui, Sonora, México, durante junio y julio de 2011. Se seleccionaron 28 vacas Holstein de entre 3 y 5 partos, con 150 ± 25.9 días en leche y condición corporal de 3.5 ± 0.35 , las cuales se alimentaron dos veces al día (0800 a 0900 h y 1700 a 1800 h). Todas las vacas recibieron la misma ración durante la fase experimental (aproximadamente 48.8 % de silo de maíz, 16.2 % de heno de alfalfa y 35 % de concentrado energético comercial, adicionado con vitaminas y minerales) y con libre acceso al agua. Como manejo cotidiano del establo, a partir de la semana nueve postparto y hasta 15 días antes del secado, las vacas recibían (vía subcutánea) un programa comercial de somatotropina bovina (500 mg de STb) a intervalos de 14 días durante la lactancia.

Tratamientos

Aleatoriamente se asignaron 14 animales a cada tratamiento: enfriamiento (E) antes de la ordeña

productive efficiency in lactating cattle decreases because the weather become more adverse⁽¹⁹⁾. An increase of bath frequency during the day can help to reduce some physiological indicators of heat stress to avoid a sudden reduction in Holstein cattle milk production as the weather conditions become worst during summer. Therefore, the objective of this study was to evaluate physiological, endocrine and reproductive responses in Holstein dairy cattle subjected to direct cooling at the beginning of the summer.

MATERIAL AND METHODS

Experimental location and animals

The study was conducted at the Unidad académica de investigación en producción lechera of the Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON), located in block 910 (N: 27°21' O: 109°54') of the Yaqui Valley, Sonora, Mexico, during June and July, 2011. Twenty-eight (28) multiparous Holstein cows with 150 ± 25.9 d in milk and 3.5 ± 0.35 of body condition score (BCS) were selected for this study. Cows were maintained in shaded holding pens with free access to water, and they were fed twice a day (i.e., 0800 to 0900 h and 1700 to 1800 h) with a ration made up with 48.8 % corn silage, 16.2 % alfalfa hay, and 35 % commercial energy supplement added with vitamins and minerals premix. All cows received bovine somatotropin (BST; 500 mg S.C.) each 14 d during lactation, from wk 9 postpartum until 15 d before to start the dry period.

Treatments

Cows were randomly assigned in two treatments: cooling (C) before milking (two times per day, 0700 and 1700 h) and additional cooling (AC) each 2 h (six times per day, from 0700 to 1700 h). Therefore, cows from treatments C and AC entered daily into the holding pen of the milking parlor, and they received 2 and 6 cooling periods that were equivalent to 36 and 108 min/d of cumulative

(dos veces, a las 0700 y 1700 h) y enfriamiento adicional (EA) cada dos horas (seis veces por día, de 0700 a 1700 h). De esta forma, los animales de los tratamientos E y EA fueron llevados diariamente a la sala de espera a la ordeña donde recibieron dos y seis periodos de enfriamiento, equivalentes a 36 y 108 min/día de enfriamiento acumulado por tratamiento, respectivamente. En ambos grupos, cada periodo de enfriamiento era una secuencia de tres ciclos de baño alternado con tres de ventilación.

Equipo de enfriamiento

Por ciclo de enfriamiento se aplicaban 3 min de aspersión de agua (gasto de 15 L por vaca/ciclo) con 16 regaderas (instaladas a 2.8 m del piso) hasta mojar por completo el lomo y costado del animal, alternados con 3 min de ventilación forzada (11,000 CFU) con tres abanicos eléctricos de ½ HP cada uno situados a 2.73 m del piso. Todas las vacas tuvieron 8.5 m² de sombra en los corrales de alojamiento.

Datos climáticos

La información obtenida de temperatura ambiental (TA) y humedad relativa (HR) se colectó por una estación meteorológica automática ubicada a ~500 m del sitio experimental. El Índice de temperatura-humedad (ITH) se calculó para estimar el nivel de estrés calórico al que estuvieron expuestos los animales utilizando la fórmula⁽⁷⁾: $ITH = (0.8 * TA) + [(HR/100) * (TA - 14.4)] + 46.4$. Para obtener valores representativos del clima durante el periodo de muestreo, la información climática se registró por hora de 0900 a 1700 h y promediando la información respecto a los dos últimos días previos a la fecha de muestreo⁽⁴⁾.

Indicadores fisiológicos de estrés calórico

En ambos grupos durante el estudio, la frecuencia respiratoria (FR; resp/min) y la temperatura rectal (TR; °C) se registraron a las 1200 h dos veces por semana. Para medir la FR se contaron visualmente los movimientos

cooling per treatment, respectively. Each cooling period included a sequence of three soaking cycles alternated with three ventilation cycles.

Cooling system

Each cooling cycle included 3 min of water aspersion (~ 15 L per cow/cycle) with a system made up by 16 sprayers (located at 2.73 m from the bottom) which allowed soaking the back and side of each cow, alternated with 3 min of forced ventilation with three ½ HP electric fans located at 2.73 m from the bottom. All cows received 8.5 m² of shadow inside the holding pens.

Climatic data

Ambient temperature (AT) and relative humidity (RH) data were collected from a nearby (~500 m) and automatic climatic station. Such information was used to calculate the temperature-humidity index (THI), that estimates the level of heat stress at which the cows were exposed, using the formula⁽⁷⁾: $THI = (0.8 * AT) + [(RH/100) * (AT - 14.4)] + 46.4$. In order to obtain accuracy climatic values during the sampling period, climatic data were registered each hour from 0900 through 1700 h, which were averaged and combined to information from the last 2 d before each sampling date⁽⁴⁾.

Physiological markers of heat stress

Respiratory rate (RR; breaths/min) and rectal temperature (RT; °C) were collected in both groups at 1200 h twice per week during the study. The RR was measured by visual counting of intercostal movements⁽¹⁾, while RT was collected using a digital thermometer (TES-1310®) with a contact sounding line (type K; 9-cm large), that was introduced into the animal to touch the rectal mucosa⁽²⁰⁾.

Dynamic of blood hormone levels

Blood samples (i.e., 8 ml) were collected weekly from the coccygeal vein using Vacutainer tubes without anticoagulant. Once the samples were

costales⁽¹⁾, mientras que la TR se registró utilizando un termómetro digital (TES-1310®) con sonda (tipo K) de contacto (largo de 9 cm) que era introducida para hacer contacto con la mucosa del recto del animal⁽²⁰⁾.

Dinámica de niveles hormonales en sangre

Entre las 1000 y 1100 h los animales de ambos grupos se sangraron una vez por semana mediante punción de la vena de la cola utilizando equipo vacutainer® para extraer 8 a 10 ml de sangre en tubos sin anticoagulante. En cada muestreo, los tubos se identificaron y transportaron (5 °C) al Laboratorio de Biotecnología Reproductiva del Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias del ITSON (Cd. Obregón, Sonora, México) para centrifugarse a 2,500 rpm por 30 min y extraer el suero. Las muestras séricas se transportaron al Laboratorio de Endocrinología de New Mexico State University, USA, para medir las concentraciones (ng/ml) de prolactina (PRL) y del factor de crecimiento parecido a la insulina tipo 1 (IGF1), por radioinmunoanálisis (Packard Instrument Company Inc., Meriden, CT, USA) de doble anticuerpo^(11,12) bajo un coeficiente de variación de 9.4 % y 13.4 % para PRL e IGF1, respectivamente.

Producción de leche

La producción (kg) individual de leche (PL) correspondiente a las dos ordeñas del día (0700 y 1700 h), se registró diariamente utilizando un sistema electrónico de ordeño (Metraton 21™, GEA. Westfalia-Surge Farm Technologies, Siemensstraße, Bönen Germany).

Análisis estadístico

Los procedimientos estadísticos PROC UNIVARIATE y PROC GLM (prueba de Levene) se utilizaron para analizar la distribución normal e igualdad de varianzas, respectivamente, de todas las variables analizadas. Mediante el procedimiento MIXED del paquete estadístico SAS V9.4⁽²¹⁾, los comandos *Repeated* y *Random* se utilizaron para analizar las mediciones

collected (i.e., from 1000 to 1100), each tube was labeled and transported (5 °C) to the Reproductive Biotechnology Lab from the Department of Veterinary and Agronomic Sciences at ITSON (5 °C) and centrifuged at 2,500 rpm/30 min to obtain the blood serum. Then, serum samples were transported to the Endocrinology Lab of New Mexico State University, USA, in order to measure concentrations (ng/ml) of prolactin (PRL) and insulin-like growth factor 1 (IGF1), using radioimmunoassay (Packard Instrument Company Inc., Meriden, CT, USA) of double antibody^(11,12) under a coefficient of variation of 9.4 and 13.4 % for PRL and IGF1, respectively.

Milk yield

Cows were milked twice per day (0700 and 1700) and milk production (MY; kg) was recorded daily using an electronic system (Metraton 21™, GEA. Westfalia-Surge Farm Technologies, Siemensstraße, Bönen Germany).

Statistical analyses

The procedures PROC UNIVARIATE and PROC GLM (Levene's test) were used to test normal distribution and equality of variances, respectively. Repeated and random statements from the MIXED procedure were processed using the SAS software V9.4⁽²¹⁾, in order to analyze repeated measures per week of RR, RT, PRL, IGF1 and MY. The mixed model included treatment, time, treatment x time interaction, and lactation number as fixed effects, and the cow as random effect. Days in milk was included in the model as covariant, which resulted as significant source of variation ($P < 0.05$). According to Bayesian and Akaike information criterion, the auto-regressive covariance resulted as the best fitted structure for repeated measures in the mixed model. If the term time resulted as significant source of variation ($P < 0.05$), then a pairwise comparison of the minimum square means was executed using the PDIFF option in SAS.

repetidas por semana de FR, TR, PRL, IGF1 y PL. El modelo mixto incluyó los efectos fijos de tratamiento, tiempo, la interacción tratamiento por tiempo, y el número de lactancias, así como el efecto aleatorio de la vaca. La variable días en leche se consideró como covariable dentro del modelo, la cual resultó ser una fuente significativa de variación ($P < 0.05$). De acuerdo a los criterios Bayesiano y Akaike, se seleccionó la estructura de covarianza auto-regresiva para las mediciones repetidas del modelo mixto, ya que ésta resultó ser la estructura de covarianza de mejor ajuste. Si el efecto tiempo resultó significativo ($P < 0.05$), se ejecutaron comparaciones pareadas de medias de cuadrados mínimos utilizando la opción PDIF en SAS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Datos climáticos

Durante el estudio, la temperatura ambiental mostró una variación de 30.4 hasta 36.6 °C (Cuadro 1). El umbral térmico máximo para la raza Holstein es de 25 °C (7), y con fluctuaciones térmicas entre 21 y 32 °C se han observado pérdidas en leche(22). El nivel de HR durante el día se mantuvo entre 18.1 y 32.8 % a lo largo del experimento. El efecto de la humedad es

RESULTS AND DISCUSSION

Climatic data

Ambient temperature showed a variation from 30.4 to 36.6 °C (Table 1). The maximum thermic threshold for Holstein cattle is 25 °C(7), and thermic fluctuations from 21 to 32 °C lead to a reduction in milk yield(22). The RH level fluctuated during the day from 18.1 y 32.8 % through the experiment. Effect of humidity is non-significant at 24 °C; however, an important negative impact appears when daily temperature increases above 34 °C(23), and evaporative functions (i.e., panting and sweating) of thermic regulation will be limited when RH is higher than 45 %. Although in this study HR was lower, it tended to intensify early in the summer which represents the beginning of regular conditions of heat stress in this region. The average THI during the day was 79.1 units that is considered as moderate heat stress(15), and it became more adverse after wk 4. Collier *et al*(25) showed that milk yield in high producer cows starts to decline when the THI reaches 68 units.

Heat stress markers

Treatment by time interaction was significant ($P < 0.001$) for RR and RT (Table 2), which are

Cuadro 1. Condiciones climáticas e índice de temperatura-humedad durante el estudio

Table 1. Climatic conditions and temperature-humidity index during the study

Week	ET (°C)			RH (%)			THI (units)		
	Mean	Min	Max	Mean	Min	Max	Mean	Min	Max
1	30.4	29.7	30.9	19.2	17.1	28.3	74	73.1	76.1
2	36.6	35.6	37.2	18.1	17.8	31.1	80.1	79.0	83.6
3	32.8	31.9	33.4	19.6	18.8	33.4	76.6	75.6	79.8
4	34.2	33.6	34.8	21.9	19.2	34.6	78.5	77.3	81.7
5	36.3	35.7	36.9	24.5	20.3	35.5	81.2	79.6	84.3
6	36.2	35.5	36.9	28.3	24.3	37.9	81.9	80.3	84.8
7	34.9	34.4	35.6	32.8	29.7	39.4	81.4	80.2	83.5

ET= Environmental temperature; RH=Relative humidity; THI= Temperature-humidity index. All climatic variables correspond to the hourly average (0900 to 1700 h) of -2 d before sampling.

Cuadro 2. Medias de cuadrados mínimos y probabilidad para los efectos de tratamiento, tiempo y su interacción en vacas Holstein expuestas a diferentes frecuencias de enfriamiento

Table 2. Least squares means and probability for treatment, time and its interaction effects in Holstein cows subjected to different frequencies of cooling

Variable	Treatments (mean± SE)		P-value of fixed effects		
	Cooling	Additional cooling	Time	Treatment	Treatment by time
RR	70.5 ± 0.71	66.7 ± 0.29	<0.001	<0.001	<0.001
RT	38.4 ± 0.04	38.2 ± 0.03	<0.001	<0.001	<0.001
PRL	29.4 ± 2.36	35.1 ± 2.69	<0.001	0.004	0.454
IGF1	269.6 ± 19.99	295.9 ± 28.59	0.014	0.486	0.648
MY	21.6 ± 1.19	22.4 ± 1.08	<0.001	0.596	0.002

RR= Respiratory rate (breaths per minute); RT= Rectal temperature (°C); PRL= Prolactin levels (ng/ml); IGF1= Insulin like growth factor-1(ng/ml); MY= Milk yield (kilograms per day).

insignificante a 24 °C, pero cuando la temperatura del día es >34 °C su impacto negativo es considerable⁽²³⁾, y a partir de una HR >45 % las funciones evaporativas (jadeo y sudoración) de regulación térmica son limitadas⁽²⁴⁾. Aunque la HR no alcanzó ese límite, sí fue evidente una tendencia en su intensificación al inicio del verano, lo que representaría la entrada a las condiciones regulares de estrés por calor en esta región. El promedio de ITH durante el día fue de 79.1 unidades, considerándose un estrés calórico moderado⁽¹⁵⁾, experimentándose condiciones más adversas después de la semana cuatro. Collier *et al*⁽²⁵⁾ demostraron que a partir de 68 unidades de ITH, la producción en vacas altas productoras comienza a declinar.

Indicadores de estrés calórico

El Cuadro 2 muestra que la interacción tratamiento por tiempo fue significativa ($P<0.001$) para FR y TR, considerados los indicadores de estrés calórico. En cierto modo era de esperar que al incrementar el número de baños el beneficio pudiera ser mayor; sin embargo, el efecto del tratamiento sobre las variables indicativas de estrés calórico sólo se observó al final del estudio. Ello coincidió con el inicio del verano (semanas 6 y 7), por lo que

considered as indicators of heat stress. It was expected that an increase in the number of showers improves RR and RT; however, the effect of the treatment on these variables was only detected at the end of the study. It coincided with the beginning of the summer (wk 6 and 7); therefore, the favorable effect after to increase the number of showers depended of the variable time/week which involves the climatic variables. Berman⁽²⁰⁾ tested different cooling levels at 38 °C and 47 % of humidity including until seven cycles of shower and ventilation to reduce rectal temperature in Holstein cows, but it did not improve after increase cycles from eight to ten. Spiers *et al*⁽⁹⁾ reported a group of cows which under thermo neutral conditions (AT of 19 °C and RH ~55 %) showed 59.6 breaths/min of RR and 39 °C of RT; however, once the cows were heat-stressed (AT of 29 °C and RH ~50 %), their RR and RT increased 32.8 and 2.5 %, respectively. In this study, RR was similar between treatments ($P>0.05$) during the first 5 wk (Figure 1), but it was lower in AC group in comparison to C group ($P<0.05$) in wk 6 (78.5 vs 82.9 breaths/min) and 7 (69.5 vs 69.9 breaths/min), which coincided with the time when climatic conditions became more severe. Likewise, the RT in AC cows was lower ($P<0.05$) than C cows only in wk 6 (38.5 vs 39.0 °C) and 7 (38.6 vs 39.1 °C).

el efecto favorable de incrementar la frecuencia de baños dependió de la variable tiempo/semana, y por lo tanto, de las variables climáticas. Berman⁽²⁰⁾ probó diferentes niveles de enfriamiento a 38 °C y 47 % de humedad, donde fueron necesarios hasta siete ciclos de baño y ventilación para disminuir la temperatura rectal de vacas Holstein, sin observar mejoría al aumentar los ciclos a ocho o diez. Spiers *et al*⁽⁹⁾ reportaron bajo condiciones termoneutrales (TA de 19 °C y HR de ~55 %), un grupo de vacas mostraron FR de 59.6 respiraciones/minuto y TR de 39 °C, pero al ser sometidas a un periodo de estrés calórico (TA de 29 °C y HR de ~50 %), su FR y TR se incrementaron en 32.8 % y 2.5 %, respectivamente. En este estudio la FR fue similar entre tratamientos ($P>0.05$) en las primeras cinco semanas (Figura 1), pero fue menor en el grupo EA en

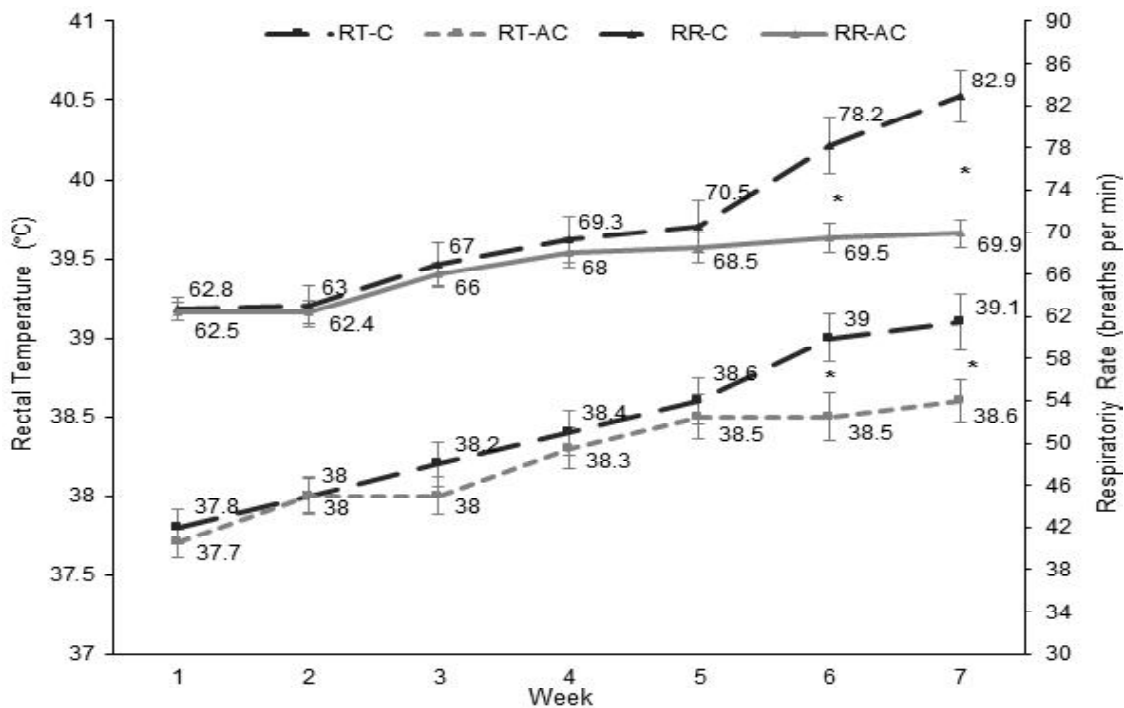
During the study, cows from C group increased ($P<0.001$) 32.0 and 3.4 % their RR and RT, respectively, while cows from AC group only increased 11.8 and 2.3 %, respectively. Differences between treatments are lower because the two groups received cooling. However, heat stress conditions start once the cow exceeds a RT of 39.2 °C and RR of 70 breaths/min. Under these conditions, the objective of the artificial cooling is to maintain RT and RR closer to a physiological threshold. At the end of this study, both groups maintained a RT <39.2 °C, even though RR in C cows was higher than 70 breaths/min.

Dynamic of blood hormone levels

Serum levels of PRL differed by treatment ($P=0.004$) and sampling time ($P<0.001$; Table

Figura 1. Frecuencia respiratoria (RR) y temperatura rectal (RT) en vacas Holstein expuestas a diferentes frecuencias de enfriamiento al inicio de verano

Figure 1. Respiratory rate (RR) and rectal temperature (RT) in Holstein cows subjected to different frequencies of cooling at the summer onset



* Difference ($P<0.05$) of the treatment*time fixed effect. RT= Rectal temperature; RR= Respiratory rate; C= Cooling; AC= Additional cooling.

comparación con el grupo E ($P < 0.05$) a partir de la semana seis (78.5 vs 82.9 respiraciones/minuto) y siete (69.5 vs 69.9 respiraciones/minuto), lo que coincidió con el momento en que las condiciones climáticas fueron más severas. Del mismo modo, la TR en EA fue menor que en E ($P < 0.05$) sólo en las semanas 6 (38.5 vs 39.0 °C) y 7 (38.6 vs 39.1 °C). A lo largo del experimento, las vacas en el grupo E incrementaron ($P < 0.001$) en 32.0 y 3.4 % su FR y TR, respectivamente, mientras que en EA las vacas sólo mostraron un aumento de 11.8 y 2.3 % en su FR y TR, respectivamente. Es importante mencionar que, en general, la diferencia no es tan amplia debido a que ambos grupos recibieron enfriamiento. Cuando la vaca rebasa los 39.2 °C de TR y las 70 respiraciones/minuto de FR, entra a una condición de estrés por calor, por lo que bajo estas condiciones el enfriamiento artificial tiene como objetivo mantener estas variables lo más cercano a un umbral fisiológico. Al concluir este estudio, ambos grupos lograron mantener la TR < 39.2 °C aunque en el E la FR fue > 70 respiraciones/minuto.

Dinámica de niveles hormonales en sangre

Los niveles de PRL difirieron por tratamiento ($P = 0.004$) y por efecto del tiempo de muestreo ($P < 0.001$; Cuadro 2). Durante el experimento, los valores promedio de PRL fueron más elevados para el tratamiento EA (35.1 ± 1.3) en comparación con E (29.4 ± 1.1 ng/ml). En contraste, Igono *et al*⁽²²⁾ reportaron una reducción en los niveles de PRL en vacas que recibieron enfriamiento más sombra, en comparación con aquellas que sólo recibieron sombra, por lo cual concluyeron que la PRL sérica se redujo al disminuir el estrés calórico y mejorar el confort ambiental de la vaca. Sin embargo, en la presente investigación es probable que los niveles superiores de PRL encontrados en las vacas con enfriamiento adicional estén asociados al proceso de lactación, ya que el muestreo sanguíneo se realizó durante las mañanas inmediatamente después del ordeño. Por lo tanto, el horario de

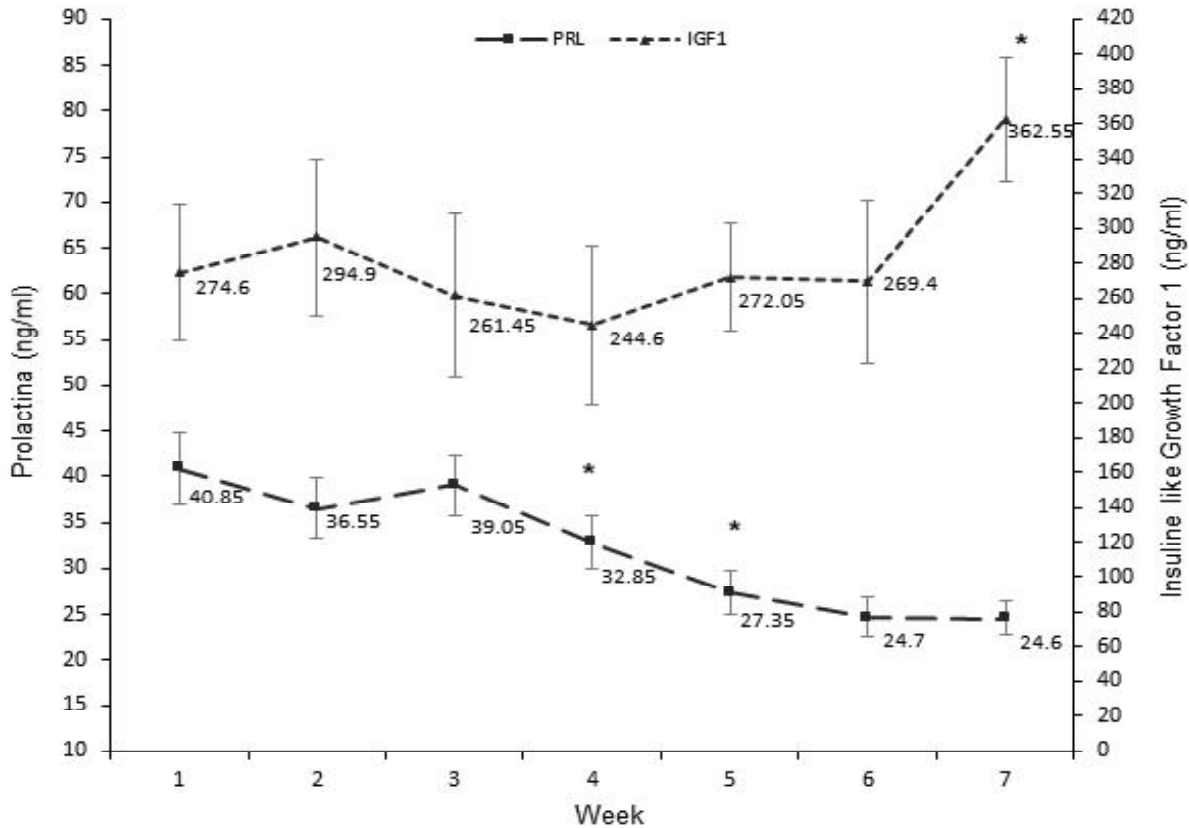
2). During the experiment, PRL average values were higher for AC treatment (35.1 ± 1.3) in comparison with C treatment (29.4 ± 1.1 ng/ml). In contrast, Igono *et al*⁽²²⁾ reported a reduction in PRL levels from cows that received cooling and shadow, in comparison to those cows that only received shadow, and they concluded that serum PRL declined in response to heat stress reduction and the improvement of the environmental comfort of the cows. However, the higher values of PRL found in this study in cows that received additional cooling could be associated to lactation process, because the blood samples were collected in the morning after milking. Therefore, it would be that this early sampling masked the effect of heat stress on PRL levels in cows without additional cooling.

Regarding to the time of sampling, the Figure 2 depicts a gradual reduction of serum PRL ($P < 0.05$) on wk 4 and 5, which become steady on wk 6 and 7. In contrast to such results, Scharf *et al*⁽¹⁴⁾ have reported that PRL concentrations increase in warm climates, because it is an homoeothermic hormone associated to heat stress events^(26,27). Likewise, PRL stimulates the expression of heat shock proteins (HSP)⁽²⁸⁾, which avoid protein denaturalization in bovine body cells threatened by environmental heat stress⁽²⁹⁾. The unexpected PRL response found in middle July was probably due to the short experimental time, because the negative effect of the weather in this area is more severe after July⁽¹⁹⁾ due to the accumulation of heat load in cows; then, activation of mechanisms involving PRL would be more evident at the end of the summer. Moreover, the covariant of days in milk could influence PRL levels at the end of the study, because this variable resulted as significant source of variation ($P < 0.05$).

The serum concentrations of IGF1 were only effected by time ($P = 0.0143$; Table 2), and tended to increase at the end of the study ($P < 0.05$; Figure 2). Rhoads *et al*⁽¹⁰⁾ have reported a small IGF1 reduction in cows exposed to warm climate conditions. Growth hormone

Figura 2. Dinámica de los niveles (ng/ml) de prolactina (PRL) y del factor de crecimiento similar a la insulina tipo-1 (IGF1) durante el estudio

Figure 2. Dynamic of the prolactin (PRL) and insulin like growth factor-1 (IGF1) levels (ng/ml) during the study



As effect of time [*] indicate statistical difference ($P<0.05$) in relation to the previous week on average level per week (i.e., including both treatments; ng/ml) of PRL and IGF1 during the study.

toma de la muestra pudo haber enmascarado el efecto del estrés calórico sobre los niveles de PRL en vacas sin enfriamiento adicional.

Respecto al tiempo de muestreo, la Figura 2 muestra una reducción gradual de PRL ($P<0.05$) en las semanas 4 y 5, estabilizándose sus niveles en las semanas 6 y 7. Contrario a estos resultados, Scharf *et al.*(14) han reportado que la concentración de PRL incrementa en climas cálidos, ya que es una hormona homeotérmica ante eventos de estrés por calor(26,27). Del mismo modo, la PRL estimula la expresión de las proteínas de choque de calor (HSP)(28), las cuales evitan la desnaturalización de proteínas en células ante la amenaza de estrés calórico

(GH) and IGF1 have a close relationship on metabolic processes associated to milk yield(11), then GH measurements would help to explain the environmental effect on IGF1 levels and its relationships with milk production. It is important to mention that cows from this study received a subcutaneous application of bovine somatotropin (STB) as part of the herd management. The STB is a synthetic hormone with similar function to GH in bovine cattle, and its exogenous application is a potential enhancer of heat load in lactating cows under heat stress(13,30,31), as well as blood concentrations of IGF1(32-35). Therefore, administration of STB in this study could induce a direct effect on IGF1 levels, and consequently on PRL levels.

en el bovino⁽²⁹⁾. Es probable que la respuesta no esperada en los niveles de PRL a mediados del mes de julio se debió a la corta duración del experimento, ya que el impacto del clima de esta zona es más severo para el ganado después de julio⁽¹⁹⁾, por la acumulación de la carga calórica en la vaca, siendo posible que la activación de mecanismos que involucran la PRL sería más evidente a finales del periodo de verano. Además, la covariable días en leche resultó significativa ($P<0.05$), por lo que dicha variable pudo haber influido en la disminución en los niveles de PRL al final del estudio.

La concentración de IGF1 solo se afectó por efecto de tiempo ($P=0.0143$; Cuadro 2), observándose un incremento ($P<0.05$) al final del ensayo (Figura 2). Rhoads *et al*⁽¹⁰⁾ han reportado una ligera reducción en los niveles de IGF1 del ganado expuesto a condiciones cálidas. La hormona del crecimiento (GH) y el IGF1 tienen una relación muy estrecha en procesos metabólicos que promueven la producción de leche⁽¹¹⁾, por lo que la medición de GH apoyaría en la explicación del efecto ambiental sobre la IGF1 y su relación con la producción de leche. Vale la pena señalar que las vacas de este estudio recibían la aplicación de un producto comercial como manejo habitual a base de somatotropina bovina (STB). La STB es una hormona sintética cuya función es similar a la GH en el bovino y su administración exógena incrementa potencialmente la carga de calor en ganado lactante bajo estrés calórico^(13,30,31), así como también la concentración de IGF1 en sangre^(32,33,34,35). Por lo tanto, la administración de STB en este trabajo pudo inducir un efecto directo sobre los niveles de IGF1 y consecuentemente en los de PRL. Aún y cuando los niveles de IGF1 se mantuvieron constantes pero sin una tendencia clara a lo largo de casi todo el experimento, durante la semana 7 sí se observó un incremento significativo de IGF1 ($P<0.05$) alcanzando su máxima concentración, lo que coincide con el periodo más caliente del muestreo.

Existen rutas alternativas que puede tomar la GH para movilizar energía de otros tejidos en

Although levels of IGF1 were constant during the study, it showed a significant increasing ($P<0.05$) until to reach its higher concentration on wk 7, which coincided with the hottest period of the experiment.

Growth hormone has alternative pathways to mobilize energy from other tissues in bovine cattle exposed to a high energetic demand needed for maintenance (i.e., thermoregulation) and lacto genesis in milking cows⁽¹⁰⁾. Metabolic regulation of GH and IGF1 allows to prioritize some emerging functions such as the adaptive response to a warm climate in transition for lactation maintenance of milking cattle. The PRL activates milk synthesis in ruminants, however, it is not essential for lactation maintenance⁽³⁶⁾, while the IGF1 pathway stimulates galactophoyesis and interacts by separate with PRL and STB⁽³⁷⁾. It explains the reduction in PRL levels and the increasing in IGF1 levels during the warmest period of this study.

Milk yield

The treatment by time interaction was significant ($P=0.002$) for milk yield (Table 2). A higher production was observed in cows from AC group in comparison with cows from C group on wk 6 (17.9 vs 21.0 kg) and 7 (18.0 vs 21.1 kg), when the heat stress represented by the ITH was higher (Figure 3). Direct cooling (shower) and forced ventilation under warm and moist climates is able to reduce negative effects from a summer heat season on cows physiology^(16,18), which contributes to hormonal status⁽¹²⁾ and help to correct energy metabolism⁽¹³⁾ in order to improve their productive performance⁽¹⁾. A 9.3 % improvement in milk production has been reported after to increase cooling series from 5 to 8 in the waiting parlor area⁽¹⁷⁾. Low pressure cooling in this area before milking can avoid a milk reduction of 0.76 kg/d per cow, when ambient temperature fluctuates from 27 y 46 °C⁽¹⁵⁾.

In this experiment, the reduction in MY started at the third week when the cows were exposed to an THI level of 76.6 units (Figure 3). Collier *et al*⁽²⁵⁾ demonstrated that cows producing >35

el bovino ante la simultánea demanda energética de las funciones de mantenimiento (ej. termorregulación) y lactogénesis en el ganado lechero especializado⁽¹⁰⁾. La regulación metabólica de PRL e IGF1 permite priorizar algunas funciones emergentes como la del intento de adaptarse a un clima cálido en transición y mantener una lactancia (por demanda ambiental) en ganado especializado, aún en bajos niveles. La PRL tiene acción en la síntesis de leche en rumiantes, sin embargo, no es esencial para mantener la lactancia⁽³⁶⁾, mientras que la ruta del IGF1 estimula la galactopoyesis e interactúa en forma independiente de la prolactina y STB⁽³⁷⁾. Lo anterior, puede explicar la caída en los niveles de PRL y el incremento del IGF1 en el periodo más cálido de este estudio.

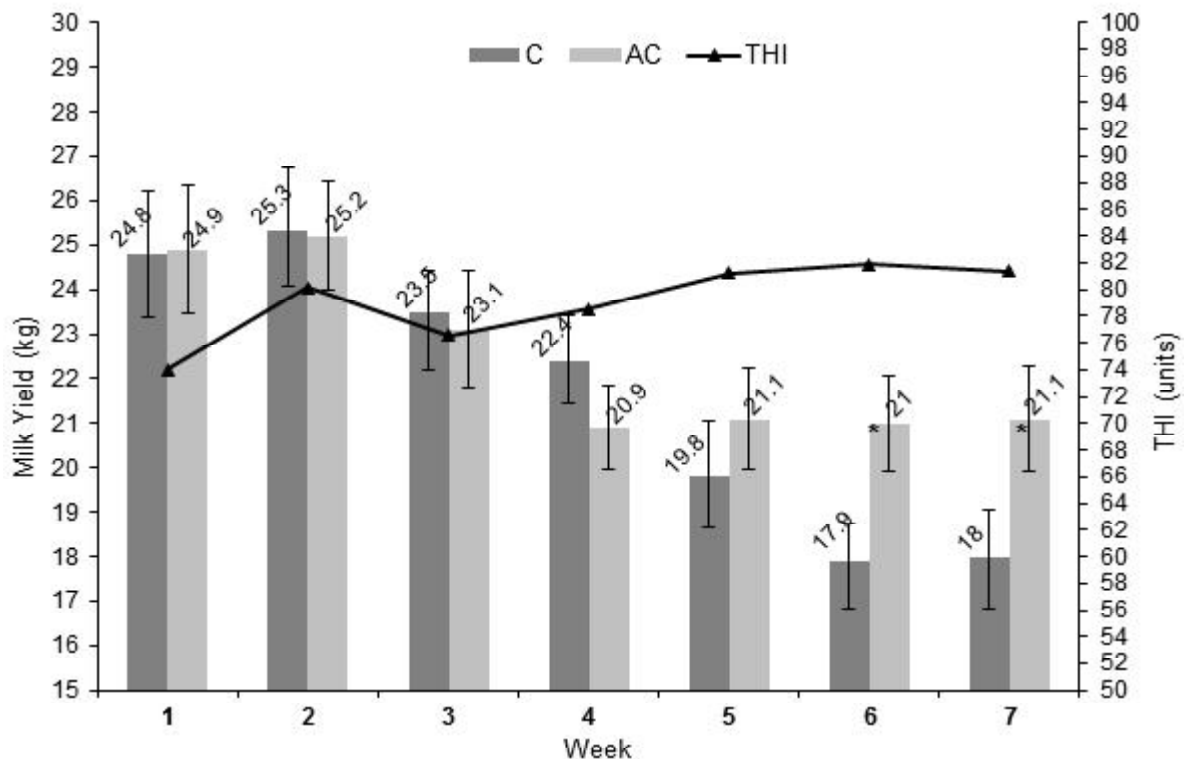
kg/d need artificial cooling once the THI reaches 68 units, because at this threshold dairy cows reduce milk production 2.2 kg/d. Leyva *et al.*⁽¹⁹⁾ found in Sonora a milk yield reduction of 0.65 kg/d per cow, once the threshold for THI reached 71.2 units.

While the negative effect of summer was approaching, higher conditions of heat stress where mitigated with the rise of cooling sessions in AC cows during the day.

This represents an advantage if we consider that all physiological and metabolic changes that the cows experienced trying to regulate body temperature by themselves could be diminished using additional cooling. Serum PRL levels and milk yield had the same trend in both treatments (Figures 2 and 3), then we assume that PRL

Figura 3. Efecto del enfriamiento adicional sobre la producción de leche (PL) en vacas Holstein durante el estudio

Figure 3. Effect of additional cooling on milk yield (MY) performance of Holstein cows



MY= Milk yield. [*] In means of columns indicate the effect of treatment by week ($P < 0.05$). THI= Temperature-Humidity Index. The treatments C= Cooling and AC= Additional cooling.

Producción de leche

La interacción de tratamiento por tiempo fue significativa ($P=0.002$) para PL (Cuadro 2), observándose mayor producción en EA en comparación con E en las semanas 6 (17.9 vs 21.0 kg) y 7 (18.0 vs 21.1 kg), cuando el nivel de estrés (representado por ITH) fue mayor (Figura 3). El enfriamiento directo (baños) y ventilación forzada en ambientes cálidos y húmedos, ha demostrado que puede reducir los efectos negativos de la temporada de calor sobre la fisiología de la vaca^(16,18), contribuyendo en el estado hormonal⁽¹²⁾ y corrigiendo el metabolismo energético⁽¹³⁾, que en conjunto mejoran su desempeño productivo⁽¹⁾. Se ha reportado una mejoría de 9.3 % en la producción de leche al incrementar de cinco a ocho las sesiones de enfriamiento en la sala de espera⁽¹⁷⁾. Con temperaturas entre 27 y 46 °C, el enfriamiento de baja presión en la sala de espera a la ordeña puede evitar pérdidas en leche de 0.76 kg/d por vaca⁽¹⁵⁾.

En este experimento, la reducción en PL inició en la tercera semana cuando las vacas experimentaron un nivel de ITH de 76.6 unidades (Figura 3). Collier *et al*⁽²⁵⁾ demostraron que las vacas con una producción >35 kg/día requieren enfriamiento artificial a partir de un ITH de 68 unidades, ya que al alcanzar este umbral, la pérdida negativa en leche se ha estimado en 2.2 kg/día. Trabajos realizados en Sonora por Leyva *et al*⁽¹⁹⁾ identificaron que a partir de un umbral de 71.2 unidades de THI las pérdidas alcanzaban 0.65 kg/día por vaca⁽¹⁹⁾.

Mientras que el efecto negativo de verano se acercaba, condiciones de estrés calórico más altas se mitigaron con el aumento de las sesiones de enfriamiento en EA durante el día. Esto representa una ventaja teniendo en cuenta que todos los cambios fisiológicos y metabólicos que la vaca puede experimentar en un intento de regular su temperatura corporal por sí sola, podrían disminuirse con el enfriamiento suplementario. Es notable como los niveles de PRL se mueven en la misma dirección que la PL en ambos grupos (Figura 2 y 3), por lo que la

was associated to milking instead of thermoregulation. However, both the increase in IGF1 levels and the additional cooling probably allowed the cow to mobilize energy to maintain lactation as the cows experienced a higher energy requirement to support thermoregulation the last 2 wk of this study.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

The increase of shower frequency in Holstein cows mitigated the impact of the physiological indicators of heat stress at the beginning of the summer, which was reflected in the maintenance of milk production in a summer season characterized by a gradual increase of THI levels. Serum levels of PRL and IGF1 were unexpected, which could be due to the short experimental period and the early-morning sampling time in case of PRL, and due to the application of commercial STB in case of PRL and IGF1. Milk yield increased 3.1 L per cow at wk 6 and 7, which represents an additional income of \$23.25 Mexican pesos per cow. However, such profit maybe is not enough to compensate expenses due to the water supply needed for additional cooling, which would not be a problem if a water recycling system is available. Therefore, an initial study of economic implications is suggested before to start an additional cooling system. Moreover, the identification of cattle with a superior threshold for heat stress tolerance is proposed as an economic and environmental strategy to increase milk production during summer without a rise in the water supply required for additional cooling.

End of english version

PRL se relaciona con la lactancia en vez de termorregulación. Sin embargo, es probable que el aumento en los niveles de IGF1 y el enfriamiento suplementario permitieran la movilización de energía para mantener la lactancia ante una demanda energética cada vez más alta para mantenimiento

(termorregulación), lo cual fue experimentado por las vacas en las últimas dos semanas.

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Incrementar la frecuencia de baños en vacas Holstein mitigó la magnitud de los indicadores fisiológicos de estrés por calor al inicio del verano, lo cual se reflejó en el mantenimiento de la producción de leche en una época del año caracterizada por el incremento gradual en el nivel del ITH. El comportamiento de los niveles de prolactina e IGF1 no fue el esperado debido posiblemente al efecto de la corta duración del experimento y el horario matutino de muestreo hormonal, en el caso de la prolactina, y debido a la aplicación de STB comercial, en el caso de prolactina e IGF1. Un incremento significativo en producción de leche de 3.1 L por vaca se encontró en las semanas 6 y 7, que representa un ingreso adicional de \$23.25 por vaca, el cual es probable que no compense el costo por la elevación en el consumo de agua que implica la tecnología de enfriamiento adicional, a menos que la empresa cuente con un sistema de reciclaje de agua que permita mayor eficiencia en este proceso. En base a lo anterior, se sugiere un estudio de impacto económico antes de iniciar con un sistema de enfriamiento adicional. Por otra parte, la identificación de ganado con un umbral de tolerancia al estrés calórico más alto sería una alternativa de impacto económico y ambiental para seguir produciendo leche en verano con poca o nula cantidad de agua para su enfriamiento artificial.

AGRADECIMIENTOS

The University of California Institute for Mexico and the United States (UCMEXUS) y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). UC MEXUS – CONACYT Collaborative Grants 2010. Project: Genomic variation and physiological response of Holstein dairy cows managed under heat stress in the Yaqui Valley.

LITERATURA CITADA

1. Avendaño RL, Álvarez FD, Correa CA, Saucedo QJS, Robinson PH, Fadel JG. Effect of cooling Holstein cows during the dry period on postpartum performance under heat stress conditions. *Liv Sci* 2006;105:198-206.
2. Correa CA, Leyva C, Avendaño L, Rivera F, Díaz R, Álvarez FD, Ardon F, Rodríguez F. Effect of artificial cooling and its combination with timed artificial insemination on fertility of Holstein heifers during summer. *J Appl Anim Res* 2009;35:59-62.
3. Collier RJ, Collier JL, Rhoads RP and Baumgard LH. Invited review: Genes involved in the bovine heat stress response. *J Dairy Sci* 2008;91:445-454.
4. West JW, Mullinix BG, Bernard JK. Effects of hot, humid weather on milk temperature, dry matter intake, and milk yield of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2003;86:232-242.
5. Finch VA. Body temperature in beef cattle: its control and relevance to production in the tropics. *J Anim Sci* 1986;62(2):531-542.
6. Dikmen SE, Cole JB, Null DJ, PJ Hansen. Heritability of rectal temperature and genetic correlations with production and reproduction traits in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2011;95:3401-3405.
7. Hahn GL. Dynamic responses of cattle to thermal heat loads. *J Anim Sci* 1999;77:10-20.
8. Berman A. Predicted limits for evaporative cooling in heat stress relief of cattle in warm conditions. *J Anim Sci* 2009;87(10):3413-3417.
9. Spiers DE, Spain JN, Sampson JD, Rhoads RP. Use of physiological parameters to predict milk yield and feed intake in heat stressed dairy cows. *J Thermal Biol* 2004;29:759-764.
10. Rhoads ML, Rhoads RP, VanBaale MJ, Collier RJ, Sanders SR, Weber WJ, *et al.* Effects of heat stress and plane nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. *J Dairy Sci* 2009;92:1986-1997.
11. Rhoads ML, Kim JW, Collier RJ, Crooker B, Boisclair YR, Baumgard LH, Rhoads RP. Effects of heat stress and nutrition on lactating Holstein cows: II. Aspects of hepatic growth hormone responsiveness. *J Dairy Sci* 2010;93:170-179.
12. DoAmaral BC, Connor EE, Tao S, Hayen JM, Bubolz JW, Dahl GE. Heat stress abatement during the dry period influences prolactin signaling in lymphocytes. *Dom Anim Endo* 2010;38:38-45.
13. Wheelock JB, Rhoads RP, VanBale MJ, Sanders SR, Baumgard LH. Effect of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci* 2010;93:644-655.
14. Scharf B, Carroll JA, Riley DG, Chase CC, Coleman SW, Keisler DH, *et al.* Evaluation of physiological and blood serum differences in heat-tolerant (Romosinuano) and heat-susceptible (Angus) *Bos Taurus* cattle during controlled heat challenge. *J Anim Sci* 2010;88(7):2321-2336.
15. Armstrong DV. Heat stress interaction with shade and cooling. *J Dairy Sci* 1994;77:2044-2050.
16. Flamenbaum I, Wolfenson D, Mamen M, Berman A. Cooling dairy cattle by a combination of sprinkling and forced ventilation and its implementation in the shelter system. *J Dairy Sci* 1986;69:3140-3147.

ENFRIAMIENTO AL INICIO DE VERANO PARA MITIGAR EL ESTRÉS POR CALOR EN VACAS HOLSTEIN

17. Honig H, Miron J, Lehrer H, Jackoby S, Zachut M, Zinou A, Portnick Y, Moallem U. Performance and welfare of high-yielding dairy cows subjected to 5 or 8 cooling sessions daily under hot and humid climate. *J Dairy Sci* 2012;95:3736-3742.
18. Legrand A, Schütz KE, Tucker CB. Using water to cool cattle: Behavioral and physiological changes associated with voluntary use of cows showers. *J Dairy Sci* 2011;94:3376-3386.
19. Leyva JCC, Félix PV, Luna NP, Morales MIP, Grageda JG. Impacto de las condiciones climáticas de verano en el valle del Yaqui sobre el desempeño productivo del ganado lechero. Reunión internacional sobre producción de carne y leche en climas cálidos. Mexicali BC, México. 2008:233-237.
20. Berman A. Forced heat loss from body surface reduces heat flow to body surface. *J Dairy Sci* 2010;93:242-248.
21. SAS Institute Inc. 2014. SAS/STAT® 13.2 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.
22. Igono MO, Bjotvedt G, Sanford-Crane HT. Environmental profile and critical temperature effects on milk production of Holstein cows in desert climate. *Int J Biometeorol* 1992;36:77-87.
23. Johnson HD, Vanjonack WJ. Effects of environmental and other stressors on blood hormone patterns in lactating animals. *J Dairy Sci* 1976;59:1603-1617.
24. Berman A. Extending the potential of evaporative cooling for heat-stress relief. *J Dairy Sci* 2006;89:3817-3825.
25. Collier RJ, Zimbelman RB, Rhoads RP, Rhoads ML, Baumgard LH. A Re-evaluation of the impact of temperature humidity index (THI) and black globe humidity index (BGHI) on milk production in high producing dairy cows. *Western Dairy Management Conf.* Reno, NV. USA. 2011:113-125.
26. Wettemann RP, Tucker HA, Beck TW, Meyerhoeffer DC. Influence of ambient temperature on prolactin concentrations in serum of Holstein and Brahman x Hereford heifers. *J Anim Sci* 1982;55:391-394.
27. Beede DK, Collier RJ. Potential nutritional strategies for intensively managed cattle during thermal stress. *J Anim Sci* 1986;62:543-554.
28. Peroti C, Liu R, Parusel CT, Böcher N, Schultz J, Bork P, *et al.* Heat shock protein-90-alpha, a prolactin-STAT5 target gene identified in breast cancer cells, is involved in apoptosis regulation. *Breast Cancer Res* 2008;10:6/R93.
29. Collier JL, Abdallah MB, Hernandez LL, Norgaard JV, Collier RJ. Prostaglandins A1 (PGA1) and E1 (PGE1) alter heat shock protein 70 (HSP-70) gene expression in bovine mammary epithelial cells (BMEC) [abstract]. *J Dairy Sci* 2007;90(Suppl 1):62.
30. Elvinger F, Natzke RP, Hansen PJ. Interaction of heat stress and bovine somatotropin affecting physiology and immunology of lactating cows. *J Dairy Sci* 1992;75:449-462.
31. Settivari RS, Spain JN, Ellersieck MR, Byatt JC, Collier RJ, Spiers DE. Relationship of thermal status to productivity in heat-stressed dairy cows given recombinant bovine somatotropine. *J Dairy Sci* 2007;90:1265-1280.
32. Gallo GF, Block E. Effects of recombinant bovine somatotropin on nutritional status and liver function of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 1990;73:3276-3286.
33. Bilby CR, Bader JF, Salfen BE, Youngquist RS, Murphy CN, Garverick HA, *et al.* Plasma GH, IGF-I and conception rate in cattle treated with low doses of recombinant bovine GH. *Theriogenology* 1999;51:1285-1296.
34. Rhoads RP, La Noce AJ, Wheelock JB, Baumgard LH. Short communication: Alterations in expression of gluconeogenic genes during heat stress and exogenous bovine somatotropin administration. *J Dairy Sci* 2011;94:1917-1921.
35. Davey HW, Xie T, McLachlan MJ, Wilkins RJ, Waxman DJ, Grattan DR. STAT5b is required for GH-induced liver IGF-1 gene expression. *Endocrinology* 2001;142:3836-3841.
36. Yang J, Zhao B, Baracos VE, Kennelly JJ. Effects of bovine somatotropin on α -casein mRNA levels in mammary tissue of lactating cows. *J Dairy Sci* 2005;88:2806-2812.
37. Miller AR, Stanisiewski EP, Erdman RA, Douglass LW, Dahl GE. Effects of long daily photoperiod and bovine somatotropin (Trobtest) on milk yield in cows. *J Dairy Sci* 1999;82:1716-1722.

